



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA



**ESTUDOS *IN SILICO* E FUNCIONAL COM O TRANSPORTADOR DE AÇÚCAR
Tr69957 DE *Trichoderma reesei*: FOSFORILAÇÃO COMO POSSÍVEL
MECANISMO DE REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL**

CLAUDIA BATISTA CARRARO

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

CLAUDIA BATISTA CARRARO

**ESTUDOS *IN SILICO* E FUNCIONAL COM O TRANSPORTADOR DE AÇÚCAR
Tr69957 DE *Trichoderma reesei*: FOSFORILAÇÃO COMO POSSÍVEL MECANISMO
DE REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Bioquímica
Orientador: Dr. Roberto do Nascimento Silva**

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVECIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Carraro, Cláudia Batista

ESTUDOS *IN SILICO* E FUNCIONAL COM O TRANSPORTADOR DE AÇÚCAR Tr69957 DE *Trichoderma reesei*: FOSFORILAÇÃO COMO POSSÍVEL MECANISMO DE REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL

8p. il., 30 cm.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Dr. Roberto do Nascimento Silva

1. *Trichoderma reesei*. 2. Tr69957. 3. Transportadores de açúcares. 4. Docagem molecular

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARRARO, C. B.

ESTUDOS *IN SILICO* E FUNCIONAL COM O TRANSPORTADOR DE AÇÚCAR Tr69957 DE *Trichoderma reesei*: FOSFORILAÇÃO COMO POSSÍVEL MECANISMO DE REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Ivete Batista, por todo apoio, dedicação e amor incondicional.

Ao meu irmão, Willian, e meu sobrinho, Vini.

Ao meu namorado, Flávio.

As minhas amigas, Mônica, Letícia e Jess.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha mãe, que sempre me ensinou a não desistir, não importa o tamanho da pedra no caminho, mas que sempre esteve lá em todas as quedas que eu tive e tenho, me ajudando a levantar.

Ao Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva, por ter me apoiado tanto, mesmo com todos os meus problemas. Você fez tanto por mim, me deu todas as condições que eu precisava e também me ajudou a não desistir. Não tenho palavras para agradecer.

Às agências de fomento CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Biotecnologia Molecular: Zuleica e Silvia. Zu, obrigada por todo carinho e simpatia para comigo, e por compartilhar todas as histórias dos cachorrinhos e gatinhos, sempre alegrando meu dia. Silvia, obrigada por todas as risadas, cafezinhos e colaboração.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia Molecular: Wellington, Iasmin, David, Luis, Marcus, Hermano e Lucas. Obrigada pelo apoio em todos os momentos que eu precisei, pelas boas risadas, fofocas, rolês e todo o auxílio durante meu doutorado. Em especial ao Ton e à Iasmin, que mais que apoio profissional, me deram o ombro e me acolheram sempre que precisei.

Ao Flávio, que começou a participar de um capítulo da minha história há pouco, mas que me ensinou tanto sobre motivação. Amo você.

Às minhas melhores amigas da vida inteira, Mônica, Letícia e Jess, por todo apoio do universo. Vocês são mais que especiais para mim.

Ao meu irmão e ao Vini, os piás da minha vida. Que vocês tenham dedicação suficiente para alcançar todos os seus objetivos, e que eles sejam realmente altos.

E a todas as pessoas que contribuíram, de forma direta ou não, para a concretização desse objetivo. Do fundo do coração, obrigada.

RESUMO

CARRARO, Cláudia Batista. **ESTUDOS *IN SILICO* E FUNCIONAL COM O TRANSPORTADOR DE AÇÚCAR Tr69957 DE *Trichoderma reesei*: FOSFORILAÇÃO COMO POSSÍVEL MECANISMO DE REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL**. 2023. 81f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é um produtor altamente eficiente de enzimas lignocelulolíticas, sendo uma espécie de grande interesse biotecnológico. Para a manutenção de sua eficiência na degradação da biomassa, ele deve possuir mecanismos minuciosos para que perceba quais os tipos de fontes de carbono presentes no meio, a fim de ativar ou reprimir seu sistema celulolítico. Transportadores da família MFS desempenham importante papel neste tipo de controle, sendo que o Tr69957 foi caracterizado como tendo afinidades variáveis por diferentes açúcares, além de apresentar vários sítios de fosforilação. Análises computacionais de *docking* molecular e a expressão heteróloga do transportador Tr69957 em *Saccharomyces cerevisiae* permitiram a verificação da importância dos sítios de fosforilação no *sensing* do carbono, uma vez que tanto a fosforilação *in silico* como a construção de mutantes com mimetização da ausência da fosforilação promoveram alterações na capacidade de interação entre o transportador Tr69957 e os carboidratos celobiose, frutose, lactose, xilose, trealose, manose e maltose, indicando diferentes afinidades pelos açúcares derivados da biomassa lignocelulósica, sendo o transportador de interesse mais apto a interagir com e a transportar de forma energeticamente favorável os di- ao invés de monossacarídeos. Além disso, os sítios de fosforilação encontrados nos domínios citosólicos da proteína, especialmente na extremidade N-terminal, foram verificados como sendo possivelmente importantes para a sinalização intracelular, o que sugere que a interação entre o transportador Tr69957 e os açúcares do meio externo pode modular alostericamente o funcionamento da proteína, permitindo seu papel como um possível transceptor, influenciando na capacidade de o fungo produzir as enzimas para a degradação da biomassa lignocelulósica. Esses resultados permitem melhor entendimento de como as modificações pós-traducionais podem afetar o *sensing* de nutrientes extracelulares e, por consequência, a produção de enzimas celulolíticas, abrindo caminhos para a engenharia de proteínas que possam otimizar a produção de bioetanol de segunda geração.

Palavras-chave: *Trichoderma reesei*. Fosforilação. *Docking*. Expressão heteróloga. Celulases.

ABSTRACT

CARRARO, Cláudia Batista. ***IN SILICO* AND FUNCTIONAL STUDIES OF THE SUGAR TRANSPORTER Tr69957 FROM *Trichoderma reesei*: PHOSPHORYLATION AS A POTENTIAL MECHANISM OF POST-TRANSLATIONAL REGULATION.** 2023. 81p. Doctoral Thesis - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

The filamentous fungus *Trichoderma reesei* is a highly efficient producer of lignocellulolytic enzymes, making it a species of great biotechnological interest. In order to maintain its efficiency in biomass degradation, it must possess intricate mechanisms to perceive the types of carbon sources present in the environment, in order to activate or repress its cellulolytic system. Transporters of the MFS family play an important role in this type of control, with Tr69957 being characterized as having variable affinities for different sugars, as well as multiple phosphorylation sites. Computational molecular docking analyses and heterologous expression of the transporter Tr69957 in *Saccharomyces cerevisiae* allowed for the verification of the importance of phosphorylation sites in carbon sensing. Both in silico phosphorylation and the construction of mutants mimicking the absence of phosphorylation brought about changes in the interaction capacity between the Tr69957 transporter and the carbohydrates cellobiose, fructose, lactose, xylose, trehalose, mannose, and maltose. This indicated different affinities for sugars derived from lignocellulosic biomass, with the transporter being more apt to interact with and energetically favor the transport of disaccharides rather than monosaccharides. Additionally, the phosphorylation sites found in the cytosolic domains of the protein, especially in the N-terminal end, were deemed possibly important for intracellular signaling. This suggests that the interaction between the Tr69957 transporter and external sugars may allosterically modulate the protein's functioning, allowing it to serve as a potential transceptor, influencing the fungus's ability to produce enzymes for lignocellulosic biomass degradation. These results provide a better understanding of how post-translational modifications can affect the sensing of extracellular nutrients and, consequently, the production of cellulolytic enzymes, paving the way for protein engineering that can optimize second-generation bioethanol production.

Keywords: *Trichoderma reesei*. Phosphorylation. Docking. Heterologous expression. Cellulases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático das holocelulases de <i>Trichoderma reesei</i> .	16
Figura 2. Sistema de transporte de T. reesei.	23
Figura 3. Estratégia de construção dos mutantes contendo a mimetização dos sítios preditos de fosforilação para alanina.	29
Figura 4. Construção do modelo 3-D do transportador Tr69957 e validação do mesmo.	32
Figura 5. Disposição da sequência primária indicando as regiões dos domínios transmembrana de Tr69957.	34
Figura 6. Motivos-assinatura de transportadores MFS em Tr69957.	35
Figura 7. Conservação de estruturas secundárias entre Tr69957 e outros transportadores MFS.	37
Figura 8. Alinhamento e sequências entre Tr69957 e os transportadores selecionados no estudo.	40
Figura 9. Conservação de aminoácidos na sequência primária de Tr69957.	41
Figura 10. Conservação dos motivos específicos de ligação a açúcares entre Tr69957 e os transportadores selecionados no estudo.	45
Figura 11. Alinhamento tridimensional de Tr69957 e os outros transportadores selecionados no estudo.	46
Figura 12. Representação tridimensional da disposição dos sítios de fosforilação e dos motivos específicos de ligação a açúcares.	48
Figura 13. Representação tridimensional da disposição dos sítios de fosforilação e dos motivos específicos de ligação a açúcares no modelo fosforilado in silico de Tr69957.	49
Figura 14. Túneis identificados no transportador Tr69957 como passíveis de comunicação com o meio extracelular.	50
Figura 15. Ocupação dos túneis que fazem comunicação entre o centro da proteína e o meio extracelular em Tr69957.	53
Figura 16. Túneis identificados no transportador Tr69957 como passíveis de comunicação com o meio intracelular.	54
Figura 17. Ocupação dos túneis que fazem comunicação entre o centro da proteína e o meio intracelular em Tr69957.	56
Figura 18. Re-docking de 4ZW9 com glicose.	58
Figura 19. Re-docking de 4ZWC com maltose.	59
Figura 20. Docking de mono e dissacarídeos com o Tr69957.	60
Figura 21. Docking de mono e dissacarídeos com a região interna do Tr69957 fosforilado in silico.	61
Figura 22. Amplificação de fragmentos para a construção de mutantes pontuais de Tr69957.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados para construção das mimetizações dos sítios de fosforilação por alanina.	27
Tabela 2. Proteínas selecionadas para alinhamento dos motivos específicos de ligação a açúcares.	38
Tabela 3. Resíduos com alto grau de conservação em Tr69957, a partir de análise no ConSurf.	42
Tabela 4. Sítios preditos de fosforilação (NetPhos 3.1) em Tr69957, indicando a possível cinase envolvida.	47
Tabela 5. Resíduos formadores dos túneis que fazem comunicação entre o centro do Tr69957 e o meio extracelular.	51
Tabela 6. Resíduos formadores dos túneis que fazem comunicação entre o centro do Tr69957 e o meio intracelular.	54
Tabela 7. Variação de energia interna da proteína Tr69957 para avaliação da estabilidade proporcionadas pelas mutações pontuais miméticas de alanina.	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
a. A produção de bioetanol no cenário brasileiro	12
b. <i>Trichoderma reesei</i> e a degradação da biomassa lignocelulósica	14
c. Transportadores MFS	19
d. Regulação do transporte por fosforilação	21
e. O transportador Tr69957	22
2. OBJETIVOS	24
a. Objetivo geral	24
b. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
a. Construção do modelo tridimensional de Tr69957	25
b. Análise estrutural de Tr69957	25
c. <i>Docking</i> molecular	26
d. <i>Normal mode analysis</i> , verificação da estabilidade das mutações pontuais, interações proteína-proteína	26
e. Cepas utilizadas e condições de cultivo	26
f. Construção das linhagens mutantes pontuais com mimetização dos sítios fosforiláveis com alanina	27
4. RESULTADOS	30
a. Análise estrutural do Tr69957	30
b. Sítios de fosforilação preditos em Tr69957	46
c. Análises de <i>docking</i> e transporte <i>in silico</i> de Tr69957	57
d. Expressão heteróloga	61
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

a. A produção de bioetanol no cenário brasileiro

As mudanças climáticas, especialmente causadas pelo aquecimento global, requerem uma resposta coordenada e abrangente pelas autoridades diplomáticas do mundo todo. O reconhecimento da urgência na abordagem das mudanças climáticas resultou em tratados de cooperação internacional, como o Acordo de Paris, cujo objetivo é limitar o aumento da temperatura do planeta em até 2°C. O Brasil, ao assinar o Acordo, comprometeu-se a reduzir a emissão de gases do efeito estufa em 37% até 2025, chegando a 43% de redução em 2030. As energias renováveis desempenham papel central na conquista destas metas, sendo o investimento em seu estudo crucial para o desenvolvimento de tecnologias que permitem a maximização do potencial da energia renovável, com otimização de seu custo. Esse tipo de investimento é essencial para a amenização e até atraso dos efeitos do aquecimento global, promovendo a transição para um futuro sustentável economicamente viável (MIRANDA, 2018; SOUZA; CORAZZA, 2017; ZANGEROLAME TAROCO; SABBÁ COLARES, 2019).

Tendo em vista que a queima de combustíveis fósseis para produção de energia oferece uma contribuição muito significativa para a emissão de gases do efeito estufa e, por consequência, para o aquecimento global, as energias renováveis podem proporcionar uma alternativa que possibilita menor liberação de carbono, permitindo a redução do impacto das mudanças climáticas. Energias renováveis derivadas de biomassa, ou seja, obtidas de materiais orgânicos, são consideradas uma importante alternativa aos combustíveis fósseis, por possibilitar a liberação de dióxido de carbono (CO₂) que continua a participar do ciclo natural do carbono. Desta forma, a nova biomassa cultivada é capaz de capturar a quantidade equivalente de CO₂ emitido pela biomassa anteriormente utilizada, criando um ciclo de carbono fechado, o qual não contribui para o aumento dos níveis deste gás na atmosfera. Além disso, outra vantagem das energias renováveis derivadas de biomassa é a possibilidade de utilizar resíduos orgânicos da agricultura, evitando seu desperdício e o aumento da poluição de modo geral, promovendo o desenvolvimento de abordagens de economia circular (CÂNDIDO JÚNIOR, 2022; PACHECO, 2011; SOUZA; CORAZZA, 2017).

É importante salientar que a sustentabilidade da energia renovável derivada de biomassa depende das práticas do cultivo do material orgânico, visando a minimização do impacto ambiental e desflorestamento, além da garantia de benefícios econômicos

para as comunidades locais. Nesse sentido, embora ainda enfrentando grandes gargalos ambientais, o Brasil se apresenta como um dos mais importantes produtores de bioetanol de primeira e segunda geração, um tipo de energia renovável derivada da cana-de-açúcar (CÂNDIDO JÚNIOR, 2022; PACHECO, 2011).

O Brasil começou a investir na produção de bioetanol na década de 70, como resposta à crise de petróleo instalada na época. Desde então, aproveitando as condições climáticas e agricultura favoráveis, juntamente com o desenvolvimento de infraestrutura e suporte governamental, o país se tornou o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, alcançando mais de 650 milhões de toneladas do vegetal produzidas entre os anos de 2020 e 2021, resultando na produção de cerca de 40 milhões de toneladas de açúcar e 29 bilhões de litros de bioetanol. Assim, o Brasil ocupa também a posição de segundo maior produtor mundial de bioetanol, ficando atrás apenas dos EUA. Entretanto, o bioetanol produzido nos EUA provém do milho, sendo, portanto, o Brasil o maior produtor mundial de bioetanol derivado da cana-de-açúcar (MILANEZ; FAVERET FILHO; ROSA, 2008; NACHILUK, 2021; SANTOS, 2021; SCHUTTE; BARROS, 2010; VIDAL, 2021, 2022).

O bioetanol de primeira geração derivado de cana-de-açúcar é produzido a partir da fermentação dos carboidratos presentes em vastas quantidades no vegetal. Para tanto, a cana-de-açúcar pura é lavada e triturada, originando um líquido chamado melado (~70%) uma porção sólida, denominada bagaço (~30%). O melado é clarificado e fermentado por leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, a qual utiliza a glicose existente no melado para produção de etanol e gás carbônico, sendo a mistura resultante destilada, dando origem ao álcool hidratado, ou ainda pode ser desidratado, originando o etanol anidro. Esse tipo de produção, embora apresente a habilidade de reduzir a emissão de gases efeito estufa e a potencial de aprimorar a segurança energética, apresenta preocupações relacionadas à competição com a cadeia produtiva de alimentos e aos impactos ambientais, considerando a sustentabilidade (CAMARGOS, 2019; VIDAL, 2021).

Por outro lado, o bioetanol de segunda-geração, também chamado de bioetanol celulósico, ao invés de plantações primárias, utiliza-se de resíduos orgânicos para ser produzido, como o próprio bagaço de cana-de-açúcar. Seu processo de produção é mais complexo e envolve processos mais avançados, se iniciando com a preparação ou pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, para a quebra de sua estrutura complexa no intuito de melhorar a acessibilidade da celulose e hemicelulose para a hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática lisa esses componentes para formar açúcares mais

simples, como a glicose e a xilose, os quais serão fermentados até etanol, que será destilado e purificado de maneira semelhante ao bioetanol de primeira-geração. Assim, o bioetanol de segunda-geração possui vantagens de não haver competição com a cadeia de produção de alimentos, além de reduzir o impacto ambiental. Porém, apesar de ter a capacidade de alcançar alto rendimento e eficiência energética, o custo da produção do bioetanol de segunda-geração ainda é muito alto devido à complexidade de seu processo (CÂNDIDO JÚNIOR, 2022; PACHECO, 2011; SOARES; PATROCÍNIO; SILVA, 2017). Por isso, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para solucionar esses desafios, a fim de melhorar as tecnologias de conversão e aprimorar a sustentabilidade deste tipo de produção.

b. *Trichoderma reesei* e a degradação da biomassa lignocelulósica

Fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são ubíquos e cosmopolitas (GUPTA, 2014; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). A eficiência na utilização de substratos disponíveis no meio garante o sucesso na colonização de múltiplos tipos de habitat por eles, especialmente de materiais lignocelulósicos e rizosferas vegetais (GUPTA et al., 2016a; HARMAN et al., 2012; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). A sobrevivência em diversos ambientes é proporcionada pela habilidade que as espécies desse gênero possuem de rapidamente traduzir os sinais ambientais externos em respostas adaptativas certas, que envolvem a regulação do crescimento e morfologia, de esporulação, de produção de metabólitos secundários e de secreção de enzimas responsáveis por diversas ações, como a degradação do material lignocelulósico diretamente (GUPTA et al., 2016b; SCHMOLL et al., 2016; SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA, 2016). Atualmente existe mais de 100 espécies de *Trichoderma* filogeneticamente caracterizadas, dentre as quais muitas são usadas nas indústrias têxtil, de papel e alimentícia, além da utilização no biocontrole na agricultura e na produção de biocombustíveis (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016; HARMAN et al., 2012; KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012; LI et al., 2016; SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA, 2016).

Uma das espécies com imensa importância biotecnológica no que se refere à degradação de lignocelulose é *Trichoderma reesei*, representante da fase assexuada de *Hypocrea jecorina* e produtor altamente eficiente de enzimas xilanolíticas e celulolíticas (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016; GUPTA et al., 2016b; HUANG et al., 2014; KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012). A biomassa lignocelulósica é composta por lignina e holocelulose, a qual é dividida em hemicelulose e celulose. O sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* é um dos mais eficientes e mais bem estudados para

a quebra da celulose. Ele é composto por duas celobiohidrolases ou exoglicanases, responsáveis pela quebra da cadeia polissacarídica em suas extremidades redutoras e não-redutoras (CEL7a e CEL6a, respectivamente), removendo resíduos de celobiose da cadeia de celulose; cinco endoglicanases (CEL7B, CEL5A, CEL12A, CEL61, CEL45A) e três endoglicanases preditas (CEL74A, CEL61B, CEL5b), incumbidas da hidrólise da celulose em suas regiões amorfas; e duas β -glicosidases (CEL1A e CEL3A) que, em conjunto com cinco β -glicosidases preditas (CEL1B, CEL3B, CEL3C, CEL3D, CEL3E), fazem a hidrólise dos oligossacarídeos em monossacarídeos fermentáveis, prevenindo o acúmulo de celobiose (ADAV; SZE, 2014; GUPTA et al., 2016b; HERPOEL-GIMBERT et al., 2008; OUYANG et al., 2006). Essas enzimas agem sinergicamente entre si, juntamente com o auxílio de proteínas acessórias, sendo a solenina (SWO1) e expansinas endoglicanase-like (EEL1, EEL2 e EEL3) facilitadoras do acesso das celulasas à cadeia polissacarídica, e as lipopolissacarídeo mono-oxigenases (LPMOs) responsáveis pela quebra oxidativa da celulose (BERLIN, 2013; BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016; GUPTA et al., 2016b; HERPOEL-GIMBERT et al., 2008; HORTA et al., 2018). Além disso, para melhorar o acesso das celulasas com a celulose, *T. reesei* utiliza de diversas enzimas hemicelulolíticas, como endoxilanasas, β -xilosidasas, manosidasas, mananases, endoarabinases, galactosidasas, acetiltransferases, xiloglicanases, glicuronidasas, arabinofuronidasas e feruloil-esterases, para a degradação da hemicelulose (BERLIN, 2013; HORTA et al., 2018; PAYNE et al., 2015; SEGATO et al., 2014).

O sistema celulolítico de *T. reesei*, apesar de muito competente, possui uma quantidade consideravelmente pequena de holocelulasas (Figura 1) (ADAV; SZE, 2014; BERLIN, 2013; GUPTA et al., 2016b; SCHMOLL, 2008). Essa alta eficiência pode ser traduzida por uma regulação bastante fina dos diversos processos envolvendo essas enzimas na degradação da biomassa lignocelulósica. Dentre os diversos níveis de controle do sistema celulolítico, a fonte de carbono em que o organismo se encontra tem papel fundamental na regulação da secreção dessas enzimas. Existem fontes de carbono classificadas como repressoras das celulasas, como a glicose e a frutose, as quais, por serem rápida e facilmente metabolizáveis, são mais energeticamente favoráveis ao microrganismo, inibindo a produção das enzimas celulolíticas que seriam utilizadas para a degradação de materiais mais complexos (CASTRO et al., 2014; CHAMBERGO et al., 2002; DOS SANTOS CASTRO et al., 2014). Já as fontes de carbono consideradas como indutoras de celulasas são a sofrose, lactose e celulose, cujas presenças ativam a maquinaria de degradação da biomassa lignocelulósica (CASTRO et al., 2014; DOS SANTOS CASTRO et al., 2014; SILVA, 2008). Quando o

microrganismo entra em contato com a celulose do meio, ele libera celobiohidrolases para a degradação do polímero de celulose em celooligossacarídeos, os quais podem ser decompostos até a glicose diretamente metabolizável, ou transglicosilados, formando sofrorose. A sofrorose induz a produção de mais celulases, para que a biomassa continue a ser degradada até seu término. Esse fenômeno pode ser explicado pela produção de um sinal intracelular pela celulose da biomassa, resultando na ativação de genes responsáveis pela produção de enzimas celulolíticas, otimizando a produção das celulases para a utilização de fontes de carbono complexas (SUTO; TOMITA, 2001; ZHOU et al., 2012).

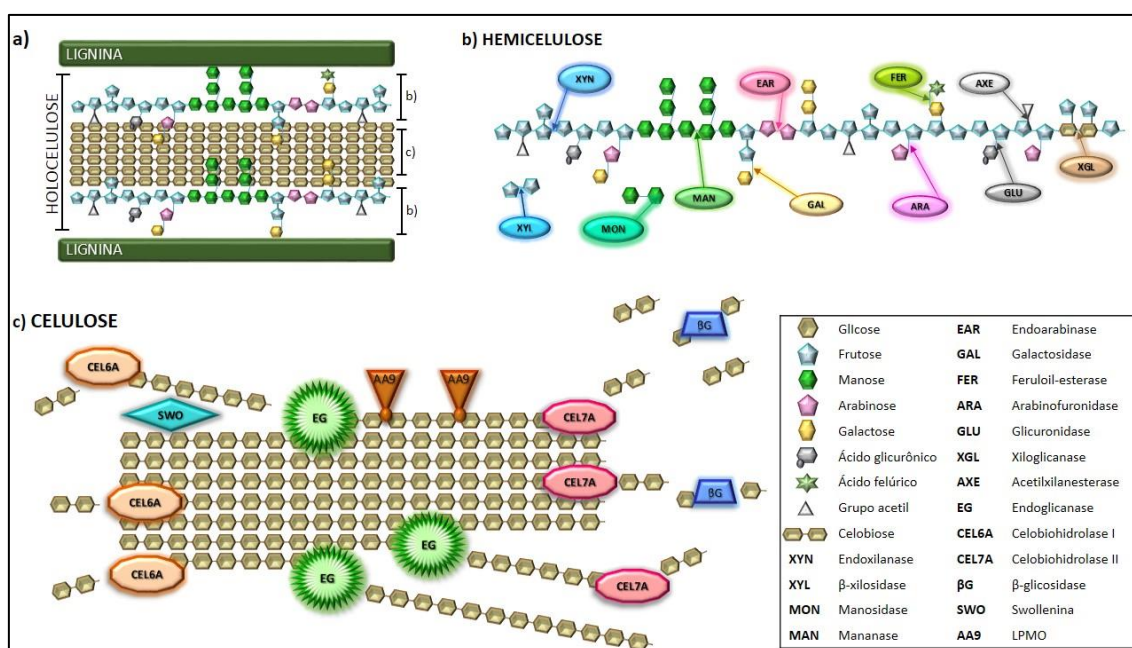


Figura 1. Desenho esquemático das holocelulases de *Trichoderma reesei*. (A) Modelo estrutural da biomassa lignocelulósica, a qual é composta por lignina, hemicelulose e celulose; **(B)** As hemicelulases e seus respectivos alvos; **(C)** Celulases de *T. reesei* e seus mecanismos de ação geral. Adaptado de: (DE PAULA et al., 2018a).

Além disso, fatores de transcrição, ou seja, proteínas que controlam a expressão de genes específicos, possuem papéis importantes na regulação do sistema celulolítico. A nível transcricional, as celulases são reguladas positivamente por XYR1, ACE2, ACE3, LAE1, VEL1, BgIR, CRZ1, AZF1, RXE1, CLP1, ARE1, VIB1, CLR1 e HAP2/3/5 (ANTONIETO et al., 2019; BEIER et al., 2020; IVANOVA et al., 2017; MARTINS-SANTANA et al., 2020; QIAN et al., 2019; WANG et al., 2019a, 2019b); e negativamente por ACE1, RCE1, CTF1, Trpac1, XPP1 and CRE1 (DERNTL et al., 2017; HE et al., 2014; MENG et al., 2020). XYR1 é o principal fator de transcrição responsável pela ativação da expressão de genes relacionados à degradação da biomassa lignocelulósica, sendo

que sua deleção inibe completamente a expressão destes genes (AKEL et al., 2009; DOS SANTOS CASTRO et al., 2016; FURUKAWA et al., 2009; PORTNOY et al., 2011; STRICKER et al., 2006). Esse fator de transcrição também é responsável, juntamente com outros fatores de transcrição e transportadores, pela regulação das enzimas CAZymes (DOS SANTOS CASTRO et al., 2016). Da mesma forma, ACE2 e ACE3 controlam a transcrição de genes de celulases, além do funcionamento adequado dessas enzimas, sendo que a deleção desses fatores de transcrição compromete a atividade celulolítica em *T. reesei* (ARO et al., 2001; HÄKKINEN et al., 2014). O complexo HAP2/3/5 se liga à região promotora de *cbh2* e é necessário para ativar o processo de transcrição (ZEILINGER et al., 2003), enquanto BglR controla positivamente a transcrição de genes relacionados às β -glicosidases e xilanases (NITTA et al., 2012). VEL1 influencia na expressão de genes de celulases e xilanases, regulando também *xyr1* em lactose (KARIMI-AGHCHEH et al., 2014), enquanto LAE1 pode regular a expressão de celulases, proteínas acessórias, β -glicosidases e xilanases de maneira coordenada ao VEL1 (KARIMI-AGHCHEH et al., 2014; SEIBOTH et al., 2012). AZF1 e CLP1 podem agir como reguladores positivos dos genes de celulases em condições indutoras, por meio da interação com promotores alvo (ANTONIETO et al., 2019; WANG et al., 2019b). Além disso, VIB1 e RXE1 podem modular a produção de celulases quando acoplados ao *xyr1* (CHEN et al., 2021; IVANOVA et al., 2017; WANG et al., 2019a), enquanto ARE1 é capaz de regular celulases e proteases, dependendo da fonte de nitrogênio disponível (QIAN et al., 2019). Mais recentemente, um homólogo de *Neurospora crassa*, CLR1, em conjunto com CLR2, foi verificado como relacionado à regulação positiva de xilanases e pectinases em *T. reesei* (BEIER et al., 2020). Por fim, CRZ1 é capaz de modular transcricionalmente os níveis de diversos fatores de transcrição em *T. reesei*, como o XYR1 (MARTINS-SANTANA et al., 2020).

O principal regulador negativo transcricional do sistema celulolítico de *T. reesei* é CRE1, que usa o mecanismo de repressão catabólica de carbono (CCR) para economizar energia, por reprimir processos envolvidos com a produção de compostos necessários para degradar fontes complexas de carbono, como o bagaço de cana-de-açúcar (ANTONIETO et al., 2014; ANTONIÉTO et al., 2016). CRE1 também é capaz de inibir a expressão de genes de celulases e os fatores de transcrição que servem como reguladores positivos destes, assim como a assimilação das fontes de carbono indutoras (MACH-AIGNER et al., 2008). Outro regulador negativo é o ACE1, que reprime a ação dos genes de celulases *cbh1*, *cbh2*, *egl1* e *egl2*, e de xilanases, *xyn1* e *xyn2*, em condições indutoras (ARO et al., 2003). A deleção do fator de transcrição *Trpac1* em *T. reesei* apresentou aumento na expressão de *xyr1* e *ace2*, sendo, portanto, considerado

um repressor da produção de celulases (HE et al., 2014). XPP1 pode inibir especificamente a expressão de xilanases, sendo up-regulado em condições repressoras (DERNTL et al., 2017). Finalmente, RCE1 apresenta ação oposta ao XYR1, já que pode se ligar à região promotora de *cbh1* e reprimir a expressão de celulases (CAO et al., 2017), tendo sua expressão modulada por CTF1 (MENG et al., 2020).

Outro nível de regulação do sistema celulolítico compreende as modificações pós-traducionais. Em *T. reesei*, diferentes vias de sinalização têm sido extensivamente estudadas, sendo envolvidas com diversos processos celulares relacionados à esporulação, percepção do ambiente e a produção de enzimas celulolíticas. A via de sinalização mediada por proteínas G e cAMP podem controlar diversos processos envolvidos com o desenvolvimento, morfogênese, metabolismo secundário, manutenção da parede celular e micoparasitismo no gênero *Trichoderma* [43–45] [46] [47] [48,49]. A fosforilação também desempenha papéis importantes no controle de muitos processos celulares a partir do mecanismo de adição de grupamentos fosfato por uma cinase, e a remoção destes por uma fosfatase. Esse tipo de processo já foi demonstrado como estando envolvido no controle da expressão de genes codificadores de celulases em *T. reesei* (PEDERSOLI et al., 2021; SCHMOLL et al., 2016). Além disso, já foi demonstrado que a enzima PKA pode ativamente participar na regulação de genes relacionados às celulases em *T. reesei* através de estímulos luminosos (SCHUSTER et al., 2007, 2012), sendo outras cinases, como a CKII α 2 e EKil, capazes de modular a expressão de genes relacionados à produção de quitinases, à esporulação, glicólise e integridade da parede celular (HE; GUO; ZHANG, 2015; WANG et al., 2015). Além dessas, as MAPKs permitem a transdução de sinais externos por meio de cascatas de fosforilação, promovendo uma resposta celular adequadamente rápida, para que o organismo possa sobreviver (HAMEL et al., 2012; LENGELER et al., 2000). *T. reesei* possui três MAPKs: TMK1, que participa da regulação de quitinases, celulases e glicosil-hidrolases, sendo que, quando deletada, ocorre a super-expressão de genes de quitinases (DE PAULA et al., 2018b; MENDOZA-MENDOZA et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2003; REITHNER et al., 2007; WANG et al., 2017); TMK2, que está envolvida na resposta ao estresse, integridade da parede celular, esporulação e na produção de celulases (DE PAULA et al., 2018b; WANG et al., 2014, 2017); e TMK3, relacionada a mecanismos de regulação osmótica e integridade da parede celular (WANG et al., 2013, 2017).

Considerando que as vias de sinalização e a transcrição gênica podem depender do estímulo externo à célula para regular a produção de celulases, os transportadores

de carboidratos são cruciais para o *sensing* adequado da fonte de carbono e, conseqüentemente, para a degradação da biomassa.

c. Transportadores MFS

Os transportadores da superfamília MFS (*Major Facilitator Superfamily*) são um tipo de proteína transportadora de membrana capaz de facilitar o transporte de uma variedade de moléculas de diversos tamanhos e funções, íons e solutos através da membrana celular. Eles funcionam a partir de uma combinação única de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos para criar um poro na membrana, agindo como um condutor para o transporte das moléculas substrato (QUISTGAARD et al., 2016; REDDY et al., 2013; YAN, 2015). O mecanismo exato pelo qual o substrato é transportado varia entre os transportadores MFS, mas em geral, eles utilizam energia oriunda do ATP (transporte ativo) ou da concentração de gradiente do substrato para direcionar o processo de transporte (difusão facilitada). A estrutura geral dos transportadores MFS é um conjunto de 12 hélices transmembrana, com o sítio de ligação do substrato localizado no poro central hidrofílico criado pelas hélices (DREW et al., 2021; QUISTGAARD et al., 2016; WISEDCHAISRI et al., 2014; ZHANG et al., 2015b).

Os transportadores MFS utilizam diversos mecanismos para transportar os substratos através da membrana plasmática, sendo que o tipo exato depende do tipo de item a ser transportado, a direção do transporte e a energia disponível para o mesmo (DREW et al., 2021; DREW; BOUDKER, 2016). O modelo do acesso alternado descreve o processo pelo qual os transportadores MFS alternam entre duas conformações diferentes para transportar substratos através da membrana. Esse modelo se baseia na ideia de que o transportador sofre mudanças conformacionais em resposta à presença do substrato, permitindo a alternância entre duas conformações distintas: os estados aberto e fechado, os quais possibilitam o transporte do substrato. No estado fechado, o sítio de ligação ao substrato é ocluso, não permitindo a entrada ou saída do mesmo da célula. No estado aberto, o sítio de ligação é exposto, permitindo que o substrato se ligue a ele e seja transportado através da membrana. O modelo do acesso alternado foi suportado por muitas técnicas experimentais, que promoveram esclarecimentos sobre este mecanismo (DENG et al., 2014; DREW; BOUDKER, 2016; IANCU et al., 2013; KABACK et al., 2011; PAULSEN; CUSTÓDIO; PEDERSEN, 2019; QUISTGAARD et al., 2013; SUN et al., 2012; WISEDCHAISRI et al., 2014; ZHANG et al., 2015b).

Os transportadores MFS possuem uma sequência que representa um motivo conservado denominado de domínio *sugar porter*, responsável pela ligação e transporte

de vários açúcares. Os motivos de ligação a açúcares nesses transportadores são tipicamente compostos por diversas hélices e loops transmembrana que formam um bolso ou cavidade para a acomodação do carboidrato (MITROVIC et al., 2022; VISHWAKARMA et al., 2018). Os resíduos específicos de aminoácidos nesses motivos de ligação envolvidos com o reconhecimento dos e interação com os açúcares podem variar dependendo do tipo de açúcar a ser transportado, embora haja grande grau de conservação para desempenho da função do transportador (CHEN et al., 2015; VISHWAKARMA et al., 2018). Algumas características comuns incluem a presença de amino ácidos aromáticos, como triptofano e tirosina, os quais são envolvidos em interações aromáticas de *stacking* (empilhamento) com a molécula de açúcar, e aminoácidos polares, como serina, treonina, histidina, asparigina, aspartato, glutamato e glutamina, que podem formar pontes de hidrogênio com os grupamentos hidroxila do substrato, por exemplo (JIANG et al., 2013; KAKARLA et al., 2017; KUMAR et al., 2016). Além disso, motivos exofaciais, como o ExxxxxxE (EX7E), no qual o glutamato na posição 7 é essencial para a ligação com o açúcar, podem ser altamente seletivos para a interação com monossacarídeos (ABSMANNER et al., 2010; KOSTOVA et al., 2003). Similarmente, a conservação de pares de glutamato e triptofano podem indicar a interação com dissacarídeos, uma vez que o glutamato pode coordenar o core do açúcar, enquanto o triptofano interage com o anel do carboidrato (KAKARLA et al., 2017; MADEJ et al., 2013; MADEJ; KABACK, 2013).

Essas interações são críticas para a especificidade e seletividade do transportador, já que elas determinam quais são os açúcares capazes de interagir e ser transportados. A composição aminoacídica nos motivos de ligação aos açúcares também podem impactar na taxa do transporte da molécula e na estabilidade do transportador (KUANY SHEV et al., 2021; KUMAR et al., 2016; ZHANG et al., 2015a). Por exemplo, a presença de aminoácidos volumosos ou carregados dentro do sítio de ligação pode impedir o movimento do carboidrato através do transportador. Por outro lado, a presença de aminoácidos menores ou mais flexíveis pode facilitar o movimento da molécula de açúcar, aumentando a taxa de transporte (CHEN et al., 2015; EBERT et al., 2018; FISCHER et al., 2002; KASAHARA; KASAHARA, 2003; NAULA et al., 2010; WU; FRITZ; POWERS, 1998). Assim, o entendimento dos tipos específicos de aminoácidos envolvidos nestes motivos pode promover conhecimento sobre como o transportador funciona e como sua função pode ser otimizada para aplicações específicas, como a degradação da biomassa lignocelulósica por *T.reesei*.

Considerando isso, mutações nos resíduos de aminoácidos que participam do motivo de ligação aos açúcares, seja na própria sequência primária ou sejam adjacentes ao motivo, na sequência terciária, podem impactar significativamente na seletividade do transportador pelos carboidratos, influenciando na eficiência do transporte. Dessa forma, é necessário compreender o papel de resíduos específicos de aminoácidos no motivo de ligação aos açúcares para desenhar novos transportadores mais eficientes.

d. Regulação do transporte por fosforilação

A fosforilação é uma modificação pós-traducional que consiste na adição de um grupamento fosfato em uma proteína, possibilitando sua mudança de conformação, além de alterações na sua estabilidade, localização e atividade. A adição do grupamento fosfato se dá a partir da ação de uma proteína cinase. Por exemplo, as serina/treonina cinases fosforilam resíduos de serina ou treonina, enquanto as tirosina cinases fosforilam resíduos de tirosina, sendo que essas enzimas podem ter especificidade dupla, fosforilando os três tipos de resíduos aqui mencionados (HUMPHREY; JAMES; MANN, 2015; JOHNSON; LEWIS, 2001; NISHI; SHAYTAN; PANCHENKO, 2014).

Considerando os transportadores de açúcares, a fosforilação pode afetar a seletividade dessa proteína e sua afinidade com relação aos diferentes carboidratos passíveis de transporte, modulando sua conformação e cinética (HOVSEPIAN et al., 2017; TAMAYO ROJAS et al., 2021). Por exemplo, a fosforilação no transportador Hxt6, de *Saccharomyces cerevisiae*, torna possível o aumento da taxa de captação de glicose, por melhorar o seu recrutamento e acomodação na membrana plasmática e aumentar sua afinidade por glicose (LLOPIS-TORREGROSA et al., 2016).

A fosforilação também pode afetar a seletividade dos transportadores de açúcar, permitindo-os reconhecer diferentes substratos. Por exemplo, a fosforilação do transportador STP13, de *Arabidopsis* sp., permite o transporte de glicose e frutose, enquanto o transportador não fosforilado consegue somente transportar a glicose (YAMADA et al., 2016). Além disso, a fosforilação pode mediar o cross-talk entre diferentes vias de sinalização que regulam o metabolismo dos carboidratos e seu transporte. Em plantas, a fosforilação do fator de transcrição bZIP63 pela cinase SnRK1 promove a expressão de transportadores de açúcares e a mobilização de reservas de carbono (JAMSHEER K; KUMAR; SRIVASTAVA, 2021; MAIR et al., 2015; TSAY, 2014a).

O entendimento do papel da fosforilação no transporte de açúcares pode direcionar o desenvolvimento de métodos mais eficientes e economicamente viáveis

para a degradação da biomassa. Ao identificar os sítios de fosforilação específicos e seus efeitos no transportador, é possível a engenharia de transportadores com o aumento da seletividade por alguns açúcares e/ou da eficiência com que eles são transportados através da membrana celular. Esse conhecimento também torna possível o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos mais efetivos para a degradação da biomassa lignocelulósica, uma vez que enzimas que funcionam em conjunto com os transportadores de açúcares podem ser otimizadas para melhor lise de carboidratos, levando a maior rendimento com menor custo.

e. O transportador Tr69957

Para que a maquinaria enzimática seja eficientemente ativada e mantida durante a degradação da biomassa lignocelulósica por *T. reesei*, é necessária a capacidade de sentir qual o tipo de fonte de carbono presente no meio externo de forma adequada (GUPTA et al., 2016b; ZHANG et al., 2013). Os sistemas de transporte transmembrana têm papel importante no sensing de carbono e na captação dos nutrientes e compostos necessários para a manutenção da vida na célula, além de funcionarem como canais de excreção de substâncias tóxicas ao microrganismo e de subprodutos de seu metabolismo, bem como canais de comunicação intercelular (QUISTGAARD et al., 2016; YAN, 2015). Uma das famílias de transportadores mais amplamente estudadas em *T. reesei* é a de MFS (Major Facilitator Superfamily), cujas proteínas são responsáveis pelo transporte de diversos tipos de compostos (Figura 2) (PERLIN; ANDREWS; TOH, 2014; YAN, 2015). Existem três famílias de MFS envolvidas com a internalização de açúcares nas células, sendo que os transportadores da família MFS permease são responsáveis pelo transporte de sacarídeos em fungos filamentosos, sendo normalmente promíscuos, ou seja, envolvidos com o transporte de mais de um tipo de açúcar (PERLIN; ANDREWS; TOH, 2014; QUISTGAARD et al., 2016).

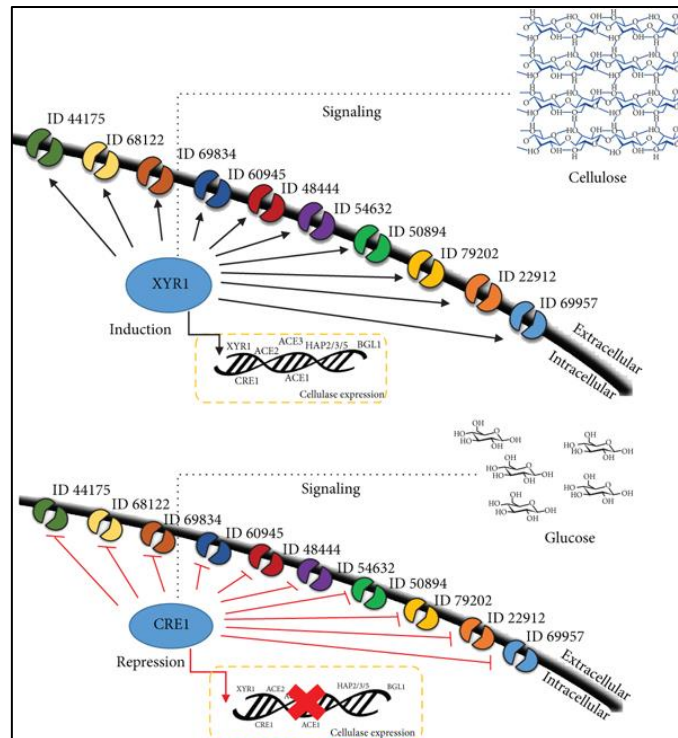


Figura 2. Sistema de transporte de *T. reesei*. O modelo predito de regulação transcricional por CRE1 e XYR1. Adaptado de: (DE PAULA et al., 2018a).

Nogueira et al. (2018) caracterizaram o transportador Tr69957 de *T. reesei*, o qual havia sido identificado como sendo induzido por celulose, sorbose e glicose através de análise transcriptômica (CASTRO et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2018b). Tr69957 está relacionado com o transporte de xilose, celobiose, lactose, frutose, galactose e manose em *T. reesei*, o que foi demonstrado por meio de expressão heteróloga do referido transportador em *Saccharomyces cerevisiae* cepa EBY.VW4000, desprovida de transportadores de hexoses (DOS REIS et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2018b). Por meio de estudos computacionais, os mesmos autores verificaram que o transportador Tr69957 tem maior afinidade por dissacarídeos ao invés de monossacarídeos, apesar de este comportamento ser o oposto in vivo, o que sugere um comportamento bifuncional da proteína, tanto como transportador de açúcares como sensor de qual fonte de carbono está presente no meio (NOGUEIRA et al., 2018b). Desta forma, esse estudo teve como objetivo entender como este transportador é influenciado por meio de modificações pós-traducionais, mais especificamente a fosforilação, para dar preferência a um ou outro carboidrato presente no meio, e assim, compreender o funcionamento da sinalização a partir do sensing de carbono, para induzir ou reprimir a produção e secreção de enzimas celulolíticas.

2. OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Analisar qual a influência da fosforilação na estrutura e função do transportador Tr69957 durante a degradação da biomassa lignocelulósica e como esta impacta na seletividade e consumo dos diversos tipos de carboidratos oriundos da biomassa.

b. Objetivos específicos

Avaliar a relevância de cada sítio de fosforilação predito em Tr69957 e como cada um influencia na afinidade de interação entre os carboidratos celobiose, lactose, maltose, trealose, manose, frutose, xilose e glicose e o referido transportador, por meio das abordagens computacionais de modelagem e docagem molecular;

Verificar as alterações de consumo dos carboidratos mencionados no transportador Tr69957 submetido a mutações sítio-dirigidas dos resíduos preditos como sítios de fosforilação (serina, treonina e tirosina), substituídos por alanina para mimetizar a ausência da fosforilação, por meio da expressão heteróloga do transportador na plataforma biotecnológica *Saccharomyces cerevisiae* EBY.VW4000.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Construção do modelo tridimensional de Tr69957

Para a construção do modelo tridimensional do transportador Tr69957, foi utilizada a plataforma colaborativa ColabFold, que utiliza a abordagem de machine learning AlphaFold2, juntamente com o alinhamento MMseqs2 (JUMPER et al., 2021; MIRDITA et al., 2022). Para isso, foi utilizada a sequência FASTA do transportador Tr69957, obtida do banco de dados Uniprot (ID: G0RW02) como query, além da aplicação de campo de força AMBER. Não foi utilizado um template específico, mas um alinhamento múltiplo de sequências com 6 etapas de reciclagem estrutural.

Os modelos obtidos foram submetidos ao refinamento estrutural na plataforma GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) (HEO; PARK; SEOK, 2013) e foram validados na plataforma SAVES v6.0 (UCLA-DOE LAB) (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), com as ferramentas Errat, Verify3D e Procheck. Após isso, a minimização de energia e preparo para a docagem molecular foram realizados no software Chimera (UCSF). Para a construção do modelo fosforilado in silico, foi utilizada a ferramenta online VIENNA-PTM 2.0 (MARGREITTER; PETROV; ZAGROVIC, 2013; MARGREITTER; REIF; OOSTENBRINK, 2017; PETROV et al., 2013).

b. Análise estrutural de Tr69957

Para avaliar a estrutura do modelo tridimensional Tr69957 e compará-la com a de outros transportadores, foi realizado o alinhamento múltiplo de sequências. Para isso, foram realizadas buscas na ferramenta BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997), em bancos de dados não redundantes, de organismos modelos e de estruturas experimentalmente resolvidas. Além disso, foi utilizada a ferramenta DALI (HOLM, 2022), para alinhamento de estruturas secundárias e terciárias. As sequências obtidas pela ferramenta BLAST e DALI foram alinhadas por meio do servidor ClustalW (SIEVERS et al., 2011) e o alinhamento resultante foi visualizado no software Jalview (WATERHOUSE et al., 2009).

Para análise das cavidades e túneis preditos em Tr69957, foi utilizado o servidor CAVERweb (STOURAC et al., 2019). A visualização e manipulação dos resultados foram realizadas com auxílio dos softwares Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) e Discovery Studio (BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio, San Diego: Dassault Systèmes, 2021). Para a análise do transporte in silico, os dados obtidos no servidor CAVERweb foram plotados no software GraphPad

Prism (GraphPad Prism versão 8.0.2 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA).

c. Docking molecular

A docagem molecular, após o preparo dos modelos tridimensionais selvagem, fosforilado e com mutações pontuais, foi realizada no software AUTODOCK4 (MORRIS et al., 2009; RIZVI; SHAKIL; HANEEF, 2013). Para isso, a proteína lida no software teve seus hidrogênios polares adicionados e convergidos, com computação de cargas Kollmann e Gasteiger. A partir disso, cada ligante (açúcar) foi adicionado e suas raízes torcionais foram detectadas. Então, com o preparo do sistema em PDBQT, a grid box foi determinada. Para a docagem da região externa do Tr69957, foi utilizada uma grid box de dimensões 126x126x112 (espaçamento = 0,375), com centro de 16,597x(-6,704)x(-17,268). Para a região intracelular, a grid box teve como dimensões 112x104x102 (espaçamento = 0,542), com centro de (-27,878)x(-1,822)x5,067. Da mesma forma, a grid box utilizada para a docagem dos ligantes na região dos túneis centrais da proteína teve as dimensões 92x52x80 (espaçamento = 0,375), com centro 5,639x(-1,528)x(-6,583). A docagem se deu em algoritmo genético Lamarckiano.

d. Normal mode analysis, verificação da estabilidade das mutações pontuais, interações proteína-proteína

Para verificar as porções mais flexíveis da proteína, a análise *Normal mode* foi realizada na ferramenta online WEBnm@ (HOLLUP; SALENSMINDE; REUTER, 2005; TIWARI et al., 2014). Para avaliar se as mutações pontuais dos sítios fosforiláveis seriam reprodutíveis *in vivo*, foi utilizada a ferramenta DynaMut (RODRIGUES; PIRES; ASCHER, 2018), a fim de avaliar as alterações de energia que a substituição dos resíduos por alanina seriam viáveis. Para a análise *in silico* de interações interproteicas relacionadas ao Tr69957, foi utilizado o banco de dados STRINGdb (SZKLARCZYK et al., 2017).

e. Cepas utilizadas e condições de cultivo

O fungo *Trichoderma reesei* da linhagem QM6a Δ tmus53 Δ pyr4 (DERNTL et al., 2015) foi obtido do Laboratório da Dr. Astrid Aigner-Mach da coleção da *Research Area Gene Technology and Applied Biochemistry, Institute for Chemical Engineering, Vienna University of Technology, Áustria*. O fungo foi mantido no Laboratório de Biotecnologia Molecular na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

em meio MEX (Extrato de malte, 3 % (p/v); Agar-Agar, 2 % (p/v)) a 4°C com repiques periódicos. Esta linhagem foi utilizada para obtenção de cDNA. Para o crescimento dessa linhagem os meios de cultivo foram suplementados com 5 mM de uridina devido a deleção do gene *pyr4*.

A levedura *S. cerevisiae* EBY.VW4000 e seu mutante contendo o transportador Tr69957 (EBY.VW4000 +pRH195m +pRH274 and Tr69957::GFP EBY.VW4000) foi crescida em 30°C em meio YNB sólido ou líquido (20 g/L agar, 7 g/L YNB sem aminoácidos e suplementado com 0.05 g/L histidina, 0.1 g/L leucina, 0.1 g/L tryptophano, and 0.1 g/L uracila. A seleção dos transformantes se deu em meio YNB sem triptofano e uracila (NOGUEIRA et al., 2018a).

f. Construção das linhagens mutantes pontuais com mimetização dos sítios fosforiláveis com alanina

Neste trabalho, tentamos construir os mutantes pontuais para os sítios preditos como fosforiláveis em Tr69957, com mimetização com alanina. Para isso, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da região iniciadora 5'FW e terminadora 3'RV de 18 dos 20 sítios de fosforilação preditos, conforme a Tabela 1. Os oligonucleotídeos foram desenhados e analisados através da ferramenta OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Para que houvesse a mutação pontual, apenas um resíduo de aminoácido foi alterado, mantendo uma região flanqueadora para combinação apropriada. Para permitir a recombinação homóloga mediada por levedura, os oligonucleotídeos contendo as regiões de homologia com os vetores pRH195m, pRH274 e GFP foram obtidos com (NOGUEIRA et al., 2018a).

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados para construção das mimetizações dos sítios de fosforilação por alanina.

Mut.	5'FW	3'RV	T (°C)
S11A	<u>TGCGGCAGCCCATGTTG</u>	CAACATGGGCTGCCGCA	59.6
S29A	<u>AAATGCCGCTGACGAAG</u>	CTTCGTGAGCGGCATT	53.3
S43A	<u>GCCTTGAAGGCCAATCGCA</u>	TGCGATTGGCCTTCAAGGC	58.9
Y63A	<u>TGGAGGGCGCCGATACGAT</u>	ATCGTATCGGCGCCCTCCA	61.3
Y192A	<u>CTCACGACCGCCGTCAACCTT</u>	AAGGTTGACGGCGGTCTGTGAG	62.1
S260A	<u>GACGCCAAAAAGCCCTGCGAAG</u>	CTTCGCAGGGCTTTTTGGCGTC	61.6
S296A	<u>AAAGCAAGCAAGGCCCTACGTGGAAT</u>	ATTCCACGTAGGCCTTGCTTGCTTT	61.3
S329A	<u>CTTTCGCATACGCTCCGTCTACTT</u>	AAGTACGACGGAGCGTATGCGAAAG	60.8
S340A	<u>AGCTGGAATGGCCCTGACCA</u>	TGGTCAGGGGCCATTCCAGCT	63.7
T373A	<u>GCCGCCGAGCGCTCTATG</u>	ACATAGAGCGCTCGGCGGC	63.0
S397A	<u>CTCTGCGACAGCTGCCAAGGAT</u>	ATCCTTGGCAGCTGTCCGAGAG	61.9
T419A	<u>TCTATGCTCTTGCAAGTTGGCCCTAT</u>	ATAGGGCCAACTGCAAGAGCATAGA	60.0
S429A	<u>ATTCTATCGTGGCCGAGACATCGTC</u>	GACGATGTCTCGGCCACGATAGAAT	60.2
S432A	<u>TCCGAGACAGCGTCCATCCGT</u>	ACGGATGGACGCTGTCTCGGA	62.7
S471A	<u>CTTGGAACGCGGCTGAAAGACG</u>	CGTCTTCCAGCCGCGTTCCAAG	62.8

S513A	<u>CAAAGAGGATTGCTGCCCGCAAGTT</u>	AACTTGCGGGCAGCAATCCTCTTTG	62.2
Y525A	<u>ATGTTGACGCTGCTGAAATGACTCC</u>	GGAGTCATTTGAGCAGCGTCAACAT	59.7
S532A	<u>CTCCAACGTTTCGCCATGTCCAAGAA</u>	TTCTTGGACATGGCGAACGTTGGAG	61.4

Os fragmentos 5'FW e 3'RV foram amplificados em reações de PCR, utilizando o cDNA de *Trichoderma reesei* como *template*. A reação de PCR sítio-dirigida para troca de resíduos foi preparada com os seguintes reagentes: 500 ng do template, 0,25 µL da enzima Phusion HF DNA Polymerase (2000 U/mL, New England BioLabs), 0,75 µL de mix de dNTPs (New England BioLabs), 5 µL do tampão Phusion Buffer HF 5x (New England BioLabs), 1 µL de cada primer a 50 µM e água ultrapurificada completando um volume final de 25 µL de reação. É importante notar que as reações de polimerização para os primers *forward* e reverso foram conduzidas separadamente. Em um termociclador, foram programadas as condições de reação: *hotstart* a 98 °C por 30 s, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento a 55 °C por 50 s e extensão a 72 °C por 7 min, com um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min. Após a amplificação, os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1%, dosados em espectrofotômetro e armazenados a -20°C até o uso.

Com a obtenção dos fragmentos, almejou-se transformá-los na linhagem transformados na linhagem de *S. cerevisiae* EBY.VW4000, por meio do método de lítio-acetado. A estratégia de recombinação homóloga se deu conforme a Figura. Para tanto, um pré-inóculo da levedura foi realizado em meio YPD, incubado overnight a 30°C, 200 rpm. Posteriormente, uma alíquota de 5 mL do pré-inóculo foi incubada em 200mL de YPD por 4 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm. O inóculo foi, então centrifugado por 5 minutos a 5000 ×g eo pellet foi lavado com água estéril e ressuscitado em 1 mL de Acetado de Lítio 1 M em TE. Foi então feito um mistura contendo os fragmentos *forward* e reverso, o vetor pRH195 e 100ug de esperma de salmão fervido. Em seguida, foram adicionados ao microtubo 600uL da mistura de PEG 3350 50%, AcLi 10x, e água estéril. O conteúdo foi agitado por inversão para homogeneização e incubado a 30 oC por 30 min, a 200rpm. Foi então adicionado DMSO e a mistura, após homogeneizada, foi incubada por 15 minutos a 42°C e em seguida colocada em gelo por 2 minutos. Por fim, cada tubo passou por uma centrifugação de 30 s a 13000 rpm, descartando o sobrenadante, ressuscitando o pellet em 200 µL de água ultrapurificada estéril e plaqueando o conteúdo em placa do meio completo SC-Ura a 30°C por um período de 48h a 72h.

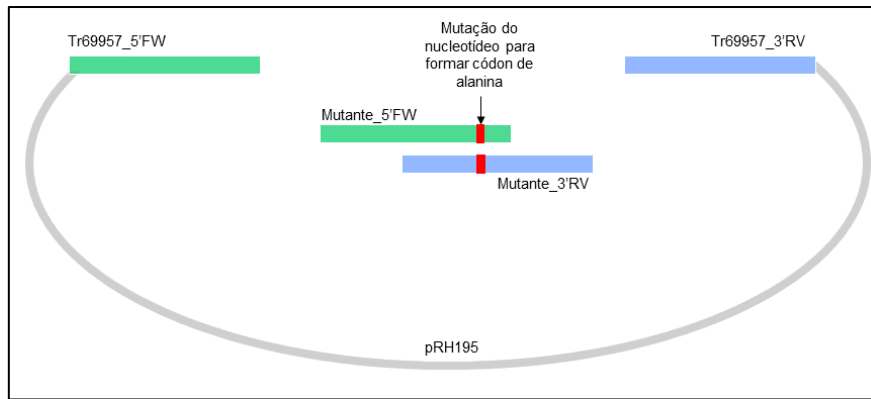


Figura 3. Estratégia de construção dos mutantes contendo a mimetização dos sítios preditos de fosforilação para alanina. Foi alterado somente um nucleotídeo para a conversão dos códons de serina, treonina e tirosina para alanina.

4. RESULTADOS

a. Análise estrutural do Tr69957

O modelo selvagem do transportador Tr69957 foi construído por meio de modelagem molecular a partir de alinhamentos de múltipla sequência MMseq2 (*Many-against-Many sequence searching*) e de modelos baseados em redes neurais, através do *software* ColabFold, que utiliza a abordagem de *machine learning* AlphaFold2. Os 5 modelos obtidos para o Tr69957 foram submetidos a relaxamento estrutural usando campo de força AMBER e foram classificados de acordo com seus valores de pLDDT (*predicted Local Distance Difference Test*) (Figura 4d). Assim, o modelo selecionado apresentou, além de um pLDDT >85, que demonstra boa qualidade e confiança estrutural local (Figura 4d), cobertura e alinhamento de sequências adequados (Figura 4b), assim como um padrão de PAE (*Predicted Alignment Error*) bastante baixo, indicando posições relativas dos resíduos bem definidas e, portanto, boa qualidade de modelo (Figura 4c).

Todos os modelos foram submetidos ao refinamento estrutural na plataforma GalaxyRefine, sendo devidamente validados pelas ferramentas PROCHECK, Errat, ProSA, Verify3D e ModRefiner (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997), e tendo sua estrutura energeticamente minimizada pelo *software* Chimera (PETTERSEN et al., 2004), possibilitando a seleção do modelo representado na Figura 4a como representativo do tipo selvagem do transportador Tr69957. Para o modelo selecionado, o refinamento estrutural resultou em uma variação de -0,0111 do escore TM (*TM-score*), indicando leve afastamento do modelo refinado em relação à similaridade com os *templates* utilizados na modelagem molecular, com desvio de 0,287 Å do modelo inicial. Esse desvio proporcionou uma melhora no escore de MolProbity (WILLIAMS et al., 2018), apresentando melhora nos escores de impedimento estérico, na diminuição de rotâmeros de menor qualidade e favorecendo a distribuição dos resíduos modelados e refinados no gráfico de Ramachandran (Figura 4e).

No modelo refinado, foi possível a verificação de 98,1% dos resíduos de aminoácidos localizados nas regiões mais favoráveis, 1,7% e 0,2% em regiões adicionalmente e amplamente permitidas, respectivamente, no gráfico de Ramachandran (Figura 4f). Da mesma forma, a ferramenta ProSA (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) permitiu a observação de um escore Z (*Z-score*) de -7.69, indicando que a estrutura refinada está dentro da variação de energias totais conformacionais representada por esse tipo de escore para proteínas de tamanhos similares ao Tr69957 experimentalmente determinadas por difração de raios-X e ressonância magnética

nuclear (Figura 4g). O servidor ModFOLD8 (MCGUFFIN et al., 2021) resultou em um escore global de qualidade de 0,6137, com p-valor = $3,37 \times 10^{-5}$, indicando a boa qualidade do modelo obtido refinado (Figura 4h). De acordo com a ferramenta Errat, foi obtido um fator de qualidade geral de 97,1%, similar ao encontrado em estruturas adequadamente obtidas por metodologias de alta resolução, enquanto a ferramenta Verify3D retornou um valor de 82,59%, indicando boa compatibilidade do modelo atômico tridimensional com a sequência primária utilizada para a proteína em questão (Figura 4i).

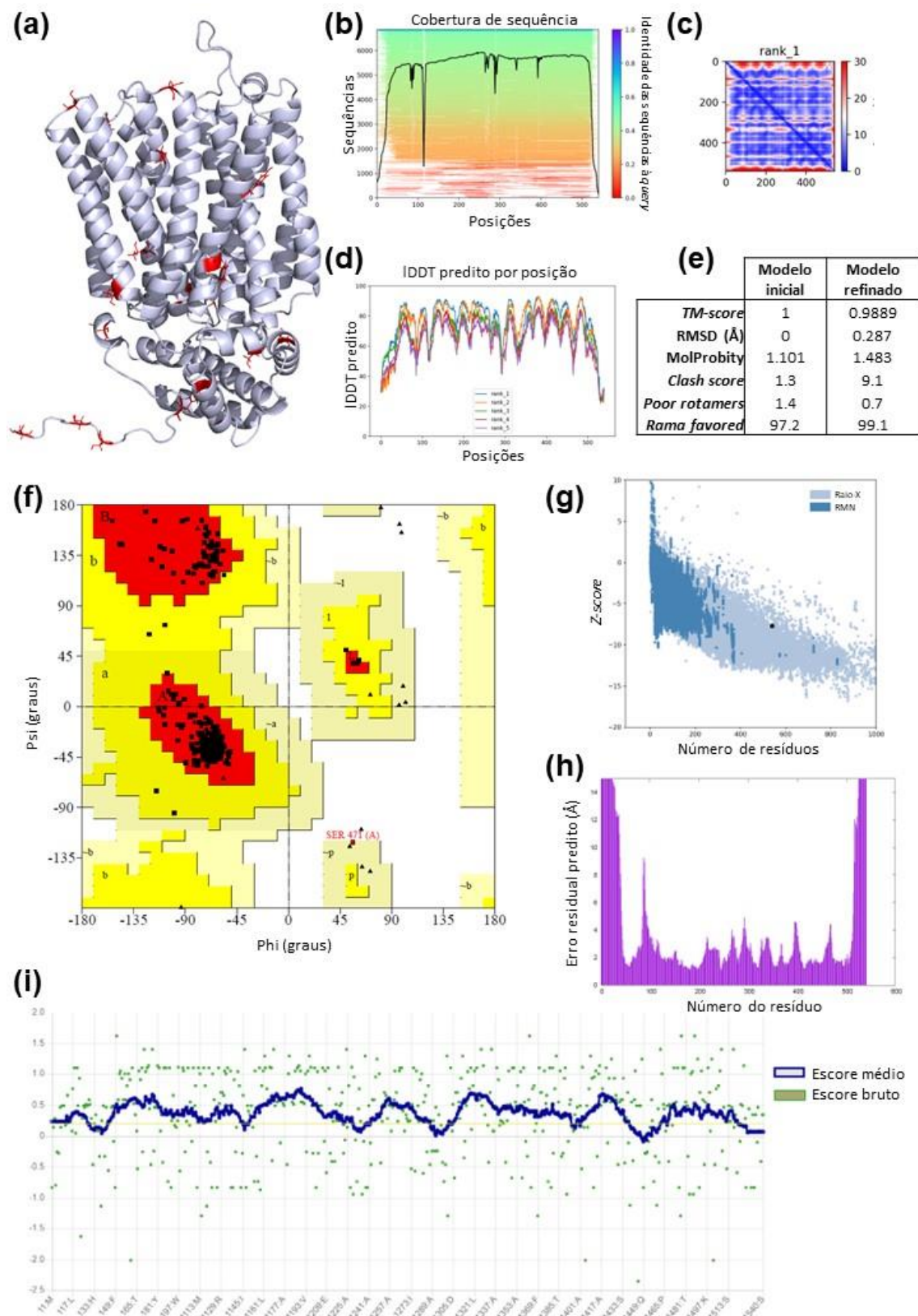


Figura 4. Construção do modelo 3-D do transportador Tr69957 e validação do mesmo. (a) Modelo 3-D do transportador Tr69957 com seus sítios de fosforilação preditos em vermelho; (b) cobertura das sequências utilizadas na metodologia MMseq2 para construção do modelo 3-D selecionado; (c) plotagem de PAE, sendo os menores valores obtidos demonstrantes de maior qualidade do modelo predito; (d) plotagem de pLDDT para cada um dos modelos construídos

pelo software colaboratório ColabFold a fim de classificá-los com base em sua confiabilidade estrutural local; **(e)** comparação entre o modelo inicial e o modelo após o refinamento estrutural, pelo GalaxyRefiner; **(f)** gráfico Ramachandran demonstrando a validação posicional dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis; **(g)** comparação entre o Z-score do modelo refinado com os mesmos escores de estruturas de tamanho similar obtidas experimentalmente; **(h)** erros admitidos por resíduo predito, em angstroms, a partir da ferramenta ModFOLD8; **(i)** comparação entre o modelo tridimensional refinado e a sequência primária da proteína Tr69957.

A fim de entender melhor a estrutura do transportador Tr69957, procuramos comparar as informações da sequência de aminoácidos que o compõem com outras proteínas semelhantes. Ao aplicar o algoritmo BLASTp para verificação de sequências de proteínas não-redundantes, foi observado alto grau de similaridade (*Score* > 800, *Query Coverage* > 96% , *Percentage Identity* > 69,96%, *E-value* = 0,0) entre a sequência do transportador Tr69957 e 99 proteínas de outras espécies de fungos ascomicetos, porém com nenhuma das proteínas resultantes desta primeira pesquisa possuindo estrutura tridimensional resolvida ou sendo suficientemente estudada. Assim, novas buscas através do algoritmo BLASTp foram realizadas. Ao utilizar o banco de dados Landmark para verificação de proteínas semelhantes em organismos modelos, foram verificados transportadores MFS bem conhecidos, como HXT1 (*Score* = 115, *Query Coverage* = 91%, *Percentage Identity* = 24,10%, *E-value* = 5e-26) e GAL2 (*Score* = 114, *Query Coverage* = 83%, *Percentage Identity* = 22,44%, *E-value* = 1e-25) de *Saccharomyces cerevisiae*, mesmo que com considerável diminuição na similaridade entre as sequências de aminoácidos. Da mesma forma, ao realizar a busca no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) por meio do algoritmo BLASTp, 9 sequências foram retornadas como produtoras de alinhamentos significativos, porém, novamente, com baixa similaridade entre as sequências primárias, sendo a sequência do transportador de glicose humano GLUT3/SLC2A3 portadora do escore máximo (*Score* = 118, *Query Coverage* = 79%, *Percentage Identity* = 28,95%, *E-value* = 4e-28). Apesar de os transportadores identificados na análise pelo BLASTp apresentarem funções comparáveis entre si, devido às divergências evolutivas para a acomodação de diferentes especificidades de substratos nos diferentes organismos eucariotos, há baixa homologia entre as sequências aminoacídicas que compõem diferentes transportadores MFS (Apêndices a, b, c).

Embora haja essa baixa identidade de sequências primárias, os transportadores MFS compartilham entre si determinados motivos e características estruturais que definem a família, como a topologia comum de 12 hélices transmembrana, a qual, por ser altamente conservada, permite que os diferentes transportadores possam ser agrupados como membros da superfamília MFS. Não diferentemente, o transportador

Tr69957, assim como verificado por Nogueira e colaboradores (2018) (NOGUEIRA et al., 2018a), possui 12 segmentos transmembrana, representados na Figura 5. Desta maneira, procuramos entender quais regiões da sequência do Tr69957 eram mais conservadas inter-espécies, com relação à interação com carboidratos.

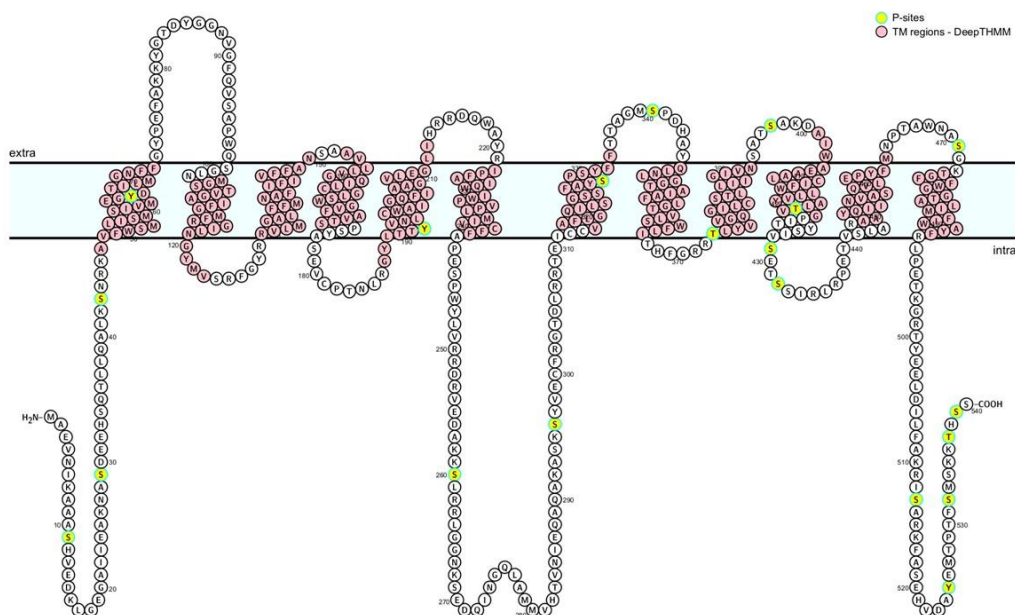


Figura 5. Disposição da sequência primária indicando as regiões dos domínios transmembrana de Tr69957. Em rosa estão as regiões transmembrana indicadas pela ferramenta DeepTHMM, sendo os resíduos em verde preditos como fosforiláveis.

Primeiramente, uma análise de identificação de motivos foi realizada pela ferramenta MotifFinder, resultando em 83 motivos contidos na sequência do transportador Tr69957. Dentre esses motivos, destacam-se uma assinatura das proteínas transportadoras de açúcar, o SUGAR_TRANSPORT_2 (PROSITE: PS00217), nas posições 161-186, além do perfil MFS nas posições 50-497 (PROSITE: PS50850). Além destes, podemos enfatizar os motivos cd17357 (MFS_Glut_Class1_2_like, NCBI: 340915) nas posições 107-499, representativo dos transportadores GLUTs das classes 1 e 2; cd17356 (MFS_HXT_NCBI: 340914), representativo da subfamília de transportadores MFS de hexoses em fungos, nas posições 54-250; cd17359 (MFS_XylE_like, NCBI: 340917) nas posições 95-253, representando transportadores de atividade de simporte de D-xilose-proton; cd17333 (MFS_FucP_MFSD4_like, NCBI: 340891), nas posições 108-269, similar à proteína fucose permease bacteriana FucP; além de outros, demonstrados na Figura 6.

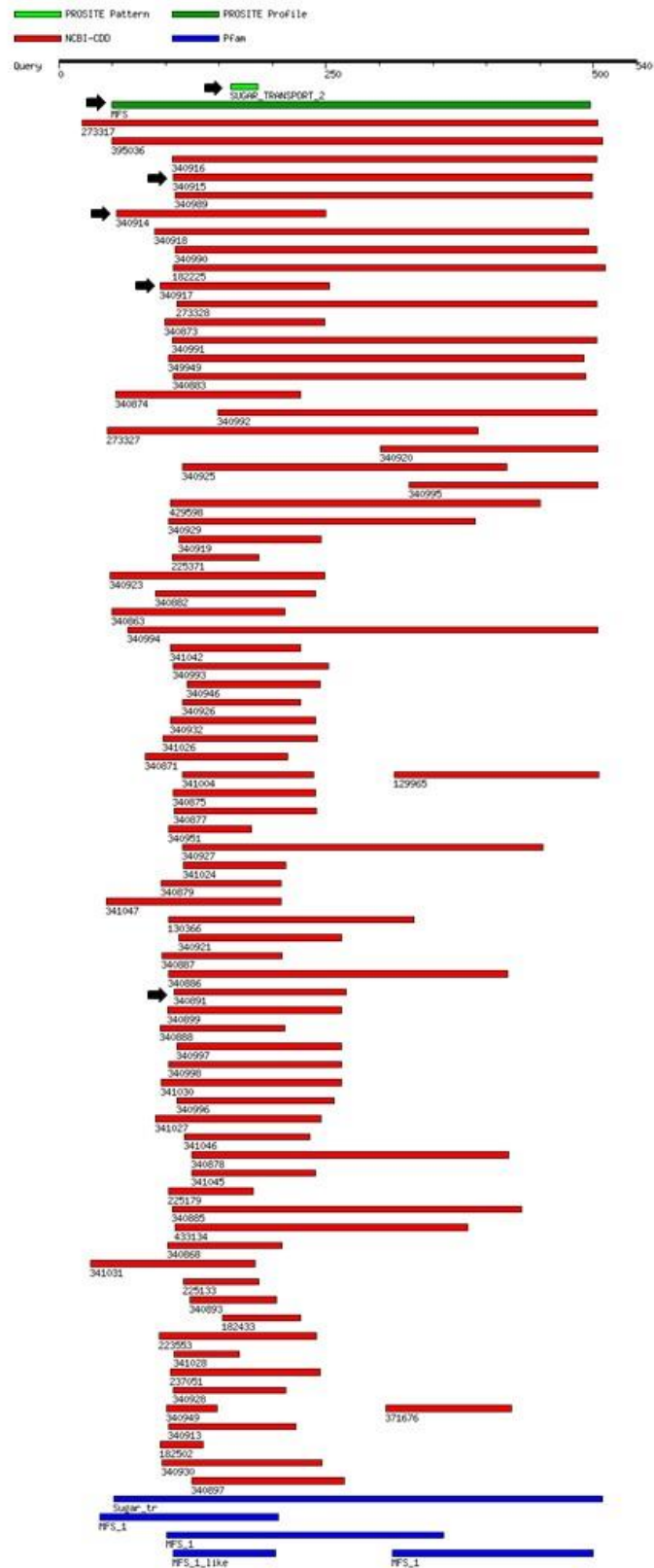


Figura 6. Motivos-assinatura de transportadores MFS em Tr69957. Motivos encontrados pela ferramenta MotifFinder, sendo os destacados por setas relacionados com transportadores de açúcar MFS já bem caracterizados.

Além dos motivos conservados como assinaturas dos transportadores de açúcares, alguns motivos-chave para a determinação da especificidade da interação entre o transportador Tr69957 e os açúcares a serem transportados foram analisados a partir do alinhamento de sequências. Para a seleção das proteínas que participariam do alinhamento de sequências, além da busca na literatura por transportadores MFS de funções comparáveis ao Tr69957, cuja estrutura tridimensional se encontrava resolvida e/ou bem estabelecida, foi utilizado o servidor Dali (*Distance matrix alignment*) para correlacionar a estrutura-função do referido transportador, por meio da comparação entre seu modelo tridimensional aqui obtido, com a estrutura tridimensional resolvida de outras proteínas do banco de dados PDB. Alinhando-se as sequências das 50 primeiras proteínas retornadas nesta análise é possível confirmar que a estrutura secundária destas é conservada com relação à do transportador Tr69957, apesar da dessemelhança entre as respectivas sequências aminoacídicas (Figura 7).

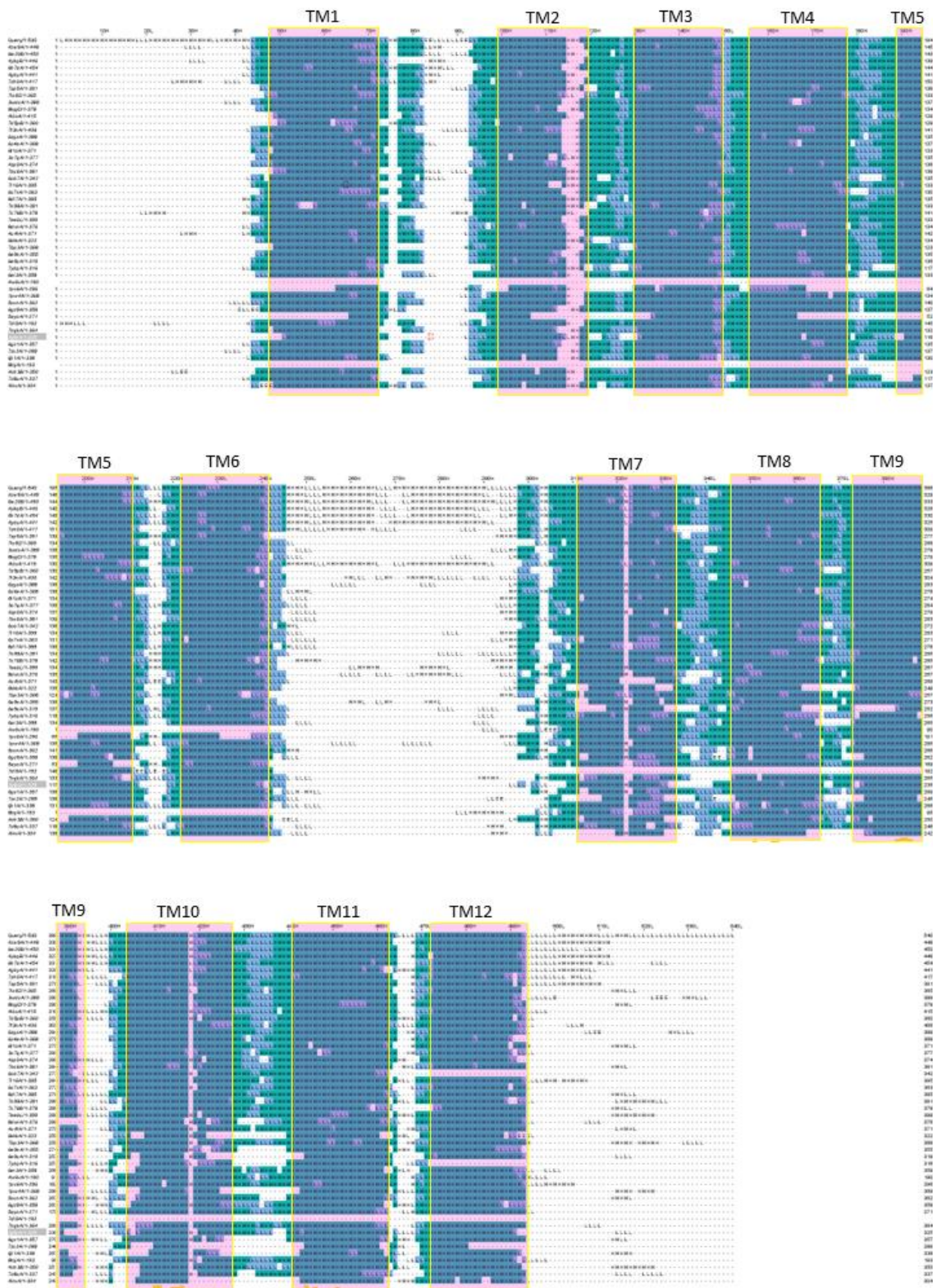


Figura 7. Conservação de estruturas secundárias entre Tr6997 e outros transportadores MFS. As regiões dos motivos específicos de ligação de carboidratos estão destacadas em rosa. Verde: hélices, Azul: alças.

Tomando-se em conjunto esses resultados, foram selecionadas 16 proteínas transmembrana MFS para comparação de motivos comuns entre diversos transportadores de hexoses e pentoses e o Tr69957. São eles: LacY (Uniprot: P02920, PDB: 1PV6), XylE (Uniprot: P0AGF4, PDB: 4GBZ) e FucP (Uniprot: P115551, PDB: 3O7Q), de *Escherichia coli* K12, o primeiro sendo capaz de transportar lactose, porém não transporta frutose, por exemplo, enquanto o segundo internaliza xilose em um sistema proton-simporte, assim como o terceiro, que utiliza esse sistema para transportar L-fucose e D-arabinose; GLUT1 (Uniprot: P11166, PDB: 4PYP), GLUT2 (Uniprot: P11168) e GLUT3 (Uniprot: P11169, PDB: 4ZWC e 4ZW9), de *Homo sapiens*; GlcP_{se} (Uniprot: A0A0H2VG78), de *Staphylococcus epidermidis*, altamente específico para a captação de glicose; PfHT1 (Uniprot: O97467, PDB: 6RW3), de *Plasmodium falciparum*; STP10 (Uniprot: Q9LT15, PDB: 6H7D), de *Arabidopsis thaliana*, capaz de transportar glicose, galactose e manose; HXT1 (Uniprot: P32465) e HXT2 (Uniprot: P23585), de *Saccharomyces cerevisiae* S288c, um transportador de glicose de baixa afinidade, podendo também transportar manose, e um transportador de glicose de alta afinidade, respectivamente; MAL11 (Uniprot: P53048) e GAL2 (Uniprot: P13181), também de *S. cerevisiae*, o primeiro com alta afinidade por maltose, trealose e glicose, sendo o segundo um transportador de galactose; SNF3 (Uniprot: P10870), ainda do mesmo organismo, um sensor de baixa concentração de glicose; MstE (Uniprot: Q400D8), um transportador de glicose de baixa afinidade putativo, e HxtA (Uniprot: Q874U9), um transportador de hexose de alta afinidade, ambos de *Aspergillus nidulans*. (Tabela 2).

Tabela 2. Proteínas selecionadas para alinhamento dos motivos específicos de ligação a açúcares.

	Acesso Uniprot	Acesso PDB	Método de seleção	Referência
LacY	P02920	1PV6	DALI, Literatura	(GUAN; KABACK, 2006; KABACK et al., 2011; KIMANIUS; LINDAHL; ANDERSSON, 2018; SERDIUK et al., 2014)
XylE	P0AGF4	4GBZ	MotifFinder, DALI, Literatura	(JIANG et al., 2019; QUISTGAARD et al., 2013; SUN et al., 2012; WISEDCHAISRI et al., 2014)
FucP	P115551	3O7Q	MotifFinder, DALI, Literatura	(DANG et al., 2010)
GLUT1	11166	4PYP	MotifFinder, Literatura	(DENG et al., 2014; PARK, 2015)
GLUT2	11168	-	MotifFinder	(THORENS, 2015; VAN DE BUNT; GLOYN, 2012)
GLUT3	11169	4ZWC, 4ZW9	BLASTp, DALI, Literatura	(PIKE et al., [s.d.]; SIMPSON et al., 2008)
GlcP _{se}	A0A0H2VG78		BLASTp, DALI	(IANCU et al., 2013)
PfHT1	O97467	6RW3	Literatura	(JIANG et al., 2020; SLAVIC et al., 2010)

STP10	Q9LT15	6H7D	DALI, Literatura	(ROTTMANN et al., 2016)
HXT1	P32465	-	BLASTp, Literatura	(MAIER et al., 2002; NIJLAND et al., 2014; SOUZA et al., 2012)
HXT2	P23585	-	BLASTp, Literatura	(KASAHARA; ISHIGURO; KASAHARA, 2004; MAIER et al., 2002)
MAL11	P53048	-	Literatura	(DE VALK et al., 2022)
GAL2	P13181	-	BLASTp, Literatura	(MAIER et al., 2002; TAMAYO ROJAS et al., 2021)
SNF3	P10870	-	Literatura	(CELENZA; MARSHALL-CARLSON; CARLSON, 1988; DIETVORST et al., 2010)
MstE	Q400D8	-	Literatura	(DOS REIS et al., 2013; FORMENT et al., 2006)
HxtA	Q874U9	-	Literatura	(DOS REIS et al., 2013; WEI et al., 2004)

O alinhamento de sequências proporcionou a possibilidade de visualização da conservação inter-espécies dos motivos específicos para a ligação a açúcares, como demonstrado na Figura 8.

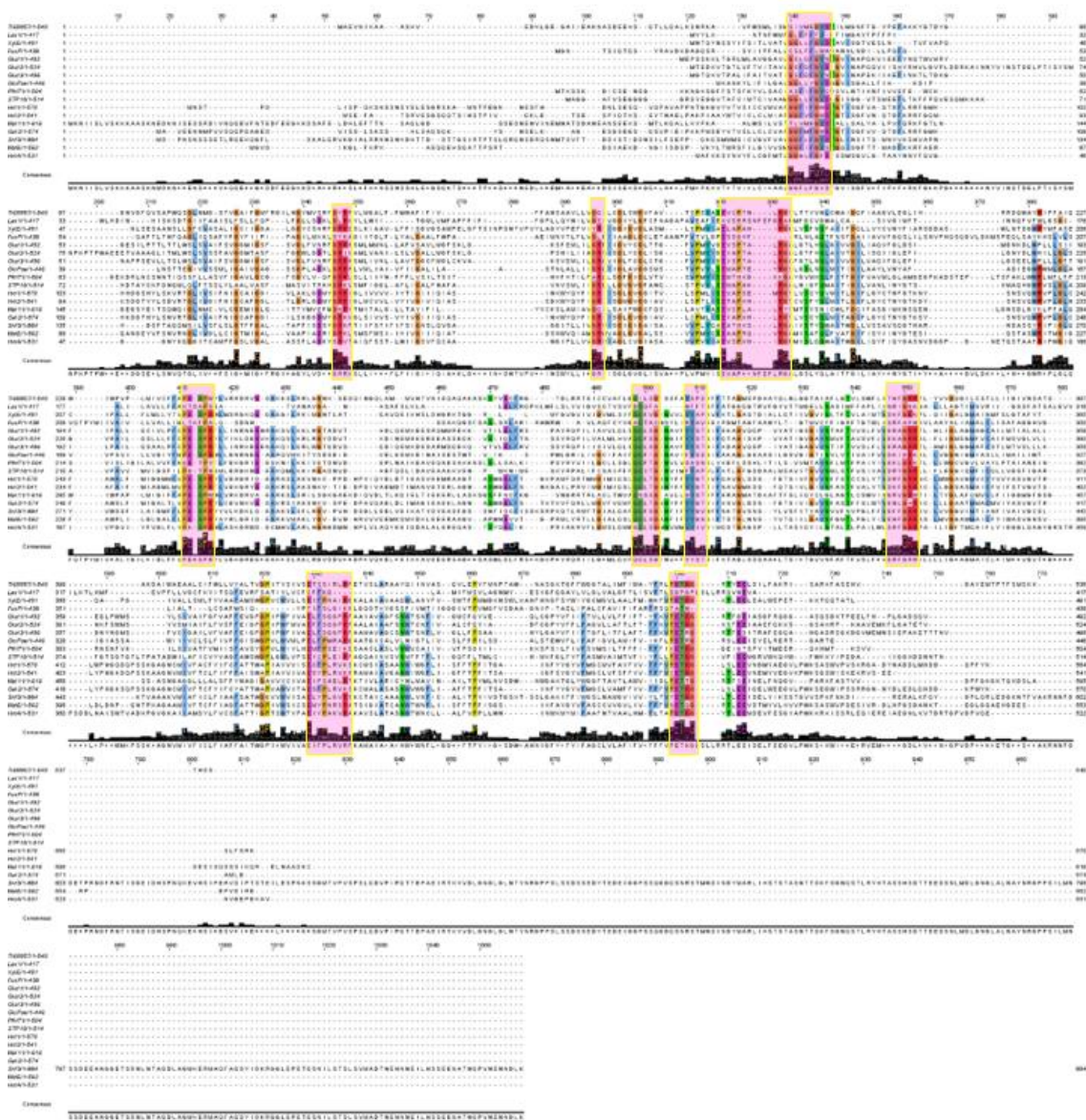


Figura 8. Alinhamento e seqüências entre Tr69957 e os transportadores selecionados no estudo. É possível perceber a baixa conservação geral das seqüências primárias, estando os motivos específicos destacados em rosa.

De acordo com a análise realizada no servidor ConSurf, (ASHKENAZY et al., 2016) para verificação do grau de conservação de cada resíduo de aminoácido entre as seqüências alinhadas, dos 540 resíduos que compõem o transportador Tr69957, 486 ultrapassavam o valor de cut-off, ou seja, possuíam informações suficientes com relação ao grau de conservação no conjunto de seqüências (Figura 9).



Figura 9. Conservação de aminoácidos na sequência primária de Tr69957. Na sequência, os resíduos mais avermelhados são mais conservados, enquanto os mais esverdeados são menos conservados, sendo os amarelos desprovidos de informação suficiente para determinação da conservação. b: resíduos enterrados na estrutura, e: resíduos expostos na estrutura, s: resíduos estruturais, f: resíduos funcionais.

Destes, 214 apresentavam escore > 5, acima do médio, destacando-se 56 deles com grau de conservação > 75% (escores 8 e 9) (Tabela 3). Alguns desses resíduos altamente conservados entre as diferentes sequências puderam ser classificados como

resíduos altamente conservados e expostos, os funcionais, e altamente conservados e enterrados, os estruturais. Os resíduos altamente conservados estruturais foram E61, G167, S244, A355, T359 e L382, que são mantidos em todas as sequências alinhadas, além de G200 e A257, que são conservados em 16 e 15 das 17 sequências utilizadas na análise. Da mesma maneira, os resíduos funcionais altamente conservados em todas as sequências alinhadas foram G127, S178, E179, N194, R221, E243, P245, R308, Q319, I320, S322, G323, G370, R371, E430, E495 e T496, enquanto os resíduos R186, G187, S324, R437, Y448, G498 e E503 foram mantidos em 16 das 17 sequências, e o resíduo S296 é conservado em 13 delas.

Tabela 3. Resíduos com alto grau de conservação em Tr69957, a partir de análise no ConSurf.

Posição	Resíduo	Escore normalizado	Exposição residual	Função	Variedade residual do MSA
61	E	-1.786	b	s	E, F, Y
62	G	-1.295	b		F, G, L
63	Y	-1.562	b		F, W, Y
108	G	-1.418	b		A, F, G
127	G	-1.585	e	f	G, S
158	G	-1.46	b		A, G, Y
159	Q	-1.674	b		L, Q, R, S
161	L	-1.488	b		I, L, V
163	G	-1.595	b		A, G
167	G	-2.01	b	s	G
176	Y	-1.48	b		F, L, Y
178	S	-1.419	e	f	A, E, G, P, S
179	E	-2.084	e	f	E, K
181	C	-1.272	b		A, C, S, T
186	R	-2.055	e	f	K, R
187	G	-1.302	e	f	A, G, Y
191	T	-1.263	b		G, I, N, S, T, V
194	N	-2.12	e	f	G, N, Q
197	W	-1.595	b		I, L, N, V, W
200	G	-1.934	b	s	G
201	Q	-1.369	b		A, I, L, Q
221	R	-1.295	e	f	H, K, P, R, W
229	I	-1.365	b		A, I, L, V
243	E	-1.501	e	f	D, E, K, T
244	S	-1.955	b	s	A, F, S, T
245	P	-1.918	e	f	P
257	A	-1.911	b	s	A, C, S
261	L	-1.259	b		I, L, M, V
296	S	-1.795	e	f	N, P, S, T
308	R	-1.283	e	f	A, I, P, R, V
319	Q	-1.934	e	f	A, D, Q, S

320	I	-2.158	e	f	I, N, Q
322	S	-1.302	e	f	A, F, I, S, T, V
323	G	-1.546	e	f	A, C, G
324	S	-1.951	e	f	A, N, S
329	S	-1.581	b		F, N, S, Y
334	F	-1.667	b		F, I, M, Y
355	A	-1.849	b	s	A, F, G, N
359	T	-1.981	b	s	M, N, R, T
366	I	-1.664	b		I, L, S, V
370	G	-1.574	e	f	A, D, G
371	R	-1.585	e	f	G, H, P, R
378	G	-1.688	b		A, G
382	L	-2.083	b	s	L, M, Q, V
401	A	-1.365	b		A, T, V
416	Y	-1.694	b		F, M, Y
421	G	-1.5	b		A, G, S
430	E	-1.716	e	f	C, E, T
437	R	-1.714	e	f	K, R
444	A	-1.436	b		A, C, K, N, S
448	Y	-1.564	e	f	L, N, Q, S, Y
459	E	-1.381	b		E, F, M, S, T, V
495	E	-1.835	e	f	A, E, G
496	T	-2.234	e	f	P, T
498	G	-1.549	e	f	G, P
503	E	-1.779	e	f	D, E, T

Ao analisar os motivos-chave relacionados com a ligação a açúcares descritos na literatura, relacionando-os com os resíduos de aminoácidos conservados no transportador Tr69957, nota-se que vários destes resíduos fazem parte dos fragmentos de sequência considerados importantes para a interação com os carboidratos (JOOST; THORENS, 2001; PENG et al., 2018). O motivo de ligação de açúcares GGxxxGxD apresenta-se como a sequência SIVMEGYD 57-64, encontrada na primeira hélice transmembrana predita, quando comparado com as outras sequências utilizadas no alinhamento, sendo os resíduos E61 (estrutural), G62 e Y63 altamente conservados no conjunto. O motivo GRR/K apresenta-se conservado nas posições 126-128, conforme a sequência GYR em uma região predita como citosólica, sendo o resíduo G127 funcionalmente conservado. Da mesma forma, o motivo GR apresenta-se na sequência altamente conservada do Tr69957 como GQ, nas posições 158-159 da quarta hélice transmembrana, enquanto o motivo ExxxxxRG é encontrado nas posições 179-187 do domínio citosólico da proteína, na sequência EVCPTNLRG, sendo os resíduos E179 (funcional), C181, R186 (funcional) e G187 (funcional) altamente conservados, além do resíduo predito como funcional S178, que precede este motivo. O motivo de ligação PxxPR é encontrado na sexta hélice, nas posições 242-246, na sequência PESPW,

cujos resíduos E243 (funcional), S244 (estrutural) e P245 (funcional) são classificados como sendo altamente conservados. O motivo QQLxG encontrado como QILSG nas posições 319-323 (sétima hélice transmembrana) apresenta alto grau de conservação nos resíduos Q319 (funcional), I320 (funcional), S322 (funcional) e G323 (funcional). Já o motivo YYxP/T é visto como YSPS nas posições 328-331 (sétima hélice transmembrana), cujo resíduo S329 é dito como altamente conservado, enquanto o motivo D/ExxGRR é verificado nas posições 367-372 (domínio intracelular) como THFGRR, sendo G370 (funcional) e R371 (funcional) classificados com alto grau de conservação. Por fim, os motivos ExxxxxR/K e PETKG são encontrados nas posições 430-437 (porção intracelular), como ETSSIRLR, e 494-498 (domínio intracelular, como PETKG, respectivamente, sendo os resíduos E430 (funcional), R437 (funcional), E495 (funcional), T496 (funcional) e G498 (funcional) altamente conservados entre as sequências utilizadas no alinhamento (Figura 10).

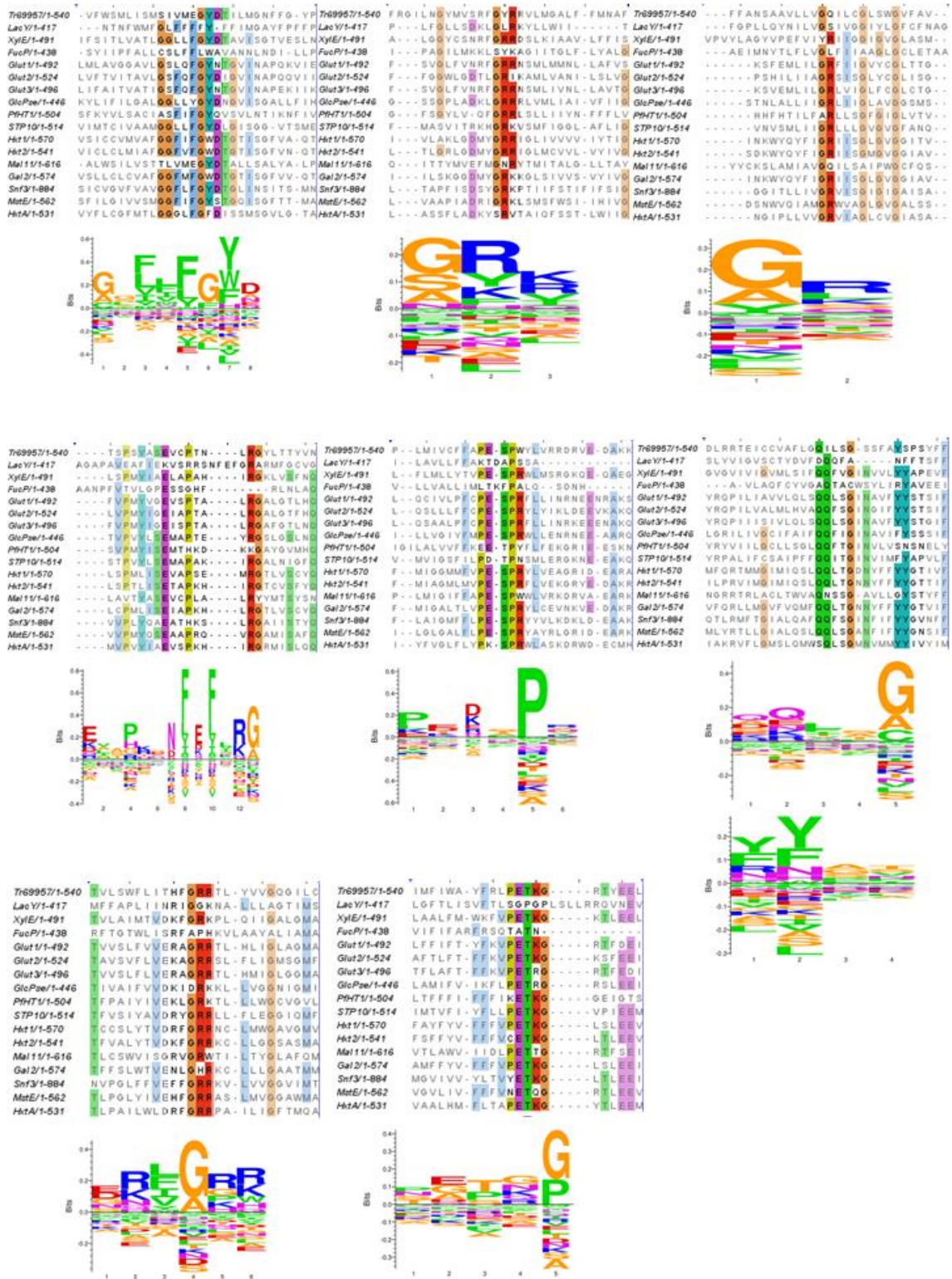


Figura 10. Conservação dos motivos específicos de ligação a açúcares entre Tr69957 e os transportadores selecionados no estudo. Alinhamento de seqüências e logo de motivos conservados inter-espécies.

Assim, levando em consideração os resultados obtidos a partir do alinhamento de sequências e da comparação estrutural entre as diversas proteínas MFS selecionadas para este alinhamento (Figura 11), é possível concluir que, embora haja pouca identidade entre os aminoácidos que compõem o transportador Tr69957 e as outras sequências, a cadeia alfa dos biopolímeros é preservada, permitindo a conservação de sua função quando compara-se com outros transportadores de açúcar da mesma família. Além da manutenção da funcionalidade e estrutura de certos resíduos, o Tr69957 compartilha motivos de ligação de carboidratos específicos com outros MFS e, se a conservação completa do resíduo não for obedecida, a divergência entre os aminoácidos que constituem certos motivos respeita o comportamento da cadeia lateral, possibilitando o transporte adequado de açúcares através da proteína transmembrana.

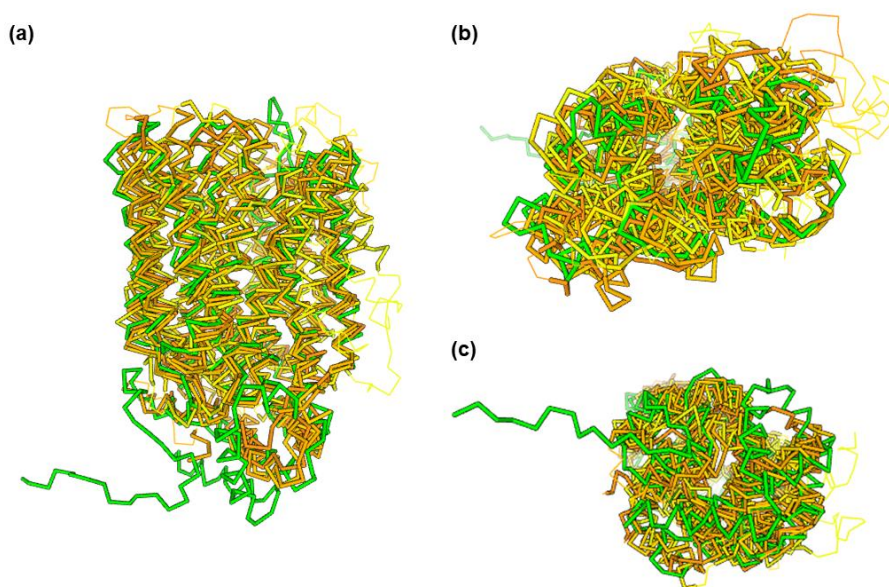


Figura 11. Alinhamento tridimensional de Tr69957 e os outros transportadores selecionados no estudo. Alinhamento das estruturas terciárias entre o Tr69957 (verde) e os outros transportadores (Tabela 2) (alaranjado-amarelo) em visão frontal (a), superior (b) e inferior (c).

b. Sítios de fosforilação preditos em Tr69957

Com o intuito de identificar os resíduos de serina, treonina e tirosina fosforiláveis no transportador Tr69957, foi realizada a predição dos sítios de fosforilação encontrados na proteína, por meio do servidor NetPhos 3.1 (BLOM et al., 2004), cuja busca retornou 20 sítios de fosforilação com probabilidade > 75%, representados na Figura 5 e na Tabela 4.

Tabela 4. Sítios preditos de fosforilação (NetPhos 3.1) em Tr69957, indicando a possível cinase envolvida.

Posição	Resíduo	Fragmento	Escore	Cinase
11	S	KAAASHVED	0.995	inespecífica
29	S	AKNASDEEH	0.996	inespecífica
43	S	QALKSNRKA	0.884	PKC
63	Y	VMEGYDTIL	0.86	inespecífica
192	Y	YLTTYVNLC	0.871	inespecífica
260	S	DAKKSLRRL	0.966	inespecífica
260	S	DAKKSLRRL	0.765	PKC
296	S	KASKSYVEC	0.977	inespecífica
329	S	SFAYSPSYF	0.908	inespecífica
340	S	TAGMSPDHA	0.972	inespecífica
373	T	FGRRTLYVV	0.909	inespecífica
397	S	NSATSAKDA	0.998	inespecífica
419	T	VYALTVGPI	0.798	PKC
429	S	YSIVSETSS	0.936	inespecífica
432	S	VSETSSIRL	0.986	inespecífica
471	S	AWNASGKTG	0.913	inespecífica
513	S	AKRISARKF	0.983	inespecífica
525	Y	HVDAYEMTP	0.878	inespecífica
532	S	TPTFSMSKK	0.816	PKC
534	S	TFSMSKKTH	0.979	inespecífica
539	S	KKTHSS---	0.823	inespecífica

Interessantemente, os resíduos fosforiláveis Y63, S296 (funcional) e S329 foram classificados como sendo altamente conservados entre as sequências previamente utilizadas no alinhamento. Além disso, alguns dos sítios de fosforilação preditos fazem parte de motivos-chave de ligação a açúcares. Por exemplo, Y63 faz parte do motivo GGxxxGxD, S329 participa da constituição do motivo YYxP/T e S432 é um dos componentes do motivo ExxxxxR/K. Além destes, resíduos outros resíduos preditos como fosforiláveis fazem parte dos motivos-chave de ligação aos açúcares, como o T373, que participa do motivo D/ExxGRR e S429, que também participa do motivo ExxxxxR/K (Figura 12).

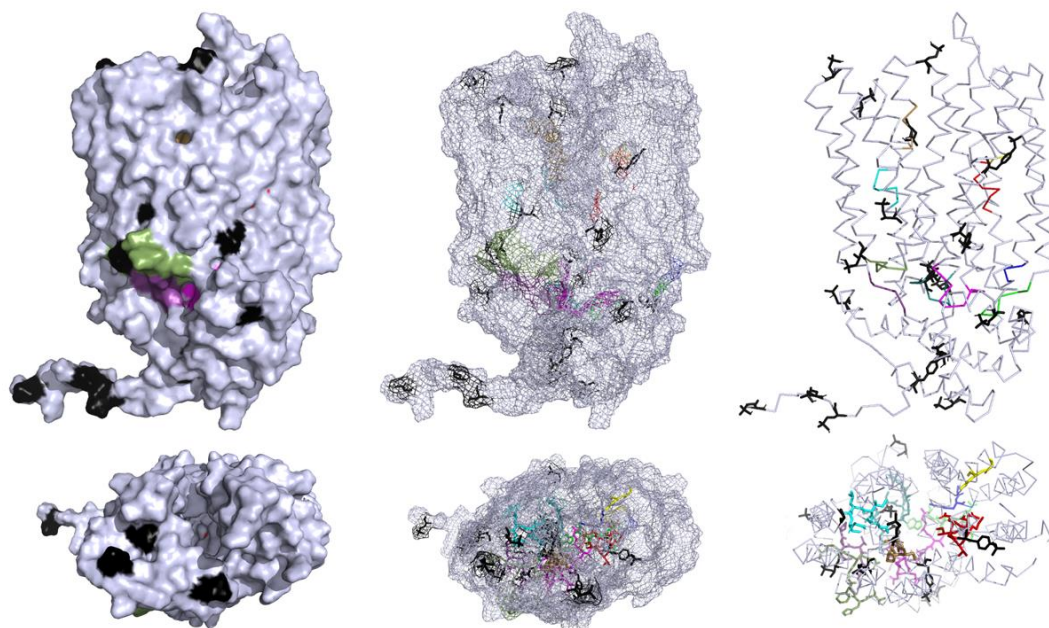


Figura 12. Representação tridimensional da disposição dos sítios de fosforilação e dos motivos específicos de ligação a açúcares. Os sítios de fosforilação preditos estão representados em preto, juntamente com os motivos específicos GGxxxGxD (vermelho), GRR/K (azul), GR (amarelo), ExxxxxRG (magenta), PxxPR (verde), QLxG (ciano), YYxP/T (marrom), D/ExxGRR (verde escuro), ExxxxxR/K (verde-água) e PETKG (violeta).

Para a comparação da estrutura dos sítios de fosforilação possuindo o grupamento fosfato com o modelo selvagem do Tr69957, um modelo tridimensional fosforilado *in silico*, nos 20 sítios de fosforilação preditos, foi construído, devidamente validado e refinado (Figura 13). Interessantemente, alguns resíduos interagem entre si quando se apresentam fosforilados. Os resíduos S429 e S432, quando fosforilados, realizam interações polares entre o oxigênio do grupo carbonila da S429 e a hidroxila do grupamento fosfato adicionado no mesmo resíduo, assim como o oxigênio da carbonila da S429 e a hidroxila do fosfato adicionado no resíduo S432, e a hidroxila do fosfato da S432 com o NH₂ do mesmo resíduo. Um comportamento semelhante é observado no resíduo Y525 que, apesar de estar na região C-terminal da proteína, realiza uma interação consideravelmente íntima com o resíduo S29, da região N-terminal, fazendo uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio de seu fosfato e o oxigênio do fosfato adicionado em S29. Outrossim, ao analisar o posicionamento dos sítios de fosforilação preditos no modelo tridimensional do transportador Tr69957, foi possível verificar a presença dos resíduos fosforiláveis S260 e T373, quando fosforilados, localizados a menos de 3,5 Å de distância das porções sequenciais que constituem os motivos-chave citados acima, sendo S260 (1,7 Å) passível de interação com o resíduo E243 e T373 (3,2 Å) com o resíduo E495, sendo ambos resíduos funcionais dos motivos PxxPR e PETKG, respectivamente. A participação de resíduos fosforiláveis em motivos

de ligação de açúcares ou próximos a esses motivos pode sugerir a regulação do transporte e especificidade de interação com certos carboidratos, visto que esses motivos são citados como importantes para a especificidade e afinidade entre os diferentes açúcares do meio (CHANG et al., 2011; LLOYD et al., 2017; TSAY, 2014b; YUAN et al., 2022).

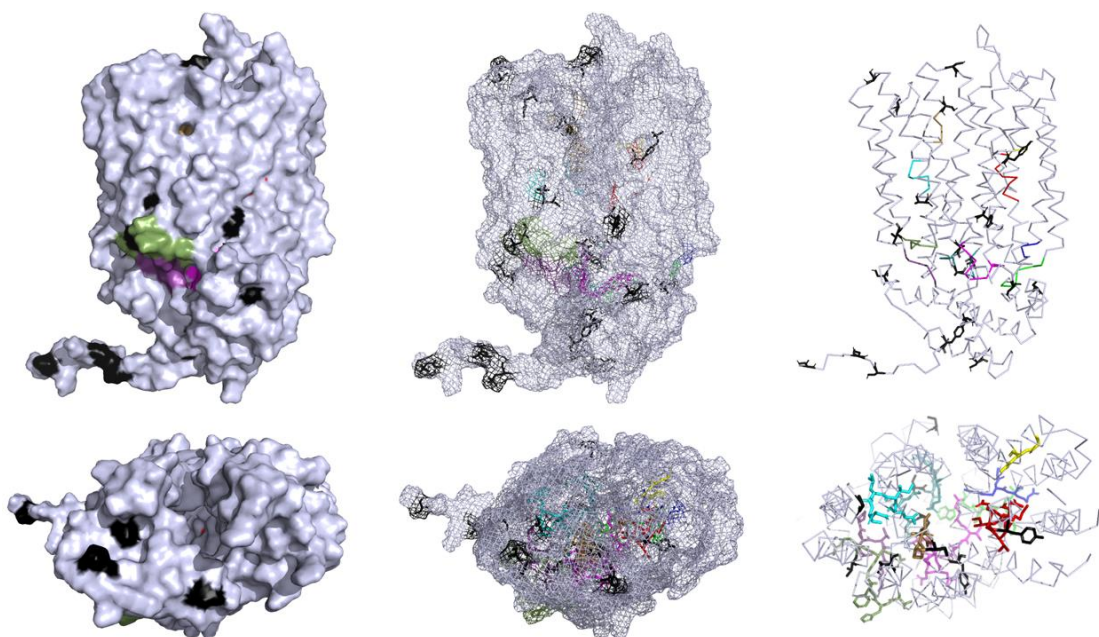


Figura 13. Representação tridimensional da disposição dos sítios de fosforilação e dos motivos específicos de ligação a açúcares no modelo fosforilado in silico de Tr69957. Os sítios de fosforilação preditos e fosforilados *in silico* estão representados em preto, juntamente com os motivos específicos GGxxxGxD (vermelho), GRR/K (azul), GR (amarelo), ExxxxxxRG (magenta), PxxPR (verde), QQLxG (ciano), YYxP/T (marrom), D/ExxGRR (verde escuro), ExxxxxR/K (verde-água) e PETKG (violeta).

As proteínas transmembrana têm sua estrutura estabilizada devido à sua inserção na bicamada lipídica, que funciona como um campo de força ao redor desta biomolécula, proporcionando limitação de flutuações na sua conformação. Assim, é possível perceber que a fosforilação dos resíduos identificados como presentes nos segmentos posicionados na porção interna da proteína, ou seja, na região transmembrana não exposta a cavidades, é bastante limitada após a alocação adequada da biomolécula na membrana celular. Embora a fosforilação seja um evento mais comumente associado com os domínios intracelulares de proteínas transmembrana, as porções extracelulares dos transportadores transmembrana podem sofrer essa modificação pós-traducional quando esses agem como transceptores, por exemplo, apresentando função dupla. Essa fosforilação pode ser resultante da ação de

proteínas quinases localizadas no meio extracelular, podendo ser ligadas à membrana ou secretadas (CUI et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2019). Sendo assim, na face extracelular da proteína, foram identificados os resíduos de serina nas posições 397 e 471 como potenciais sítios de fosforilação (Figura 5).

A fosforilação dos resíduos de aminoácidos expostos ao túnel ou canal do transportador também pode desempenhar papéis importantes, como a modulação da atividade do transportador (DREW; BOUDKER, 2016; YAN, 2015), impactando no mecanismo de “gating” ou alterando as interações entre as moléculas transportadas e o transportador. As cavidades presentes no transportador Tr69957 foram identificadas por meio da ferramenta KVfinder e, juntamente com a análise através da plataforma CaverWeb, foi possível a identificação de seis túneis que fazem a comunicação entre o meio extracelular e a porção mais estreita do interior da proteína (Figura 14c), e sete túneis que fazem a comunicação do maior estreitamento interno da proteína até o meio intracelular (Figura 15c), aqui denominados de túneis externos e internos, respectivamente.

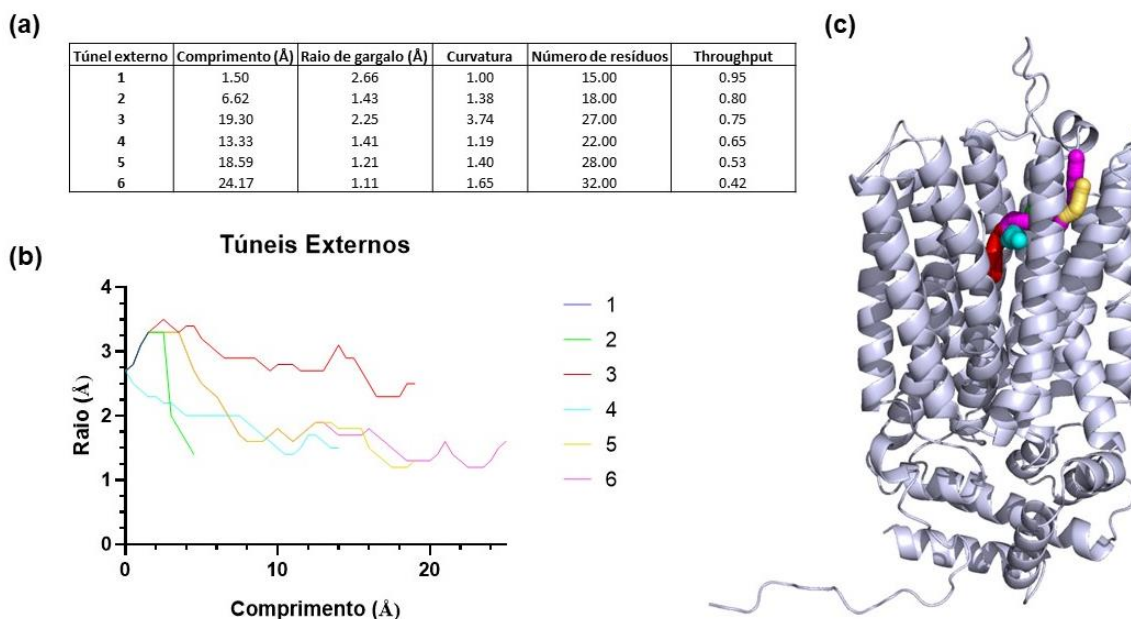


Figura 14. Túneis identificados no transportador Tr69957 como passíveis de comunicação com o meio extracelular. (a) características dos túneis 1 ao 6; (b) perfil dos túneis 1 ao 6, com variações nos seus comprimentos e raios; (c) visualização tridimensional da linha central de cada um dos túneis externos preditos.

Com relação aos seis túneis externos, seus comprimentos variaram de 1,5 (túnel 1) a aproximadamente 24 Å (túnel 6), com menor raio de gargalo, ou seja, máximo afunilamento de aproximadamente 1 Å (túnel 6), e maior gargalo de 2,7 Å (túnel 1)

(Figura 2a-b). A análise dos possíveis túneis formados a partir dos bolsos preditos para o transportador Tr69957 permitiu a verificação dos aminoácidos que podem compô-los, como apresentado nas Tabelas 5 e 6. Os gargalos dos túneis mais externos à proteína são compostos por uma variedade de quantidades e tipos de aminoácidos entre si, conforme mostrado na Tabela 1, sendo os resíduos T65, I66 e G69 formadores simultâneos dos gargalos dos túneis 1, 2 e 3, da mesma forma que o resíduo N70 forma simultaneamente os gargalos dos túneis 1, 2, 5 e 6. O resíduo W197 forma os gargalos dos túneis 1 e 3, enquanto os resíduos L208, I212 e Y345 originam os gargalos dos túneis 5 e 6. Da mesma maneira, os resíduos Y328 e P330 participam dos gargalos dos túneis 1 e 4, sendo o resíduo N348 formador do gargalo dos túneis 1 e 2. Dentre os aminoácidos que compõem os seis túneis preditos, o resíduo de serina na posição 329 foi verificado em todos os túneis, sendo, além disso, predito como potencial sítio de fosforilação, participante do motivo de ligação YYxP/T e parte do gargalo do túnel 1.

Tabela 5. Resíduos formadores dos túneis que fazem comunicação entre o centro do Tr69957 e o meio extracelular.

Túnel 1		Túnel 2		Túnel 3		Túnel 4		Túnel 5		Túnel 6	
Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.
65	THR ¹	65	THR ¹	65	THR ¹	65	THR	65	THR	65	THR
66	ILE ¹	66	ILE ¹	66	ILE ¹	66	ILE	66	ILE	66	ILE
68	MET	67	LEU	68	MET	69	GLY	68	MET	68	MET
69	GLY ¹	68	MET	69	GLY ¹	70	ASN	69	GLY	69	GLY
70	ASN ¹	69	GLY ¹	70	ASN	197	TRP	70	ASN ¹	70	ASN ¹
102	ASN	70	ASN ¹	72	PHE	201	GLN	102	ASN	71	PHE
197	TRP ¹	71	PHE	102	ASN	327	ALA	197	TRP	73	GLY
201	GLN	102	ASN	103	MET	328	TYR ¹	201	GLN	74	TYR
325	SER	197	TRP	105	SER	329	SER*	202	PHE	75	PRO
328	TYR ¹	201	GLN	106	THR	330	PRO ¹	204	ALA	102	ASN
329	SER* ¹	208	LEU	159	GLN	331	SER	205	ALA	197	TRP
330	PRO ¹	325	SER	166	TRP	346	GLN	206	GLY	201	GLN
331	SER	328	TYR	197	TRP ¹	347	LEU	208	LEU ¹	202	PHE
348	ASN ¹	329	SER*	201	GLN	348	ASN	209	GLU	204	ALA
456	GLN	330	PRO	319	GLN	349	LEU	212	ILE ¹	205	ALA
		331	SER	320	ILE	350	GLY	325	SER	206	GLY
		348	ASN ¹	324	SER	351	GLY	328	TYR	208	LEU ¹
		456	GLN	325	SER	352	THR	329	SER*	209	GLU
				328	TYR	354	ILE	330	PRO	212	ILE ¹
				329	SER*	409	CYS	331	SER	325	SER
				330	PRO	410	ILE	344	ALA	328	TYR
				348	ASN	413	LEU	345	TYR ¹	329	SER*
				416	TYR			346	GLN	330	PRO
				448	TYR			347	LEU	331	SER
				449	GLN			348	ASN	344	ALA
				452	ASN			349	LEU	345	TYR ¹

456	GLN	352	THR	346	GLN
		456	GLN	347	LEU
				348	ASN
				349	LEU
				352	THR
				456	GLN

* resíduos preditos como fosforiláveis;

¹ resíduos preditos como gargalos dos referidos túneis.

Ao analisar os túneis externos do transportador Tr69957, é possível perceber que o motivo YYxP/T (YSPS) está presente em todos os túneis preditos, contendo o resíduo fosforilável S329 em sua sequência. Além disso, no túnel 3, é possível encontrar o aminoácido Q159 e os resíduos Q319 e I320, participantes dos motivos GR (GQ) e QQLxG (QILSG), respectivamente. Da mesma maneira, ao verificar os resíduos fosforiláveis capazes de realizar interações polares (<3,0 Å) com os aminoácidos que compõem os túneis externos preditos, constata-se que Y63 interage com a I66 (2,6 Å) dos túneis 1, 2, 3, 5 e 6, além de interagir com a L67 (2,4 Å) do túnel 2. Além deste, o resíduo S340 pode interagir com a A344 (2,7 Å) dos túneis 5 e 6, enquanto a T419 interage com Y416 (2,6 Å) no túnel 3 (Figura 15).

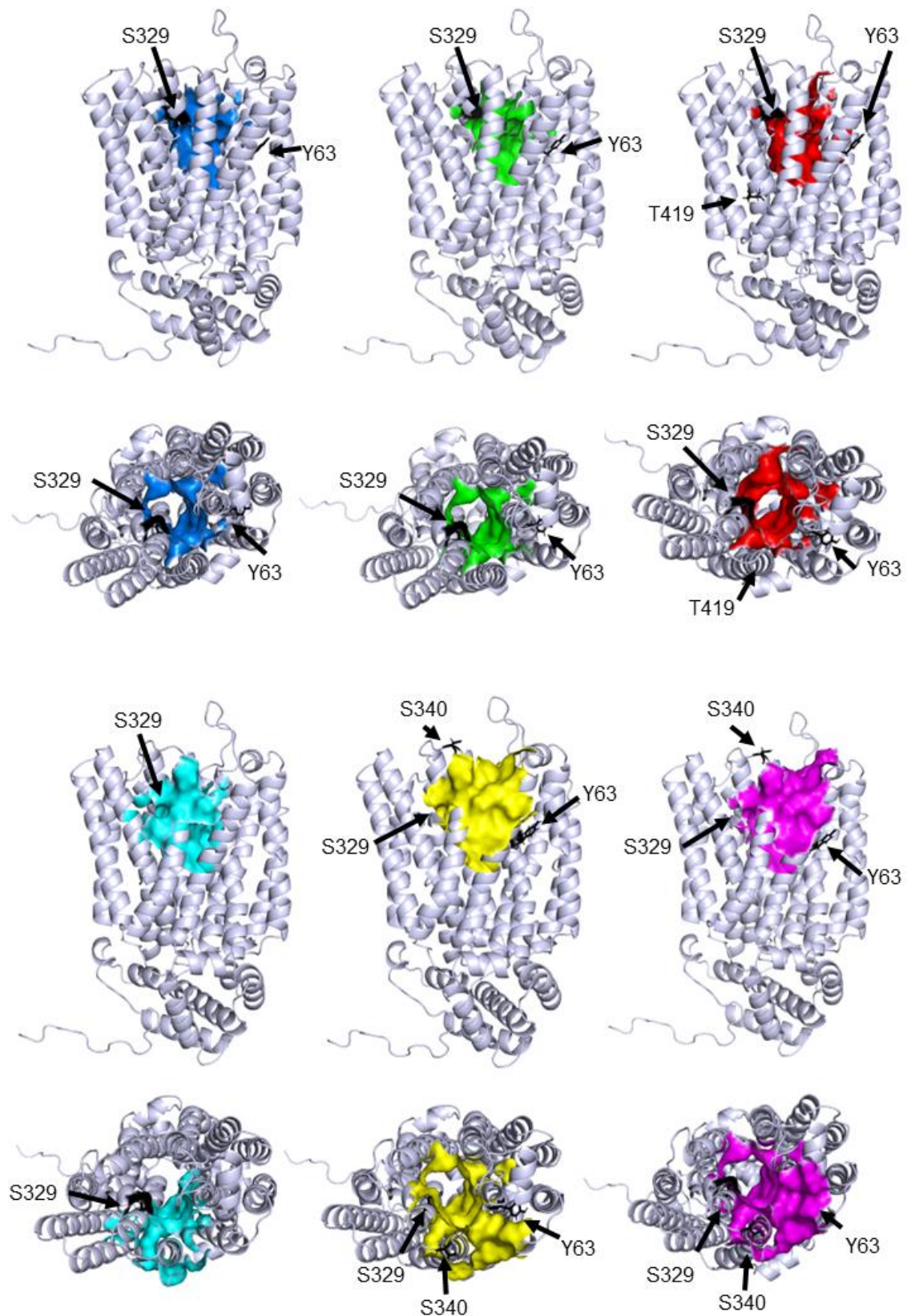


Figura 15. Ocupação dos túneis que fazem comunicação entre o centro da proteína e o meio extracelular em Tr69957. Em vista frontal e superior. Os resíduos fosforiláveis estão indicados por setas. Azul: túnel 1, verde: túnel 2, vermelho: túnel 3, ciano: túnel 4, amarelo: túnel 5, fúcsia: túnel 6.

A análise dos sete túneis internos mostrou uma variação de 10,6 Å (túnel 1) a 37,9 Å (túnel 7) de comprimento, com raio de máximo estreitamento variando entre 0,9 Å (túneis 4, 5, 6 e 7) e 1,3 Å (túnel 1) (Figura 16). Como observado na Tabela 6, dentre os aminoácidos que participam na formação dos sete túneis aqui identificados, o gargalo do túnel 1 é composto pelos resíduos A28, S29, D30, E32, H33, T183, M279, T500 e Y525, enquanto o gargalo do túnel 2 é constituído por E24, N27, A28, S29, E31, K268, D271, G275 e Q276, o estreitamento do túnel 3 pelos resíduos S29, M279, T500, E502, E503, A524 e Y525, enquanto o gargalo do túnel 4 é composto por S43, N44, L264, G265, G266, N267, K268 e Q276. Os túneis internos 5, 6 e 7 compartilham do mesmo estreitamento, sendo esse gargalo constituído pelos resíduos S29, M279, H282, T283, T500, E502, E503, I506, A524 e Y525. De todos estes resíduos que constituem regiões de gargalo dos túneis internos, os resíduos S29 (túneis 1, 2, 3, 5, 6 e 7), S43 (túnel 4) e Y525 (túneis 1, 3, 5, 6 e 7) foram preditos como passíveis de fosforilação.

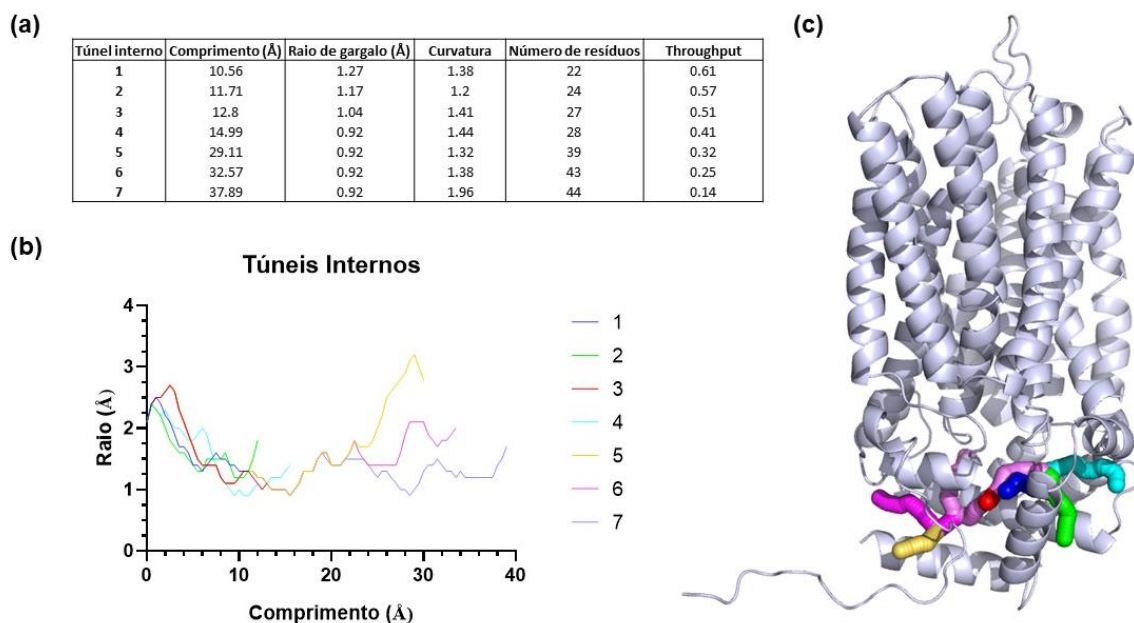


Figura 16. Túneis identificados no transportador Tr69957 como passíveis de comunicação com o meio intracelular. (a) características dos túneis 1 ao 7; (b) perfil dos túneis 1 ao 7, com variações nos seus comprimentos e raios; (c) visualização tridimensional da linha central de cada um dos túneis internos preditos.

Tabela 6. Resíduos formadores dos túneis que fazem comunicação entre o centro do Tr69957 e o meio intracelular.

Túnel 1		Túnel 2		Túnel 3		Túnel 4		Túnel 5		Túnel 6		Túnel 7	
Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.	Pos.	Res.
25	ALA	24	GLU ¹	25	ALA	28	ALA	3	GLU	1	MET	6	ILE
28	ALA ¹	25	ALA	26	LYS	29	SER*	6	ILE	2	ALA	25	ALA
29	SER* ¹	26	LYS	28	ALA	32	GLU	25	ALA	3	GLU	28	ALA

30	ASP ¹	27	ASN ¹	29	SER* ¹	35	GLN	28	ALA	5	ASN	29	SER* ¹
31	GLU	28	ALA ¹	32	GLU	42	LYS	29	SER* ¹	6	ILE	32	GLU
32	GLU ¹	29	SER* ¹	44	ASN	43	SER* ¹	32	GLU	25	ALA	44	ASN
33	HIS ¹	31	GLU ¹	179	GLU	44	ASN ¹	44	ASN	28	ALA	124	SER
44	ASN	32	GLU	180	VAL	45	ARG	179	GLU	29	SER* ¹	179	GLU
181	CYS	44	ASN	181	CYS	47	ALA	180	VAL	32	GLU	180	VAL
182	PRO	181	CYS	182	PRO	180	VAL	181	CYS	44	ASN	181	CYS
183	THR ¹	182	PRO	183	THR	181	CYS	182	PRO	179	GLU	182	PRO
184	ASN	183	THR	184	ASN	182	PRO	183	THR	180	VAL	183	THR
246	TRP	184	ASN	186	ARG	183	THR	184	ASN	181	CYS	184	ASN
261	LEU	246	TRP	246	TRP	184	ASN	186	ARG	182	PRO	186	ARG
268	LYS	261	LEU	261	LEU	246	TRP	246	TRP	183	THR	246	TRP
276	GLN	268	LYS ¹	268	LYS	261	LEU	261	LEU	184	ASN	250	ARG
279	MET ¹	271	ASP ¹	276	GLN	264	LEU ¹	268	LYS	186	ARG	251	ARG
280	MET	272	GLN ¹	279	MET ¹	265	GLY ¹	276	GLN	246	TRP	261	LEU
500	THR ¹	273	ILE	280	MET	266	GLY ¹	279	MET ¹	261	LEU	268	LYS
501	TYR	275	GLY ¹	283	THR	267	ASN ¹	280	MET	268	LYS	276	GLN
502	GLU	276	GLN ¹	434	ILE	268	LYS ¹	282	HIS ¹	276	GLN	279	MET ¹
525	TYR* ¹	279	MET	500	THR ¹	269	SER	283	THR ¹	279	MET ¹	280	MET
		280	MET	501	TYR	272	GLN	286	ILE	280	MET	282	HIS ¹
		501	TYR	502	GLU ¹	273	ILE	434	ILE	282	HIS ¹	283	THR ¹
				503	GLU ¹	276	GLN ¹	500	THR ¹	283	THR ¹	284	VAL
				524	ALA ¹	279	MET	501	TYR	286	ILE	285	ASN
				525	TYR* ¹	280	MET	502	GLU ¹	290	GLN	286	ILE
						501	TYR	503	GLU ¹	292	LYS	287	GLU
								506	ILE ¹	304	THR	288	GLN
								510	LYS	308	ARG	290	GLN
								522	VAL	434	ILE	295	LYS
								523	ASP	500	THR ¹	308	ARG
								524	ALA ¹	501	TYR	433	SER
								525	TYR* ¹	502	GLU ¹	434	ILE
								526	GLU	503	GLU ¹	435	ARG
								527	MET	505	ASP	436	LEU
								528	THR	506	ILE ¹	500	THR ¹
								529	PRO	509	ALA	501	TYR
								530	THR	510	LYS	502	GLU ¹
										511	ARG	503	GLU ¹
										523	ASP	505	ASP
										524	ALA ¹	506	ILE ¹
										525	TYR* ¹	524	ALA ¹
												525	TYR* ¹

* resíduos preditos como fosforiláveis;

¹ resíduos preditos como gargalos dos referidos túneis.

É interessante notar que os motivos-chave visualizados nas Figuras 8 e 9 se situam nas regiões de possível comunicação entre os túneis externos e internos, localizados cerca das porções de estreitamento dos mesmos. Dentre os resíduos que compõem gargalos dos 7 túneis internos, verifica-se que alguns fazem parte de motivos-chave de ligação a açúcares, sendo o motivo ExxxxxRG (EVCPTNLRG) representado em todos os túneis internos, assim como acontece com o resíduo W246, parte do motivo PxxPR (PESPW). Além desses, A I434, parte do motivo ExxxxxR/K (ETSSIRLR, é

observada como parte dos túneis 3, 5 6 e 7, sendo este último constituído também por S433, R435 e L436, do mesmo motivo. Da mesma forma, analisando-se os resíduos fosforiláveis em um espaço de 3,0 Å com relação aos resíduos que fazem parte dos túneis internos, foi constatada somente a presença de S260, que faz uma interação polar com L264 (2,0 Å), do túnel 4 (Figura 17). Assim, levando em consideração a presença de resíduos fosforiláveis vicinais e/ou adjacentes aos túneis internos e externos, além da participação destes nas regiões de estreitamento dos mesmos, é possível sugerir que a fosforilação pode ser essencial para a seletividade do transportador.

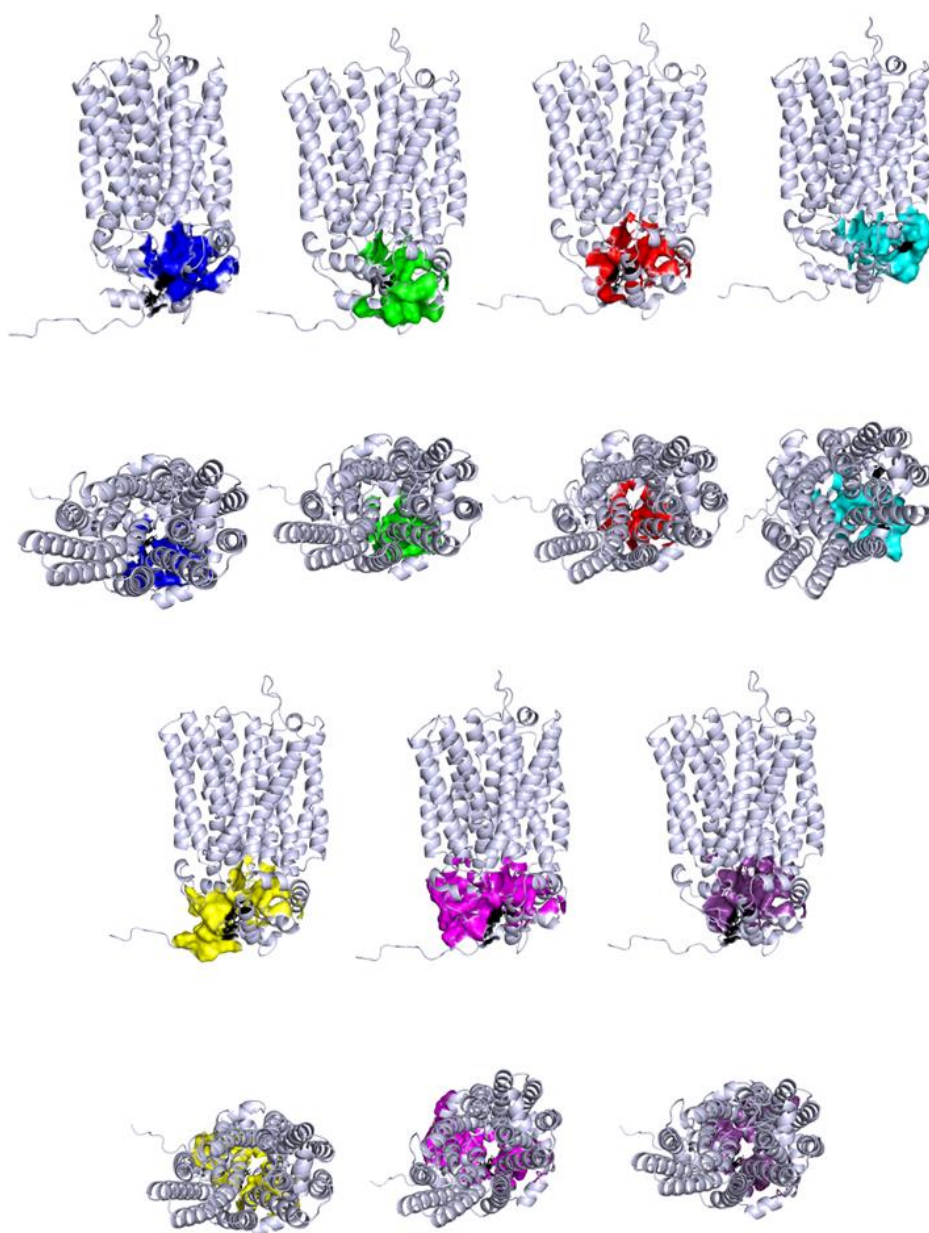


Figura 17. Ocupação dos túneis que fazem comunicação entre o centro da proteína e o meio intracelular em Tr69957. Em vista frontal e superior. Os resíduos fosforiláveis estão

indicados por setas. Azul: túnel 1, verde: túnel 2, vermelho: túnel 3, ciano: túnel 4, amarelo: túnel 5, fúcsia: túnel 6, violeta: túnel 8.

Além disso, a fosforilação de resíduos dos túneis da proteína transmembrana ou próximos a eles poderia induzir mudanças conformacionais que podem facilitar a ligação de proteínas regulatórias ou modular a interação com proteínas envolvidas na transdução de sinais, um mecanismo intracelular (PEDERSOLI et al., 2021; TAMAYO ROJAS et al., 2021). A fosforilação está envolvida como participante na indução de cascatas de transdução de sinal, afetando direta ou indiretamente a produção de enzimas, inclusive de celulasas e hemicelulasas, e normalmente se encontra em sítios de fosforilação compostos por múltiplos aminoácidos próximos entre si em regiões desordenadas da proteína, ou seja, de conformação menos específicas, como os “loops”. No caso do Tr69957, é possível verificar situação semelhante com os resíduos de aminoácidos localizados na porção C-terminal da proteína (S513, Y525, S532, S534 e S539), uma região altamente desordenada e com menor impedimento físico para a ocorrência de flutuações em sua conformação, influenciando na sua interação com outras proteínas participantes de vias de sinalização.

c. Análises de *docking* e transporte *in silico* de Tr69957

A fosforilação das porções externas da proteína transmembrana pode afetar sua atividade transportadora por influenciar sua afinidade com o ligante e, somando-se com a possibilidade de a adição de grupamentos fosfato em resíduos de aminoácidos expostos aos seus túneis poder afetar substancialmente a seletividade do transportador pelo substrato a ser transportado, criando novos sítios de ligação ou modificando os já existentes (BERGDAHL et al., 2013; CAO et al., 2011; HUMPHREY; JAMES; MANN, 2015; VERCOE; KOCHERGINSKAYA; WHITE, 2003), as análises de *docking* foram realizadas com o intuito de comparar-se a afinidade dos carboidratos celobiose, frutose, lactose, trealose, xilose, maltose e manose entre as proteínas fosforiladas *in silico* nos 20 sítios de fosforilação preditos contra o modelo tridimensional selvagem de Tr69957.

Primeiramente, para a validação dos estudos de *docking in silico* aqui mencionados, foi utilizada a estrutura resolvida do transportador GLUT3 de *Homo sapiens* ligada à maltose (4ZWC) e à glicose (4ZW9), visto que, além de este transportador ter sido o com maior identidade ao Tr69957, possuindo estrutura tridimensional determinada, ele (4ZW9) apresentou o maior escore Z (*Z-score*) na análise realizada pela ferramenta Dali (39,2). Assim, a validação do *docking* foi realizada por meio das metodologias de *re-docking* e *cross-docking*, permitindo o seguimento do processo. A re-docagem da glicose na estrutura 4ZW9 resultou em um RMSD de 0,39

À entre a glicose de referência (cristalografada juntamente com a estrutura proteica de GLUT3) e a molécula cujo docking foi realizado novamente, apresentando somente uma interação adicional entre dois doadores, sendo não favorável, conforme ilustrado na Figura 18.

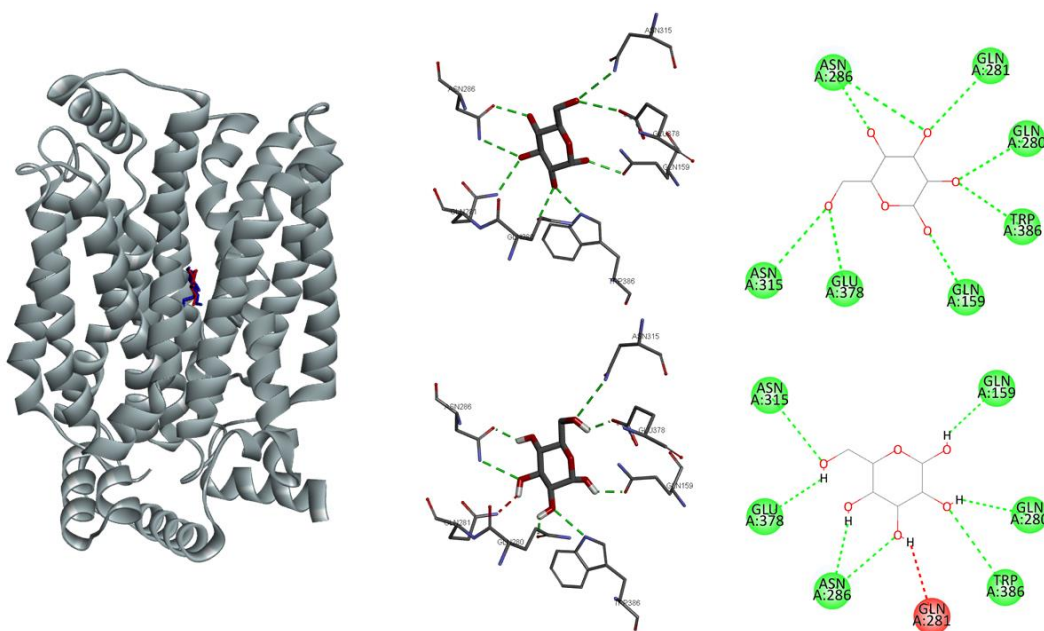


Figura 18. Re-docking de 4ZW9 com glicose. Comparação entre as duas glicoses (docada e redocada) juntamente com a representação tridimensional de suas interações com os resíduos que compõem a proteína.

Da mesma forma, a re-docagem da maltose na estrutura 4ZWC resultou em um RMSD de 1,69 Å, conforme a Figura 19, havendo a perda da interação com Q280, apenas. Dessa maneira, os experimentos de *docking* foram inicialmente validados no software AUTODOCK4.

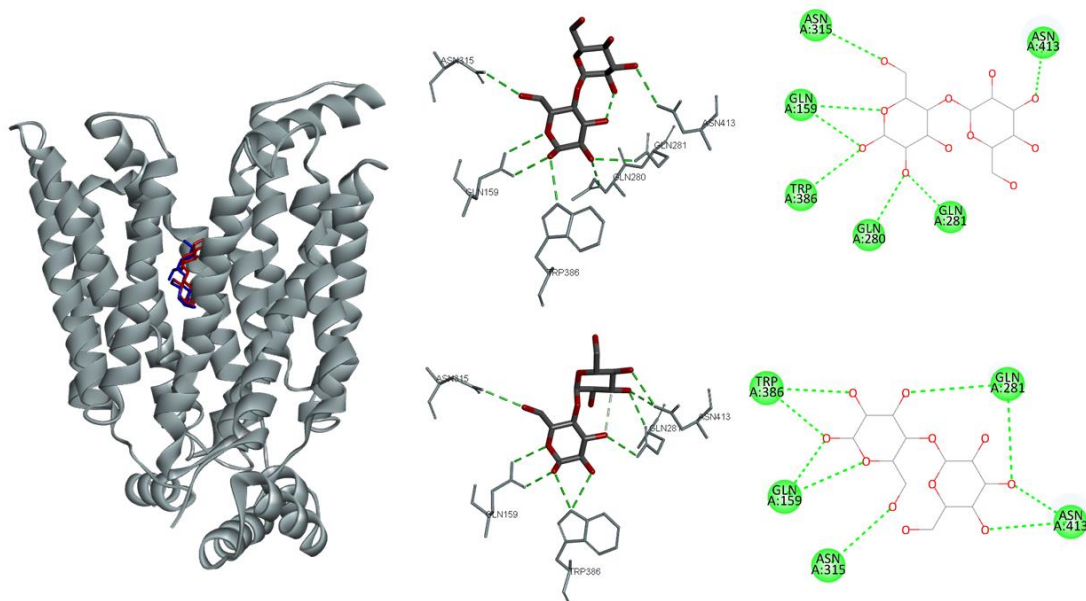


Figura 19. Re-docking de 4ZWC com maltose. Comparação entre as duas maltoses (docada e redocada) juntamente com a representação tridimensional de suas interações com os resíduos que compõem a proteína.

Ao realizar a docagem molecular, é possível perceber que, comprovando a descrição primária do Tr69957, há maior afinidade pelo transporte de maltose, quando se analisa a interação dos mono e dissacarídeos com a região dos túneis externos do transportador. Celobiose e Lactose são os açúcares de menor afinidade nesta região, seguidos de manose, frutose e xilose (Figura 20a). Interessantemente, o resíduo S329, componente do gargalo dos túneis do transportador Tr69957, além de ser um resíduo fosforilável, foi verificado como passível de interação com todos os dissacarídeos, indicando sua importância na seletividade dos carboidratos. Ao considerar a interação entre os mono e dissacarídeos aqui estudados com as porções mais externas do transportador, ou seja, os domínios completamente extracelulares, foi percebido que o mesmo padrão da interação com os túneis se mantém, apesar de a afinidade de todas as posições observadas na análise de docagem molecular referente à celobiose e à xilose ter melhorado, o contrário foi observado com a trealose (Figura 20b). Nessas interações, foram observados alguns aminoácidos como sítios de fosforilação preditos, como S340, que interage com diversas posições obtidas para celobiose, xilose, manose e frutose, S471, que interage com trealose, além de S397, que interage com frutose. Interessantemente, a análise de *docking* demonstrou que esse padrão de interações entre os açúcares e o Tr69957 muda quando se trata dos domínios intracelulares da proteína. A afinidade com a maltose é bastante diminuída, sendo que a afinidade com os monossacarídeos é consideravelmente aprimorada. Dos resíduos preditos como

fosforiláveis, S532 e S534 foram identificados como importantes para a interação com lactose e trealose, respectivamente (Figura 20c).

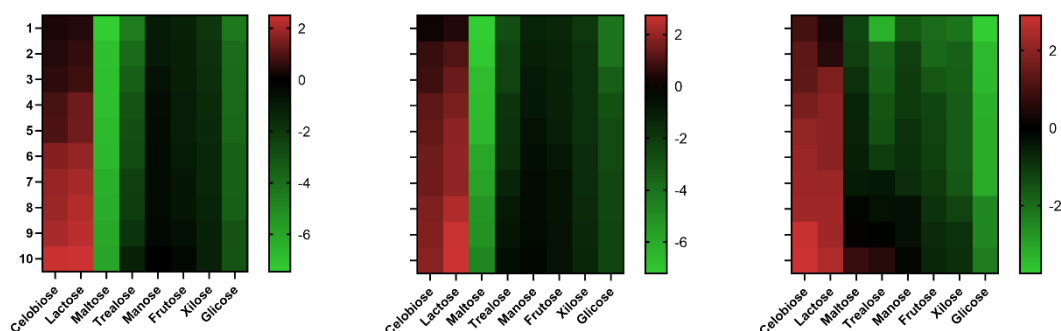


Figura 20. Docking de mono e dissacarídeos com o Tr69957. Docagem realizada na região do túnel do transportador (a), no domínio extracelular (b) e no domínio intracelular (c).

Além da docagem, também foi analisada a capacidade de transporte in silico, mais especificamente, a internalização dos carboidratos pelos túneis identificados pelas ferramentas computacionais, sendo possível perceber que a maioria dos açúcares diminuem a energia de ligação ao transportador ao internalizar a célula, com exceção da lactose (Figura). Interessantemente, em nosso estudo, a lactose é um dos dissacarídeos que possui menor energia livre de interação com o transportador Tr69957.

Com relação aos sítios fosforiláveis localizados no domínio intracelular, análises NMA demonstraram que essa porção é altamente flexível. Portanto, verificamos as possíveis interações que o Tr69957 pode realizar com outras proteínas e, interessantemente, é possível notar que este transportador interage com outros transportadores MFS, fazendo-nos sugerir uma regulação de rede de transportadores, devido à promiscuidade do mesmo. Além disso, a docagem molecular do modelo fosforilado in silico, considerando o domínio intracelular, demonstrou que há um aumento drástico da afinidade por maltose, sugerindo uma modificação conformacional na proteína (Figura 21).

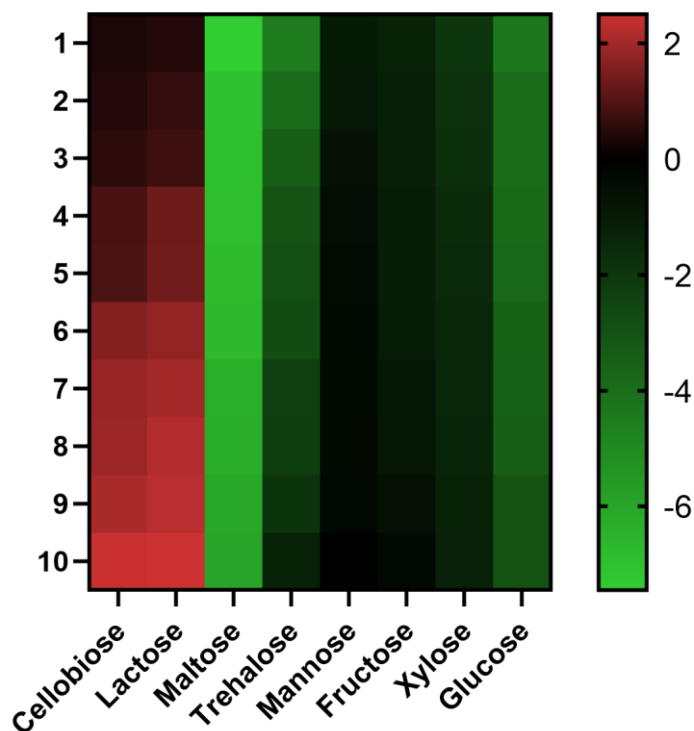


Figura 21. Docking de mono e dissacarídeos com a região interna do Tr69957 fosforilado in silico

Levando em consideração todos esses resultados, sugerimos que o resíduo S329 possa funcionar como um mecanismo de *gating* quando fosforilado, sendo que a fosforilação dos resíduos da porção C-terminal podem funcionar como reguladora de *sensing* de carbono.

d. Expressão heteróloga

Apesar de ter sido possível amplificar os fragmentos para a construção dos mutantes pontuais (Figura), embora as inúmeras tentativas, não foi possível a construção dos mutantes para o Tr69957 em *S. cerevisiae*. Nossa hipótese gira em torno de que a mutação pontual para alanina, embora induza alterações na interação com carboidratos, como demonstrado na Figura, desestabilize a estrutura proteica, conforme as variações de energia apresentadas na Tabela.

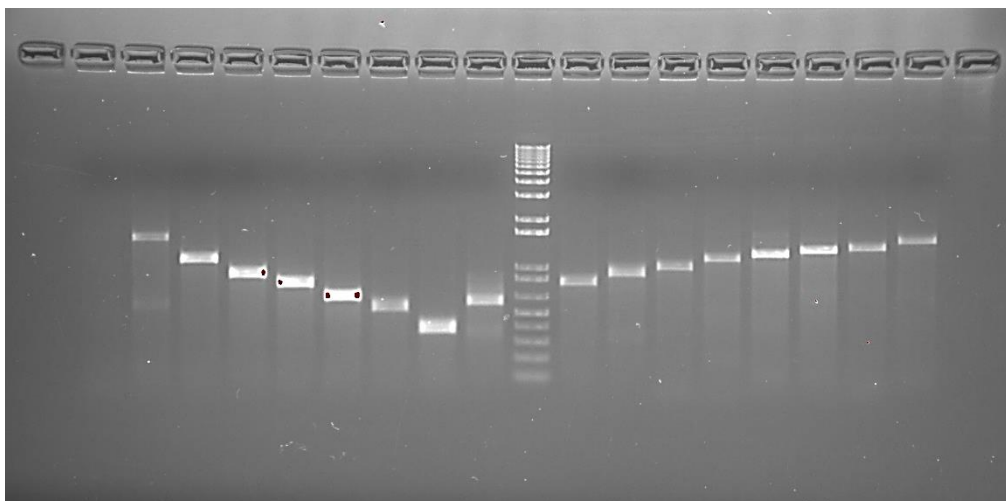


Figura 22. Amplificação de fragmentos para a construção de mutantes pontuais de Tr69957.

Tabela 7. Variação de energia interna da proteína Tr69957 para avaliação da estabilidade proporcionadas pelas mutações pontuais miméticas de alanina.

MUTANTE	ESTABILIDADE (KCAL/MOL)	ENTROPIA WTXMUT (KCAL/MOL/K)
S11A	-0.294	0.311
S29A	0.777	0.363
S43A	0.969	-0.268
Y63A	-2.671	1.719
Y192A	-0.707	1.149
S260A	0.538	-0.060
S296A	0.236	0.042
S329A	0.806	0.132
S340A	0.690	-0.016
T373A	-0.612	0.433
S397A	0.311	-0.026
T419A	-0.807	0.249
S429A	1.087	0.281
S432A	0.012	0.011

S471A	0.819	-0.352
S513A	0.267	0.136
Y525A	-1.323	0.711
Y532A	0.167	0.250
Y534A	0.683	0.280
Y539A	-0.221	0.586

5. DISCUSSÃO

Os fungos filamentosos são conhecidos por sua habilidade de degradar polissacarídeos complexos presentes na biomassa vegetal. Entretanto, para que esses polissacarídeos complexos possam ser consumidos, eles necessitam ser convertidos em açúcares menores e metabolizáveis, como os mono e dissacarídeos. Esses açúcares simples servem como fonte primária de carbono durante o crescimento e metabolismo fúngico. Os mono e dissacarídeos são transportados através da membrana celular por meio de transportadores transmembrana específicos, como o Tr69957. Assim, a habilidade de fungos filamentosos, como o *Trichoderma reesei*, degradarem a biomassa lignocelulósica de forma eficiente depende da internalização dos açúcares mais simples.

A análise estrutural de Tr69957 resultou na verificação de baixa conservação dos aminoácidos que compõem as sequências primárias dos transportadores do tipo MFS, porém com a estrutura altamente conservada, especialmente no que diz respeito aos domínios transmembrana. Assim como outros (DANG et al., 2010; IANCU et al., 2013; JIANG et al., 2019, 2020; KIMANIUS; LINDAHL; ANDERSSON, 2018; NIJLAND et al., 2014; PARK, 2015; ROTTMANN et al., 2016; SIMPSON et al., 2008; THORENS, 2015), o Tr69957 é composto por 12 hélices transmembrana, com pouca possibilidade de comparação de sua sequência aminoacídica, como pôde ser observado no alinhamento de sequências. Isso se deve ao fato de os transportadores MFS estarem envolvidos no transporte de uma variedade de substratos, mesmo que sua funcionalidade seja mantida através de diferentes organismos (PENG et al., 2018; VISHWAKARMA et al., 2018). Porém, apesar dessas diferenças, já que a funcionalidade deve ser mantida, a conservação das hélices transmembrana de modo a formar uma cavidade hidrofílica para interação com os açúcares substratos é fundamental (DREW et al., 2021). Em Tr69957, as cavidades hidrofílicas formadas no transportador e analisadas neste estudo são compostas por diversos aminoácidos de cadeias laterais hidrofílicas, tanto na porção intracelular como na porção extracelular, o que possibilita a sugestão de que essa estrutura é mantida, apesar das diferenças na sequência primária com relação a outros transportadores.

Além da estrutura, a função de transportador de açúcares é mantida por meio da conservação de certos resíduos de aminoácidos que constituem motivos de ligação aos carboidratos. Joost e Thorens (2001) identificaram alguns motivos que servem como assinaturas bem definidas de ligação a carboidratos (JOOST; THORENS, 2001).

Tr69957 possui vários dos resíduos que compõem esses motivos bem preservados evolutivamente. Assim, apesar de ser um transportador primordialmente descrito como possuidor da função de transportar maltose, a presença da variedade de motivos de ligação sugere uma promiscuidade em sua função. Esse fato é corroborado com os achados de Nogueira e colaboradores (2018), que verificaram a capacidade desse transportador internalizar não somente a maltose, mas outros dissacarídeos, como a lactose e a celobiose, e monossacarídeos como a frutose, xilose e manose (NOGUEIRA et al., 2018a).

Além disso, assim como outros fungos filamentosos (NOGUEIRA et al., 2020; PENG et al., 2018; PERLIN; ANDREWS; SAN TOH, 2014; WANG et al., 2023a), *Trichoderma reesei* não possui excesso de transportadores identificados ou caracterizados. Isso pode sugerir uma redundância funcional, como acontece com *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, que, para inibir completamente a captação de hexoses, é necessária a deleção de 20 transportadores de açúcares, ou seja, a promiscuidade pode ser uma característica fundamental desse tipo de proteína (WIECZORKE et al., 1999).

Alguns estudos demonstram que certos resíduos de aminoácidos são importantes para a interação com os carboidratos e que a mutação destes, mesmo que pontual, pode alterar significativamente a seletividade e afinidade dos transportadores com os açúcares (KAKARLA et al., 2017; KUMAR et al., 2016; MADEJ; KABACK, 2013; QUISTGAARD et al., 2013; YOUNG et al., 2014). Nosso trabalho demonstrou que a adição do grupamento fosfato ter esse mesmo efeito. Sugere-se que fosforilação do transportador Tr69957 pode impactar a seletividade da captação dos açúcares pela mudança conformacional ou pela estéreo-especificidade que o grupamento fosfato pode induzir. Dependendo do resíduo fosforilado, a interação com o açúcar pode ser aprimorada ou não, especialmente considerando a promiscuidade do Tr69957 verificada neste estudo e no estudo de Nogueira e colaboradores (2018). Comportamento similar pode ser observado em outros organismos, como a bactéria *Escherichia coli*. O inibidor do transportador de glucose PtsG, denominado StrT, é capaz de interagir com o transportador não fosforilado em *Escherichia coli*, inibindo o crescimento bacteriano em meio mínimo contendo glicose como única fonte de carbono por inibir a especificidade de PtsG, porém sem afetar o transporte de outros açúcares, como a manose, frutose ou trealose (Carreón-Rodríguez et al., 2023). Além disso, isso não ocorre somente com transportadores de carboidratos, mas também com enzimas secretadas. Uma proteína alvo de fosforilação em *Trichoderma reesei* é a glicosil-hidrolase cel7a, que tem sua

atividade diminuída quando se apresenta desfosforilada, exatamente no domínio de ligação a carboidratos, demonstrando como a fosforilação possivelmente tem o poder de regular a interação entre domínios específicos e açúcares. (PEDERSOLI et al., 2021).

A regulação por meio da fosforilação também ocorre com outros transportadores MFS em eucariotos. Foi verificado que a fosforilação de T101 em Nrt1.1, de *Arabidopsis*, pode servir como sinal para a troca da dupla afinidade pelo nitrato, transicionando de um estado de baixa afinidade para o de alta afinidade pelo substrato, além de ter papel na dimeização do transportador na membrana lipídica (FENG et al., 2015; YAMADA et al., 2016). Ademais, STP1, também de *Arabidopsis*, foi verificado como regulado por açúcares fosforiláveis, sendo essa regulação capaz de mediar a captação e a resposta metabólica às hexoses (CORDOBA et al., 2015). A fosforilação em Gal2p, em *S. cerevisiae*, regula a localização do transportador, levando a mudanças na captação da galactose (TAMAYO ROJAS et al., 2021). Similarmente, a fosforilação em Hgt4, em *Candida albicans*, pode impactar a atividade e localização do transportador, afetando a internalização de histidina e sua utilização (WIJNANTS et al., 2020).

Já STP13 pode ser fosforilado em T485, aumentando a taxa de captação de monossacarídeos para competir com outros organismos pelas fontes de carbono extracelulares, como um mecanismo de defesa, já que este processo priva esses organismos da obtenção de energia (YAMADA et al., 2016). Outro papel diferenciado da fosforilação também pode ser observado em MdSUT2.2, fosforilado em S381 em resposta à seca, em maçãs (MA et al., 2019). Dessa forma, é possível sugerir que a regulação da seletividade pelos açúcares a serem transportados podem servir como uma estratégia de sobrevivência, como um fator de virulência em alguns organismos.

Além disso, podemos sugerir que a fosforilação pode desempenhar papel importante na sinalização celular, modulando a interação do Tr69957 com outras proteínas. Foi verificado que o Tr69957 pode ser capaz de interagir com outros transportadores de carboidratos, levantando a hipótese de que a função das outras proteínas envolvidas no transporte de açúcares pode ser modulada. Interessantemente, a porção C-terminal do Tr69957 é altamente flexível, o que sugere que ela pode interagir com outras proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinais, a partir do reconhecimento da fonte de carbono disponível no meio extracelular. Snf3 é um transceptor de *S. cerevisiae*, que percebe os níveis de glicose extracelulares e regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose. A fosforilação desse transceptor, especialmente em resíduos localizados no domínio citoplasmático, melhora a capacidade de ligação à glicose, de modo a ativar cascatas de sinalização

downstream. Adicionalmente, a fosforilação de Snf3 influencia na sua internalização e degradação, regulando os níveis proteicos e prevenindo a ativação excessiva das vias de metabolismo da glicose (CELENZA; MARSHALL-CARLSON; CARLSON, 1988; DIETVORST et al., 2010) Levando em consideração essas as características dos transceptores MFS de eucariotos (VAN DIJCK et al., 2017; WANG et al., 2023b, 2022), sugerimos que o Tr69957 possa funcionar também como um transceptor, como ocorre com outros transportadores MFS em fungos e leveduras.

Levando em consideração todos esses resultados, é possível perceber que a fosforilação pode ser um mecanismo regulatório crucial que pode impactar na seletividade da captação de mono e dissacarídeos pelo transportador Tr69957, no que diz respeito à modulação da afinidade de interações entre o transportador e os açúcares, além da possível interação com outras proteínas e biomoléculas intracelulares. Por isso, o entendimento do papel da fosforilação nesse tipo de processo pode proporcionar esclarecimentos valiosos da regulação da degradação da biomassa por *Trichoderma reesei*.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo oferece uma visão teórica esclarecedora sobre o papel crucial da fosforilação como mecanismo regulatório pós-traducional no transportador de açúcar Tr69957 durante a degradação da biomassa lignocelulósica pelo fungo *Trichoderma reesei*. Através de uma abordagem multidisciplinar, na tentativa de combinar análises computacionais, expressão heteróloga e estudos de interação entre o transportador e diferentes açúcares, foi demonstrado como os sítios de fosforilação desempenham um papel fundamental no reconhecimento e na seleção de fontes de carbono. A descoberta de que o transportador Tr69957 possui afinidades variáveis por diferentes açúcares de acordo com o padrão de fosforilação de aminoácidos, bem como abre portas para uma compreensão mais profunda dos mecanismos de regulação do metabolismo de carbono nesse fungo biotecnologicamente relevante.

Além disso, a identificação dos sítios de fosforilação nos domínios citosólicos do transportador sugere um possível papel na sinalização intracelular, indicando um potencial mecanismo pelo qual o fungo pode perceber e responder às mudanças nas fontes de nutrientes externos. Essas descobertas têm implicações significativas na engenharia de proteínas e na otimização da produção de bioetanol de segunda geração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSMANNER, B. et al. Biochemical characterization, membrane association and identification of amino acids essential for the function of Alg11 from *Saccharomyces cerevisiae*, an α 1, 2-mannosyltransferase catalysing two sequential glycosylation steps in the formation of the lipid-linked core oligosaccharide. **Biochemical Journal**, v. 426, n. 2, p. 205–217, 2010.
- ADAV, S. S.; SZE, S. K. Trichoderma Secretome: An Overview. Em: GUPTA, V. K. et al. (Eds.). **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. 1. ed. Waltham: Elsevier, 2014. p. 103–114.
- AKEL, E. et al. Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 12, p. 1837–1844, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.
- ANTONIETO, A. C. et al. Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. **Fungal Genet Biol**, v. 73, p. 93–103, 2014.
- ANTONIÉTO, A. C. C. et al. *Trichoderma reesei* CRE1-mediated carbon catabolite repression in response to sophorose through RNA sequencing analysis. **Current Genomics**, v. 17, n. 2, 2016.
- ANTONIETO, A. C. C. et al. A Novel Cys2His2 Zinc Finger Homolog of AZF1 Modulates Holocellulase Expression in *Trichoderma reesei*. **mSystems**, v. 4, n. 4, jun. 2019.
- ARO, N. et al. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. **J Biol Chem**, v. 276, n. 26, p. 24309–24314, 2001.
- ARO, N. et al. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 1, p. 56–65, 2003.
- ASHKENAZY, H. et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W344–W350, 8 jul. 2016.
- BEIER, S. et al. CLR1 and CLR2 are light dependent regulators of xylanase and pectinase genes in *Trichoderma reesei*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 136, p. 103315, 2020.
- BERGDAHL, B. et al. Engineering Yeast Hexokinase 2 for Improved Tolerance Toward Xylose-Induced Inactivation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.
- BERLIN, A. No Barriers to Cellulose Breakdown. **Science**, v. 342, n. 6165, p. 1454 LP – 1456, 20 dez. 2013.

BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: The first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2016.

BLOM, N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **PROTEOMICS**, v. 4, n. 6, p. 1633–1649, 1 jun. 2004.

CAMARGOS, C. V. **Produção de etanol utilizando melaço de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 22 maio 2019.

CÂNDIDO JÚNIOR, C. S. **Capacidade para produção de etanol de segunda geração e cogeração de energia elétrica a partir do bagaço da cana-de-açúcar no estado de São Paulo**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2022.

CAO, Y. et al. Crystal structure of a phosphorylation-coupled saccharide transporter. **Nature**, v. 473, n. 7345, p. 50–54, 2011.

CAO, Y. et al. Rce1, a novel transcriptional repressor, regulates cellulase gene expression by antagonizing the transactivator Xyr1 in *Trichoderma reesei*. **Molecular microbiology**, v. 105, n. 1, p. 65–83, jul. 2017.

CASTRO, L. et al. Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei*. **Gene Expr Patterns**, v. 14, n. 2, p. 88–95, 2014.

CELENZA, J. L.; MARSHALL-CARLSON, L.; CARLSON, M. The yeast SNF3 gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 7, p. 2130–2134, 1 abr. 1988.

CHAMBERGO, F. S. et al. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13983–8, abr. 2002.

CHANG, S. et al. Allosteric and transport behavior analyses of a fucose transporter with network models. **Soft Matter**, v. 7, n. 10, p. 4661–4671, 2011.

CHEN, L.-Q. et al. Transport of Sugars. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 865–894, 2 jun. 2015.

CHEN, X. et al. Understanding the Role of *Trichoderma reesei* Vib1 in Gene Expression during Cellulose Degradation. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, 2021.

CORDOBA, E. et al. Sugar regulation of SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1) expression in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 1, p. 147–159, jan. 2015.

CUI, J. et al. A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation. **elife**, v. 4, p. e06120, 2015.

DANG, S. et al. Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 734–738, 2010.

- DE PAULA, R. G. et al. New Genomic Approaches to Enhance Biomass Degradation by the Industrial Fungus *Trichoderma reesei*. **International Journal of Genomics**, v. 2018, p. 1974151, 2018a.
- DE PAULA, R. G. et al. The Duality of the MAPK Signaling Pathway in the Control of Metabolic Processes and Cellulase Production in *Trichoderma reesei*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 14931, 8 out. 2018b.
- DE VALK, S. C. et al. Engineering proton-coupled hexose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 15, n. 1, p. 47, 2022.
- DENG, D. et al. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 121–125, 2014.
- DERNTL, C. et al. Transcription factor Xpp1 is a switch between primary and secondary fungal metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 4, p. E560–E569, 24 jan. 2017.
- DIETVORST, J. et al. Amino acid residues involved in ligand preference of the Snf3 transporter-like sensor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 27, n. 3, p. 131–138, 1 mar. 2010.
- DOS REIS, T. F. et al. Identification of glucose transporters in *Aspergillus nidulans*. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e81412–e81412, 25 nov. 2013.
- DOS REIS, T. F. et al. Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, p. 204, 2016.
- DOS SANTOS CASTRO, L. et al. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. **Biotechnol Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 41, 2014.
- DOS SANTOS CASTRO, L. et al. Understanding the Role of the Master Regulator XYR1 in *Trichoderma reesei* by Global Transcriptional Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 175, fev. 2016.
- DREW, D. et al. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). **Chemical Reviews**, v. 121, n. 9, p. 5289–5335, 12 maio 2021.
- DREW, D.; BOUDKER, O. Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 543–572, 2 jun. 2016.
- EBERT, K. et al. Identification of essential amino acids for glucose transporter 5 (GLUT5)-mediated fructose transport. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 6, p. 2115–2124, 2018.
- EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press, 1997. v. 277p. 396–404.
- FENG, J. et al. Biochemical and structural study of *Arabidopsis* hexokinase 1. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, p. 367–375, 2015.

FISCHER, W. et al. Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. **The Plant Journal**, v. 29, n. 6, p. 717–731, 2002.

FORMENT, J. V et al. Identification of the *mstE* Gene Encoding a Glucose-inducible, Low Affinity Glucose Transporter in *Aspergillus nidulans**. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8339–8346, 31 mar. 2006.

FURUKAWA, T. et al. Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 46, n. 8, p. 564–74, ago. 2009.

GUAN, L.; KABACK, H. R. Lessons from lactose permease. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 35, p. 67–91, 2006.

GUPTA, V. K. et al. The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei*: What's Next? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 12, p. 970–982, 2016a.

GUPTA, V. K. et al. The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei*: What's Next? **Trends in biotechnology**, 2016b.

GUPTA, V. KUMAR. **Biotechnology and biology of trichoderma**. [s.l.] Elsevier, 2014.

HÄKKINEN, M. et al. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 14, jan. 2014.

HAMEL, L.-P. et al. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. **The Plant Cell**, v. 24, n. 4, p. 1327–1351, abr. 2012.

HARMAN, G. E. et al. Special issue: *Trichoderma*-from Basic Biology to biotechnology. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 1–2, 2012.

HE, R. et al. *Trpac1*, a pH response transcription regulator, is involved in cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 67, p. 17–26, 2014.

HE, R.; GUO, W.; ZHANG, D. An ethanolamine kinase *Eki1* affects radial growth and cell wall integrity in *Trichoderma reesei*. **FEMS microbiology letters**, v. 362, n. 17, p. fnv133, set. 2015.

HEO, L.; PARK, H.; SEOK, C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W384–W388, jul. 2013.

HERPOEL-GIMBERT, I. et al. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnol Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 18, 2008.

HOLLUP, S. M.; SALENSMINDE, G.; REUTER, N. WEBnm@: a web application for normal mode analyses of proteins. **BMC Bioinformatics**, v. 6, n. 1, p. 52, 2005.

HOLM, L. Dali server: structural unification of protein families. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W210–W215, 5 jul. 2022.

- HORTA, M. A. C. et al. Network of proteins, enzymes and genes linked to biomass degradation shared by *Trichoderma* species. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1341, 22 jan. 2018.
- HOVSEPIAN, J. et al. Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 6, p. 1811–1831, 2017.
- HUANG, J. et al. Direct ethanol production from lignocellulosic sugars and sugarcane bagasse by a recombinant *trichoderma reesei* strain hj48. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- HUMPHREY, S. J.; JAMES, D. E.; MANN, M. Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 26, n. 12, p. 676–687, dez. 2015.
- IANCU, C. V et al. Crystal structure of a glucose/H⁺ symporter and its mechanism of action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. 17862–17867, 29 out. 2013.
- IVANOVA, C. et al. Genome sequencing and transcriptome analysis of *Trichoderma reesei* QM9978 strain reveals a distal chromosome translocation to be responsible for loss of *vib1* expression and loss of cellulase induction. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 209, 2017.
- JAMSHEER K, M.; KUMAR, M.; SRIVASTAVA, V. SNF1-related protein kinase 1: the many-faced signaling hub regulating developmental plasticity in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 17, p. 6042–6065, 2021.
- JIANG, D. et al. Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 36, p. 14664–14669, 2013.
- JIANG, X. et al. Engineered XylE as a tool for mechanistic investigation and ligand discovery of the glucose transporters GLUTs. **Cell Discovery**, v. 5, n. 1, p. 14, 2019.
- JIANG, X. et al. Structural Basis for Blocking Sugar Uptake into the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell**, v. 183, n. 1, p. 258- 268.e12, 2020.
- JOHNSON, L. N.; LEWIS, R. J. Structural Basis for Control by Phosphorylation. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2209–2242, 1 ago. 2001.
- JOOST, H.-G.; THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. **Molecular membrane biology**, v. 18, n. 4, p. 247–256, 2001.
- JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.
- KABACK, H. R. et al. The alternating access transport mechanism in LacY. **The Journal of membrane biology**, v. 239, n. 1–2, p. 85–93, jan. 2011.
- KAKARLA, P. et al. Functional roles of highly conserved amino acid sequence motifs A and C in solute transporters of the major facilitator superfamily. **Drug resistance in bacteria, fungi, malaria, and cancer**, p. 111–140, 2017.

- KARIMI-AGHCHEH, R. et al. The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112799, jan. 2014.
- KASAHARA, T.; ISHIGURO, M.; KASAHARA, M. Comprehensive Chimeric Analysis of Amino Acid Residues Critical for High Affinity Glucose Transport by Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae**. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30274–30278, 2004.
- KASAHARA, T.; KASAHARA, M. Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* Hxt2 transporter. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 1, p. 247–252, 2003.
- KIMANIUS, D.; LINDAHL, E.; ANDERSSON, M. Uptake dynamics in the Lactose permease (LacY) membrane protein transporter. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14324, 2018.
- KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083–1087, 2012.
- KOSTOVA, Z. et al. Comparative importance in vivo of conserved glutamate residues in the EX7E motif retaining glycosyltransferase Gpi3p, the UDP-GlcNAc-binding subunit of the first enzyme in glycosylphosphatidylinositol assembly. **European journal of biochemistry**, v. 270, n. 22, p. 4507–4514, 2003.
- KUANYSHEV, N. et al. Identification and analysis of sugar transporters capable of co-transporting glucose and xylose simultaneously. **Biotechnology Journal**, v. 16, n. 11, p. 2100238, 1 nov. 2021.
- KUMAR, S. et al. Structural and functional roles of two evolutionarily conserved amino acid sequence motifs within solute transporters of the major facilitator superfamily. **Trends Cell Mol Biol**, v. 11, p. 41–53, 2016.
- LENGELER, K. B. et al. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 746–785, dez. 2000.
- LI, Y. et al. Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 503–510, 2016.
- LLOPIS-TORREGROSA, V. et al. Regulation of the yeast Hxt6 hexose transporter by the Rod1 α -arrestin, the Snf1 protein kinase, and the Bmh2 14-3-3 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 29, p. 14973–14985, 2016.
- LLOYD, K. P. et al. Reconciling contradictory findings: Glucose transporter 1 (GLUT1) functions as an oligomer of allosteric, alternating access transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 51, p. 21035–21046, 2017.
- MA, Q.-J. et al. An apple sucrose transporter MdSUT2.2 is a phosphorylation target for protein kinase MdCIPK22 in response to drought. **Plant biotechnology journal**, v. 17, n. 3, p. 625–637, mar. 2019.

- MACH-AIGNER, A. R. et al. Transcriptional regulation of *xyr1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6554–6562, nov. 2008.
- MADEJ, M. G. et al. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 15, p. 5870–5874, 2013.
- MADEJ, M. G.; KABACK, H. R. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters II. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. E4831–E4838, 2013.
- MAIER, A. et al. Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 4, p. 539–550, 1 dez. 2002.
- MAIR, A. et al. SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. **Elife**, v. 4, p. e05828, 2015.
- MARGREITTER, C.; PETROV, D.; ZAGROVIC, B. Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W422–W426, 1 jul. 2013.
- MARGREITTER, C.; REIF, M. M.; OOSTENBRINK, C. Update on phosphate and charged post-translationally modified amino acid parameters in the GROMOS force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 714–720, 15 abr. 2017.
- MARTINS-SANTANA, L. et al. CRZ1 regulator and calcium cooperatively modulate holocellulases gene expression in *Trichoderma reesei* QM6a. **Genetics and molecular biology**, v. 43, n. 2, p. e20190244–e20190244, 8 maio 2020.
- MCGUFFIN, L. J. et al. ModFOLD8: accurate global and local quality estimates for 3D protein models. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W425–W430, 2 jul. 2021.
- MENDOZA-MENDOZA, A. et al. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15965–15970, 2003.
- MENG, Q.-S. et al. Identification of a novel repressor encoded by the putative gene *ctf1* for cellulase biosynthesis in *Trichoderma reesei* through artificial zinc finger engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 6, p. 1747–1760, 1 jun. 2020.
- MILANEZ, A. Y.; FAVERET FILHO, P. DE S. C.; ROSA, S. E. S. DA. PERSPECTIVAS PARA O ETANOL BRASILEIRO. **BNDES Setorial**, n. 27, p. 21–38, 2008.
- MIRANDA, I. C. DE. **O Acordo de Paris e a cooperação transacional para o enfrentamento das mudanças climáticas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
- MIRDITA, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, v. 19, n. 6, p. 679–682, 2022.
- MITROVIC, D. et al. Reconstructing the transport cycle in the sugar porter superfamily using coevolution-powered machine learning. **bioRxiv**, p. 2022.09.24.509294, 1 jan. 2022.

- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.
- MUKHERJEE, P. K. et al. TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 3, p. 446–455, 2003.
- NACHILUK, K. Alta na Produção e Exportações de Açúcar Marcam a Safra 2020/21 de Cana. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 16, n. 6, p. 1–5, jun. 2021.
- NAULA, C. M. et al. A glucose transporter can mediate ribose uptake: definition of residues that confer substrate specificity in a sugar transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 29721–29728, 2010.
- NIJLAND, J. G. et al. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 168, 2014.
- NISHI, H.; SHAYTAN, A.; PANCHENKO, A. R. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 270, 7 ago. 2014.
- NITTA, M. et al. A new Zn(II)2Cys6-type transcription factor BglR regulates β -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 5, p. 388–397, maio 2012.
- NOGUEIRA, K. M. V. et al. Sugar transporters from industrial fungi: Key to improving second-generation ethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 131, p. 109991, 2020.
- NOGUEIRA, K. M. V. et al. Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 84, 2018a.
- NOGUEIRA, K. M. V. et al. Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, p. 84, 2 abr. 2018b.
- OUYANG, J. et al. A complete protein pattern of cellulase and hemicellulase genes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 11, p. 1266–1274, 2006.
- PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? 2011.
- PARK, M.-S. Molecular Dynamics Simulations of the Human Glucose Transporter GLUT1. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0125361-, 28 abr. 2015.
- PAULSEN, P. A.; CUSTÓDIO, T. F.; PEDERSEN, B. P. Crystal structure of the plant symporter STP10 illuminates sugar uptake mechanism in monosaccharide transporter superfamily. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 407, 2019.
- PAYNE, C. M. et al. Fungal Cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 11 fev. 2015.
- PEDERSOLI, W. R. et al. Analysis of the phosphorylome of *trichoderma reesei* cultivated on sugarcane bagasse suggests post-translational regulation of the secreted glycosyl hydrolase Cel7A. **Biotechnology Reports**, v. 31, p. e00652, 2021.

- PENG, M. et al. In Silico Analysis of Putative Sugar Transporter Genes in *Aspergillus niger* Using Phylogeny and Comparative Transcriptomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
- PERLIN, M. H.; ANDREWS, J.; SAN TOH, S. Essential letters in the fungal alphabet: ABC and MFS transporters and their roles in survival and pathogenicity. **Advances in genetics**, v. 85, p. 201–253, 2014.
- PERLIN, M. H.; ANDREWS, J.; TOH, S. S. Essential letters in the fungal alphabet: ABC and MFS transporters and their roles in survival and pathogenicity. **Advances in genetics**, v. 85, p. 201–253, 2014.
- PETROV, D. et al. A Systematic Framework for Molecular Dynamics Simulations of Protein Post-Translational Modifications. **PLOS Computational Biology**, v. 9, n. 7, p. e1003154-, 18 jul. 2013.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 1 out. 2004.
- PIKE, A. C. W. et al. Structure of the human glucose transporter GLUT3 / SLC2A3. **TO BE PUBLISHED**, [s.d.].
- PORTNOY, T. et al. Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 2, p. 262–71, fev. 2011.
- QIAN, Y. et al. The GATA-Type Transcriptional Factor Are1 Modulates the Expression of Extracellular Proteases and Cellulases in *Trichoderma reesei*. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 17, p. 4100, 22 ago. 2019.
- QUISTGAARD, E. M. et al. Metal-mediated crystallization of the xylose transporter XylE from *Escherichia coli* in three different crystal forms. **Journal of Structural Biology**, v. 184, n. 2, p. 375–378, 2013.
- QUISTGAARD, E. M. et al. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 123–132, 2016.
- REDDY, V. S. et al. The Major Facilitator Superfamily (MFS) Revisited Vamsee. **FEBS J.**, v. 279, n. 11, p. 2022–2035, 2013.
- REITHNER, B. et al. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 42, n. 9, p. 749–60, set. 2005.
- REITHNER, B. et al. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 44, n. 11, p. 1123–33, 2007.
- RIZVI, S. M. D.; SHAKIL, S.; HANEEF, M. A simple click by click protocol to perform docking: AutoDock 4.2 made easy for non-bioinformaticians. **EXCLI journal**, v. 12, p. 831–857, 23 set. 2013.
- ROCHA-RAMIREZ, V. et al. *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene tga1 is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 4, p. 594–605, ago. 2002.

- RODRIGUES, C. H. M.; PIRES, D. E. V; ASCHER, D. B. DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W350–W355, 2 jul. 2018.
- ROTTMANN, T. et al. STP10 encodes a high-affinity monosaccharide transporter and is induced under low-glucose conditions in pollen tubes of Arabidopsis. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 8, p. 2387–2399, abr. 2016.
- SANTOS, P. H. DE S. **Panorama atual da produção de bioetanol no Brasil e no mundo**. [s.l.] Universidade de Brasília, Brasília, 2021.
- SCHMOLL, M. The information highways of a biotechnological workhorse--signal transduction in *Hypocrea jecorina*. **BMC genomics**, v. 9, p. 430, 2008.
- SCHMOLL, M. et al. The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 205–327, 2016.
- SCHUSTER, A. et al. Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process. **BMC Genomics**, v. 8, p. 449, 2007.
- SCHUSTER, A. et al. Roles of protein kinase A and adenylate cyclase in light-modulated cellulase regulation in *Trichoderma reesei*. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 7, p. 2168–2178, 2012.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, 2010.
- SCHUTTE, G. R.; BARROS, P. S. **A Geopolítica do Etanol**. **Boletim de Economia e Política Internacional**, 2010. Disponível em:
<https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/3384/8/bepi_01_Geopolitica.pdf>
- SEGATO, F. et al. **Genomics Review of Holocellulose Deconstruction by Aspergilli**. [s.l.: s.n.]. v. 78
- SEIBOTH, B. et al. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Mol Microbiol**, v. 84, n. 6, p. 1150–1164, 2012.
- SERDIUK, T. et al. Substrate-induced changes in the structural properties of LacY. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 16, p. E1571–E1580, 22 abr. 2014.
- SHIDA, Y.; FURUKAWA, T.; OGASAWARA, W. Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 8451, n. April, p. 1–18, 2016.
- SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 1 jan. 2011.
- SILVA, R. DO N. **Estudos de sinalização celular em *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) durante a expressão dos genes de celulases (*cbh1* e *cbh2*) em presença de celulose e sofrorose e durante o antagonismo contra *Pythium ultimum***. [s.l.] Universidade de Brasília, 2008.

- SILVA, R. DO N. et al. Involvement of G-alpha protein GNA3 in production of cell wall-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) during mycoparasitism against *Pythium ultimum*. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 4, p. 531–6, abr. 2009.
- SIMPSON, I. A. et al. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 295, n. 2, p. E242–E253, ago. 2008.
- SLAVIC, K. et al. Life cycle studies of the hexose transporter of *Plasmodium* species and genetic validation of their essentiality. **Molecular microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1402–1413, mar. 2010.
- SOARES, S.; PATROCÍNIO, A. B. DO; SILVA, F. C. DA. **Desenvolvimento de uma rota tecnológica para produção de etanol celulósico de segunda geração de bagaço de cana-de-açúcar**. **Embrapa Agricultura Digital**, 2017.
- SOUZA, A. A. et al. Expression of the glucose transporter HXT1 involves the Ser–Thr protein phosphatase Sit4 in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 8, p. 907–917, 1 dez. 2012.
- SOUZA, M. C. O.; CORAZZA, R. I. Do Protocolo Kyoto ao Acordo de Paris: uma análise das mudanças no regime climático global a partir do estudo da evolução de perfis de emissões de gases de efeito estufa. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 42, 24 dez. 2017.
- STOURAC, J. et al. Caver Web 1.0: identification of tunnels and channels in proteins and analysis of ligand transport. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W414–W422, 2 jul. 2019.
- STRICKER, A. R. et al. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 12, p. 2128–2137, 2006.
- SUN, L. et al. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1–4. **Nature**, v. 490, n. 7420, p. 361–366, 2012.
- SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305–311, 2001.
- SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D362–D368, jan. 2017.
- TAMAYO ROJAS, S. A. et al. Glucose-induced internalization of the *S. cerevisiae* galactose permease Gal2 is dependent on phosphorylation and ubiquitination of its aminoterminal cytoplasmic tail. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 3, p. foab019, 2021.
- TAMAYO ROJAS, S. A. et al. Glucose-induced internalization of the *S. cerevisiae* galactose permease Gal2 is dependent on phosphorylation and ubiquitination of its aminoterminal cytoplasmic tail. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 3, p. foab019, 1 maio 2021.
- TEIXEIRA, R. M. et al. Virus perception at the cell surface: revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors. **Molecular plant pathology**, v. 20, n. 9, p. 1196–1202, 2019.

- THORENS, B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. **Diabetologia**, v. 58, n. 2, p. 221–232, 2015.
- TIWARI, S. P. et al. WEBnm@ v2.0: Web server and services for comparing protein flexibility. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 427, 2014.
- TSAY, Y.-F. How to switch affinity. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 44–45, 2014a.
- TSAY, Y.-F. How to switch affinity. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 44–45, 2014b.
- VAN DE BUNT, M.; GLOYN, A. L. A tale of two glucose transporters: how GLUT2 re-emerged as a contender for glucose transport into the human beta cell. **Diabetologia**, v. 55, n. 9, p. 2312–2315, 2012.
- VAN DIJCK, P. et al. Nutrient sensing at the plasma membrane of fungal cells. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 2, p. 10–1128, 2017.
- VERCOE, P. E.; KOCHERGINSKAYA, S. A.; WHITE, B. A. Differential protein phosphorylation-dephosphorylation in response to carbon source in *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. **Journal of applied microbiology**, v. 94, n. 6, p. 974–80, 2003.
- VIDAL, M. D. F. PRODUÇÃO E MERCADO DE ETANOL. **Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE**, v. 6, n. 159, 2021.
- VIDAL, M. DE F. Agroindústria - Etanol. **Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE**, v. 7, n. 237, 2022.
- VISHWAKARMA, P. et al. Phylogenetic and conservation analyses of MFS transporters. **3 Biotech**, v. 8, n. 11, p. 462, 2018.
- WANG, H. et al. Intracellular Sugar Transporters Facilitate Cellulase Synthesis in *Trichoderma reesei* Using Lactose. **Biomolecules**, v. 13, n. 2, p. 295, 2023a.
- WANG, H. et al. Intracellular Sugar Transporters Facilitate Cellulase Synthesis in *Trichoderma reesei* Using Lactose. **Biomolecules**, v. 13, n. 2, p. 295, 2023b.
- WANG, L. et al. A novel transcriptional regulator RXE1 modulates the essential transactivator XYR1 and cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 11, p. 4511–4523, 2019a.
- WANG, L. et al. CLP1, a Novel Plant Homeo Domain Protein, Participates in Regulating Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019b.
- WANG, M. et al. A Mitogen-Activated Protein Kinase Tmk3 Participates in High Osmolarity Resistance, Cell Wall Integrity Maintenance and Cellulase Production Regulation in *Trichoderma reesei*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72189, ago. 2013.
- WANG, M. et al. Identification of the role of a MAP kinase Tmk2 in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Scientific Reports**, v. 4, p. 6732, 2014.
- WANG, M. et al. Functional analysis of *Trichoderma reesei* CKII α 2, a catalytic subunit of casein kinase II. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 14, p. 5929–38, jul. 2015.
- WANG, M. et al. Role of *Trichoderma reesei* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in cellulase formation. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 99, 2017.

WANG, Z. et al. Functional characterization of sugar transporter CRT1 reveals differential roles of its C-terminal region in sugar transport and cellulase induction in *Trichoderma reesei*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e00872-22, 2022.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 1 maio 2009.

WEI, H. et al. A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 2, p. 148–156, 2004.

WIECZORKE, R. et al. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 464, n. 3, p. 123–128, 31 dez. 1999.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407–W410, jul. 2007.

WIJNANTS, S. et al. Sugar Phosphorylation Controls Carbon Source Utilization and Virulence of *Candida albicans*. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1274, 16 jun. 2020.

WILLIAMS, C. J. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 293–315, 1 jan. 2018.

WISEDCHAISRI, G. et al. Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4521, 2014.

WU, L.; FRITZ, J. D.; POWERS, A. C. Different functional domains of GLUT2 glucose transporter are required for glucose affinity and substrate specificity. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4205–4212, 1998.

YAMADA, K. et al. Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. **Science**, v. 354, n. 6318, p. 1427–1430, 2016.

YAN, N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 44, n. 1, p. 257–283, 22 jun. 2015.

YOUNG, E. M. et al. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. 131–136, 2014.

YUAN, Y. et al. Cryo-EM structure of human glucose transporter GLUT4. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 2671, 2022.

ZANGEROLAME TAROCO, L. S.; SABBÁ COLARES, A. C. The un Framework Convention on Climate Change and the Paris Agreement: Challenges of the Conference of the Parties. **Prolegómenos**, v. 22, p. 125–135, 2019.

ZEILINGER, S. et al. Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 270, n. 1, p. 46–55, set. 2003.

ZHANG, J. et al. Ras GTPases modulate morphogenesis, sporulation and cellulase gene expression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48786, 2012.

ZHANG, W. et al. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. **J Biol Chem**, v. 288, n. 46, p. 32861–32872, 2013.

ZHANG, W. et al. Identification of residues important for substrate uptake in a glucose transporter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 13829, 2015a.

ZHANG, X. C. et al. Energy coupling mechanisms of MFS transporters. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 24, n. 10, p. 1560–1579, out. 2015b.

ZHOU, Q. et al. Differential involvement of β -glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 11, p. 1371–81, nov. 2012.

8. APÊNDICES

- a. RESULTADOS DA BUSCA POR SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS NÃO REDUNDANTES CONTRA O TRANSPORTADOR TR69957 PELA FERRAMENTA BLASTP
- b. RESULTADOS DA BUSCA POR SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS NÃO REDUNDANTES DE ORGANISMOS MODELOS CONTRA O TRANSPORTADOR TR69957 PELA FERRAMENTA BLASTP
- c. RESULTADOS DA BUSCA POR SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS NÃO REDUNDANTES ESTRUTURALMENTE RESOLVIDAS CONTRA O TRANSPORTADOR TR69957 PELA FERRAMENTA BLASTP