



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LARA SILVA CARMINATI

**PREDIÇÃO, *in silico*, DA REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL DE
GENES ENVOLVIDOS NO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA
VIA microRNAs EM *Carica papaya* NA MELEIRA.**

VITÓRIA, ES

2018

LARA SILVA CARMINATI

**PREDIÇÃO, *in silico*, DA REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL DE
GENES ENVOLVIDOS NO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA
VIA microRNAs EM *Carica papaya* NA MELEIRA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes.

Co-orientador: Prof. Dr. Silas Pessini Rodrigues.

VITÓRIA, ES

2018

DEDICATÓRIA

À minha mãe, mulher guerreira e de fibra, cujos os esforços me permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às agências de apoio e financiamento: CNPq, FAPES, CAPES e ao INCAPER. À Universidade Federal do Espírito Santo por ter disponibilizado a infraestrutura e recursos necessários para a elaboração e concretização desse trabalho.

Aos professores Dr. Francisco Murilo Zerbini e Dr. Alexandre Martins Costa Santos por aceitarem o convite para fazer parte da banca de defesa de dissertação e pelas correções do trabalho. Ao professor Dr. Silas Pessini Rodrigues, por aceitar a co-orientação do trabalho, por sempre que necessário arrumar tempo para discutir resultados e dúvidas, além de todas as orientações que muito contribuíram para o meu crescimento. Ao Prof. Dr. Alberto Fernandes por todos os momentos de aprendizado.

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Patrícia Fernandes por acreditar na minha capacidade e aceitar me orientar ao longo desses últimos anos. Por todo o conhecimento compartilhado, pela disponibilidade toda vez que necessário e por me incentivar a ser cada vez uma profissional – e futura pesquisadora- melhor. Além de ser um exemplo de mulher cientista dedica à pesquisa num país – e momento- onde é tão difícil fazer “Hard Science”.

A todos os colegas do LBAA que acompanham nessa trajetória e compartilham os momentos de alegrias e angustias ao longo da pós-graduação. Sobretudo à Dra. Paolla Abreu, que me acolheu e me instruiu nos primeiros momentos de laboratório. À Dra. Tathiana por todos os socorros nos últimos tempos. Ao Tarcio, que compartilhou as disciplinas, os prazos, a contagem de horas, obtenções de documentos e por entender que um litrão as vezes é necessário. À Peron por todas as conversas. À Adami, Barbara e Raissa, pela amizade construída, por todo o apoio, compreensão e japonês quando nada mais parecia ter jeito.

Aos meus amigos, em especial a Juliana, JC, Mariana, Natalia, Lívia, Camila, Alexandre, Le, Ximas e Wallace, que ao longo da vida entenderam e (quase) respeitaram minhas ausências, por não me deixarem abandonar completamente a

vidinha de balada, me salvaram da minha loucura sempre que precisei e me alegraram nos momentos difíceis. Vocês são fundamentais!

À minha família que me apoiou ao longo dessa jornada. À Augusta que sempre torceu de mim e nunca mediu esforços para que eu alcance os meus objetivos.

À minha mãe que é minha força, meu exemplo, meu apoio e meu coração além de mim. Obrigada por acreditar. Por aturar as madrugadas em que eu trabalhava. Por aturar todos os momentos de mau humor. Por ter feito de tudo por mim.

À Deus por nunca ter me deixado só e por sempre ter feito o meu caminhar suave.

A todos vocês que me tornam o meu melhor, meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Estou fascinado com a ideia de que a genética é digital. Um gene é uma longa sequência de letras codificadas, como informações do computador. A biologia moderna está se tornando muito mais um ramo da tecnologia da informação.” (Richard Dawkins)

RESUMO

CARMINATI, L.S. **Predição, *in silico*, da regulação pós-transcricional de genes envolvidos no sistema ubiquitina-proteassoma via microRNAs em *Carica papaya* na meleira.** 2018. 48f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A cultura do mamoeiro é bastante susceptível a doenças, sobretudo às viroses, o que causa uma significativa diminuição da produtividade. Uma das doenças que mais afetam a produtividade nacional é a meleira do mamoeiro, uma doença associada à infecção mista por um complexo viral composto pelo papaya meleira virus (PMeV) e papaya meleira virus 2 (PMeV2), que tem como principal sintoma a exsudação espontânea de látex aquoso e fluído em folhas e frutos. Esses sintomas só são observados após a floração, assim plantas infectadas permanecem no campo por um longo tempo, constituindo como uma fonte de inóculo. Estudos em plantas de *C. papaya* infectadas com o complexo PMeV já revelaram a modulação de proteínas do Sistema Ubiquitina-Proteassoma 26S (UPS), sugerindo o envolvimento desta via neste patossistema. Também já foi observado alteração na expressão de miRNAs de *C. papaya* durante a meleira, incluindo modulação de microRNAs que almejam genes da UPS. O presente trabalho através de análises *in silico* teve como objetivo avaliar a modulação do UPS em *Carica papaya* em resposta ao complexo PMeV através da revisão de bancos de dados de transcriptômica e proteômica obtidos de plantas infectadas em diferentes fases de desenvolvimento. Além disso, foram preditos alvos de microRNAs que fosse genes que codificam para UPS, enfatizando aqueles genes modulados durante a meleira. Identificou-se, *in silico*, 1.074 transcritos e 80 proteínas em *C. papaya* similares a proteínas de UPS de outras espécies de plantas. Além disso, relatou-se 42 genes de UPS de *C. papaya* modulados durante a infecção. Também foram identificados 106 miRNAs que tinham como alvo de genes relacionados com o UPS, dos quais 3 famílias almejam genes responsivos a infecção pelo complexo PMeV.

Palavras-chave: Bioinformática. Omicas. miRNAs. Meleira do mamoeiro.

ABSTRACT

CARMINATI, L.S. **Prediction, *in silico*, of post-transcriptional regulation of genes involved in the ubiquitin-proteasome system via microRNA in *Carica papaya* in the meleira disease.** 2018. 48f. Dissertation (Masters Degree in Biotechnology) – Biotechnology Post Graduate Program, UFES, Espírito Santo. Brazil.

The cultivation of papaya trees is highly susceptible to diseases, viruses above all, which can cause a significant decrease on crop productiveness. One of the diseases which most affects national production is the Papaya Sticky Disease (PSD) – or “*meleira*” – a disease associated with mixed infection by a viral complex composed of the papaya meleira virus (PMeV) and the papaya meleira virus 2 (PMeV2), which is characterized by a spontaneous exudation of fluid and aqueous latex from the papaya fruit and leaves. These symptoms can only be observed after the flowering, therefore infected plants can remain unnoticed on plantations for a long time, acting as inoculum sources. Studies on PMeV-infected *C. papaya* plants have already revealed the modulation of proteins related to the Ubiquitin-Proteasome System 26S (UPS), indicating this pathway's involvement in this pathosystem. Alterations in the *C. papaya*'s miRNA expression have also been observed during PSD, including modulations of microRNA which long for UPS' genes. The present work, through *in silico* analysis, has had as purpose to evaluate the modulation of UPS in *Carica papaya* in response to the PMeV viral complex through the assessment of transcriptomics and proteomics databases collected from infected plants in different growth phases. Moreover, there were predicted microRNA targets that were genes code for UPS, with emphasis on those genes modulated during the sticky disease. There were identified, *in silico*, 1.074 transcripts and 80 proteins in *C. papaya* that were similar to UPS proteins from other plant species. In addition, 42 *C. papaya* UPS genes that were modulated during the infection were reported. There have also been identified 106 miRNA that had UPS-related genes as targets, of which 3 families target genes that are responsive to PMeV infection.

Keywords: Bioinformatics. Omics miRNA. Papaya Sticky Disease. Meleira.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais sintomas da meleira em frutos e folhas	16
Figura 2. Esquema de ubiquitinação das enzimas do UPS	18
Figura 3. Biogênese do miRNA	22
Figura 4. Quantidade de sequências de proteínas relacionadas ao UPS	31
Figura 5. Diagrama da busca nos dados de transcriptoma e proteoma	32
Figura 6. Representação do Proteassoma 26S.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ago	Argonauta
C2H2ZnF	Dedo de zinco C2H2
cpUPS	Proteínas de <i>C. papaya</i> relacionadas a UPS
DAPs	proteínas diferencialmente acumuladas (do inglês <i>differently accumulated proteins</i>)
DCL	DICER-like
DEGs	Genes diferencialmente expressos (do inglês <i>differently expressed genes</i>)
dsRNA	RNA de fita dupla (do inglês <i>Double-stranded RNA</i>)
DUB	Desubiquitinase
EUA	Estados Unidos da América
iUUCD	The Integrated Annotations for Ubiquitin and Ubiquitin-like Conjugation Database
miRNAs	microRNAs
mpg	Meses após a germinação
mRNA	RNA mensageiro
NAC	Nascent polypeptide-associated complex
NCBI	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
PMeV	papaya meleira virus
PMeV2	papaya meleira virus 2

PNRD	do inglês <i>Plant Non-coding RNA Database</i>
pre-miRNA	miRNA precursors
pri-miRNA	miRNA primários (do inglês <i>primary miRNAs</i>)
PRSV	Papaya ringspot virus
PTGS	Silenciamento pós-transcricional (do inglês <i>post-transcription gene silencing</i>)
PVX	<i>Potato virus X</i>
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo (do inglês <i>quantitative RT-PCR</i>),
RBSDV	<i>Rice black streaked dwarf virus</i>
RISC	Complexo de indução do silenciamento do RNA (do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>)
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>reverse transcription polimerase chain reaction</i>)
siRNA	pequeno RNA de interferência (do inglês <i>small interfering RNAs</i>)
Skp	do inglês, <i>S-Phase Kinase-associated Protein</i>
SRBSDV	<i>Southern rice black-streaked dwarf virus</i>
TGS	Mecanismo de regulação no nível de transcrição (do inglês <i>transcription gene silencing</i>)
TLCV	<i>Tomato leaf curl virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
Ub	Ubiquitina

UBA	Enzima de ativação da ubiquitina (do inglês <i>ubiquitin activating enzyme</i>)
UBC	Enzima de conjugação da ubiquitina (do inglês <i>ubiquitin conjugating enzyme</i>)
UBD	Enzima de domínios de ligação a ubiquitina (do inglês <i>ubiquitin binding domain ubiquitin</i>)
ULDs	do inglês <i>ubiquitin-like domains</i>
UL	Ubiquitina ligase
UPS	Sistema ubiquitina-proteassoma 26S

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO MAMOEIRO.....	14
1.2	A MELEIRA DO MAMOEIRO	15
1.3	SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA 26S (UPS).....	17
1.4	SILENCIAMENTO DE RNA	20
1.4.1	miRNA: possíveis candidatos para induzir resistência viral	21
1.5	BIOINFORMÁTICA.....	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	MÉTODOS	27
3.1	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	27
3.2	PREDIÇÃO DE GENES DE UPS EM <i>CARICA PAPAYA</i>	28
3.3	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES PREDITOS RELACIONADOS COM UPS DE <i>CARICA PAPAYA</i> NO CONJUNTO DE DADOS DE TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA.....	28
3.4	IDENTIFICAÇÃO, <i>IN SILICO</i> , DOS MIRNAS DE <i>CARICA PAPAYA</i> , QUE TÊM COMO ALVO TRANSCRITOS RELACIONADOS A UPS.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	PROTEÍNAS E GENES RELACIONADOS À UPS EM <i>CARICA PAPAYA</i>	31
4.2	MODULAÇÃO DOS <i>CPUPS</i> NA INFECÇÃO PELO COMPLEXO <i>PMEV</i>	33
4.3	TRANSCRITOS QUE CODIFICAM <i>CPUPS</i> ALVOS DE MIRNA EM <i>CARICA PAPAYA</i>	37
4.4	UBIQUITINA LIGASE NA INFECÇÃO PELO COMPLEXO <i>PMEV</i>	39
4.5	PROTEASSOMA 26S NA INFECÇÃO PELO COMPLEXO <i>PMEV</i>	40
4.6	UBDs NA INFECÇÃO PELO COMPLEXO <i>PMEV</i>	42
4.7	DESUBIQUITINASES NA INFECÇÃO DO <i>C. PAPAYA</i> PELO COMPLEXO <i>PMEV</i>	43
5	CONCLUSÕES	45
6	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO MAMOEIRO

Uma das frutas de maior produção mundial é o mamão. Na safra de 2015, a produção mundial foi de mais de 12 milhões de toneladas. O Brasil foi responsável por mais de 12% da produção mundial, classificando-se como o segundo maior produtor, ficando atrás apenas da Índia (FAOSTAT, 2015). Em âmbito nacional, a Bahia é o maior produtor de mamão, seguida pelo Espírito Santo com produções de aproximadamente 724 e 361 mil toneladas, respectivamente, em 2015. Esses dois estados juntos são responsáveis por 74% da produção do país (EMBRAPA, 2015).

Estima-se que a exportação brasileira de mamão tenha movimentado USD 43 milhões em 2016, sendo o Espírito Santo o principal estado exportador. Os maiores mercados do produto brasileiro, atualmente, são países Europeus, como Portugal, Holanda, Espanha, Reino Unido e Alemanha, seguidos pelos Estados Unidos (EUA) (EMBRAPA, 2015). Devido à exigência do mercado, principalmente internacional, a demanda por frutos de qualidade é alta. No entanto, a cultura do mamão é bastante suscetível às doenças, sobretudo às viroses, o que causa grandes prejuízos aos produtores, ocasionando até mesmo a destruição completa dos pomares (ABREU et al., 2015). Dentre as principais doenças que afetam esse cultivar está a meleira do mamoeiro (ABREU et al., 2015), de ocorrência relatada no Brasil e no México (KITAJIMA et al., 1993; PEREZ-BRITO et al., 2012).

1.2 A MELEIRA DO MAMOEIRO

Os primeiros relatos da meleira do mamoeiro foram na década de 80 nos estados da Bahia e do Espírito Santo. Atualmente a doença já atingiu os estados de Pernambuco, Ceará e Rio Grande do Norte (DALTRO et al., 2014). Além do Brasil, o México é o único país onde a doença também já foi relatada (PEREZ-BRITO et al., 2012).

Inicialmente, os sintomas da meleira do mamoeiro foram associados a estresses abióticos com déficit hídrico ou deficiência de absorção de cálcio e boro (NAKAGAWA; TAKAYAMA; SUZUKAMA, 1987). Posteriormente, através de estudos de dispersão da meleira no campo, sugeriu-se a associação de um patógeno com a doença (RODRIGUES; VENTURA; MAFFIA, 1989). Plantas sadias inoculadas com látex obtido a partir de plantas sintomáticas para a meleira apresentaram os sintomas da doença após 60 dias, sugerindo que o agente causador da doença estava presente no látex. Ao se analisar o látex de plantas doentes foi observada a presença de partículas isoméricas e detectado RNA de fita dupla (dsRNA, do inglês *Double-stranded RNA*) em plantas infectadas (KITAJIMA et al., 1993). Os Postulados de Koch foram realizados confirmando a etiologia viral da meleira do mamoeiro e realizando a descrição oficial do Papaya meleira virus (PMeV) como um vírus de partículas isométricas, com aproximadamente 45 nm de diâmetro e portador de um genoma de dsRNA de aproximadamente 12kbp (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003), relacionado aos vírus da família *Totiviridae* (ABREU et al., 2015; SÁ ANTUNES et al., 2016).

Contudo, um estudo recente revelou que a meleira está associada a uma infecção mista pelo PMeV e pelo papaya meleira virus 2 (PMeV2), esse um vírus relacionado aos vírus do gênero *Umbravirus*, possui genoma de fita simples (ssRNA) de aproximadamente 4,5 Kb não codificante para proteína capsidial (SÁ ANTUNES et al., 2016), formando, assim, o Complexo PMeV. Propõe-se que a associação ocorra em termos da montagem de PMeV2 com a proteína capsidial do PMeV (SÁ ANTUNES et al., 2016).

Em plantas infectadas pelo complexo PMeV ocorre a exsudação espontânea de látex aquoso e translúcido, principalmente em folhas e frutos (RODRIGUES; VENTURA; MAFFIA, 1989). Em contato com o ar, esse látex é oxidado causando lesões necróticas nas folhas jovens e a coloração escura e melada do fruto (Figura 1) (VENTURA et al., 2003). Além disso, são verificadas manchas zonadas, amadurecimento desigual e má formação dos frutos (DALTRO et al., 2014), o que inviabiliza sua comercialização (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004).

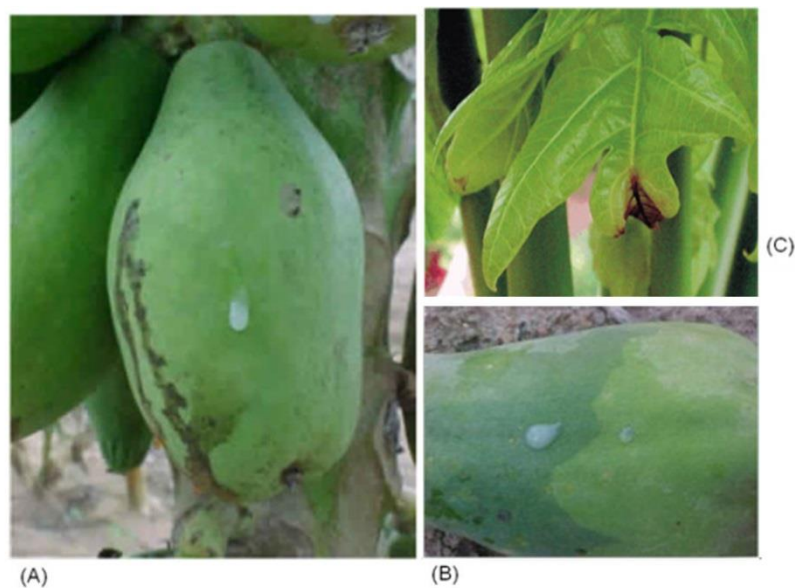


Figura 1. Principais sintomas da meleira em frutos e folhas. (A) Exsudação espontânea de látex aquoso e translúcido. Na lateral pode-se observar o látex oxidado, dando o aspecto “melado” do fruto. (B) Manchas zonadas de coloração verde-clara na superfície do fruto. (C) Queima da ponta de folhas jovens. Fonte: Adaptado de VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004.

Uma particularidade da meleira é que a ocorrência de sintomas só inicia na transição juvenil-adulto da planta, marcada pela floração, que ocorre aproximadamente aos 4-6 meses após a germinação (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003). Em campo, o diagnóstico da meleira é feito baseado na visualização dos primeiros sintomas e, até o presente momento, o único método de controle é a destruição das plantas doentes (*roguing*) (VENTURA et al., 2003). Assim, plantas infectadas assintomáticas podem permanecer no campo por um longo período, constituindo uma importante fonte de inóculo. Apesar do desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico -

através de técnica de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR, do inglês, *reverse transcription polimerase chain reaction*) e RT-PCR quantitativo (qRT-PCR, do inglês *quantitative RT-PCR*), ter possibilitado grandes avanços na pesquisa e diagnóstico de plantas infectadas independente do desenvolvimento dos sintomas (ABREU et al., 2012) a ausência de informações sobre aspectos de interação vírus-planta é um grande desafio no desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle da meleira.

1.3 SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA 26S (UPS)

O sistema ubiquitina-proteassoma 26S (UPS) é a principal via proteolítica em eucariotos (DREHER; CALLIS, 2007) auxiliando na regulação dos mais diversos processos celulares, incluindo ciclo celular, transcrição e tradução, reparo do DNA, processo de floração e na sinalização e regulação da interação planta-patógeno (DUPLAN; RIVAS, 2014). Estudos demonstram a participação do UPS como um importante componente da defesa da planta contra infecções virais (MANDADI; SCHOLTHOLF, 2013)

O processo de ubiquitinação ocorre, fundamentalmente, com controle de três classes de enzimas: a enzima de ativação da ubiquitina (E1 ou UBA, do inglês *ubiquitin activating enzyme*), a enzima de conjugação da ubiquitina (E2 ou UBC, do inglês *ubiquitin conjugating enzyme*) e a ubiquitina ligase (E3 ou UL) (Figura 2).

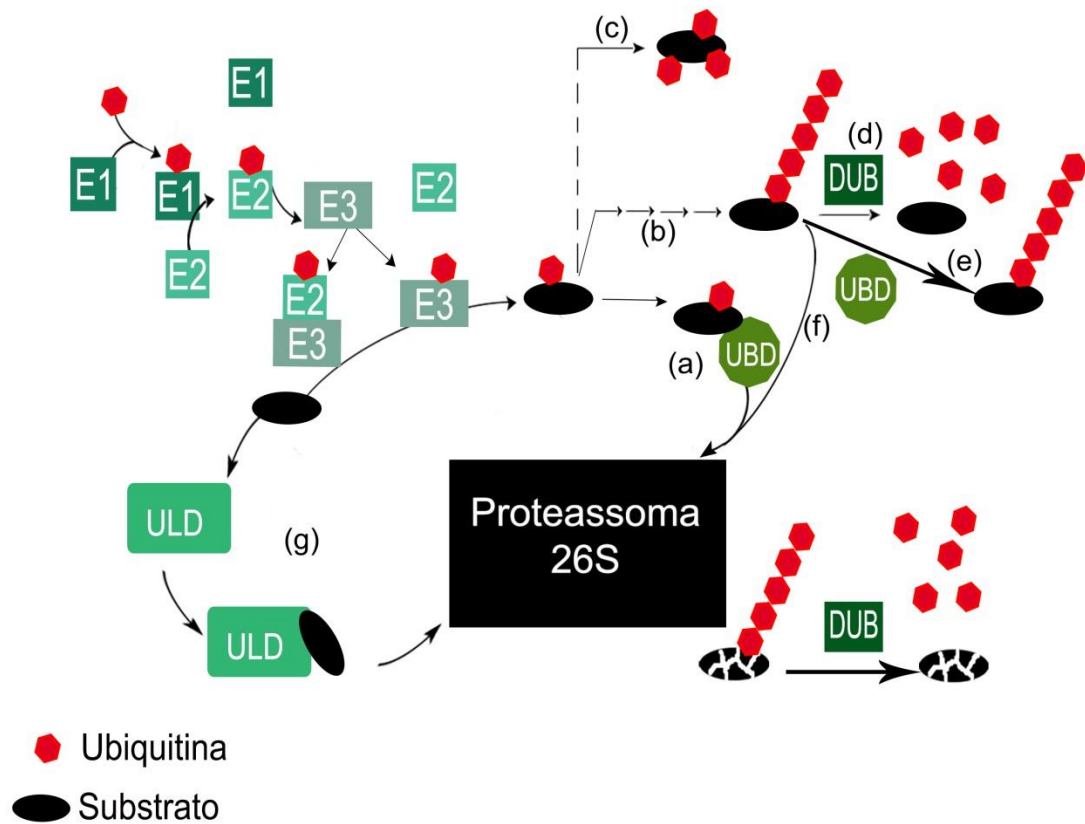


Figura 2. Esquema de ubiquitinação das enzimas do UPS. A ubiquitinação é geralmente conduzida por três enzimas, enzima de ativação da ubiquitina (E1), enzima de conjugação da ubiquitina (E2) e ubiquitina ligase (E3) monoubiquitinando o substrato. (a) Os substratos monoubiquitinados podem ser direcionados ao proteossoma após a interação com enzima de domínios de ligação a ubiquitina (UBDs), sofrerem outros ciclos de ubiquitinação tornando-se (b) poliubiquitinado ou (c) poli-mono-ubiquitinado. (d) O substrato poliubiquitinado pode ser reconhecido e deubiquitinado por deubiquitinases (DUBs); (e) reconhecido por UBDs e direcionado para processos celulares ou (f) enviado ao proteossoma para degradação. (g) O alvo ainda pode ser direcionado ao proteossoma por ação de enzimas ubiquitin-like domains (ULDs). Após degradação pelo proteossoma as ubiquitinas são recicladas pela ação das DUBs.

Inicialmente, ocorre a ativação de E1 através de uma ligação tioéster altamente energética com a ubiquitina (Ub) que é, então, transferida para E2, liberando E1. A enzima E3 reconhece o complexo E2-Ub e se liga não covalentemente à proteína-alvo. E2 catalisa a transferência da ubiquitina para o substrato, tornando-o monoubiquitinado (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012; SMALLE; VIERSTRA, 2004). O substrato monoubiquitinado pode (i) ser direcionado ao proteossoma através de ligação com enzimas de domínios de ligação a ubiquitina (UBDs, do inglês ubiquitin

binding domain); (ii) ser direcionado a processos celulares; (iii) sofrer novos ciclos de ubiquitinação, tornando-se poliubiquitinado (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012).

O substrato poliubiquitinado pode (i) ser direcionado a processos celulares por meio de ligação com UBDs; (ii) sofrer desubiquitinação através da ação de enzimas desubiquitinases (DUBs); (iii) ser direcionado ao proteassoma (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012). O substrato pode, ainda, ser direcionado ao proteassoma mediados por ligação com proteínas semelhantes à ubiquitina (ULDs, do inglês *ubiquitin-like domains*) (YU et al., 2016). Após a degradação do substrato pelo proteassoma, a ubiquitina é recuperada por ação das DUBs (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN, 2012).

Devido à capacidade de promover modificações no padrão de abundância de proteínas, o UPS desempenha um papel crucial na interação planta-patógeno. Alterações nos níveis de Ub e das enzimas do UPS são cruciais durante a defesa em plantas (DELAURÉ et al., 2008), sobretudo alterações de E3, por ser essa enzima o elemento chave na especificidade dos alvos do UPS, auxiliando em respostas de defesa precoce (ZENG et al., 2006). Uma das formas de defesa antiviral do UPS é através da degradação de proteínas virais, como nos casos do *Tobacco mosaic virus* (TMV) (REICHEL; BEACHY, 2000) e *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) (DRUGEON; JUPIN, 2002), cujas proteínas de movimento são direcionadas e degradadas pelo UPS reduzindo a carga viral de TMV e a virulência de TYMV.

Por outro lado, o sistema ubiquitina-proteassoma 26S também pode ser utilizado pelo vírus auxiliando na virulência. Diversos vírus de plantas exploram o UPS para superar o sistema de defesa da planta (EINI et al., 2009; LAI et al., 2009). De forma geral, os vírus inibem ou modificam a especificidade das enzimas de ubiquitinação, alterando o reconhecimento do substrato (MANDADI; SCHOLTHOLF, 2013). Além disso, alguns vírus são capazes de codificarem suas próprias desubiquitinases, inibindo a degradação das proteínas virais (VERCHOT, 2016). Porém, o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) os vírus controlam o UPS em plantas ainda não foi(ram) determinado(s). Estudos demonstraram o envolvimento da via UPS na infecção pelo complexo PMeV (ABREU et al., 2014; MANDRONERO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2012; SOARES et al., 2018), sendo sugerido que os vírus

possam usurpar o controle da via tanto como estratégia de auxílio para a replicação, como para manter a viabilidade do hospedeiro (ABREU et al., 2014). Entender como a via UPS é modulada durante a infecção parece ser um ponto fundamental tanto para entender a progressão da doença quanto para desenvolver estratégias de desenvolvimento de plantas resistentes ao complexo PMeV.

1.4 SILENCIAMENTO DE RNA

O silenciamento de RNA é um mecanismo altamente conservado entre eucariotos. Em plantas as vias de silenciamento se diversificaram bastante e, atualmente, sabe-se de, pelo menos, três diferentes vias, que se sobrepõem em alguns pontos (ELVIRA-MATELOT; ALBA; VAUCHERET, 2017; GUO et al., 2016; ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005). Em comum, a indução de todas as vias ocorre por dsRNAs: os pequenos RNAs de interferência (siRNA, do inglês *small interfering RNAs*) e os microRNAs (miRNAs). Estes pequenos dsRNAs são processados por proteínas DICER-like (DCL) e emergiram como reguladores da expressão gênica, guiando a clivagem do RNA mensageiro (mRNA), a inibição da tradução ou a modificação da cromatina. A primeira via de silenciamento conhecida é um mecanismo de regulação no nível de transcrição (TGS, do inglês *transcription gene silencing*), e está associada com a metilação do DNA e supressão da transcrição gênica através de siRNAs (ELVIRA-MATELOT; ALBA; VAUCHERET, 2017; ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005). Sua principal função está associada a proteção do genoma contra danos causados por transposons (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004). As outras duas vias de silenciamento do RNA ocorrem a nível pós-transcricional (PTGS, do inglês *post-transcription gene silencing*) (i) através de siRNAs, que pode ser originado da transcrição de um gene endógeno, de um transgene, ou por dsRNA produzido por vírus durante sua replicação, e está relacionado a degradação de mRNA endógeno e de transgene (ELVIRA-MATELOT;

ALBA; VAUCHERET, 2017; ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005) e (ii) através de miRNAs com degradação ou inibição da tradução de mRNA endógenos (ELVIRA-MATELOT; ALBA; VAUCHERET, 2017; ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005).

1.4.1 miRNA: possíveis candidatos para induzir resistência viral

Os miRNAs são pequenos RNAs de 20-24nt originados de loci genéticos denominados MIR (Figura 3). No núcleo, os genes MIR são transcritos pela RNA polimerase II originando o transcrito de miRNA primários (pri-miRNA, do inglês *primary miRNAs*). Os pri-miRNA formam uma estrutura em forma de grampo (*hairpin* ou um imperfeito “*fold-back*” *stem-loop*) e são processados pela DCL1, com auxílio da proteína de ligação de dsRNA DRB1 ou HYL1, em um curto stem-loop precursor, o pre-miRNA (do inglês, miRNA precursors) (LIU et al., 2017).

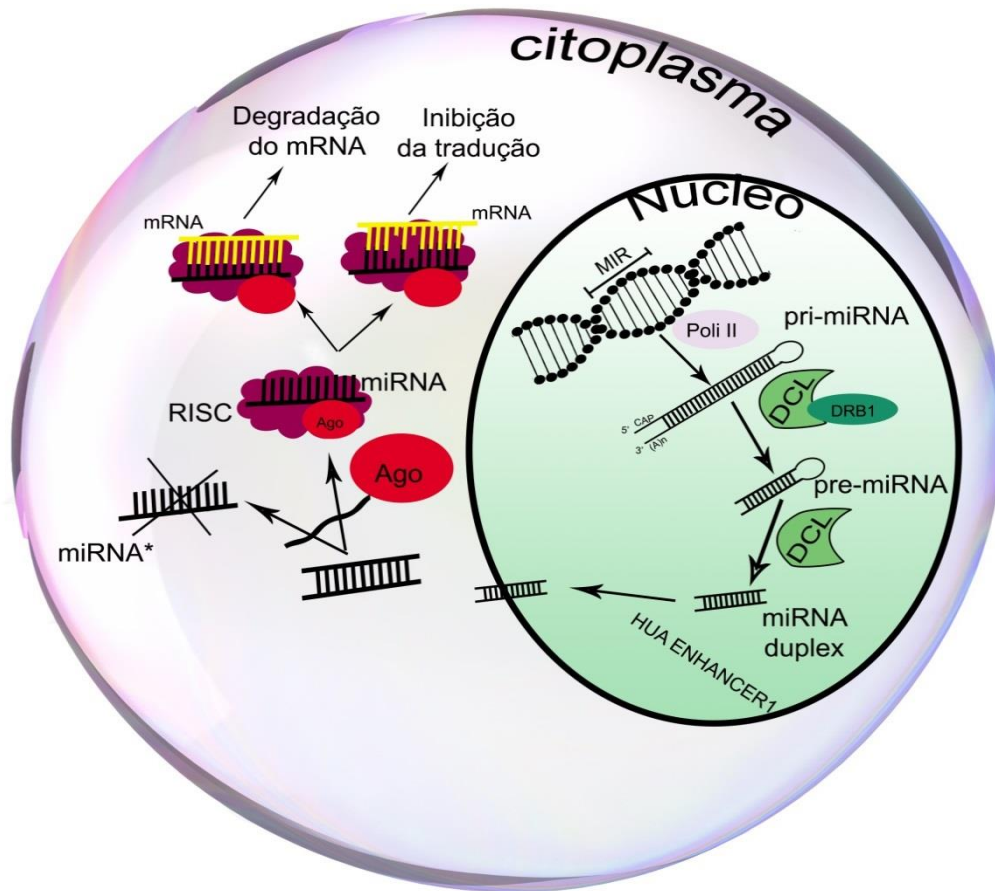


Figura 3. Biogênese do miRNA. O miRNA é transcrito, no núcleo, pela polimerase II, originando o pri-miRNA, esse, através da ação da DCL é processado originando o pre-miRNA, que também é processado pela DCL, originando o miRNA duplex. A enzima HUA ENHANCER1 metila a extremidade 3' do duplex que é exportado para o citoplasma. No citoplasma o duplex é separado. O miRNA* é degradado e o miRNA maduro, junto com a AGO compõem o RISC. O RISC tem como alvo o mRNA e de acordo com complementariedade total ou parcial com o miRNA, o mRNA será degradado ou terá a tradução inibida, respectivamente.

Ainda no núcleo, o pre-miRNA é processado pela DCL1 gerando um duplex de RNA de aproximadamente 22 nt composto por uma fita miRNA e uma miRNA*. Os nucleotídeos da extremidade 3' do duplex são metilados pela RNA metilase e exportados para o citoplasma onde a fita-simples de miRNA maduro é incorporado a uma proteína Argonauta (AGO), principalmente AGO1, compondo o centro catalítico do complexo de indução do silenciamento do RNA (RISC, do inglês RNA-induced silencing complex) (LIU et al., 2017).

RISC tem como alvo mRNAs com sequências complementares totais ou com alta complementariedade levando à completa degradação ou inibição da tradução, respectivamente. Sabe-se que miRNAs estão envolvidos em diversas vias metabólicas, incluindo o desenvolvimento e floração e respostas de estresses abióticos e bióticos (LIU et al., 2017). Os miRNAs já foram relacionada ao desenvolvimento de sintomas de doença em *Nicotiana tabacum* (BAZZINI et al., 2007) e em tomate (NAQVI; HAQ; MUKHERJEE, 2010). Além de ser relatado que infecções por *Tobacco mosaic virus* altera o perfil de expressão de miRNAs em *Arabidopsis* (TAGAMI et al., 2007) e infecção pelo complexo PMeV altera expressão de miRNAs (miR156, miR164, miR166, miR172, miR390, miR396, miR397, miR399, miR162, miR398 e miR408) em *Carica papaya*. Dos onze miRNAs conhecidos responsivos a meleira quatro deles (miR156, miR162, miR398 e miR408) foram preditos tendo como alvos genes do UPS (ABREU et al., 2014).

Frente a isso, os dados sugerem que monitorar a modulação do UPS em resposta a meleira e determinar os miRNAs que possam controlar os genes do UPS em *Carica papaya* auxiliará no entendimento da resposta da planta ao vírus.

1.5 BIOINFORMÁTICA

A partir do desenvolvimento de plataformas de sequenciamento de DNA começou-se a gerar um imenso volume de dados, conhecidos como big data (PETTERSSON; LUNDEBERG; AHMADIAN, 2009). A necessidade de analisar e interpretar esses dados, transformando-os em informação e conhecimento originou a bioinformática. Uma ciência capaz de explorar esses dados através de ferramentas computacionais (LUSCOMBE; GREENBAUM; GERSTEIN, 2001).

Por intermédio da bioinformática tornou-se possível a integração dos mais diversos dados biológicos, como sequências de DNA; estrutura de peptídeos; vias metabólicas e de sinalização. Possibilitando um melhor entendimento dos processos biológicos como alterações da expressão gênica, análise e previsão de estruturas e funções de genes, RNAs e proteínas, predição e detecção de redes de regulação gênica, simulação de ambientes para modelagem de células inteiras entre outros diversos processos (VASSILEV et al., 2005).

Desde o sequenciamento do genoma da planta-modelo *Arabidopsis thaliana* a bioinformática tornou-se parte fundamental do melhoramento vegetal (VASSILEV et al., 2005). Tanto pela necessidade de conseguir transformar o grande fluxo de dados em informação, quanto pelo desenvolvimento de softwares e algoritmos cada vez melhores a nível de acurácia, especificidade e eficiência (DIAS; PASCUTTI; SILVA, 2016; GOMES, 2016). Além disso, as análises *in silico* permitem uma maior cobertura de análises de informações, possibilitando que os experimentos *in vitro* e *in vivo* sejam realizados a partir de um direcionamento otimizando os experimentos, diminuindo o tempo e os custos da pesquisa (ARAÚJO et al., 2008; DIAS; PASCUTTI; SILVA, 2016; GOMES, 2016).

O grupo de pesquisa de Biotecnologia aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo contava com três fontes distintas de *big datas*, dados de transcriptoma, dados de proteômica e dados de predição de miRNA, até o presente trabalho analisados de forma independente, ocorrendo pouca comunicação entre os mesmos. Assim, os resultados apresentados possibilitaram a integração entre esses

dados gerando informação e aumentando o conhecimento na regulação do UPS em *Carica papaya* infectado pelo complexo PMeV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

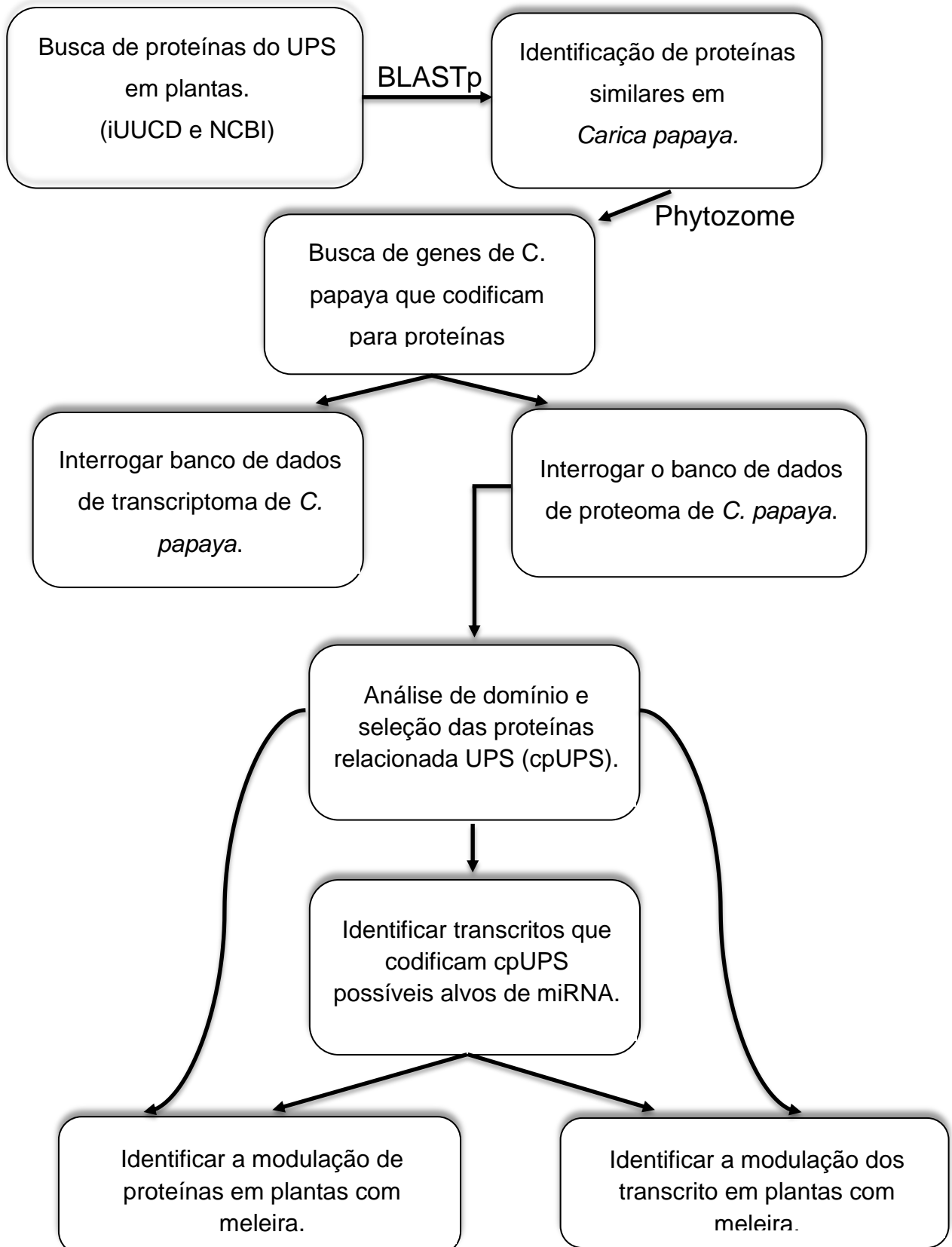
- Identificar, *in silico*, miRNAs envolvidos na regulação do UPS em *Carica papaya* infectado pelo complexo PMeV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, *in silico*, proteínas envolvidas com o UPS no mamoeiro;
- Identificar, *in silico*, genes que codificam as proteínas no tópico anterior;
- Verificar, *in silico*, existência dos genes/proteínas identificados nos bancos de dados de transcriptoma e proteoma de *C. papaya* do Laboratório de Biotecnologia aplicada ao Agronegócio;
- Confirmar, *in silico*, a existência de domínios relacionados ao UPS nas sequências de proteínas preditas em *C. papaya* similares a proteínas de outras espécies de plantas;
- Evidenciar a modulação de proteínas e genes do UPS em *C. papaya* durante a infecção por meleira;
- Busca de miRNAs que tem como alvo transcritos do UPS.

3 MÉTODOS

3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



3.2 PREDIÇÃO DE GENES DE UPS EM *Carica papaya*

Para seleção de genes de Ubiquitina e Proteassoma em plantas foram consultados dois bancos de dados, ambos acessados em maio de 2017: (i) The Integrated Annotations for Ubiquitin and Ubiquitin-like Conjugation Database (iUUCD, version 2.0) disponível em (<http://iuucd.biocuckoo.org>) e (ii) The National Center for Biotechnology Information (NCBI, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Foi feito o download, em formato fasta, das sequências das enzimas de ubiquinação e ubiquitinação-like e das proteínas do proteassoma 26S do iUUCD e NCBI, respectivamente. No NCBI, foram utilizadas as expressões de busca: “26s proteasome regulatory” e “proteasome subunit alpha/beta” e as listas obtidas foram filtradas pela categoria “*plant*”.

Através do software Geneious v.9.1.2, as sequências obtidas no iUUCD e no NCBI foram submetidas a um BLAST local (Blastp, utilizando *maximum hits per query* e *e-value* de 1 e e-1, respectivamente) contra o proteoma de *Carica papaya* disponível na base de dados Phytozome (v.12, acessado em maio de 2017 e disponível em <https://phytozome.jgi.doe.gov/>).

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES PREDITOS RELACIONADOS COM UPS DE *Carica papaya* NO CONJUNTO DE DADOS DE TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA

A fim de confirmar a existência dos genes preditos de UPS em *C. papaya* e a resposta destes à infecção pelo complexo PMeV, dois conjuntos de dados foram revisados, sendo um composto por mRNAs (MANDRONERO et al., 2018) e outro por proteínas (SOARES et al., 2018) de *C. papaya*.

Os dois bancos de dados interrogados, relativos ao transcriptoma e proteoma, foram obtidos a partir de amostras de *C. papaya* cultivadas em campo e inoculadas com complexo PMeV (n=3) ou inoculadas com tampão fosfato de sódio 50Mm pH 7.0 (n=3). As amostras de folha de mamão foram coletadas com 4, 7 e 9 meses após a germinação (mpg) e submetidas à extração total de RNA e proteínas. As sequências de RNAs e proteínas foram obtidas utilizando *Illumina HiSeq2000* (MANDRONERO et al., 2018) e LC-MS/MS 5600 *Triple-tof* (SOARES et al., 2018), respectivamente. O banco de dados do transcriptoma é composto por 19.952 mRNAs identificados (transcritos presentes em pelo menos uma amostra com FPKM diferente de zero) e os genes diferencialmente expressos (DEGs, do inglês *differently expressed genes*, FDR ajustados $p < 0,05$ e \log_2 fold change $\geq 0,5$) identificados foram 633 em 4 mpg, 72 em 7 mpg e 88 em 9 mpg (MANDRONERO et al., 2018). A base de dados de proteômica é composta por 1,593 sequências de proteínas (FDR $< 1\%$, $p \leq 0,05$) e as proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs, do inglês *differently accumulated proteins*, $p < 0,05$) identificadas foram 127 em 4 mpg, 156 em 7 mpg e 17 em 9 mpg (SOARES et al., 2018).

A identificação dos genes de *C. papaya* preditos relacionados com UPS nos dados do transcriptoma e proteoma foi feita utilizando a ferramenta *Venny* 2.1. Os genes, cuja ocorrência foi confirmada utilizando os dois bancos de dados, foram submetidos à análise de domínio da proteína utilizando o *Interproscan* v.5.24-63.0. Foram selecionados genes cuja proteína retornasse ao menos um domínio identificado como de UPS. Uma lista final de genes de *C. papaya* relacionados ao UPS foi obtida combinando os genes identificados conforme descrito acima juntamente com os genes encontrados em uma busca no *Phytozome* (v.12.1.1) utilizando as palavras-chave “*ubiquitin*” e “*proteasome*”. As redundâncias foram removidas.

3.4 IDENTIFICAÇÃO, *in silico*, dos miRNAs DE *Carica papaya*, QUE TÊM COMO ALVO TRANSCRITOS RELACIONADOS A UPS

Um banco de dados de miRNAs de *C. papaya* contendo 462 sequências (ABREU et al., 2014) foi carregado no software *plant small RNA target analysis server, psRNA Target* v.2017 (disponível em: <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>). Os possíveis alvos dos miRNAs foram pesquisados pelo alinhamento com os genes de *C. papaya* relacionados a UPS, conforme descrito anteriormente (LIU; WANG; AXTELL, 2017): *schema V2 2017*, modificando o *HSP size* para 17, permitindo *2 mismatches allowed in seed region* e selecionado para calcular a acessibilidade do alvo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROTEÍNAS E GENES RELACIONADOS À UPS EM *Carica papaya*

A busca no iUUCD e NCBI retornou um total de 46.776 proteínas do UPS em diversas espécies de planta (Figura 4). Após a exclusão de sequências redundantes foram selecionadas 46.662 proteínas. Essas sequências foram submetidas ao Blastp contra o proteoma predito de *C. papaya*, composto por 27.796 sequências, a fim de identificar proteínas de *Carica papaya* relacionadas ao UPS. Resultando em 6.100 sequências não-redundantes, o que representa cerca de 22% do proteoma predito do *C. papaya*. Dentre as proteínas encontradas por Blastp estavam incluídas 566 das 599 proteínas relacionadas à UPS anotadas no *Phytozome*.

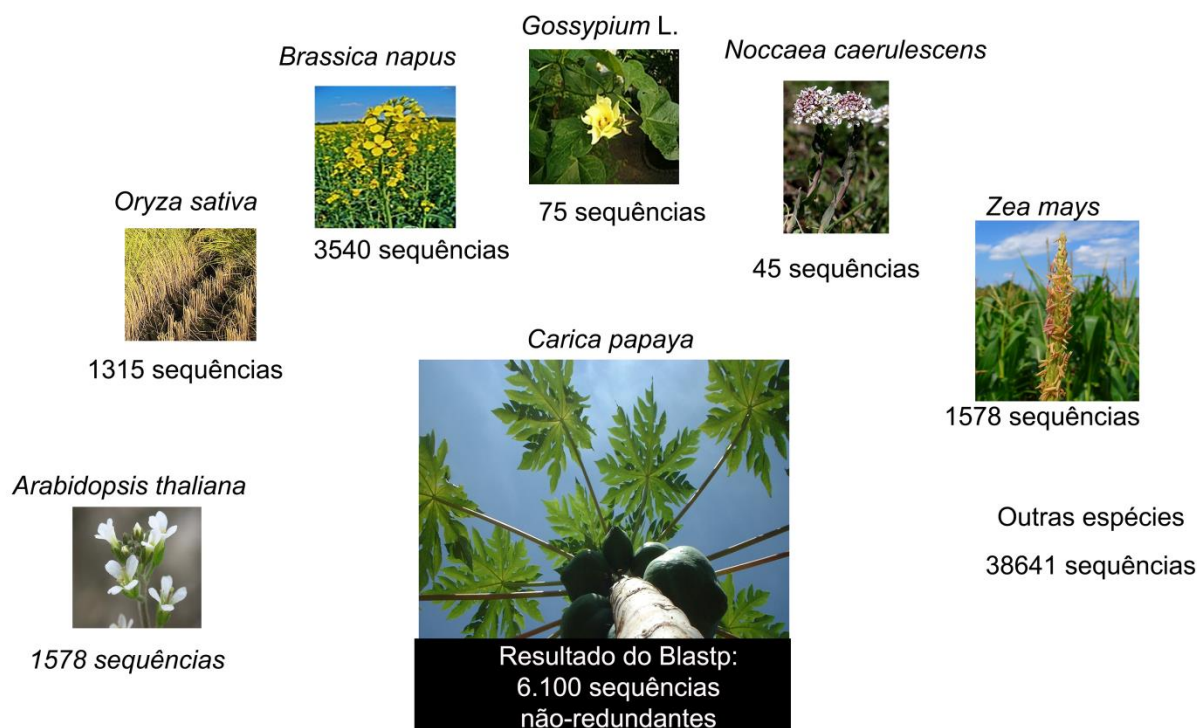


Figura 4. Quantidade de sequências de proteínas relacionadas ao UPS. A busca no NCBI e no iUUCD retornou 46.776 proteínas do UPS em diferentes plantas. Essas sequências

foram submetidas ao BLASTp, obtendo um total de 6.100 sequências de mamoeiro similares a proteínas do UPS em outras espécies de plantas.

Uma ferramenta do *Phytozome*, o BioMart, foi utilizada para obter as sequências de peptídeos e dos transcritos que codificam as proteínas relacionadas a UPS. Essas sequências foram, então, utilizadas para interrogar dois bancos de dados: o da proteoma (SOARES et al., 2018) e do transcriptoma (MANDRONERO et al., 2018) de *Carica papaya* obtidos anteriormente pelo grupo de pesquisa. Das 6.100 sequências 5.411 e 441 estavam presentes nos dados do transcriptoma e proteoma, respectivamente, sendo que 75 sequências eram comuns a ambos os conjuntos de dados (Figura 5).

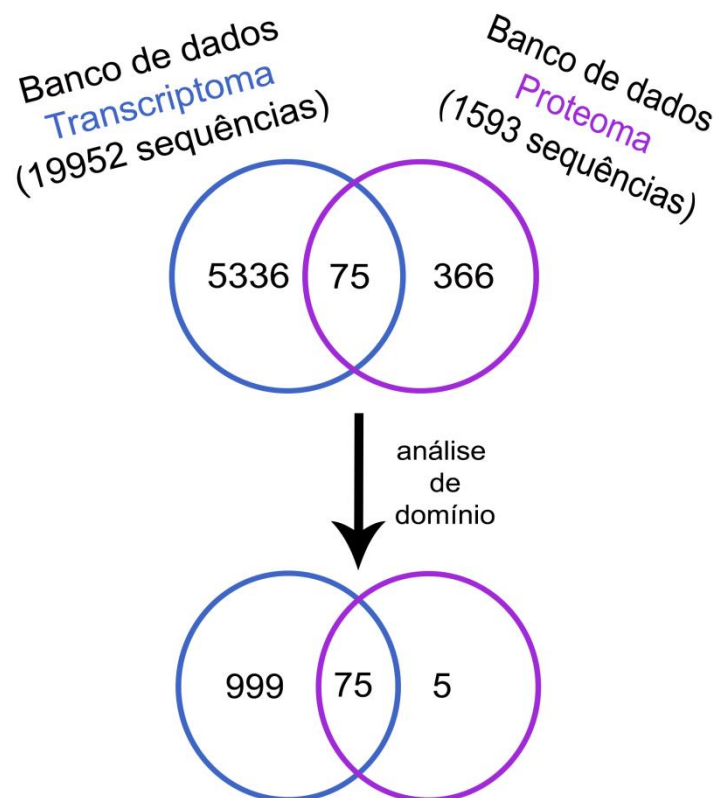


Figura 5. Diagrama da busca nos dados de transcriptoma e proteoma. Os bancos de dados de transcriptoma e proteoma são compostos por 19.952 e 1.593 sequências, respectivamente. Das 6.100 sequências similares a sequências de UPS em outras plantas 5.411 e 441 estavam presentes no transcriptoma e proteoma, respectivamente, sendo que 75 eram comum aos dois bancos de dados. Após análise de domínio das sequências das proteínas, os bancos foram interrogados novamente e foram obtidas 1.074 e 80 sequências de transcritos e proteínas, sendo 75 sequências comuns a ambos os bancos de dados.

Para verificar a existência de domínio(s) proteico(s) relacionado(s) com UPS, as proteínas relacionadas ao UPS de *C. papaya* presentes nos referidos conjuntos de dados foram submetidas à análise de domínio usando o InterproScan. Após a exclusão de sequências sem nenhum domínio proteico relacionado ao UPS, foi obtida uma lista composta por 1.074 e 80 sequências de transcritos e proteínas, respectivamente. Setenta e cinco sequências eram comuns a ambos os conjuntos de dados. Assim, 1.079 proteínas únicas (4% de proteoma previsto para *C. papaya*) foram listadas como proteínas de *C. papaya* relacionadas a UPS (cpUPS). A lista cpUPS contém 480 sequências adicionais às sequências de proteínas de *C. papaya* anotadas anteriormente relacionadas ao UPS no Phytozome. Os números obtidos são condizentes com os relatados para *A. thaliana*, em que foram encontrados 1.600 genes (> 6% do proteoma da planta) codificando proteínas relacionadas à UPS (DUPLAN; RIVAS, 2014).

4.2 MODULAÇÃO DOS cpUPS NA INFECÇÃO PELO COMPLEXO PMeV

Os sintomas da meleira do mamoeiro só se desenvolvem em plantas de *C. papaya* infectado pelo complexo de PMeV após a floração, o que ocorre aproximadamente aos 6 mpg (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004). Assim, é possível que exista um mecanismo de tolerância que funcione antes da fase da floração de *C. papaya* que é regulado negativamente nas fases seguintes do desenvolvimento. Entretanto, até o presente, o conhecimento sobre o envolvimento da UPS em resposta à infecção pelo complexo PMeV é limitado. Rodrigues et al. (2012) identificaram mudanças na abundância de proteínas da subunidade RPT5a do proteassoma 26S AAA-ATPase e em proteínas do proteassoma 20S em plantas com meleira. Neste estudo, o papel da UPS no desenvolvimento de sintomas da meleira foi avaliado através da análise da modulação de genes de codificam cpUPS, a nível de transcrito e proteína.

Amostras de folhas de *C. papaya* inoculadas pelo complexo PMeV e controle foram coletadas aos 4, 7 e 9 mpg e utilizadas para o transcriptoma (MANDRONERO et al., 2018) e proteoma (SOARES et al., 2018). O cpUPS foi utilizado para interrogar esses dois bancos de dados quanto a transcritos diferencialmente expressos e proteínas diferencialmente acumuladas (Tabela 1 e 2). Quarenta e dois genes que codificam cpUPS (aproximadamente 4%) foram responsivos à infecção pelo complexo PMeV no nível de transcritos (18 pré-floração (4 mpg) e 7 pós floração, (7 e 9 mpg) e ao nível de proteínas (9 pré floração (4 mpg) e 12 pós-floração (todas em 7 mpg e 0 a 9 mpg). Um gene, ETS_106.1 / 16405150, foi identificado em ambos os conjuntos de dados.

Tabela 1: Genes do UPS de *C. papaya* diferencialmente expressos

Gene ID ¹	Descrição ²	Pré-floração	Pós-floração	
		Log ₂ FC ³ (4 mpg)	Log ₂ FC ³ (7 mpg)	Log ₂ FC ³ (9 mpg)
ETS_1.98	RING-type zinc-finger	0.5	0.23	-1.45*
ETS_150.23	Zinc finger PHD-type profile.	0.54	-1.09*	0.3
ETS_69.15	U-box domain	0.55	-0.23	3.19*
ETS_55.125	F-box-like	1.01	0.29	-1.64*
ETS_45.32	E3 ubiquitin ligase involved in syntaxin degradation	-0.70*	0.026	0.58
ETS_106.1	26Sp45: 26S proteasome subunit P45 family	0.78*	-0.5	-0.22
ETS_2.421	Ubiquitin domain profile.	0.78*	0.1	-0.42
ETS_14.143	RING-type zinc-finger	0.80*	0.1	-0.92*
ETS_6.288	Ubiquitin-conjugating enzymes active site.	0.81*	-0.83	-0.48
ETS_228.3	26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT4	0.84*	-0.59	-0.39
ETS_127.38	BTB/POZ domain	-0.89*	0.21	0.66
ETS_2.89	Zinc finger C2H2 type domain profile.	-0.96*	0.29	0.82*
ETS_223.21	Speckle-type POZ protein SPOP and related proteins with TRAF, MATH and BTB/POZ domains	-0.98*	-0.58	0.71
ETS_9.225	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)	-1.04*	-0.21	-0.13
ETS_18.32	USP_Like	1.13*	-0.12	-0.61
ETS_107.51**	E3 ubiquitin ligase involved in syntaxin degradation	-1.14*	0.64	0.91*

(continua)

Gene ID ¹	Descrição ²	Pré-floração	Pós-floração	
		Log ₂ FC ³ (4 mpg)	Log ₂ FC ³ (7 mpg)	Log ₂ FC ³ (9 mpg) (continuação)
ETS_56.53**	26S proteasome regulatory complex, subunit PSMD10	1.38*	0.33	0.06
ETS_124.37	U-box domain	1.64*	-3.44	0.17
ETS_48.32	BTB/POZ domain	1.86*	-0.72	-0.58
ETS_3.427	RING-type zinc-finger	-1.91*	0.26	-0.11
ETS_84.65	Zinc finger PHD-type profile.	-2.03*		0.48
ETS_66.17	Zinc finger C2H2 type domain signature.	-2.11*	0.62	0.92

¹ Identificação abreviada do genes de *Carica papaya*, baseada na identificação do banco de dados Phytozome. ETS and ETC são abreviaturas para evm.TU.supercontig e evm.TU.contig, respectivamente.

² Descrição obtida no Phytozome ou InterProScan.

³ Log-Fold change da expressão de transcritos comparando plantas infectadas pelo complex PMeV vs plantas controle.

* Genes cuja expressão estava diferencial usando p-value ajustado para FDR < 0.05.

** Dominio não identificado pelo InterproScan porém discrito pelo Phytozome.

Embora já se saiba sobre diversas famílias e subfamílias associadas a UPS, e o grande número de genes envolvidos nesse sistema, a contribuição da maioria dos componentes relacionados à UPS para a biologia celular de plantas ainda não está clara. Porém, vários estudos (VERCHOT, 2016) apontam o papel crucial da UPS na infecção por vírus de plantas que corrobora com nossos resultados de análises DEG/DAP, conforme discutido a seguir.

Tabela 2: Proteínas do UPS de *C. papaya* com abundância diferencial

PAC Proteína ID ¹	Gene ID ²	Descrição da proteína ³	Pré-floração	Pós-floração
			Log ₂ FC ⁴ (4 MPG)	Log ₂ FC ⁴ (7 MGP)
16411576	ETS_182.25	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E [EIF3E].	-2.05	-
16417516	ETS_327.2	26Sp45: 26S proteasome subunit P45 family	-1.4	-

(continua)

PAC Proteína ID ¹	Gene ID ²	Descrição da proteína ³	Pré- floração	Pós- floração
			Log ₂ FC ⁴ (4 MPG)	Log ₂ FC ⁴ (7 MGP)
16426335	ETS_79.5	26S proteasome regulatory subunit N12 (PSMD8, RPN12)	-1.11	-
16428909	ETS_95.66	26Sp45: 26S proteasome subunit P45 family	-1.36	-
16414807	ETS_25.205	26Sp45: 26S proteasome subunit P45 family	-0.68	-
16408635	ETS_14.139	U-box and Ubiquitin elongating factor core	-0.65	-
16410640	ETS_17.146	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B [EIF3B].	-0.64	-
16414081	ETS_227.5	Ubiquitin specific protease (USP) domain profile.	-0.64	-
16426854	ETS_81.100	26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT4	0.71	-
16404385	ETS_1.437	26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT4	0.78	-
16417606	ETS_33.158	UBA_NAC_euk	-	0.68
16423481	ETS_6.295	Skp1 family, tetramerisation domain	-	0.69
16405150	ETS_106.1	26Sp45: 26S proteasome subunit P45 family	-	0.8
16418604	ETS_37.150	proteasome_alpha_type_7	-	0.84
16424190	ETS_64.119	proteasome_beta_type_3	-	0.9
16412645	ETS_2.273	26Sp45: 26S proteasome subunit P45 family	-	1.28
16410318	ETS_163.7	JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 ubiquitin protease and MPN_RPN7_8	-	1.33
16416747	ETS_3.440	WD40	-	1.58
16423462	ETS_6.278	Proteasome alpha-type subunit profile.	-	1.6
16429356	ETC_24415.6	JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 ubiquitin protease	-	2.24
16429896	ETC_30829.2	20S proteasome subunit alpha 1	-	0.65

¹Número de identificação da proteína segundo

Pytozome

² Identificação abreviada do genes de *Carica papaya*, baseada na identificação do banco de dados Phytozome. ETS and ETC são abreviaturas para evm.TU.supercontig e evm.TU.contig, respectivamente.

³ Descrição obtida no Phytozome ou InterProScan .

⁴ Log₂-Fold change da abundancia de proteínas comparando plantas infectadas pelo complex PMeV vs plantas controle.

4.3 TRANSCRITOS QUE CODIFICAM cpUPS ALVOS DE miRNA EM *Carica Papaya*

Os miRNAs têm sido relatados por desempenhar um papel na defesa da planta, incluindo em infecções virais como descrito para o tobamovírus em *A. thaliana* (HU et al., 2011), *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV) em arroz (SUN et al., 2015), *Citrus psorosis virus* em citrus (REYES et al., 2016) e complexo PMeV em *C. papaya* (ABREU et al., 2014). De acordo com o banco de dados *Plant Non-coding RNA Database* (PNRD) (<http://structuralbiology.cau.edu.cn/PNRD/index.php>), existem 16.438 sequências de miRNAs preditos em 16 espécies de plantas, sendo que apenas 50% dos miRNAs foram validados por métodos experimentais. Por exemplo, *A. thaliana*, uma das plantas mais estudadas, tem 1.581 miRNAs preditos, dos quais 377 foram validados experimentalmente (YI et al., 2014). Em *C. papaya*, 505 miRNAs foram preditos (ABREU et al., 2014; LIANG et al., 2013; YI et al., 2014) e 81 foram validados experimentalmente (YI et al., 2014). Apesar dos estudos de miRNA ainda faltam dados sobre o alvo desses, principalmente em relação ao controle da UPS por miRNAs.

Liang et al. (2013) usou diferentes ferramentas de bioinformática para identificar 86 miRNAs em *C. papaya*, dos quais apenas o miR-397 foi descrito como visando um gene relacionado ao UPS. Abreu et al. (2014), confirmaram experimentalmente a capacidade de resposta ao complexo PMeV de quatro miRNAs (miR156, miR408, miR398 e miR162) que tem como alvo genes relacionados ao UPS. No presente estudo, os miRNAs de *C. papaya* conhecidos foram alinhados contra os transcritos de genes que codificam cpUPS. Foi identificado um total de 106 miRNAs atribuídos a 33 famílias alinhando contra 146 transcritos de cpUPS (Tabela 3). Entre eles, 22 miRNAs previam atingir 4 genes (ETS_124.37, ETS_223.21, ETS_56.53 e ETS_66.17) que foram observados modulados no nível de transcrição no estágio pré-floração e 1 gene (ETS_33.158) modulado em nível de proteína no estágio pós-floração. ETS_124.37 e ETS_223.21 codificam um domínio de U-box pertencendo a família de enzimas E3. ETS_33.158 e ETS_66.17 codificam domínios de UBDs. ETS_56.53 codificam domínio de 19S não-ATPase do proteassoma 26S. Alguns

miRNAs são preditos alinhando em mais de um transcrito: ETS_56.53 e ETS_223.21 alvos do miR838, ETS_66.17 e ETS_33.158 alvo do miR414. ETS_124.37 alvo do miR156/miR157. Assim, foi predito, *in silico*, a participação de miRNAs no patossistema da meleira, uma vez que os miRNAs almejam transcrito de genes modulados durante a infecção. Por essa razão, foi identificada a via UPS envolvendo os 42 transcritos/proteínas modulados, com ênfase nos cinco que são alvos dos miRNAs, inferindo seu papel na interação do complexo PMeV-*C. papaya*.

Tabela 3: Predição dos alvos do UPS de miRNA em *C. papaya*.

Gene ID ¹	Descrição ²	miRNA ³	Expectation ⁴	UPE ⁵
ETS_124.37	U-box domain	miR156/miR157_19	2,5	14,22
		miR838_380	0	11
		miR838_376	1	11
	Speckle-type POZ protein	miR838_381	1	11
	SPOP and related	miR838_384	1	11
ETS_223.21	proteins with TRAF, MATH and BTB/POZ domains	miR838_386	1	11
		miR838_392	1	11
		miR838_393	1	11
		miR838_383	2.5	11
		miR838_381	0	14
		miR838_391	0	14
		miR838_392	0	14
		miR838_393	0	14
	26S proteasome	miR838_376	1	14
ETS_56.53	regulatory complex, subunit PSMD10	miR838_378	1	14
		miR838_380	1	14
		miR838_386	1	14
		miR838_383	1.5	14
		miR838_374	2	14
		miR838_384	2	14
ETS_66.17	Zinc finger C2H2 type domain	miR414_279	3	16.76
ETS_33.158	UBA_NAC_euk	miR414_283	1.5	6.319

¹ Identificação abreviada do genes de *Carica papaya*, baseada na identificação do Phytozome. ETS and ETC são abreviaturas para evm.TU.supercontig e evm.TU.contig, respectivamente. ² Descrição do Phytozome ou InterProScan. ³ miRNA preditos por al., 2014. ⁴ Score da complementariedade entre miRNAs e seus possíveis alvos. ⁵ Energia necessária abertura da estrutura secundária e ligação ao alvo.

4.4 UBIQUITINA LIGASE NA INFECÇÃO PELO COMPLEXO PMeV

Os resultados identificaram E3 Ub-ligases como alvos de miRNAs das famílias miR156/miR157 e miR838, ETS_124.37 (up-regulado) e ETS_223.21 (down-regulado), respectivamente (Tabela 3). A família E3 é o maior grupo de proteínas envolvidas na ubiquitinação além de ser responsável pela especificidade (FINLEY et al., 2012). Um elevado número de transcritos/proteínas moduladas na interação complexo PMeV-*C. papaya* foram associados às E3 Ub-ligases. As subfamílias de E3 são conhecidas por estarem envolvidas na interação planta-patógeno e apesar de muitas dessas proteínas serem bem descritas auxiliando a resposta de defesa da planta, alguns foram identificados para interagir com efetores de vírus. Além dos transcritos alvos de miRNAs outros 12 elementos com domínios relacionados a E3 foram encontrados modulados durante a infecção pelo complexo PMeV. Destes, 7 genes (ETS_1.98, ETS_14.143, ETS_3.427, ETS_9.225, ETS_223.21, ETS_107.51 e ETS_45.32) e 1 proteína (16408635 codificadas por ETS_14.139) estavam negativamente modulados na fase de pré-floração. Curiosamente, dois genes (ETS_69.15 e ETS_107.5) e 2 proteínas (16423481 e 16416747 codificadas por ETS_6.295 e ETS_3.440, respectivamente) mostraram modulação oposta; estes encontravam-se regulados na fase pós-floração. Os resultados são condizentes com os relatos da literatura que indicam a contribuição das E3 na replicação ou movimento do vírus. Por exemplo, a proteína Rsp5p apresenta um domínio identificado como da subfamília HECT de E3 Ub-ligases e atua como um regulador negativo da replicação do tombusvirus em *Saccharomyces cerevisiae* (BARAJAS; LI; NAGY, 2009).

Outro domínio de E3 Ub-ligases, o Skp (do inglês, *S-Phase Kinase-associated Protein*), é positivamente modulado pela proteína TGB3 codificada pelo *Potato virus X* (PVX) (YE et al., 2013). No tabaco, o silenciamento do Skp1 leva à redução da carga de PVX e provoca a inibição da morte das células da planta (YE et al., 2013). Estes resultados sugerem fortemente que a Skp é um componente do UPS relevante para o progresso da infecção viral. De acordo com esta ideia: (i) ETS_223.21, cuja proteína possui um domínio BTB/POZ homóloga a SKP1, foi

encontrada negativamente regulada em plantas de *C. papaya* infectada pelo complexo PMeV comparadas a plantas assintomáticas e (ii) ETS_6.295, o homólogo SPK1 proteína em *C. papaya*, acumulada em estágio pós-floração sintomático. Estes resultados sugerem que as proteínas Skp podem estar envolvidas com o progresso da infecção do complexo PMeV em *C. papaya*. A regulação negativa do gene Skp observada na fase pré-floração pode envolver miRNAs, uma vez que ETS_223.21 faz parte da lista de alvos do miR838.

O ETS_124.37, também associado a E3, foi encontrado regulado na pré-floração do *C. papaya*. Este gene é alvo do miRNA da família miR156 / miR157, outra isoforma de miRNA dessa família foi regulado negativamente na pós-floração de *C. papaya* infectado pelo complexo PMeV (ABREU et al., 2014). É relatado o envolvimento de miRNAs da família miR156/miR157 com o tempo de floração e controle do desenvolvimento de sementes em *Arabidopsis*, arroz e álamo (POETHIG, 2013). A capacidade de resposta desta família de miRNAs (ABREU et al., 2014) e a modulação de um de seus potenciais alvo em resposta à infecção do complexo PMeV podem representar uma das conexões moleculares mais diretas entre a floração da planta e o desenvolvimento de sintomas da meleira.

4.5 PROTEASSOMA 26S NA INFECÇÃO PELO COMPLEXO PMeV.

O proteassoma 26S é composto pelo proteassoma regulatório 19S e pelo cilindro central 20S (Figura 6), conhecido como um componente celular importantes na interação planta-vírus (VERCHOT, 2016). O proteassoma 19S é composto por uma base contendo seis ATPases (proteínas Rpt1-6) e duas proteínas não-ATPases (Rpn 1-2) e uma tampa constituída por oito proteínas não-ATPases (Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11, Rpn12).

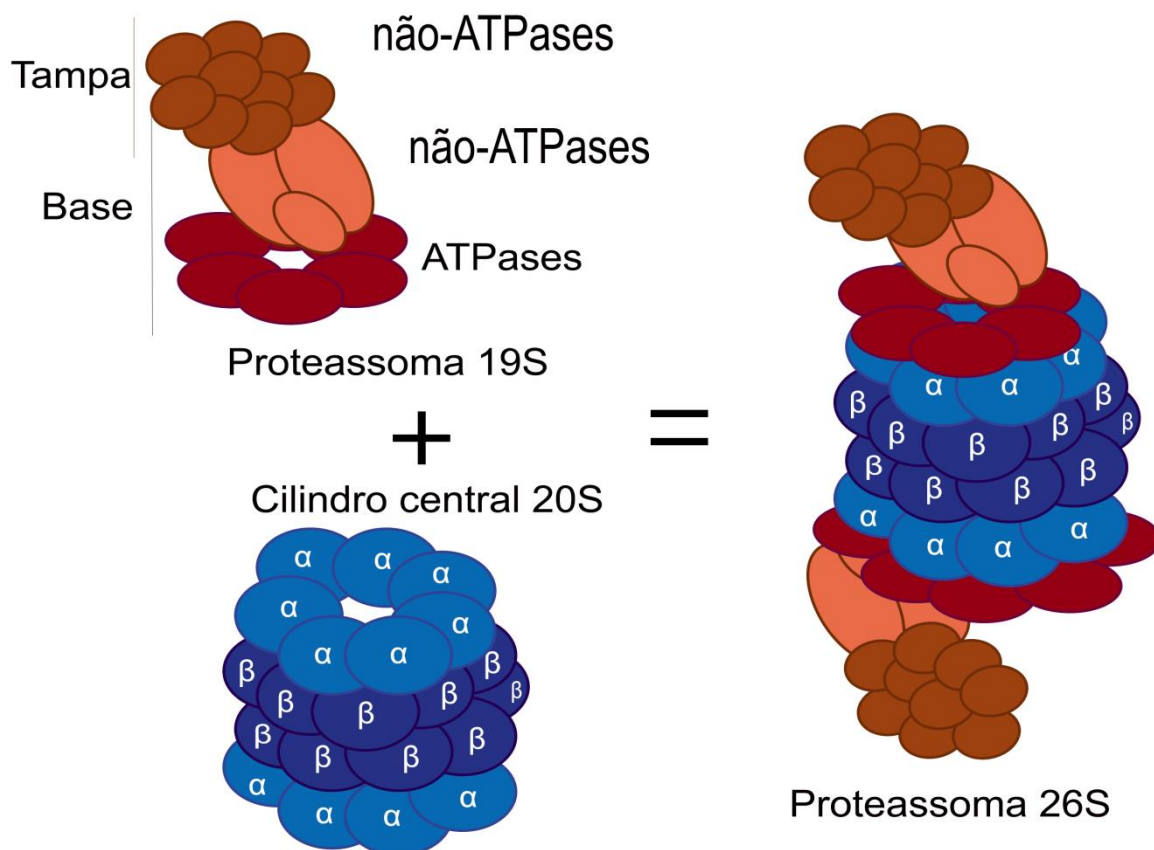


Figura 6. Representação do Proteassoma 26S. O proteassoma 26S é formado pela montagem de uma unidade do cilindro central 20S e duas unidades de Proteassoma 19S nas extremidades. O Proteassoma 19S é composto por um estrutura de base, composto por seis proteínas ATPases e duas proteínas não-ATPases e uma tampa constituída por oito proteínas não-ATPases. Enquanto o 20S é composto por quatro anéis sobrepostos, sendo os dois anéis das extremidades constituídos por subunidades alfa e os dois anéis internos constituídos por subunidades beta.

Neste estudo, duas Rpns de *C. papaya* (proteína RPN7_8 e o gene que codifica para Rpn 12) foram identificados modulados positivamente e negativamente, respectivamente, após a floração da planta. No tabaco, a acumulação de Rpn9 inibe o movimento sistêmico viral e reduz o transporte de auxina alterando o desenvolvimento vascular da planta (JIN et al., 2006). Os miRNAs podem estar envolvidos com a modulação dos níveis de Rpn durante a infecção viral e, em *C. papaya*, a família miR838 foi predita tendo como alvo o transcrito ETS_56.53 que codifica uma Rpn. O miR838 é conhecido por regular Dicer-Like1 em *Arabidopsis* (RAMACHANDRAN; CHEN, 2008) e outras proteínas, como o inibidor de cisteína

protease em *Brassica rapa* L. (HAJIEGHRARI et al., 2017). Assim, aprofundar os estudos sobre a função do miR838 pode auxiliar no entendimento da alteração dos níveis de cisteína proteases no látex de *C. papaya* infectado pelo complexo PMeV (RODRIGUES et al., 2012).

4.6 UBDs NA INFECÇÃO PELO COMPLEXO PMeV

As proteínas de domínio de ligação a ubiquitina fazem parte das enzimas de UPS. Neste estudo, 3 UBDs foram encontrados modulados em *C. papaya* infectados pelo complexo PMeV (Tabela 1 e 2). A proteína codificada por ETS_33.158 foi positivamente acumulada na pós-floração e ETS_2.89 foi positivamente expresso após o florescimento. ETS_66.17, bem como ETS_2.89, foram negativamente expressos na pré-floração e possuem domínio de dedo de zinco C₂H₂ (C₂H₂ZnF), o principal domínio representante de UBDs (DIKIC; WAKATSUKI; WALTERS, 2009; HICKE; SCHUBERT; HILL, 2005). C₂H₂ZnF exibe afinidade para substratos mono- e poliubiquitinados (XIE et al., 2015) e está envolvido com a marcação de proteínas para a desubiquitinação, conseguindo assim, evitar a degradação pelo proteassoma (LIVNEH et al., 2016). Os genes *C. papaya* que codificam as proteínas C₂H₂ZnF foram regulados durante a infecção pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV) (JIANG; PAN, 2012). A interação de proteínas do vírus *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV) com proteínas contendo domínio C₂H₂ZnF favoreceu a infecção pelo SRBSDV no arroz (LI et al., 2017). Assim sendo, a regulação negativa dos genes que codificam para proteínas com domínio C₂H₂ZnF em *C. papaya* pode representar uma tentativa de planta para baixar a carga do complexo PMeV. Curiosamente, ETS_66.17 faz parte da lista de alvos do miR414, o que pode ser relacionado a reduções da expressão de ETS_66.17. É razoável especular que o aumento da expressão de miR414 poderia reduzir ainda mais os níveis de ETS_66.17 e aumentar a resistência a *C. papaya* ao complexo PMeV. Além do mais,

o miR414 também foi sugerido para aumentar a resistência de *Gossypium hirsutum* ao *Cotton leaf curl Multan virus* (BAIG; KHAN, 2013).

Também foi observado em plantas de mamão infectadas pelo complexo PMeV outra UBD modulada codificada pelo gene ETS_33.158. Esta proteína contém um domínio UBA/*Nascent polypeptide-associated complex* (NAC), que é capaz de se ligar com alta afinidade a proteínas poli e mono ubiquitinadas e controlando sua degradação (DIKIC; WAKATSUKI; WALTERS, 2009; OHNO et al., 2005). Estudos sugerem a associação de proteínas que contêm domínio NAC à resposta da defesa da planta contra a infecção pelo *Tobacco mosaic virus* (WANG; GOREGAOKER; CULVER, 2009). No tabaco, o domínio NAC também está associado ao desenvolvimento da doença (WANG; GOREGAOKER; CULVER, 2009). No tomate, a interação entre a proteína de replicação do vírus *Tomato leaf curl virus* (TLCV) e as proteínas que contêm domínio NACs é capaz de ativar a replicação do vírus (SELTH et al., 2005). No *C. papaya* infectado pelo complexo PMeV, a proteína codificada pelo gene ETS_33.158 foi acumulada após a floração da planta. Esse resultado é consistente com uma maior carga do complexo PMeV durante a fase sintomática da meleira (ABREU et al., 2014). O gene ETS_33.158 também deve ser alvo por miR414. Portanto, o aumento da expressão de miR414 e a consequente redução dos níveis de transcritos ETS_33.158 e ETS_66.17 podem resultar em aumento da resistência do *C. papaya* ao complexo PMeV.

4.7 DESUBIQUITINASES NA INFECÇÃO DO *C. PAPAYA* PELO COMPLEXO PMeV

A liberação de ubiquitina do substrato faz parte do controle da afinidade ao nível de proteínas. As enzimas de desubiquitinação (DUBs) apresentam principalmente atividade de cisteína proteinase (SADANANDOM et al., 2012). Neste estudo, observou-se que cinco genes de *C. papaya* infectados pelo complexo PMeV foram modulados (Tabela 1 e 2), um a nível de transcrito e quatro em nível de proteína.

Com exceção da proteína com domínio DUB USP_Like codificada por ETS_18.32, três proteínas (16410640, 16411576 e 16414081) foram moduladas negativamente na pré-floração. Isso é consistente com a tolerância de *C. papaya* ao desenvolvimento de sintomas de meleira nesse estágio, uma vez que as enzimas DUB são conhecidas como reguladores negativos da imunidade das plantas (EWAN et al., 2011). Concordantemente, UBP12 controla negativamente resposta de hipersensibilidade em *Arabidopsis* e em tabaco UBP13 suprime a morte das células da planta em resposta à infecção por *Pseudomonas syringae* pv tomato (PstDC3000) (EWAN et al., 2011). No estágio pós-floração, quando os sintomas da meleira se desenvolveram, observou-se o aumento dos níveis de DUB JAB1/Mov34/MPN/PAD-1, codificado por ETC_24415.6. Se os efeitos celulares desta proteína forem baseados em sua atividade de cisteína protease, os mecanismos de controle pós-traducionais podem estar ocorrendo, já que a infecção pelo complexo de PMeV reduz a atividade desse grupo de proteínas, no látex, em fases avançadas da meleira (RODRIGUES et al., 2012)

5 CONCLUSÕES

- Este estudo possibilitou a predição de 6.100 proteínas em *C. papaya* similares a proteínas de UPS em outras espécies de plantas. Dessas, 1.079 possuem domínios relacionados à UPS em *C. papaya* (cpUPS), sendo que 1.074 sequências estavam presentes nos dados do transcriptoma e 80 estavam presentes nos dados do proteoma de *Carica papaya* realizados pelo grupo de pesquisa.
- 42 cpUPS foram identificados modulados em *C. papaya* em resposta à infecção do complexo PMeV, reforçando o envolvimento da UPS na interação planta-vírus.
- Os miRNAs de *C. papaya* que tem como alvo mRNA de genes que codificam cpUPS, também foram determinados e 33 famílias de miRNAs foram identificadas.
- Três famílias de miRNAs foram preditas tendo como possíveis alvos mRNAs do UPS de *C. papaya* cuja expressão foi alterada em resposta ao complexo PMeV, sendo 4 alterados a nível de transcrito e um alterado a nível de proteína. As evidências experimentais e os dados da literatura suportam a ideia de que miR156 / miR157, miR838 e miR414 são especialmente relevantes no controle de UPS durante a resposta de *C. papaya* ao complexo PMeV. Considerando os papéis conservados de vários genes de codificação de miRNA e proteínas relacionadas a UPS, os resultados aqui apresentados se somam ao conhecimento do envolvimento e controle da UPS durante a infecção do vírus nas plantas.

6 REFERÊNCIAS

- ABREU, P. M. V. et al. Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 180, n. 1, p. 11–17, 2012.
- ABREU, P. M. V. et al. *Carica papaya* microRNAs are responsive to Papaya meleira virus infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103401, 2014.
- ABREU, P. M. V. et al. A current overview of the Papaya meleira virus, an unusual plant virus. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1853–1870, 2015.
- ALCAIDE-LORIDAN, C.; JUPIN, I. Ubiquitin and plant viruses, let's play together! **Plant physiology**, v. 160, n. 1, p. 72–82, 2012.
- ARAÚJO, N. D. et al. A ERA DA BIOINFORMÁTICA: SEU POTENCIAL E SUAS IMPLICAÇÕES PARA AS CIÊNCIAS DA SAÚDE. **Estudos de Biologia**, v. 307172, n. 70, p. 143–8, 2008.
- BAIG, M. S.; KHAN, J. A. Identification of *Gossypium hirsutum* miRNA targets in the genome of Cotton leaf curl Multan virus and betasatellite. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 336–342, 2013.
- BARAJAS, D.; LI, Z.; NAGY, P. D. The Nedd4-type Rsp5p ubiquitin ligase inhibits tombusvirus replication by regulating degradation of the p92 replication protein and decreasing the activity of the tombusvirus replicase. **J Virol**, v. 83, n. 22, p. 11751–11764, 2009.
- BAZZINI, A. A. et al. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 12157–12162, 2007.
- DALTRO, C. B. et al. Genetic diversity studies of Papaya meleira virus. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 104–108, 2014.
- DELAURÉ, S. L. et al. Building up plant defenses by breaking down proteins. **Plant Science**, v. 174, n. 4, p. 375–385, 2008.
- DIAS, M. F. R.; PASCUTTI, P. G.; SILVA, M. L. DA. APRENDIZADO DE MÁQUINA E SUAS APLICAÇÕES EM BIOINFORMÁTICA. **Semioses**, v. 10, n. 1, p. 23–37, 2016.
- DIKIC, I.; WAKATSUKI, S.; WALTERS, K. J. Ubiquitin-binding domains — from structures to functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 10, p. 659–671, 2009.
- DREHER, K.; CALLIS, J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. **Annals of botany**, v. 99, n. 5, p. 787–822, 2007.

DRUGEON, G.; JUPIN, I. Stability in vitro of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3187–3197, 2002.

DUPLAN, V.; RIVAS, S. E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 42, 2014.

EINI, O. et al. Interaction with a Host Ubiquitin-Conjugating Enzyme Is Required for the Pathogenicity of a Geminiviral DNA β Satellite. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 6, p. 737–746, 2009.

ELVIRA-MATELOT, E.; ALBA, A. E. M.; VAUCHERET, H. Diversity of RNA silencing pathways in plants. In: DALMAY, T. (Ed.). **Plant Gene Silencing: Mechanisms and Applications**. Boston: CABI Biotechnology, 2017.

EMBRAPA. **Mamão - Portal Embrapa**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

EWAN, R. et al. Deubiquitinating enzymes AtUBP12 and AtUBP13 and their tobacco homologue NtUBP12 are negative regulators of plant immunity. **New Phytologist**, v. 191, n. 1, p. 92–106, 2011.

FAOSTAT. **Crop Production**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>.

FINLEY, D. et al. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 192, n. 2, p. 319–60, 2012.

GOMES, V. **Métricas de qualidade de software - TI Especialistas**. Disponível em: <<https://www.tiespecialistas.com.br/2016/01/metricas-de-qualidade-de-software/>>. Acesso em: 27 jan. 2018.

GUO, Q. et al. RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. **Current genomics**, v. 17, n. 6, p. 476–489, 2016.

HAIJIEGHRARI, B. et al. Computational Identification of MicroRNAs and Their Transcript Target(s) in Field Mustard (*Brassica rapa* L.). **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 22–32, 2017.

HICKE, L.; SCHUBERT, H. L.; HILL, C. P. Ubiquitin-binding domains. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 8, p. 610–621, 2005.

HU, Q. et al. Specific Impact of Tobamovirus Infection on the Arabidopsis Small RNA Profile. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19549, 2011.

JIANG, L.; PAN, L. J. Identification and expression of C2H2 transcription factor genes in *Carica papaya* under abiotic and biotic stresses. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 6, p. 7105–7115, 2012.

- JIN, H. et al. Down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 inhibits viral systemic transport and alters plant vascular development. **Plant physiology**, v. 142, n. 2, p. 651–61, 2006.
- KITAJIMA, E. W. et al. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with “meleira” (“Sticky disease”) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 118–122, 1993.
- LAI, J. et al. RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. **The Plant Journal**, v. 57, n. 5, p. 905–917, 2009.
- LI, J. et al. Interaction between southern rice black-streaked dwarf virus minor core protein P8 and a rice zinc finger transcription factor. **Archives of Virology**, v. 162, n. 5, p. 1261–1273, 2017.
- LIANG, G. et al. Identification of miRNAs and miRNA-mediated regulatory pathways in *Carica papaya*. **Planta**, v. 238, n. 4, p. 739–752, 2013.
- LIPPMAN, Z.; MARTIENSSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 364–370, 2004.
- LIU, S.-R. et al. MicroRNA-Mediated Gene Silencing in Plant Defense and Viral Counter-Defense. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1801, 2017.
- LIU, W. Q.; WANG, F.; AXTELL, M. J. Analysis of Complementarity Requirements for Plant MicroRNA Targeting Using a *Nicotiana benthamiana* Quantitative Transient Assay. 2017.
- LIVNEH, I. et al. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. **Cell Research**, v. 26, n. 8, p. 869–885, 2016.
- LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. **Methods of information in medicine**, v. 40, n. 4, p. 346–58, 2001.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E. et al. Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 389–394, 2003.
- MANDADI, K. K.; SCHOLTHOLF, K.-B. G. Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease? **The Plant Cell**, v. 25, p. 1489–1505, 2013.
- MANDRONERO, J. et al. **Transcriptome Analysis Provides Insights into the Mechanisms Underlying Papaya Plant Resistance to Sticky Disease at the Pre-flowering Stage.** [manuscrito submetido].
- NAKAGAWA, J.; TAKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. **Exudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de ocorrência em Teixeira de Freitas, BA.** Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais...**1987

NAQVI, A. R.; HAQ, Q. M.; MUKHERJEE, S. K. MicroRNA profiling of tomato leaf curl new delhi virus (tolcndv) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 281, 2010.

OHNO, A. et al. Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with ubiquitin molecular determinants for ubiquitin recognition. **Structure (London, England : 1993)**, v. 13, n. 4, p. 521–32, 2005.

PEREZ-BRITO, D. et al. First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13564–13570, 2012.

PETTERSSON, E.; LUNDEBERG, J.; AHMADIAN, A. Generations of sequencing technologies. **Genomics**, v. 93, n. 2, p. 105–111, 2009.

POETHIG, R. S. Vegetative phase change and shoot maturation in plants. **Current topics in developmental biology**, v. 105, p. 125–52, 2013.

RAMACHANDRAN, V.; CHEN, X. Small RNA metabolism in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 7, p. 368–374, 2008.

REICHEL, C.; BEACHY, R. N. Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. **Journal of virology**, v. 74, n. 7, p. 3330–7, 2000.

REYES, C. A. et al. Citrus psorosis virus$\gt;24K$ protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA accumulation and target expression. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 317–329, 2016.

RODRIGUES, C. H.; VENTURA, J. A.; MAFFIA, L. A. Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 118, 1989.

RODRIGUES, S. P. et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* L. plants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 11, p. 3191–3198, 2012.

SÁ ANTUNES, T. F. et al. The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155240, 2016.

SADANANDOM, A. et al. The ubiquitin-proteasome system: Central modifier of plant signalling. **New Phytologist**, v. 196, n. 1, p. 13–28, 2012.

SELTH, L. A. et al. A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. **The Plant cell**, v. 17, n. 1, p. 311–25, 2005.

SMALLE, J.; VIERSTRA, R. D. the Ubiquitin 26S Proteasome Proteolytic Pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 555–590, 2004.

- SOARES, E. A. et al. **Changes in C. papaya proteome induced by papaya sticky disease throughout the papaya's life cycle.** [submetido].
- SUN, Z. et al. Genome-Wide Characterization of Rice Black Streaked Dwarf Virus-Responsive MicroRNAs in Rice Leaves and Roots by Small RNA and Degradome Sequencing. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 4, p. 688–699, 2015.
- TAGAMI, Y. et al. Specific enrichment of miRNAs in Arabidopsis thaliana infected with Tobacco mosaic virus. **DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 14, n. 5, p. 227–33, 2007.
- VASSILEV, D. et al. Application of Bioinformatics in Plant Breeding. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 19, n. sup3, p. 139–152, 2005.
- VENTURA, J. A. et al. MELEIRA DO MAMOEIRO: ETIOLOGIA, SINTOMAS E EPIDEMIOLOGIA. **Papaya Brasil**, 2003.
- VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. DA S. Papaya Diseases and Integrated Control. In: **Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 201–268, 2004
- VERCHOT, J. Plant Virus Infection and the Ubiquitin Proteasome Machinery: Arms Race along the Endoplasmic Reticulum. **Viruses**, v. 8, n. 11, p. 314, 2016.
- WANG, X.; GOREGAOKER, S. P.; CULVER, J. N. Interaction of the Tobacco mosaic virus replicase protein with a NAC domain transcription factor is associated with the suppression of systemic host defenses. **Journal of virology**, v. 83, n. 19, p. 9720–30, 2009.
- XIE, X. et al. Molecular basis of ubiquitin recognition by the autophagy receptor CALCOCO2. **Autophagy**, v. 11, n. 10, p. 1775–1789, 2015.
- YE, C. M. et al. TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 3, p. 241–255, 2013.
- YI, X. et al. **PNRD. Plant Non-coding RNA Database**. Disponível em: <<http://structuralbiology.cau.edu.cn/PNRD/>>. Acesso em: 24 set. 2017.
- YU, H. et al. Ubiquitin-like domains can target to the proteasome but proteolysis requires a disordered region. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 14, p. 1522–1536, 2016.
- ZENG, L.-R. et al. Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. **Cell Research**, v. 16, n. 5, p. 413–426, 2006.
- ZERBINI, F. M.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, E. C. **O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus** ReserchGate, 2005. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/240623722%0AO>>.