UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CLÁUDIA BATISTA CARRARO

**Identificação de alvos de fosforilação de MAPK em *Trichoderma reesei* através de
fosfoproteômica durante a produção de celulasas**

RIBEIRÃO PRETO

2018

CLÁUDIA BATISTA CARRARO

**Identificação de alvos de fosforilação de MAPK em *Trichoderma reesei* através de
fosfoproteômica durante a produção de celulasas**

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

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Dr. Roberto do Nascimento Silva

RIBEIRÃO PRETO

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVECCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Carraro, Cláudia Batista

Identificação de alvos de fosforilação de MAPK em *Trichoderma reesei* através de fosfoproteômica durante a produção de celulasas

82p. il., 30 cm.

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

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Dr. Roberto do Nascimento Silva

1. *Trichoderma reesei*. 2. Vias de sinalização. 3. MAPK. 4. Celulasas. 5. Fosfoproteômica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARRARO, C. B.

Identificação de alvos de fosforilação de MAPK em *Trichoderma reesei* através de fosfoproteômica durante a produção de celulases

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre 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.

Aos meus tios, Chatri e Ana.

Aos meus avós, Abílio e Magdalena, a base de todos os meus ensinamentos.

As minhas amigas, Mônica e Letícia.

Aos meus amores, Margarida, Julieta, Malu e Bella.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha mãe, grande exemplo de mulher forte e independente que eu me orgulho muito de seguir. Meu coração transborda de amor por ti. Espero ter herdado toda essa força e dedicação que você possui.

Ao Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva, por ter me recebido em seu laboratório, e por ter me orientado nesse trabalho. Obrigado por todos os desafios a mim propostos e todo conhecimento científico a mim cedido. Você é um exemplo de pessoa e profissional.

À minha professora e amiga, Prof^a. Dr^a. Nereida Mello da Rosa Gioppo, por ter me introduzido ao mundo científico, por todos os ensinamentos e confiança depositados em mim.

À Prof^a. Dr^a. Graziella Elisa Rosein e ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio, do Centro Redox de Proteômica, da unidade de Espectrometria de Massas, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela análise de espectrometria de massas de nossas amostras.

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 por não me xingar quando eu sujava mais vidrarias (coitado do Douglas).

À galera do Laboratório de Biotecnologia Molecular: Renatinho, Wellington, Douglas, Karol, Amanda, Alinne, Mari Morena, Mari Loira e Lili. Obrigada pelo apoio em todos os momentos que eu precisei, pelas boas risadas, fofocas, rolês e todo o auxílio durante meu mestrado. Em especial, agradeço ao Renatinho, Ton e Lili por toda a ajuda no meu trabalho, sem vocês isso não seria possível.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, Laura e João. Minha grande amiga Laura, obrigada por compartilhar todos os momentos comigo, desde os mais loucos e divertidos, até os mais sérios e intelectuais, espero te ver na Espanha em breve. Agradeço (e muito) ao João pelo 6-pack de risadas que eu sempre consigo quando a gente se vê, por ser meu ombro amigo nessa cidade, e por ter me apresentado um estilo de vida completamente maravilhoso.

Às minhas amigas da zoeira: Thais, Nene, Talita e Maira. Que nossa amizade continue durando por muitos e muitos anos rendendo ótimas risadas, e que vocês continuem com toda a capacidade cortante de uma pessoa saudável (vocês entendem). Vocês são linfas e nossa amizade é abençoada de beus.

Às minhas queridas amigas que a faculdade trouxe para minha vida: Gaúcha, Laiza, Aline, Lieko, Doni, Débora, Letícia, Maira, Thais, Nene (repito mesmo). Que nós ainda tenhamos muitos eventos para nos reunirmos, lembrarmos de nossas peripécias mitológicas (podemos pensar em contratar o tal do Jorge Matheus para o after dos eventos), e deixar a Dinda sempre feliz. #vamosmexermocada

Às minhas melhores amigas da vida inteira, Mônica e Letícia, por todo apoio do universo. Muito obrigada por vocês estarem sempre lá por mim, me apoiando, me aconselhando, me ouvindo (e até brigando comigo). Mônica, minha melhor amiga BFF gêmea desde a fase EMO/chinelo e meia, e Letícia, esse ser que a farmacologia trouxe pra me atazanar, espero que vocês atinjam o patamar máximo de felicidade na vida de vocês – não aceito menos que isso. Todo o sucesso que eu desejo para mim, eu desejo para vocês também. Vocês são mais que especiais para mim.

Às minhas pequenas, Margarida, Julieta, Bella e Malu. Ao amor da minha vida, dona Margarida, por sempre me mostrar que as imperfeições se tornam perfeitas quando se possui um coração bom; amo muito você e seus olhos de jabuticaba. À Julieta, a jubarte mais linda do universo, por ser um poço de carinho e amor, mesmo que escondido no meio dessa carcaça raivosa. À Malu, minha companheira da vida que me ensinou o significado de amor incondicional e livre; obrigada por todo o carinho e pelos longos papos. À Bella, minha primeira melhor amiga, que me ensinou que laços de amizade podem ser extremamente fortes quando sinceros, independentemente de nossas diferenças. Gaga, Juba e Malu, espero poder acompanhar vocês por muitos anos da minha vida e que eu consiga retribuir todo o amor concedido a mim por vocês. Bella, você continua no meu coração e assim vai permanecer até o fim.

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.

Aos meus avós, Abílio e Magdalena. Gostaria muito que vocês estivessem nesse plano para acompanhar essa minha conquista. Espero que, onde quer que vocês estejam, se sintam orgulhosos da “Pituquinha do Vô”. Sinto saudades eternas de vocês.

Aos meus tios, Chatri e Ana. Vocês são pessoas incríveis. Tio Chatri, você é um exemplo de determinação. Tia Ana, você é uma das pessoas mais amorosas que eu conheci na minha vida toda, além de toda a força que você esbanja (deve ser mal das Batistas). Admiro muito vocês.

E a todas as pessoas que contribuíram, de forma direta ou não, para a concretização desse objetivo.

Do fundo do coração, obrigada.

“Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade”.

(Dalai Lama)

RESUMO

CARRARO, Cláudia Batista. **Identificação de alvos de fosforilação de MAPK em *Trichoderma reesei* através de fosfoproteômica durante a produção de celulases.** 2018. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O fungo filamentosso *Trichoderma reesei* é uma espécie de grande importância biotecnológica no que tange a degradação de biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol em larga escala. Seu sistema de enzimas celulolíticas é muito eficiente, apesar de ser possuir poucas celulases, sugerindo que o controle dessas enzimas vai além da regulação transcricional. Assim, neste trabalho nós obtivemos o perfil fosfoproteômico de *T. reesei* cultivado em glicose e bagaço de cana-de-açúcar a partir de análise fosfoproteômica LC-MS/MS por *spectral counting*. A comparação entre os perfis de fosfoproteínas obtidos das linhagens parental QM6a de *T. reesei* e dos mutantes *knockout* para TMK1 e TMK2 permitiu a demonstração de que essas MAPK agem de maneira interconectada com outras vias de transdução de sinal na célula, especialmente a via de TOR e de AMPc-PKA, para regulação da produção de celulases. Além disso, também demonstramos a regulação da resposta a estresse celular por TMK2, e o papel da fosforilação no controle direto de enzimas CAZy. Nossos resultados mostram que a fosforilação desempenha papel importante na regulação dessas enzimas e de outras funções celulares no fungo após a transcrição de seus respectivos genes. O agrupamento desses dados permite melhor entendimento da via de sinalização mediada pelas MAPK TMK1 e TMK2 de *T. reesei*, e como as modificações pós-traducionais promovidas por elas afetam no *sensing* de nutrientes celulares e, por consequência, na produção de enzimas celulolíticas, de forma direta ou indireta.

Palavras-chave: *Trichoderma reesei*. Vias de sinalização. MAPK. Celulases. Fosfoproteômica

ABSTRACT

CARRARO, Cláudia Batista. **Identification of phosphorylation targets for *Trichoderma reesei* MAPKs through phosphoproteomics during the production of cellulases** 2018. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The filamentous fungus *Trichoderma reesei* has great biotechnological importance in regards to the lignocellulosic biomass degradation for large-scale production of bioethanol. Its cellulolytic system is very efficient, despite being composed by only a few cellulases, which suggests that the control of these enzymes goes beyond their transcriptional regulation. Thus, in this study, we performed a spectral counting LC-MS/MS analysis and achieved the phosphoproteomic profile of *T. reesei* grown either in glucose or sugarcane bagasse as sole carbon source. The comparison between the phosphoproteins profiles obtained from the parental strain QM6a and the knockout mutants for TMK1 and TMK2 allowed us to demonstrate that these MAPK act in an interconnected manner with other signaling transduction pathways, especially the TOR and cAMP-PKA pathways, in order to regulate the cellulases production. Furthermore, we were also able to determine the regulation of cellular stress response by TMK2, and the role of phosphorylation in the direct control of CAZymes. Our results show that phosphorylation plays an important role on the control of these enzymes and other cellular functions in *T. reesei* after the transcription of their respective genes. Taken together, this data allows better comprehension of the signaling pathways mediated by TMK1 and TMK2 in *T. reesei*, and how the post-translational modification promoted by these MAPK might affect the nutrient sensing and, therefore, the production of the cellulolytic enzymes, either directly or indirectly.

Keywords: *Trichoderma reesei*. Signaling pathways. MAPK. Cellulases. Phosphoproteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático das holocelulases de <i>Trichoderma reesei</i>	3
Figura 2. Vias de sinalização mediada por MAPK em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	9
Figura 3. Rede de interações proteína-proteína envolvendo TMK1, de forma direta ou indireta.	11
Figura 4. Rede de interações proteína-proteína envolvendo TMK2, de forma direta ou indireta.	12
Figura 5. Eletroforese SDS-PAGE do extrato proteico total obtido das linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i>	24
Figura 6. Replicatas biológicas da linhagens cultivadas em glicose, usadas para análise de espectrometria de massas MS/MS.....	25
Figura 7. Replicatas biológicas da linhagens cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar, usadas para análise de espectrometria de massas MS/MS.....	26
Figura 8. Proporção das quantidades de sítios de fosforilação encontrados nas fosfoproteínas identificadas na análise de espectrometria de massas MS/MS.....	28
Figura 9. Distribuição dos tipos de resíduos fosforilados encontrados nas fosfoproteínas identificadas na análise de espectrometria de massas MS/MS.....	29
Figura 10. Distribuição das fosfoproteínas identificadas com base na classificação por grupos KOG.....	30
Figura 11. Classificação das fosfoproteínas encontradas na linhagem parental QM6a de acordo com as classes de KOG, sob cultivo em glicose ou bagaço de cana-de-açúcar.	31
Figura 12. Classificação das fosfoproteínas encontradas na linhagem mutante $\Delta tmk1$ de acordo com as classes de KOG, sob cultivo em glicose ou bagaço de cana-de-açúcar.	32
Figura 13. Classificação das fosfoproteínas encontradas na linhagem mutante $\Delta tmk2$ de acordo com as classes de KOG, sob cultivo em glicose ou bagaço de cana-de-açúcar.	33
Figura 14. Proporção das funções das fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, de acordo com as anotações KOG, sob crescimento em glicose como fonte de carbono.	34
Figura 15. Proporção das funções das fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, de acordo com as anotações KOG, sob crescimento em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.	35

Figura 16. <i>Heatmap</i> das intensidades computadas para as fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, <i>Δtmk1</i> e <i>Δtmk2</i> , sob crescimento em glicose ou bagaço de cana como fonte de carbono.	36
Figura 17. Distribuição do total de fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, <i>Δtmk1</i> e <i>Δtmk2</i> , sob crescimento em glicose como fonte de carbono.	37
Figura 18. Distribuição das proteínas igual e diferencialmente fosforiladas nas linhagens parental QM6a, <i>Δtmk1</i> e <i>Δtmk2</i> , sob crescimento em glicose como fonte de carbono.....	38
Figura 19. Predição da interação de TMK1 com as proteínas diferencialmente fosforiladas envolvidas com processos de sinalização celular, em glicose.....	39
Figura 20. Predição da interação de TMK2 com as proteínas diferencialmente fosforiladas envolvidas com processos de sinalização celular, em glicose.....	40
Figura 21. Distribuição do total de fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, <i>Δtmk1</i> e <i>Δtmk2</i> , sob crescimento em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.	41
Figura 22. Distribuição das proteínas igual e diferencialmente fosforiladas nas linhagens parental QM6a, <i>Δtmk1</i> e <i>Δtmk2</i> , sob crescimento em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono..	42
Figura 23. Predição da interação de TMK1 com as proteínas diferencialmente fosforiladas envolvidas com processos de sinalização celular, em bagaço de cana-de-açúcar.....	42
Figura 24. Predição da interação de TMK2 com as proteínas diferencialmente fosforiladas envolvidas com processos de sinalização celular, em bagaço de cana-de-açúcar.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meio MEX	17
Tabela 2. Meio Mandels-Andreotti	17
Tabela 3. Solução-tampão de extração de proteínas intracelulares	18
Tabela 4. Solução-tampão de amostra	19
Tabela 5. Gel Separador 12%	19
Tabela 6. Gel Concentrador 5%	20
Tabela 7. Tampão de corrida	20
Tabela 8. Corante Coomassie Brilliant Blue Coloidal R-250	21
Tabela 9. Gradiente de separação dos fosfopeptídeos	22
Tabela 10. Total de fosfopeptídeos e fosfoproteínas significativos identificados nas linhagens QM6a, <i>Δtmk1</i> e <i>Δtmk2</i> , sob cultivo em diferentes fontes de carbono.	27
Tabela 11. Fosfoproteínas identificadas na linhagem QM6a de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em glicose.	64
Tabela 12. Fosfoproteínas identificadas no mutante <i>Δtmk1</i> de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em glicose.	64
Tabela 13. Fosfoproteínas identificadas no mutante <i>Δtmk2</i> de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em glicose.	64
Tabela 14. Fosfoproteínas identificadas na linhagem QM6a de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	64
Tabela 15. Fosfoproteínas identificadas no mutante <i>Δtmk1</i> de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	64
Tabela 16. Fosfoproteínas identificadas no mutante <i>Δtmk2</i> de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	64
Tabela 17. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas na linhagem QM6a de <i>T. reesei</i> , com relação à TMK1, sob cultivo em glicose.	64
Tabela 18. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas no mutante <i>Δtmk1</i> de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em glicose.	64
Tabela 19. Fosfoproteínas igualmente fosforiladas na linhagem QM6a e no mutante <i>Δtmk1</i> de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em glicose.	64
Tabela 20. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas na linhagem QM6a de <i>T. reesei</i> , com relação à TMK2, sob cultivo em glicose.	64

Tabela 21. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas no mutante $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em glicose.	64
Tabela 22. Fosfoproteínas igualmente fosforiladas na linhagem QM6a e no mutante $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em glicose.	64
Tabela 23. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas na linhagem QM6a de <i>T. reesei</i> , com relação à TMK1, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	65
Tabela 24. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas no mutante $\Delta tmk1$ de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	65
Tabela 25. Fosfoproteínas igualmente fosforiladas na linhagem QM6a e no mutante $\Delta tmk1$ de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	65
Tabela 26. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas na linhagem QM6a de <i>T. reesei</i> , com relação à TMK2, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	65
Tabela 27. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas no mutante $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	65
Tabela 28. Fosfoproteínas igualmente fosforiladas na linhagem QM6a e no mutante $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i> , sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Trichoderma reesei</i> e a produção de holocelulases	1
1.2. Regulação transcricional da expressão de celulasas	4
1.3. As vias de sinalização e a produção de celulasas por <i>T. reesei</i>	6
1.4. Vias de sinalização por MAPK	7
1.5. Análise fosfoproteômica por espectrometria de massas	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos:	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Origem e manutenção das cepas de <i>Trichoderma reesei</i>	16
3.2. Condições de cultivo e meios de cultura utilizados	16
3.3. Extração de proteínas	18
3.4. Análise eletroforética por SDS-PAGE	19
3.5. Digestão tripsínica	21
3.6. Enriquecimento de fosopeptídeos	21
3.7. Espectrometria de massas	22
3.8. Processamento e análise de dados obtidos pela espectrometria de massas	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Verificação da qualidade do extrato proteico e da presença de proteínas fosforiladas	24
4.2. Identificação e quantificação de fosopeptídeos e fosfoproteínas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i>	25

4.3. Categorização funcional das fosfoproteínas identificadas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i>	29
4.4. Comparação do perfil transcricional com o perfil de fosforilação das proteínas identificadas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i> , cultivadas em glicose como fonte de carbono.35	
4.5. Comparação do perfil transcricional com o perfil de fosforilação das proteínas identificadas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de <i>T. reesei</i> cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono	41
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO DE PUBLICAÇÕES.....	63
APÊNDICE	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trichoderma reesei* e a produção de holocelulases

Com o aumento da população mundial, o rápido desenvolvimento da industrialização e com o início de escassez dos combustíveis fósseis e os danos ambientais causados por esse tipo de fonte energética, dá-se atenção à busca e desenvolvimento de novas tecnologias de fontes alternativas de energia renovável. Assim, é fundamental que a produção de biocombustíveis não implique na produção de alimentos para animais e pessoas, e que não cause desflorestamento ou qualquer tipo de dano ambiental, ou seja, deve ser sustentável, além de economicamente viável (PEREIRA et al., 2015). O Brasil, por ser o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo atual e um dos maiores de bioetanol, tem também a maior geração de resíduos provindos desse tipo de cultivo. Os resíduos lignocelulósicos (constituídos de celulose, hemicelulose e lignina), como o bagaço da cana-de-açúcar, são normalmente queimados ou descartados, porém, atualmente tem-se percebido que esse tipo de material é uma potente fonte de etanol de segunda geração (CANILHA et al., 2012; KILBANE, 2016; KOPPRAM et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; YADAV et al., 2014).

Enquanto o etanol de primeira geração é produzido a partir da fermentação do suco diretamente extraído da cana-de-açúcar, a produção de etanol de segunda geração consiste primeiramente na liberação de celulose e hemicelulose do bagaço dessa cana-de-açúcar, para que, então, os monômeros de glicose provindos desses polímeros possam sofrer fermentação até etanol (CANILHA et al., 2012; KILBANE, 2016; KOPPRAM et al., 2014; PAULOVA et al., 2015; PEREIRA et al., 2015). Embora essa produção seja muito vantajosa em termos de disponibilidade de matéria prima e sustentabilidade ambiental (YADAV et al., 2014), o processo de produção de etanol de segunda geração apresenta alguns desafios técnicos e econômicos (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012; PAULOVA et al., 2015; PEREIRA et al., 2015). Uma vez que a degradação da biomassa lignocelulósica é realizada, normalmente, por processos enzimáticos (PITARELO et al., 2012), a compatibilidade dos coquetéis enzimáticos e tipos de microorganismos usados para produção dos mesmos têm grande influência na produção do biocombustível (PAULOVA et al., 2015).

Neste quesito, destaca-se a importância do *Trichoderma reesei*, um fungo filamentoso usado em escala industrial por ser o principal produtor das enzimas celulasas e hemicelulasas, as quais são extremamente interessantes para a indústria de biocombustíveis de segunda geração a partir de resíduos de celulose, uma vez que, para este tipo de produção são requeridas enzimas específicas para a decomposição da biomassa celulósica em monômeros de glicose (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016; GUPTA et al., 2016; HUANG et al., 2014; KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012; LI et al., 2016).

A primeira descrição do gênero *Trichoderma* se deu no final do século XVIII, porém somente após a segunda metade do século XIX, o gênero foi identificado como sendo a fase assexuada do gênero teleomórfico *Hypocrea* (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA, 2016a). As espécies do gênero *Trichoderma* são ubíquas e cosmopolitas, colonizadores de material celulósico e de rizosferas de vegetais. São produtores de diversos pigmentos, e apresentam rápido crescimento (GUPTA et al., 2016; HARMAN et al., 2012; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA, 2016a). Atualmente, mais de 100 espécies caracterizadas filogeneticamente são descritas, sendo que *T. reesei*, representante da fase assexuada de *Hypocrea jecorina*, é uma das espécies mais estudadas com relação à degradação de lignocelulose, sendo produtor altamente eficiente de enzimas celulolíticas e xilanolíticas (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016; HARMAN et al., 2012; LI et al., 2016; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA, 2016a).

Apesar de *T. reesei* apresentar uma quantidade pequena de enzimas celulolíticas, ele é o fungo filamentoso com maior capacidade de degradação de biomassa lignocelulósica, pois possui um sistema muito eficiente de indução transcricional de genes de celulasas, e de alta produção e secreção dessas enzimas (BERLIN, 2013; GUPTA et al., 2016; LI et al., 2016; SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA, 2016a). Seu sistema enzimático está ilustrado de modo geral na Figura 1 e é composto por enzimas específicas para degradação de hemicelulose e de celulose. As enzimas que participam da degradação de hemicelulose são (Figura 1b) endoxilanasas, β -xilosidasas, manosidasas, mananases, endoarabinases, galactosidasas, feruloil-esterases, arabinofuronidasas, glicuronidasas, xiloglicanasas e acetil-xilanesterases; sendo que todas essas agem de maneira conjunta e sinérgica para remoção da barreira hemicelulósica, otimizando o

acesso das enzimas celulolíticas à celulose (BERLIN, 2013; PAYNE et al., 2015; SEGATO et al., 2014).

Figura 1. Desenho esquemático das holoceluloses de *Trichoderma reesei*. (A) Modelo estrutural da biomassa lignocelulósica, a qual é composta por lignina, hemicelulose e celulose; (B) As hemiceluloses e seus respectivos alvos; (C) Celulases de *T. reesei* e seus mecanismos de ação geral.

Com relação à degradação de celulose (Figura 1c), especificamente, a espécie *T. reesei* faz uso de duas exoglicanases ou celobiohidrolases (CEL7A e CEL6A), que fazem a quebra nas extremidades redutoras e não-redutoras da cadeia polissacarídica, respectivamente; cinco endoglicanases (CEL7B, CEL5A, CEL12A, CEL61, CEL45A) e três endoglicanases preditas (CEL74A, CEL61B, CEL5b), as quais hidrolisam regiões amorfas do polissacarídeo; duas β-glicosidases (CEL3A, CEL1A) e cinco β-glicosidases preditas (CEL3B, CEL3D, CEL1B, CEL3C, CEL3E), que fazem a quebra dos oligossacarídeos, especialmente a celobiose, provindos da ação das outras enzimas celulolíticas em monossacarídeos passíveis de metabolização direta pelo microorganismo (GUPTA et al., 2016; HERPOEL-GIMBERT et al., 2008; OUYANG et al., 2006). Além disso, outras proteínas de *T. reesei* também estão envolvidas no processo de degradação de celulose, sendo elas a solenina (*swol*) e expansinas/família 45 endoglicanase-like (EEL1, EEL2 e EEL3), as quais auxiliam no acesso das enzimas celulolíticas à cadeia polissacarídica; e

lipopolissacarídeo mono-oxigenases (LPMOs), cuja ação é compreendida pelo metabolismo oxidativo dependente de íons metálicos bivalentes (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016; GUPTA et al., 2016; HERPOEL-GIMBERT et al., 2008). A ação sinérgica de todas essas proteínas e este sistema enzimático permitem que a holocelulose seja hidrolisada de modo eficiente pelo respectivo fungo filamentoso (BERLIN, 2013; GUPTA et al., 2016; HORTA et al., 2018).

1.2. Regulação transcricional da expressão de celulases

A regulação da produção e secreção de holocelulases por *T. reesei* é um mecanismo altamente coordenado, sendo dependente da disponibilidade de fontes de carbono do meio. Glicose e frutose atuam como fontes de carbono repressoras da produção de celulases, uma vez que o fungo utiliza essas fontes rapidamente metabolizáveis por serem mais favoráveis energeticamente, não necessitando da produção das enzimas para degradar materiais mais complexos (CASTRO et al., 2014; CHAMBERGO et al., 2002; DOS SANTOS CASTRO et al., 2014). Quando não há glicose ou frutose no meio, o organismo ativa sua maquinaria de degradação da biomassa, sendo os açúcares sofrorose, lactose e celulose, indutores do sistema celulolítico (CASTRO et al., 2014; DOS SANTOS CASTRO et al., 2014; SILVA, 2008). Foi demonstrado que, ao entrar em contato com a celulose presente no meio, a célula degrada essa fonte de carbono complexa pela ação da celobiohidrolase, produzindo celo-oligossacarídeos que podem ser hidrolisados até glicose diretamente metabolizável, ou transglicosilados para produção de sofrorose. Essa sofrorose age como um indutor da produção de celulases para degradação de mais biomassa, sendo que o processo funciona como um ciclo em que a sofrorose é continuamente formada até completa degradação da celulose (SUTO; TOMITA, 2001). A explicação para esse fenômeno é baseada na produção de um sinal intracelular pela celulose do meio, promovendo a produção rápida de celulases para adaptação da célula para utilização de fontes de carbono mais complexas (ZHOU et al., 2012).

Além do tipo de fonte de carbono presente no meio, o sistema celulolítico também é regulado a nível transcricional (FURUKAWA et al., 2009; NAKARI-SETALA et al., 2009; PORTNOY et al., 2011b; SHIDA; FURUKAWA; OGASAWARA, 2016b). Sabe-se que *T. reesei* possui dez fatores de transcrição envolvidos no controle da produção das celulases, sendo os reguladores positivos, ou seja, que ativam o sistema celulolítico, o XYR1, ACE2, ACE3, LAE1

VEL1, BglR e o complexo HAP2/3/5. Da mesma forma, os fatores de transcrição negativos ou repressores de celulases são ACE1, RCE1 e CRE1. XYR1 é o principal fator de transcrição responsável pela ativação da expressão dos genes relacionados com a degradação da biomassa lignocelulósica e, como já demonstrado, a deleção de *xyr1* bloqueia a expressão desses genes por completo (AKEL et al., 2009; FURUKAWA et al., 2009; PORTNOY et al., 2011a; STRICKER et al., 2006). Além disso, XYR1 é responsável pela regulação de enzimas da família CAZy, além de transportadores e outros fatores de transcrição envolvidos com esse processo, sendo também dependente da fonte de carbono presente no meio (DOS SANTOS CASTRO et al., 2016). Igualmente, ACE2 e ACE3 também são importantes para a transcrição dos genes de celulases, bem como para a função adequada dessas enzimas, já que a deleção de seus respectivos genes prejudica 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 a ativação do processo de transcrição (ZEILINGER et al., 2003). Enquanto isso, BglR controla positivamente a transcrição de genes relacionados a β -glicosidases (NITTA et al., 2012). Por fim, VEL1 tem grande influência na expressão de genes de celulases e xilanases, além de regular *xyr1* em lactose (SEIBOTH et al., 2012). Da mesma forma, LAE1 pode regular a expressão de genes de celulases, de proteínas acessórias, de β -glicosidases e de xilanases, de forma coordenada com VEL1 (KARIMI-AGHCHEH et al., 2014; SEIBOTH et al., 2012).

O principal regulador negativo da produção de celulases em *T. reesei* é CRE1, que utiliza do mecanismo de CCR (*carbon catabolite repression*) para repressão da expressão dos genes de holocelulases na presença de glicose, como forma de se economizar energia por reprimir processos de produção de compostos para degradação de fontes mais complexas de carbono (ANTONIETO et al., 2014; PORTNOY et al., 2011b). CRE1 pode reprimir a expressão de genes de celulases e dos fatores de transcrição que agem como reguladores positivos desses genes, XYR1, ACE2 e o complexo HAP2/3/5, ou pode inibir a captação e assimilação da fonte de carbono indutora de celulases (MACH-AIGNER et al., 2008, 2012). Além disso, foi demonstrado que esse fator de transcrição pode modular a expressão de genes envolvidos com o transporte de nutrientes e com o metabolismo oxidativo. Outro regulador negativo da expressão de celulases é ACE1, o qual reprime a expressão dos principais genes de celulases, *cbh1*, *cbh2*, *egl1* e *egl2*, e de xilanases, *xyn1* e *xyn2*, em condições indutoras (ARO et al., 2003). Finalmente, o fator de transcrição Rce1 foi

recentemente descrito como possuindo ação contrária ao XYR1, uma vez que pode se ligar à região promotora de *cbhl* e reprimir a expressão das celulases (CAO et al., 2017).

1.3. As vias de sinalização e a produção de celulases por *T. reesei*

A percepção e captação dos sinais do ambiente extracelular é crucial para a sobrevivência da célula fúngica. A reação aos sinais externos se dá a partir da integração de vias de sinalização celular, que se intercomunicam para promoção de uma interpretação correta do estímulo e, por consequência, de resposta rápida a esse ambiente para que a célula se adapte de maneira adequada e consiga sobreviver de forma eficiente (SCHMOLL et al., 2016). Dentre as diversas vias, a sinalização mediada por AMPc é de grande importância e altamente conservada em eucariotos, estando envolvida com diversos processos, como o controle da morfogênese, esporulação, e o monitoramento do estado nutricional e estresse celular, influenciando também nos processos de transcrição e progressão do ciclo celular (D'SOUZA; HEITMAN, 2001; KRONSTAD et al., 1998; MEHRABI et al., 2009). A via de sinalização AMPc-PKA é composta principalmente pela adenilato ciclase e as subunidades regulatória e catalítica da proteína quinase A, além de proteínas G α e GTPases como elementos *upstream* a essa cascata. Basicamente, a partir de um estímulo externo captado por um receptor GPCR, a subunidade G α é desprendida desse receptor e ativa a adenilato ciclase, que catalisa a conversão de ATP a AMPc, aumentando a concentração intracelular desse mensageiro secundário (KRONSTAD et al., 1998; LEE; D'SOUZA; KRONSTAD, 2003; OMANN; ZEILINGER, 2010; TAMAKI, 2007). Outra forma de ativação da adenilato ciclase é por meio das proteínas Ras, uma família de GTPases que interagem com essa enzima com o mesmo objetivo de se aumentar os níveis de AMPc na célula (BUDOVSKAYA et al., 2004; TAMANOI, 2011; ZHANG et al., 2012). A alta concentração de AMPc estimula a ativação da PKA, desencadeando a fosforilação de proteínas envolvidas nos diversos processos celulares já citados (BUDOVSKAYA et al., 2004; MEHRABI et al., 2009; TAMAKI, 2007). As vias de sinalização têm sido extensivamente estudadas em *T. reesei*, estando envolvidas com diversos processos celulares relacionados com a esporulação e o *sensing* do ambiente externo, além da produção de enzimas celulolíticas nessa espécie (DE PAULA, 2017; LENDENFELD; KUBICEK, 1998; MORAWETZ et al., 1996; REITHNER et al., 2005; ROCHA-RAMIREZ et al.,

2002; SCHMOLL, 2008; SESTAK; FARKAS, 1993; TISCH; SCHMOLL, 2013; WANG et al., 2013b, 2014a; ZHANG et al., 2012).

A via de sinalização intercedida por proteínas G e AMPc pode controlar diversos processos envolvidos com o desenvolvimento celular, morfogênese, metabolismo secundário, manutenção da parede celular e micoparasitismo em *Trichoderma* (REITHNER et al., 2005; ROCHA-RAMIREZ et al., 2002; SILVA et al., 2009). Foi demonstrado que as proteínas G α podem auxiliar no controle da transcrição de genes relacionados à produção de celulases a partir de estímulos luminosos (SCHMOLL et al., 2009; SEIBEL et al., 2009). Da mesma forma, as proteínas G e GTPases Ras podem modular a expressão de *cbh1* na presença de celulose (WANG; NUSS, 1995; ZHANG et al., 2012). Além disso, as concentrações intracelulares de AMPc podem regular a expressão de genes de celulases dependendo da fonte de carbono do meio em que a célula se encontra (NOGUEIRA et al., 2015; SESTAK; FARKAS, 1993).

A fosforilação desempenha importante papel no controle de muitos processos celulares. A adição de grupamentos fosfato às proteínas se dá a partir da ação de proteínas quinase, e a retirada desses grupamentos pelas proteínas fosfatases (DICKMAN; YARDEN, 1999; HUMPHREY; JAMES; MANN, 2015). Esse processo de fosforilação e desfosforilação tem se mostrado como envolvido no controle da expressão de genes das enzimas celulolíticas em *T. reesei* (SCHMOLL et al., 2016). Foi demonstrado que, a partir do controle exercido por estímulo luminoso, a PKA participa ativamente da regulação da transcrição dos referidos genes (SCHUSTER et al., 2012). Além dela, outras proteínas quinases, como a casína quinase CKII α 2 e a EK1, modulam a expressão de genes relacionados com a produção de quitinases, além da esporulação, metabolismo de glicose e processos relacionados com a parede celular (HE; GUO; ZHANG, 2015; WANG et al., 2015).

1.4. Vias de sinalização por MAPK

Para que o *T. reesei* tenha sucesso na colonização de diversos habitats, é preciso que ele utilize o substrato presente no ambiente de forma bastante eficiente. Para isso, produção e secreção das enzimas holocelulolíticas deve ser finamente regulada, para que a degradação da biomassa disponível se dê de forma eficaz (GUPTA et al., 2016; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SHIDA;

FURUKAWA; OGASAWARA, 2016a). Esse controle é realizado por meio da regulação da expressão gênica e por modificações pós-traducionais, em especial a fosforilação. Os mecanismos de transdução de sinal por meio de proteínas ativadoras de mitógenos (MAPK) permite que o microrganismo seja capaz de sentir as mudanças no ambiente externo e de promover a resposta celular adequada para sua adaptação. A partir da recepção de um sinal externo, as cascatas de fosforilação são responsáveis pela transmissão, integração e amplificação desse sinal, o qual pode estar envolvido em vários processos celulares e fundamentais para a sobrevivência celular.

Cada cascata corresponde à fosforilação de uma proteína quinase para a sua ativação. As MAPKKK (proteínas quinase quinase quinase) são ativadas, dependendo da situação, por uma MAPKKKK (proteína quinase quinase quinase), ou diretamente por uma proteína ativadora, estando as GTPases e a proteína quinase C (PKC) dentre as principais ativadoras das MAPKKK (QI; ELION, 2005). Sua ativação induz à fosforilação de uma MAPKK (proteína quinase quinase), em resíduos específicos dos aminoácidos serina e treonina. A MAPKK fosforila a MAPK em resíduos específicos de treonina e tirosina, que a partir disso, age em substratos, podendo essa interação ocorrer no núcleo ou citoplasma, regulando as funções celulares (HAMEL et al., 2012; PEARSON et al., 2001; SCHAEFFER; WEBER, 1999). A sinalização é dinâmica, em que a célula responde às alterações do ambiente em certo tempo, podendo a mesma ser isolada ou interconectada (*cross-talk*), sendo, portanto, de suma importância a regulação estrita de cada uma das cascatas. As MAPK são proteínas responsáveis pela regulação da resposta celular de acordo com estado nutricional, estresse ambiental, desenvolvimento sexual ou assexual, e morfogênese celular (HAMEL et al., 2012; LENGELER et al., 2000; PEARSON et al., 2001; SCHAEFFER; WEBER, 1999).

Em *Saccharomyces cerevisiae* são definidas cinco MAPKs (Figura 2): Fus3, essencial para a regulação da resposta a feromônios; Kss1, que participa da mesma resposta de Fus3, mas também se envolve na regulação do crescimento invasivo e filamentosos; Hog1, que regula a resposta ao estresse osmótico extracelular e ao ácido cítrico; Mpk1, que regula a integridade da parede celular e brotamento em respostas a mudanças físicas na parede; e Smk1, envolvida na regulação da esporulação (CHEN; THORNER, 2007; MART, 2010; QI; ELION, 2005).

Figura 2. Vias de sinalização mediada por MAPK em *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Chen e Thorner, 2017.

A partir do sequenciamento genômico de *T. reesei*, foi possível a identificação de três genes para MAPK (MARTINEZ et al., 2008; SCHMOLL et al., 2016). O primeiro deles, *tmk1* (ID 121539), que é homólogo de Fus3 de *S. cerevisiae*, o qual codifica TMK1 e participa das funções de regulação da produção de chitinases, celulasas e glicosil-hidrolases; e, ao deletar-se esse gene em *T. reesei*, observa-se uma superexpressão gênica pra chitinases (MENDOZA-MENDOZA et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2003; REITHNER et al., 2007; SCHMOLL, 2008; WANG et al., 2017). A segunda MAPK de *T. reesei* identificada é a TMK2 (ID 82351), homóloga de Slt2 de *S. cerevisiae*, sendo envolvida em respostas para estresse e integridade da parede celular, esporulação e produção de celulasas no respectivo fungo filamentososo (WANG et al., 2014b). TMK3 (ID 45018), outra MAPK de *T. reesei*, é homóloga de Hog1 em *S. cerevisiae*, estando envolvida em mecanismos de osmorregulação e integridade da parede celular (WANG et al., 2013a, 2017).

Através de caracterizações funcionais, De Paula (2017) demonstrou que em *T. reesei*, assim como acontece com as MAPK descritas em *S. cerevisiae*, TMK1 e TMK2 podem regular processos independentemente entre si, ou podem ser interconectadas, sendo isso importante para a modulação da expressão gênica desse organismo. Também foi demonstrado que, além de ambos

os genes que codificam para essas MAPK serem superexpressos na linhagem parental QM6a quando cultivada em bagaço de cana-de-açúcar, os respectivos mutantes *knockout* têm seus fenótipos mudados quando crescidos em glicose e lactose, assim como alterações no controle osmótico. Por meio de análises transcricionais por RNA-seq, o mesmo autor mostrou que *tmk1* e *tmk2* são envolvidos na regulação de expressão de celulases, do controle epigenético da expressão gênica, no reconhecimento, transporte e metabolismo de diferentes fontes de carbono e no metabolismo oxidativo. Além disso, TMK1 e TMK2 apresentam sítios preditos de fosforilação em diversos genes diferencialmente expressos em mutantes para a referida linhagem, o que levanta a hipótese de um papel fundamental das cascatas de fosforilação de MAPKs para a regulação e expressão gênica em *T. reesei*.

O presente trabalho consiste na análise fosfoproteômica do papel de duas das MAPK de *T. reesei*, TMK1 e TMK2. A partir da predição de redes de associações proteicas obtidas pela plataforma STRING (<https://string-db.org/>) (SZKLARCZYK et al., 2017), é possível observar que TMK1 (Figura 3) interage diretamente com três MAPKK, sendo elas a Mkk1 (ID 21168), com a qual possui uma relação inibitória; uma MAPKK envolvida com a osmorregulação intracelular (ID 80816); e uma MAPKK homóloga a Ste7p de *S. cerevisiae*, a qual é envolvida na resposta a feromônios e controle do crescimento filamentosos (CHEN; THORNER, 2007). TMK1 também interage com duas proteínas fosfatases, sendo uma de dupla especificidade (ID 119697), possivelmente interferindo com a regulação transcricional da mesma; e duas de domínio Tyr-fosfatase (ID 77689 e ID 25159). Além disso, na mesma predição, TMK1 se mostra diretamente envolvida na inibição de Ste12, um transativador transcricional envolvido na resposta a feromônios; e na inibição da adenilato-ciclase (*acy1*, ID 49183), mostrando o possível envolvimento de AMPc nas vias de sinalização envolvidas na produção de celulases, como demonstrado por Nogueira et al. (2015). Não obstante, TMK1 ainda se mostra envolvido na ativação direta e indireta (por meio de uma interação com o regulador da resposta a estresse celular, ID 47635) de uma proteína com domínio Hsp90 (ID 123114), ainda não descrita em literatura.

Figura 3. Rede de interações proteína-proteína envolvendo TMK1, de forma direta ou indireta. Rede predita pela plataforma STRING, mostrando as possíveis interações entre TMK1 e outras proteínas de *T. reesei*.

Da mesma forma, a análise da predição das interações proteína-proteína que envolvem TMK2 (Figura 4) demonstra que essa MAPK se encontra envolvida com as MAPKK Mkk1 (ID 21168), ID 80186 e ID 75872; e com as fosfatases de IDs 77689, 119697 e 25159. TMK2 também está envolvida em uma relação inibitória com a adenilato ciclase Acy1 (ID 49183); e na ativação de uma proteína predita de domínio Hsp90 (ID 123114), de forma direta ou indireta. Além disso, TMK2 parece estar envolvido na ativação de um fator de transcrição predito de domínio MADS-box, o qual ainda não foi descrito na literatura.

Figura 4. Rede de interações proteína-proteína envolvendo TMK2, de forma direta ou indireta. Rede predita pela plataforma STRING, mostrando as possíveis interações entre TMK2 e outras proteínas de *T. reesei*.

1.5. Análise fosfoproteômica por espectrometria de massas

A adição de grupamentos fosfato em determinados resíduos aminoacídicos permite a alteração de atividade proteica, estabilidade, localização e de interações entre as proteínas, propiciando uma resposta celular rápida aos estímulos externos e adaptação com rapidez e eficiência aos diversos tipos de ambientes e situações que ela possa se encontrar, como já mencionado (GRIMSRUD et al., 2010; HUANG; WHITE, 2008; LARANCE; LAMOND, 2015; MUMBY; BREKKEN, 2005).

Devido ao fato de que a quantidade de proteínas fosforiladas em uma célula é muito menor do que as demais proteínas em determinado momento, e pela transigência dos eventos de fosforilação, torna-se desafiadora a análise desses parâmetros (GRIMSRUD et al., 2010; HUANG;

WHITE, 2008; HUANG et al., 2010; ROUX; THIBAUT, 2013). Assim, técnicas mais sensíveis para quantificação de proteínas fosforiladas em um proteoma têm sido desenvolvidas, sendo uma das técnicas mais empregada a análise baseada em espectrometria de massas (MS), uma vez que ela permite a investigação fosfoproteômica em larga escala e em diversos contextos biológicos (GRIMSRUD et al., 2010; HUANG et al., 2010; LARANCE; LAMOND, 2015; MUMBY; BREKKEN, 2005; ROUX; THIBAUT, 2013).

Um dos fatores que determina o sucesso da análise fosfoproteômica é o isolamento de peptídeos fosforilados de misturas complexas de proteínas. Para isso, é necessário o enriquecimento desses fosfopeptídeos (GRIMSRUD et al., 2010; ROUX; THIBAUT, 2013). Atualmente, existem diversas técnicas de enriquecimento, sendo as principais baseadas em cromatografias de afinidade por metais, porém métodos alternativos também podem ser utilizados, como métodos químicos e de imunoprecipitação (GRIMSRUD et al., 2010; HUANG; WHITE, 2008; ROUX; THIBAUT, 2013). No nosso trabalho, usamos o enriquecimento baseado em afinidade com óxidos de metais (MOAC), sendo essa a técnica geralmente mais utilizada, e que compreende o uso de microcolunas com óxido de titânio ou zircônio, onde os grupos fosfato são adicionados em pH ácido e eluídos em pH básico (NEGRONI et al., 2012; ROUX; THIBAUT, 2013; WOLSCHIN; WECKWERTH, 2005; WOLSCHIN; WIENKOOP; WECKWERTH, 2005).

Após o enriquecimento, pode-se realizar técnicas de análise quantitativa, como o uso de isótopos estáveis incorporados em cultura celular (SILAC), marcadores químicos (TMT, iTRAQ ou DiART), e o método de *spectral counting* (GRIMSRUD et al., 2010; HUANG; WHITE, 2008; HUANG et al., 2010). Devido a certas limitações no emprego de marcadores químicos e isótopos, a abordagem por *spectral counting* tem sido muito utilizada para quantificação em fosfoproteômica (BALBUENA; DEMARTINI; THELEN, 2014; HUANG; WHITE, 2008; LUNDGREN et al., 2010). Esta técnica, que foi utilizada no nosso trabalho, tem a vantagem de permitir que os peptídeos fosforilados possam ser quantificados em apenas uma condição específica, já que ela é fundamentada na contagem dos espectros gerados nas amostras em que determinado peptídeo foi identificado (BALBUENA; DEMARTINI; THELEN, 2014; HUANG et al., 2010; LUNDGREN et al., 2010; ROUX; THIBAUT, 2013).

Considerando as possíveis interações proteína-proteína em que as MAPK estão envolvidas e os dados de RNA-seq obtidos previamente por nosso grupo de pesquisa (De Paula, 2017), nós fizemos a análise fosfoproteômica por espectrometria de massas para avaliar o papel da fosforilação mediada pelas MAPK TMK1 e TMK2 na presença de bagaço de cana-de-açúcar e glicose como fontes de carbono, e como isso pode influenciar na regulação da produção e expressão de celulasas em *T. reesei* após a transcrição de seus respectivos genes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a análise fosfoproteômica do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* durante a degradação de glicose e bagaço de cana-de-açúcar no intuito para identificar os mecanismos regulatórios envolvendo as vias de sinalização celular mediada pelas MAPKs a partir da identificação de seus alvos específicos de fosforilação.

2.2. Objetivos específicos:

Realizar a análise fosfoproteômica de *T. reesei* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e glicose para identificar os alvos de fosforilação das MAPKs em *T. reesei* cultivado em bagaço de cana de açúcar e em glicose;

Correlacionar a via de sinalização mediada pelas MAPK TMK1 e TMK2 de *T. reesei* com outras vias de sinalização envolvidas na regulação da produção de celulasas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Origem e manutenção das cepas de *Trichoderma reesei*

A linhagem parental QM6a Δ tmus53 Δ pyr4 (DERNTL et al., 2015) de *Trichoderma reesei* foi obtida 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. Este teve sua manutenção em meio MEX (Tabela 1) suplementado com 5 mM de uridina, a 4 °C, no Laboratório de Biotecnologia Molecular na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

As cepas mutantes *knockout* Δ tmk1 e Δ tmk2 foram construídas por De Paula (2017), partindo-se do princípio de recombinação homóloga mediada por levedura, de acordo com os protocolos descritos por Collopy et al. (2010), Colot et al. (2006), e Gietz et al. (2007). Para isso, foi utilizada a linhagem SC9721 de *S. cerevisiae* (MAT α his3- Δ 200 URA3-52 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63) (Fungal Genetic Stock Center – www.fgsc.net), e o vetor pRS426 (*ampR lacZ URA3*) digerido pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), e purificado com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemanha). As leveduras positivas foram selecionadas pelo crescimento em lisina, histidina, leucina, triptofano e a ausência de uracila. O DNA genômico das leveduras selecionadas foi extraído conforme protocolos de Goldman et al. (2003) (GOLDMAN et al., 2003) e Sambrook e Russel (2001) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), e usado para a amplificação dos cassetes de deleção descritos por De Paula (2017). A transformação de *T. reesei* foi realizada utilizando protoplastos de acordo com protocolo descrito por Gruber et al. (1990) (GRUBER et al., 1990) e a confirmação da deleção dos genes *tmk1* e *tmk2* se deu por meio de PCR convencional, de qRT-PCR e de *Southern Blotting*, também por De Paula (2017).

3.2. Condições de cultivo e meios de cultura utilizados

As três cepas utilizadas nesse trabalho foram cultivadas em meio MEX (Tabela 1) e incubadas a 30 °C por 7 dias para esporulação total. A linhagem parental QM6a foi cultivada da mesma forma, porém com a adição de 5 mM de uridina. Para cultivo em glicose como fonte de

carbono, 10^6 esporos/mL de cada uma das linhagens mutantes e parental cultivadas em meio MEX foram inoculados, em triplicata, em 200 mL de meio de cultura Mandels-Andreotti (Tabela 2) provido de 2% (p/v) de glicose. Cada Erlenmeyer contendo os referidos inóculos foi incubado em *shaker* a 30 °C/200 rpm por 48h. Após esse período, os micélios produzidos foram coletados por filtração, congelados em N₂ líquido e mantidos a -80°C para posterior extração de proteínas.

Tabela 1. Meio MEX

Extrato de malte	3% (p/v)
Agar-Agar	2% (p/v)
Água destilada	q.s.

Tabela 2. Meio Mandels-Andreotti

Solução mineral 50% (v/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,8g/L
	KH ₂ PO ₄	4,0g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6g/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,8g/L
Tampão citrato-fosfato pH 5,0 (48% (v/v))	Na ₂ HPO ₄ anidro	0,2M
	Ácido cítrico	0,2M
Solução de elementos traços 50x (2% (v/v))	FeSO ₄ .7H ₂ O	250mg/L
	MnSO ₄ .H ₂ O	85mg/L
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	70mg/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	100mg/L
	H ₂ SO ₄	Ajuste para pH 2,0
Adicionar 1g/L de peptona bacteriológica, 5 mM de ureia e a fonte de carbono		

O cultivo das linhagens parental e mutantes *knockout* em bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono se deu em duas etapas. A primeira delas consistiu na transferência de 10^6 esporos/mL de cada uma das cepas para 200 mL de meio Mandels-Andreotti com 1% (p/v) de glicerol por 24h, a 30 °C/200 rpm. Após essa etapa, o micélio obtido foi transferido para 200 mL de meio Mandels-Andreotti sem peptona, contendo 1% (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar, e

cultivado por 48h a 30 °C/200 rpm. Da mesma forma que o cultivo em glicose, o micélio oriundo do cultivo em bagaço de cana foi coletado por filtração, congelado e armazenado a -80°C, e as culturas se deram em triplicatas.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado como fonte de carbono nos nossos experimentos foi doado por Nardini Agroindustrial Ltda, Vista Alegre do Alto, São Paulo, Brasil. Este foi preparado de acordo com protocolo descrito por Souza *et al.* (2011) (DE SOUZA *et al.*, 2011), em que o bagaço *in natura* passa por tratamento com vapor d'água, é lavado com água destilada até eliminação total dos açúcares redutores (detecção por método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)), e é seco em estufa a 40 °C para que seja triturado por moinho de facas e esteja pronto para uso.

3.3. Extração de proteínas

Os micélios produzidos a partir do cultivo das linhagens QM6a e mutantes, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, em meio Mandels-Andreotti com 2% (p/v) glicose ou 1% (p/v) bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e armazenados a -80°C, foram utilizados para extração das proteínas intracelulares. Primeiramente, eles foram triturados com o uso de nitrogênio líquido para manutenção de temperatura. A partir disso, 0,1g de cada micélio foi transferido para 900 μ L de tampão de extração (Tabela 3) para imediata sonicação (amplitude 60% e pulso 10 *on*/10 *off*, por 1 minuto) em gelo, a fim de que houvesse o rompimento da parede celular fúngica. Após isso, os micélios sonicados foram centrifugados duas vezes a 4 °C/13500 rpm por 15 min, e tiveram seus respectivos sobrenadantes cuidadosamente coletados e transferidos para novos tubos, para armazenamento em -20°C para posterior análise.

Tabela 3. Solução-tampão de extração de proteínas intracelulares

PBS pH 7,4 (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,7% Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O, 0,024% KH ₂ PO ₄)	877 μ L
NaF	18 μ L
Na ₃ VO ₄	1,8 μ L
Inibidor de protease	1,8 μ L
Inibidor de fosfatase	1,8 μ L

3.4. Análise eletroforética por SDS-PAGE

Para verificar a qualidade da extração proteica, foi realizada uma eletroforese em gel SDS-PAGE. Para isso, após dosagem de proteínas em cada amostra pelo método de Bradford (1976), 50 µg de proteínas intracelulares de cada replicata correspondente às linhagens QM6a e mutantes, *Δtmk1* e *Δtmk2*, em cada fonte de carbono, foram transferidas para uma solução de ácido tricarbóxico (TCA) 20% em acetona, e armazenados a -20 °C *overnight*. As amostras precipitadas foram então centrifugadas a 4 °C/12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante de cada uma foi coletado. Neste, foi então adicionada uma solução de 0,07% de β-mercaptoetanol em acetona, seguindo-se de três centrifugações sucessivas de 10 minutos, a 4 °C/12000 rpm, com remoção do sobrenadante formado após cada uma delas. Então, as proteínas precipitadas foram purificadas com o 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA), transferidas para o tampão de amostra (Tabela 4) e incubadas a 100 °C por 5 minutos.

Tabela 4. Solução-tampão de amostra

Tris-HCl, 0,5M - pH 6,8	12,5% (m/v)
Glicerol	10% (m/v)
SDS	2% (m/v)
Azul de Bromofenol	2,5% (m/v)
β-mercaptoetanol	5% (m/v)
H ₂ O (q.s.p.)	1000 mL

Para confecção do gel de poliacrilamida, o gel separador 12% (Tabela 5) foi aplicado em placa de vidro 10,1 x 7,3 cm, a qual foi completada com água destilada e mantida em temperatura ambiente por 15 minutos. Então, a água destilada foi substituída pelo gel concentrador 5% (Tabela 6), aguardando-se novos 15 minutos. O gel foi transferido para o sistema de eletroforese acrescido do tampão de corrida (Tabela 7) e 30 µL de cada amostra foi aplicada em cada poço do gel, além do marcador molecular (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A corrida eletroforética se deu em tensão fixa de 200 V em temperatura ambiente, por 50 minutos.

Tabela 5. Gel Separador 12%

Acrilamida/Bisacrilamida	4mL
--------------------------	-----

Tris 1,0M pH – 6,8	2,5mL
SDS 10%	1,0mL
H ₂ O (q.s.p.)	2,3mL
Temed	10μL
PSA 10%	200μL

Tabela 6. Gel Concentrador 5%

Acrilamida/Bisacrilamida	830μL
Tris 1,0M pH – 6,8	625μL
SDS 10%	500μL
H ₂ O (q.s.p.)	3mL
Temed	5μL
PSA 10%	100μL

Tabela 7. Tampão de corrida

Tris	25 mM, pH 8,3
Glicina	0,192M
SDS	0,1%

Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi corado com o corante fluorescente Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Molecular Probes, Eugene, OR), de acordo com protocolo do fabricante. O gel foi então imerso em água Milli-Q por duas vezes de 5 minutos cada, e suas imagens foram em seguida capturadas pelo leitor Pharos FX Plusgel (Bio-Rad) com o software Quantity One 4.6.9. (Bio-Rad), com filtro de emissão 532±50 nm, a fim de que pudessem ser visualizadas as fosfoproteínas nele presentes. Para a visualização das proteínas totais, os géis foram submetidos à imersão em corante Coomassie Brilliant Blue Coloidal R-250 (Tabela 8) em temperatura ambiente, *overnight*, e em seguida descorados com 30% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético até aparecimento das bandas. As imagens do gel pronto foram capturadas também por meio do software Quantity One 4.6.9. (Bio-Rad), sem filtro, apenas com luz branca.

Tabela 8. Corante Coomassie Brilliant Blue Coloidal R-250

Ácido Fosfórico 85%	10% (v/v)
Sulfato de Amônio	10% (m/v)
Coomassie G-250	0,12% (m/v)
Metanol	20% (v/v)
H ₂ O Mili-Q	q.s.

3.5. Digestão tripsínica

Como início da preparação das amostras para leitura em espectrômetro de massas, 500 µg das proteínas intracelulares de cada amostra foram incubadas em TCA 20% gelado, na proporção de 1:1, por 1h. Então, elas foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C/14000 rpm, sendo o sobrenadante removido e o precipitado formado ressuspensionado em acetona, para posterior centrifugação e secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuspensionado em 250 µL de uma solução de DTT 7,5 mM, ureia 8 M e NH₄HCO₃ 100 mM, e incubado em coluna de centrifugação Amicon Ultra 0.5 mL (MWCO 3 kDa) (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA) a 37 °C por 1 hora. Em seguida, a amostra solubilizada foi centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos, e aplicou-se uma solução de ureia 8 M, NH₄HCO₃ 100 mM e iodoacetamida 50 mM, na proporção 1:1, com incubação em temperatura ambiente, no escuro, por 1 hora. Posteriormente, 250 µL de DTT 500 mM foram adicionados às amostras e as colunas seguiram para centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos, seguida de lavagem dos filtros das colunas com NH₄HCO₃ 100 mM. As proteínas retidas foram então transferidas para novos tubos, nos quais foi adicionado 1 µg de tripsina para cada 50 µg de proteína, seguindo-se de incubação a 37 °C por 16 h. Para bloqueio da reação, ao final desse período, foi adicionada solução de ácido trifluoracético (TFA) 10% até concentração final de 1% TFA, obtendo-se pH <4 para desativação da tripsina. Os peptídeos foram então ressuspensionados em 5% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico para cada 1µg/µL de proteína, e foram então armazenados a -80 °C até o processo de enriquecimento dos fosfopeptídeos.

3.6. Enriquecimento de fosfopeptídeos

As amostras com os peptídeos oriundos da digestão das proteínas intracelulares foram submetidas a um processo de enriquecimento dos fosfopeptídeos nelas presentes por uma coluna

TiO₂ Mag Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia), composta por *beads* magnéticas de TiO₂. O procedimento de enriquecimento de fosfopeptídeos se deu conforme protocolo do fabricante das colunas TiO₂ Mag Sepharose. Os fosfopeptídeos enriquecidos foram então liofilizados e enviados para leitura em espectrômetro de massas.

3.7. Espectrometria de massas

Os fosfopeptídeos enriquecidos foram submetidos à análise de espectrometria de massas por um sistema Easy-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado ao espectrômetro Orbitrap Fusion Lumos equipado com uma fonte *nanospray* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para isso, 12 µL de cada amostra de fosfopeptídeos foram injetados em uma coluna de retenção (Acclaim PepMap 0,075mm, 2cm, C18, 3 µm, 100Å; Thermo) alinhada com uma coluna Nano-LC (Acclaim PepMap RSLC (0,050mm, 15cm, C18, 2 µm, 100Å; Thermo), e lavados com 20 µL de solvente A (0,1% (v/v) de ácido fórmico em água) em pressão constante (500 bar) e taxa de fluxo de 300 nL/min para eluição das amostras. A separação ocorreu conforme o gradiente mostrado na Tabela 9, com o solvente B (0,1% (v/v) de ácido fórmico em solução de acetonitrila:água (80:20)).

Tabela 9. Gradiente de separação dos fosfopeptídeos

Tempo (min)	Duração (min)	Fluxo (nL/min)	Mistura (% de solvente B)
00	00	300	5
80	80	300	28
90	10	300	40
92	02	300	95
104	12	300	95

As análises MS/MS foram conduzidas no modo ESI⁺ (*positive-ion electrospray ionization*). O instrumento foi configurado com voltagem do *spray* de 1950 kV, temperatura capilar de 300 °C, nível de S-Lens RF de 30%. A verificação completa dos espectros se deu no modo *profile*, com relação massa/carga (*m/z*) de 400-1600, sob resolução de 120000, seguida de análises MS/MS em um ciclo de 3 segundos. Dissociação por colisão de alta energia (HCD), com energia de colisão normalizada a 30% foi usada para fragmentação. Os fragmentos resultantes foram detectados em

m/z 100-2000, por meio do espectrômetro Orbitrap com resolução de 30000, em modo centroide. Foram utilizados um alvo AGC (Automatic Gain Control) de $5e^4$ e um tempo de injeção máxima de 54 ms.

3.8. Processamento e análise de dados obtidos pela espectrometria de massas

Com a finalidade de identificar os fosfopeptídeos presentes nas amostras de proteínas intracelulares provenientes das linhagens QM6a e mutantes $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de *T. reesei*, os arquivos .raw provenientes da leitura pelo espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foram processados pelo *software* MaxQuant 1.6.1.0. (Max Planck Institute of Biochemistry, München, Alemanha) e sua ferramenta de busca Andromeda (TYANOVA et al., 2015), tendo sido usado o conjunto de proteínas de *Trichoderma reesei*, obtidos pelo banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>). A partir dos valores de intensidades múltiplas obtidos no arquivo “Phospho(STY)Site” gerado pelo MaxQuant, os fosfopeptídeos identificados foram submetidos a análises estatísticas pelo *software* Perseus 1.6.1.2. (Max Planck Institute of Biochemistry, München, Alemanha) (TYANOVA et al., 2016), sendo os fosfopeptídeos considerados significativos quando com a probabilidade de localização do sítio de fosforilação fosse igual ou maior que 75%, admitindo-se como *threshold* para análise múltipla ANOVA, o p-valor de 0,05, FDR de Benjamini-Hochberg de 0,05, e 250 randomizações, em pelo menos duas das três replicatas para cada condição analisada.

4. RESULTADOS

4.1. Verificação da qualidade do extrato proteico e da presença de proteínas fosforiladas

Para realização de estudos proteômicos, a obtenção de extratos proteicos para a análise fosfoproteômica é uma etapa bastante crítica, uma vez que, a partir do rompimento da parede celular fúngica, são liberadas proteases e outros compostos que podem interferir nos experimentos posteriores. Para verificar a qualidade dessa extração a fim de prosseguir com os estudos, submetemos nossas amostras a uma análise eletroforética em gel de poliacrilamida desnaturante unidimensional (SDS-PAGE) (Figura 5). Como pode-se observar na Figura 5, a ausência de arraste e a presença de bandas proteicas bem definidas e de vários tamanhos demonstram boa qualidade na etapa de extração e a presença de fosfoproteínas de boa qualidade em todas as replicatas. A partir do momento em que se verificou a qualidade dos extratos proteicos, os mesmos foram digeridos com Tripsina 20 ng/uL na proporção de 1:50 tripsina:amostra, e, a seguir, os peptídeos foram enriquecidos em colunas de TiO_2 .

Figura 5. Eletroforese SDS-PAGE do extrato proteico total obtido das linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de *T. reesei*. Os géis mostram a presença de fosfoproteínas e a qualidade das mesmas. Coloração por Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Molecular Probes, Eugene, OR).

4.2. Identificação e quantificação de fosfopeptídeos e fosfoproteínas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de *T. reesei*

Os fosfopeptídeos enriquecidos provenientes das linhagens parental (QM6a) e mutantes $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, em ambas as fontes de carbono (glicose e bagaço de cana-de-açúcar), foram submetidos à análise pelo espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific). Após o processamento dos dados gerados nessa análise pelos *softwares* MaxQuant e Perseus, foi identificado um total bruto de 5318 fosfopeptídeos nas amostras de todas as linhagens e nos diferentes cultivos. Desse total, 3195 fosfopeptídeos foram identificados como possuindo probabilidade de localização maior ou igual a 75%. Foi avaliada a qualidade dos dados gerados e uma correlação de Pearson adequada foi obtida quando comparamos as replicatas de QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ sob cultivo em glicose (Figura 6) e em bagaço de cana-de-açúcar (Figura 7).

Figura 6. Replicatas biológicas da linhagens cultivadas em glicose, usadas para análise de espectrometria de massas MS/MS. Os gráficos representam a correlação de *Pearson* entre as réplicas biológicas para cada amostra cultivada em glicose demonstrando a confiabilidade dos dados de intensidade.

Figura 7. Replicas biológicas da linhagens cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar, usadas para análise de espectrometria de massas MS/MS. Os gráficos representam a correlação de Pearson entre as réplicas biológicas para cada amostra cultivada em bagaço de cana demonstrando a confiabilidade dos dados de intensidade. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

A partir da confirmação de que os extratos proteicos obtidos em suas respectivas fontes de carbono para as diferentes linhagens são comparáveis entre si, prosseguiu-se a análise estatística no *software* Perseus, onde selecionamos 1392 fosfopeptídeos significativos de acordo com a análise de significância para amostras múltiplas, ANOVA (Tabela 10). Sob cultivo em glicose como fonte de carbono, foram identificados 1307 fosfopeptídeos significativos, correspondentes a 504 proteínas. Destes, 922, 851 e 1020 fosfopeptídeos foram identificados em QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, respectivamente, correspondendo a 310, 280 e 359 fosfoproteínas obtidas a partir do cultivo em glicose (Tabelas 11, 12 e 13, no Apêndice, CD em anexo). Já em bagaço de cana-de-açúcar, um total de 710 fosfopeptídeos significativos foi identificado, correspondendo a 264 proteínas fosforiladas. De todos os fosfopeptídeos identificados em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, 443, 442 e 211 foram encontrados em QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, respectivamente, correspondendo a 162, 152 e 72 fosfoproteínas (Tabelas 14, 15 e 16, no Apêndice, CD em anexo).

Tabela 10. Total de fosfopeptídeos e fosfoproteínas significativos identificados nas linhagens QM6a, *Δtmk1* e *Δtmk2*, sob cultivo em diferentes fontes de carbono.

Linhagem	Quantificação	Glicose	Bagaço de cana-de-açúcar
QM6a	Fosfopeptídeos	922	443
	Fosfoproteínas	310	162
<i>Δtmk1</i>	Fosfopeptídeos	851	452
	Fosfoproteínas	280	152
<i>Δtmk2</i>	Fosfopeptídeos	1020	211
	Fosfoproteínas	359	72

A partir da seleção desses fosfopeptídeos, foi possível a classificação dos mesmos e de suas respectivas proteínas com relação ao número de sítios de fosforilação e ao tipo de resíduo fosforilado. A Figura 8 mostra a proporção detalhada da quantidade de sítios de fosforilação nas proteínas encontradas em cada linhagem, sob as diferentes formas de cultivo. Percebe-se que para todas as linhagens testadas em ambas as fontes de carbono, apesar de que a maior parte das proteínas encontradas são única ou duplamente fosforiladas, tomando-se em conjunto, grande parte da fosforilação acontece em múltiplos sítios em uma única proteína. Assim, é possível inferir que há uma fina regulação funcional por meio de múltiplos sítios de fosforilação em cada fosfoproteína.

Figura 8. Proporção das quantidades de sítios de fosforilação encontrados nas fosfoproteínas identificadas na análise de espectrometria de massas MS/MS. Os gráficos representam distribuição proporcional do número de vezes que as fosfoproteínas identificadas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, quando cultivadas em glicose ou bagaço de cana-de-açúcar. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

De todos os sítios de fosforilação encontrados nas três cepas de *T. reesei*, quando crescidas tanto em glicose quanto em bagaço de cana-de-açúcar, a maioria corresponde a fosfoserinas (pS) (87,30% e 87,75%, respectivamente), seguidos de fosfotreoninas (pT) (12,24% e 11,97%) e de fosfotirosinas (pY) (0,46% e 0,28%) (Figura 9a), estando esta distribuição de acordo com outras células eucarióticas de um modo geral. A proporção específica dos três tipos de resíduos fosforilados em cada uma das cepas trabalhadas é detalhada na figura 9b.

Figura 9. Distribuição dos tipos de resíduos fosforilados encontrados nas fosfoproteínas identificadas na análise de espectrometria de massas MS/MS. (A) proporção dos tipos de resíduos fosforilados nas fosfoproteínas encontradas em todas as cepas estudadas, quando crescidas em glicose ou bagaço de cana; (B) proporção específica dos fosforesíduos encontrados em cada uma das linhagens nas diferentes fontes de carbono. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

4.3. Categorização funcional das fosfoproteínas identificadas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de *T. reesei*

Foi realizada a análise funcional de cada uma das fosfoproteínas encontradas nas linhagens parental, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de *T. reesei* em ambas condições de crescimento (glicose ou bagaço de cana-de açúcar como fonte de carbono), com base nas anotações de KOG (Eukaryotic Ortholog Groups) (Figura 10). A partir desta análise, verificou-se que as fosfoproteínas identificadas têm envolvimento em uma série diversa de papéis biológicos e moleculares, incluindo processos celulares, metabólicos e de armazenamento e processamento de informação. Dentre esses processos (Figuras 11, 12 e 13), destaca-se a grande quantidade de proteínas fosforiladas relacionadas à transcrição, processamento de RNA e, não surpreendentemente, à transdução de sinal, uma vez que a fosforilação desempenha grande importância na captação de sinais externos para adaptação celular.

Figura 10. Distribuição das fosfoproteínas identificadas com base na classificação por grupos KOG. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

Figura 11. Classificação das fosfoproteínas encontradas na linhagem parental QM6a de acordo com as classes de KOG, sob cultivo em glicose ou bagaço de cana-de-açúcar. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

Figura 12. Classificação das fosfoproteínas encontradas na linhagem mutante *Δtmk1* de acordo com as classes de KOG, sob cultivo em glicose ou bagaço de cana-de-açúcar. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

Figura 13. Classificação das fosfoproteínas encontradas na linhagem mutante *Δtmk2* de acordo com as classes de KOG, sob cultivo em glicose ou bagaço de cana-de-açúcar. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

Além disso, quando comparamos a proporção das fosfoproteínas envolvidas em cada um dos processos anotados em KOG com relação às diferentes condições de cultivos em que as linhagens parental QM6a e mutantes *Δtmk1* e *Δtmk2* foram submetidas, é possível perceber que, ao contrário do crescimento em glicose como fonte de carbono, sob crescimento em bagaço de cana-de-açúcar, não foram identificadas fosfopeptídeos correspondentes às fosfoproteínas envolvidas em processos de motilidade celular e estruturas extracelulares (Figuras 14 e 15). Somados, estes resultados comprovam a influência e importância da fosforilação em grande variedade de processos regulatórios na célula deste fungo.

Figura 14. Proporção das funções das fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, *Dtmk1* e *Dtmk2*, de acordo com as anotações KOG, sob crescimento em glicose como fonte de carbono.

Figura 15. Proporção das funções das fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, *Δtmk1* e *Δtmk2*, de acordo com as anotações KEGG, sob crescimento em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

4.4. Comparação do perfil transcricional com o perfil de fosforilação das proteínas identificadas nas linhagens QM6a, *Δtmk1* e *Δtmk2* de *T. reesei* cultivadas em glicose como fonte de carbono

As fosfoproteínas aqui estudadas foram selecionadas a partir de seus valores de intensidade, oriundos da análise de espectrometria de massas MS/MS. A figura 16 mostra o perfil desses valores nas linhagens QM6a, *Δtmk1* e *Δtmk2*, tanto no crescimento em glicose como em bagaço de cana como fonte de carbono. A partir dela, percebe-se que há diferentes padrões de intensidades em cada cepa, mostrando as diferenças do perfil de fosforilação das proteínas encontradas em cada uma delas, o que indica que a fosforilação mediada pelas MAPK TMK1 e TMK2 pode ter um papel importante na regulação de proteínas relacionadas a diversos processos celulares em *T. reesei*.

Figura 16. *Heatmap* das intensidades computadas para as fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, *Δtmk1* e *Δtmk2*, sob crescimento em glicose ou bagaço de cana como fonte de carbono. Intensidades obtidas a partir do processamento dos arquivos .raw no software MaxQuant; *heatmap* confeccionado a partir de análise de *clusterização* hierárquica no software Perseus.

A fim de verificar o papel da importância da fosforilação na regulação da função proteica, comparamos os dados de RNA-seq obtidos por De Paula (2017) com as fosfoproteínas encontradas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ neste trabalho. A figura 17 mostra a distribuição das fosfoproteínas identificadas em cada cepa estudada, sob cultivo em glicose como fonte de carbono.

Figura 17. Distribuição do total de fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, sob crescimento em glicose como fonte de carbono. Diagrama de Venn confeccionado na plataforma Venny 2.1.0.

Analisando-se detalhadamente o perfil de fosforilação das proteínas selecionadas em cada uma das linhagens estudadas sob cultivo em glicose como fonte de carbono (Figura 18), nota-se a presença de 166 e 209 proteínas igualmente fosforiladas nas linhagens parental e mutante $\Delta tmk1$, e parental e mutante $\Delta tmk2$, respectivamente. Ainda sob mesmo cultivo, identificamos 144 e 101 proteínas fosforiladas somente em QM6a, quando comparada com os mutantes $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, respectivamente. Da mesma maneira, verificamos que 114 e 150 proteínas foram diferencialmente fosforiladas em $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, respectivamente, quando comparados com a linhagem parental.

Figura 18. Distribuição das proteínas igual e diferencialmente fosforiladas nas linhagens parental QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, sob crescimento em glicose como fonte de carbono. (A) quantificação de fosfoproteínas igual e diferencialmente fosforiladas em QM6a e $\Delta tmk1$; (B) quantificação de fosfoproteínas igual e diferencialmente fosforiladas em QM6a e $\Delta tmk2$. Diagrama de Venn confeccionado na plataforma Venny 2.1.0.

A fim de se comparar as proteínas encontradas fosforiladas somente na linhagem parental QM6a cultivada em glicose com suas respectivas taxas de transcrição obtidas pela referida análise de RNA-seq, verificamos que, das 144 proteínas diferencialmente fosforiladas somente nesta linhagem (Tabela 17, Apêndice, CD em anexo) quando comparada com o mutante $\Delta tmk1$ (Figura 18a), 141 delas (97,92%) foram consideradas como tendo seus genes igualmente transcritos, uma vez que a razão entre valor de TPM (*Transcripts per Million*) encontrados em $\Delta tmk1$ e em QM6a se encontram numa faixa de -2 a 2 (DE PAULA, 2017). A maioria dessas proteínas está relacionada com processos de transcrição, de sinalização celular, processamento de RNA, transporte e metabolismo de carboidratos e outros metabólitos, e proteínas de função desconhecida. Dentre as fosfoproteínas envolvidas com a sinalização celular (Figura 19), destacam-se RasGEF, um fator de troca de nucleotídeo guanina para GTPases Ras-like (ID 34726), com um sítio de fosforilação predito no resíduo S²¹⁸; uma Ser/Thr-kinase dependente de cAMP relacionada com SCH9 de *Saccharomyces cerevisiae* (ID 119614), fosforilada em T⁶³, T⁷³, S⁴⁵ e S⁶⁹; KIN1, envolvida na morfogênese celular (ID 79895), fosforilada em S⁶³⁵ e S⁶³⁸; e uma quinase TOR (ID 121610), fosforilada em S²³⁵⁷ e S²³⁵⁸. Além dessas, também foi identificada como sendo fosforilada somente em QM6a, em relação a $\Delta tmk1$, uma glicosidase GH63 (ID 44529), fosforilada em S⁶³⁵ e S⁶³⁹. As tabelas 18 e 19 (Apêndice, CD em anexo) correspondem às proteínas fosforiladas somente no mutante $\Delta tmk1$, e igualmente em QM6a e $\Delta tmk1$, respectivamente.

Figura 19. Predição da interação de TMK1 com as proteínas diferencialmente fosforiladas envolvidas com processos de sinalização celular, em glicose. Predição obtida pela plataforma STRING, considerando somente as proteínas identificadas como diferencialmente fosforiladas na linhagem parental QM6a com relação ao mutante *Δtmk1* sob cultivo em glicose, e que foram igualmente expressas nessas cepas, sob mesmas condições de cultivo, de acordo com os dados de RNA-seq obtidos por De Paula (2017).

Ainda com relação ao cultivo em glicose como fonte de carbono, identificamos 101 proteínas fosforiladas somente em QM6a (Tabela 20, Apêndice, CD em anexo), quando comparamo-las com o perfil de fosfoproteínas encontradas no mutante *Δtmk2* (Figura 18b). Dessas, considerando a razão $-2 \leq \text{TPM} \leq 2$, observamos que 89,11% (90) tiveram seus genes igualmente transcritos nas mesmas condições de crescimento, sendo envolvidas em vários processos celulares. As proteínas envolvidas na sinalização celular que foram consideradas como igualmente transcritas (DE PAULA, 2017), mas diferencialmente fosforiladas em QM6a com relação ao mutante *Δtmk2*

sob cultivo em glicose estão ilustradas na figura 20, de acordo com suas possíveis interações com TMK2. Da mesma forma, quando comparamos as linhagens QM6a com ambos mutantes *Δtmk1* e *Δtmk2* (Figura 17), simultaneamente, verificamos que 68 proteínas são fosforiladas somente em QM6a, e, dentre as que são expressas igualmente nas três linhagens, destacamos uma trealase GH37 (ID 120676), fosforilada nos resíduos S⁴³ e T⁴¹. As tabelas 21 e 22 (Apêndice, CD em anexo) trazem as proteínas fosforiladas somente no mutante *Δtmk2*, e igualmente fosforiladas em QM6a e *Δtmk2*, respectivamente.

Figura 20. Predição da interação de TMK2 com as proteínas diferencialmente fosforiladas envolvidas com processos de sinalização celular, em glicose. Predição obtida pela plataforma STRING, considerando somente as proteínas identificadas como diferencialmente fosforiladas na linhagem parental QM6a com relação ao mutante *Δtmk2* sob cultivo em glicose, e que foram igualmente expressas nessas cepas, sob mesmas condições de cultivo, de acordo com os dados de RNA-seq obtidos por De Paula (2017).

4.5. Comparação do perfil transcricional com o perfil de fosforilação das proteínas identificadas nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ de *T. reesei* cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono

Ainda com o objetivo de conferir a influência da fosforilação sobre os processos celulares de *T. reesei*, identificamos as fosfoproteínas de acordo com sua distribuição nas linhagens QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ crescidas em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono (Figura 21), e, da mesma maneira que foi feito com os dados obtidos em glicose, comparamos o padrão de fosforilação delas com suas respectivas taxas de expressão. Verificamos que 77 proteínas são fosforiladas somente em QM6a, quando comparamos com os dois mutantes estudados. Dentre essas proteínas, 20 (25,97%) delas têm seus respectivos genes igualmente transcritos (DE PAULA, 2017), sendo relacionadas a diversos processos celulares. Assim, destaca-se principalmente uma proteína envolvida na transdução de sinal, proteína kinase A dependente de cAMP (ID 75878), fosforilada em S⁵⁶ e S⁶².

Figura 21. Distribuição do total de fosfoproteínas identificadas nas linhagens parental QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, sob crescimento em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Diagrama de Venn confeccionado na plataforma Venny 2.1.0. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

Figura 22. Distribuição das proteínas igual e diferencialmente fosforiladas nas linhagens parental QM6a, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$, sob crescimento em bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. (A) quantificação de fosfoproteínas igual e diferencialmente fosforiladas em QM6a e $\Delta tmk1$; (B) quantificação de fosfoproteínas igual e diferencialmente fosforiladas em QM6a e $\Delta tmk2$. Diagrama de Venn confeccionado na plataforma Venny 2.1.0. SCB: bagaço de cana-de-açúcar (*sugarcane bagasse*).

Em comparação minuciosa das fosfoproteínas identificadas em QM6a e $\Delta tmk1$ sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar (Figura 22a), verifica-se que 62 proteínas são igualmente fosforiladas nas duas linhagens, enquanto que 90 são fosforiladas somente em $\Delta tmk1$, e 100 somente em QM6a. As proteínas igual e diferencialmente fosforiladas em bagaço de cana de açúcar, com relação à TMK1, encontram-se listadas nas tabelas 23, 24 e 25 (Apêndice, CD em anexo). Dentre as proteínas diferencialmente fosforiladas em QM6a, encontramos 27 delas (27%) como tendo seus genes igualmente transcritos ($-1 \leq \text{Log2 fold change} \leq 1$ e $p \leq 0,05$). Dessas, encontram-se ilustradas na figura 23 as proteínas envolvidas na sinalização celular com suas possíveis interações preditas com TMK1.

Figura 23. Predição da interação de TMK1 com as proteínas diferencialmente fosforiladas envolvidas com processos de sinalização celular, em bagaço de cana-de-açúcar. Predição obtida pela plataforma STRING, considerando somente as proteínas identificadas como diferencialmente fosforiladas na linhagem parental QM6a com relação ao mutante $\Delta tmk1$ sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar, e que foram igualmente expressas nessas cepas, sob mesmas condições de cultivo, de acordo com os dados de RNA-seq obtidos por De Paula (2017).

Da mesma maneira, detalhando-se o perfil de fosfoproteínas encontradas na linhagem parental com relação ao mutante *Atmk2* crescidos em bagaço de cana (Figura 22b), percebemos que 40 proteínas são encontradas fosforiladas em ambas as cepas, enquanto que 37 são vistas somente em *Atmk2*, e 122 somente em QM6a (Tabelas 26, 27 e 28, Apêndice, CD em anexo). Dentre as 122 proteínas fosforiladas apenas na linhagem parental, 36 (29,51%) têm seus genes igualmente transcritos ($-1 \leq \text{Log2 fold change} \leq 1$ e $p \leq 0,05$) e, além das mostradas anteriormente como exclusivas de QM6a, destaca-se uma MAPK ativada por estresse celular Sin1p (ID 66985), fosforilada em S¹⁶⁶ e S¹⁶⁹, além de outras proteínas envolvidas na sinalização celular (Figura 24).

Figura 24. Predição da interação de TMK2 com as proteínas diferencialmente fosforiladas envolvidas com processos de sinalização celular, em bagaço de cana-de-açúcar. Predição obtida pela plataforma STRING, considerando somente as proteínas identificadas como diferencialmente fosforiladas na linhagem parental QM6a com relação ao mutante *Atmk2* sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar, e que foram igualmente expressas nessas cepas, sob mesmas condições de cultivo, de acordo com os dados de RNA-seq obtidos por De Paula (2017).

5. DISCUSSÃO

Dentre os diversos tipos de modificação pós-traducionais, a fosforilação das proteínas é uma das mais prevalentes, podendo controlar vários processos celulares, a partir da modulação da função e/ou da localização proteica. A fosforilação pode regular a função das proteínas por alterações nas interações proteína-proteína, ou por meio de mudanças conformacionais, a partir da adição de um grupamento fosfato por uma proteína quinase nos resíduos de aminoácidos Ser, Thr e Tyr, principalmente. Esse tipo de modificação deve ser bastante rápido, pois a célula necessita de ligeira adaptação ao ambiente externo, e é também transitório, devido a retirada dos fosfatos por fosfatases. O avanço da tecnologia de espectrometria de massas permitiu a identificação de grande número de resíduos fosforilados em diversos tipos de organismos, porém, ainda assim, muitos dos peptídeos que sofrem esse tipo de modificação podem não ser identificados devido a limitação de sensibilidade desse tipo de análise, já que eles podem existir de forma transitória e pouco abundante nas células. Não obstante, a espectrometria de massas é uma ferramenta bastante poderosa para análise de fosfoproteômica de larga escala. Essa técnica tem sido aplicada em diversos organismos e tem permitido a análise do envolvimento entre a fosforilação e a regulação das diversas funções desempenhadas por fungos de importância biotecnológica ou patogênica (ENGHOLM-KELLER; LARSEN, 2013; GRIMSRUD et al., 2010; HUANG; WHITE, 2008; HUMPHREY; JAMES; MANN, 2015; MUMBY; BREKKEN, 2005; RIBEIRO et al., 2017).

Com o objetivo de se estudar os efeitos da fosforilação mediada por MAPK na produção de celulases pelo fungo filamentoso *T. reesei*, foi realizada a análise fosfoproteômica diferencial entre a linhagem parental QM6a e dois mutantes *knockout* para duas das três MAPK dessa espécie, TMK1 e TMK2. No nosso trabalho foi possível identificar 1307 fosfopeptídeos de alta confiança correspondentes a 504 proteínas, quando as linhagens parental, $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$ foram cultivadas em glicose como fonte única de carbono; e 710 fosfopeptídeos equivalentes a 264 proteínas nas mesmas linhagens, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com as análises de enriquecimento e de anotações por KOG, foi possível observar que, de forma similar a outros organismos (FRANCK et al., 2015; LI et al., 2015; REN et al., 2016; WANG et al., 2016; XIONG et al., 2014), as fosfoproteínas identificadas participam de diversos processos biológicos celulares, principalmente de sinalização celular, transcrição, processamento de RNA e processos metabólicos.

Nosso grupo de pesquisa analisou o transcriptoma de *T. reesei* (De Paula, 2017) pelo qual foi verificado o papel das vias de sinalização pelas MAPK TMK1 e TMK2 em fontes repressoras e indutoras da produção de celulasas (glicose e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente), e, a partir de análise *in silico*, observou-se grande quantidade de sítios de fosforilação preditos em genes diferencialmente expressos nessas condições de crescimento. Esses dados mostram que a fosforilação a partir dessas MAPK pode ter grande importância no controle da expressão gênica nessa espécie de fungo filamentoso. Sabe-se que a fosforilação desempenha papel importante na regulação da produção de celulasas em diversas espécies de fungos. Como evidência desse papel, foi demonstrado, por exemplo, que a sinalização mediada por Ras GTPases influencia na produção de celulasas em *Cryphonectria parasitica* (WANG; NUSS, 1995) e em *T. reesei* (ZHANG et al., 2012); e que a deleção de PKA induz a produção de celulasas em *Aspergillus nidulans* (DE ASSIS et al., 2015). Em *T. reesei*, sabe-se que a concentração de AMPc intracelular influencia a produção de celulasas durante seu crescimento em meio contendo sorbose como fonte de carbono (NOGUEIRA et al., 2015), e que a luz influencia nas funções da PKA, sendo uma delas o controle da produção dessas enzimas (SCHMOLL; ESQUIVEL-NARANJO; HERRERA-ESTRELLA, 2010; SCHUSTER et al., 2012). Além disso, devido à pequena quantidade de genes que produzem essas enzimas (MARTINEZ et al., 2008), supõe-se que esse tipo de modificação pós-traducional exerce grande controle na regulação da produção e secreção das holocelulasas em *T. reesei*, a fim de se garantir a eficiência de seu sistema celulolítico.

Para que o organismo seja capaz de responder às condições ambientais de maneira eficaz e específica, as vias de sinalização agem de maneira interconectada (CHEN; THORNER, 2007; HUANG; WHITE, 2008; LENGELER et al., 2000; SCHMIDT, 2013; SHASHKOVA; WELKENHUYSEN; HOHMANN, 2015; VINOD et al., 2008). TOR (*Target of Rapamycin*) e Proteína kinase dependente de AMPc (PKA) são as duas principais vias de resposta a nutrientes no meio externo para regulação do crescimento celular em *S. cerevisiae*. A via TOR é altamente conservada entre eucariotos e é envolvida no controle do crescimento celular mediado pela disponibilidade de nutrientes, reprimindo processos catabólicos celulares e regulando processos relacionados ao citoesqueleto de actina e integridade da parede celular (ROHDE et al., 2008; SOULARD et al., 2010; VINOD et al., 2008). SCH9 de *S. cerevisiae* é um alvo direto de TORC1 e foi descrito que esta pode desempenhar papéis semelhantes a PKA, porém por mecanismos diferentes (ROOSEN et al., 2005; SMETS et al., 2008). Foi demonstrado que a ausência da SchA,

em *Aspergillus nidulans*, reduz drasticamente a produção de celulases, e que essa Ser/Thr kinase age sinergicamente com SnfA durante a repressão catabólica (BROWN et al., 2013). No nosso trabalho, foi verificado que, apesar de *TrSch9* ter sido transcrito de maneira semelhante nas linhagens QM6a e *Atmk1* sob cultivo em glicose (DE PAULA, 2017), sua proteína correspondente (ID 119614) foi fosforilada somente na linhagem parental, nas mesmas condições de cultivo, indicando que essa fosforilação pode ser mediada por TMK1. Esse achado pode estar relacionado com o crescimento vegetativo controlado por TMK1 (GRUBER; ZEILINGER, 2014), uma vez que *TrSch9* possui papel na resposta a estresse celular e no crescimento filamentosos, além da produção de celulases, já que a deleção *TrSch9* leva a uma leve diminuição da produção dessas enzimas (LV et al., 2015). Da mesma forma, identificamos uma proteína fosfatidilinositol 3-kinase (ID 121610) homóloga de Tor1p de *S. cerevisiae* e similar a TorA de *A. nidulans* (FITZGIBBON et al., 2005), como sendo fosforilada somente na linhagem parental QM6a de *T. reesei*, na presença de glicose, sendo essa fosforilação influenciada também pela presença de TMK1. Em *S. cerevisiae*, Tor1, a subunidade catalítica de TORC1, juntamente com Sch9, funciona no controle da autofagia em resposta a estresses celulares e repressão catabólica. Aluru et al. (2017) implicaram que TOR1 e FUS3 interagem de modo que a ausência de FUS3 em cepas mutantes *knockout* para *tor1* aumenta a longevidade celular, por incapacitar a célula de reprimir os processos autofágicos em *starvation* (ALURU et al., 2017). Além disso, em *Neurospora crassa*, foi sugerido que a inibição da via de sinalização TOR por rapamicina faz com que seja aumentada a taxa de produção de enzimas celulolíticas (XIONG et al., 2014). Somados, esses resultados indicam uma possível integração entre a via das MAPK mediada pela TMK1 e a via de sinalização por TOR em *T. reesei*, no que tange ao *sensing* de nutrientes e a regulação da produção de celulases.

As proteínas Ras são GTPases que se apresentam inativas quando ligadas a GDP e ativas com GTP. A hidrólise do GTP para inativação de Ras é induzida por GAPs (*GTPase-activating proteins*), e o processo contrário é realizado a partir do estímulo dos GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*). Um dos principais exemplos de GEF é a Cdc25 de *S. cerevisiae*, tendo sido observado que a ausência dessa proteína não permite que o ciclo de divisão celular proceda de forma normal (BOS; REHMANN; WITTINGHOFFER, 2007; ZHANG et al., 2005; ZHENG; QUILLIAM, 2003). Dependendo da presença de fontes de carbono diretamente fermentáveis no ambiente, a ativação de Ras a partir da ação de Cdc25 estimula a produção de AMPc pela adenilato-ciclase, e, por consequência, a indução de respostas adaptativas relacionadas com o crescimento e

diferenciação celular, proliferação, morfogênese e apoptose (SANTANGELO, 2006; TAMANOI, 2011). *S. cerevisiae* possui dois genes codificadores para Ras, *ras1* e *ras2*, sendo que Ras1 controla o ciclo celular a partir do *sensing* de glicose extracelular, e Ras2, além dessa mesma função, regula a produção de pseudo-hifas, juntamente com intermédio da via das MAPK (TAMANOI, 2011; VINOD et al., 2008). Da mesma forma, Ras1, de forma interconectada com a sinalização por MAPK, controla a produção de fatores de virulência em *Cryptococcus neoformans* (IDNURM et al., 2005; WAUGH et al., 2002) e em *Candida albicans* (ALBATAINEH; KADOSH, 2018; LEBERER et al., 2001), enquanto Ras1 controla o crescimento filamentoso de *Ustilago maydis*, uma espécie de fungo fitopatígeno (LEE; D'SOUZA; KRONSTAD, 2003). Em *A. nidulans*, homólogos de Ras1 e Ras2 regulam a expressão de aflatoxinas (aflR), por influenciar na atividade de PKA a partir da regulação da produção de AMPc (SHIMIZU et al., 2003). A partir desses achados, Schmoll (2008) sugeriu que a transdução de sinal mediada por Ras poderia influenciar na regulação da produção de celulases, e foi observado que esse tipo de sinalização pode controlar a expressão de genes responsáveis por essas enzimas (ZHANG et al., 2012). Nós verificamos que uma proteína RasGEF (ID 34726) apresentou-se fosforilada no resíduo Ser²¹⁸, somente na linhagem QM6a de *T. reesei*, sob cultivo em glicose, possivelmente sob influência de TMK1. *T. reesei* possui homólogos para Ras1 e Ras2 de *S. cerevisiae*, sendo eles regulados a nível transcricional por *xyr1* (ZHANG et al., 2012). Nosso padrão de fosforilação desse RasGEF (ID 34726), interessante, se deu de forma contrária ao encontrado por Nguyen et al. (2016), onde foi observada fosforilação intensa sob cultivo em DDGS (*distillers grains*, uma mistura de milho, arroz e outros grãos), uma fonte de carbono complexa e indutora da produção de celulases (NGUYEN et al., 2016). Entretanto, nossos achados podem indicar uma possível inibição de Ras mediada pela fosforilação de seu GEF por TMK1, uma vez que essa fosforilação se deu em uma fonte de carbono repressora de celulases.

A PKA faz parte da cascata de sinalização mediada por RAS e AMPc, e é envolvida no controle do crescimento celular, em processos de tradução, de resposta a estresse celular e no metabolismo de glicose, além de outros processos celulares. Em *S. cerevisiae*, na presença de glicose, uma proteína Ras é fosforilada por Cdc25 e, assim, estimula a produção de AMPc pela adenilato-ciclase. Altas concentrações de AMPc ativam a PKA, uma vez que o AMPc se liga à subunidade regulatória de PKA, BCY1, e a desprende da subunidade catalítica, a fim da promoção do crescimento celular (DICKMAN; YARDEN, 1999; TAMAKI, 2007). Em baixos níveis de

glicose, foi demonstrado que BCY1 é altamente fosforilada, favorecendo a localização nuclear de PKA e, por consequência, sua inativação (GRIFFIOEN et al., 2001). Soulard et al. (2010) verificaram que a fosforilação de BCY1 pode ser inibida por TORC1, ativando PKA em resposta à presença de glicose. No nosso trabalho, identificamos que a subunidade regulatória de PKA (ID 75878) foi diferencialmente fosforilada sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar e, tendo sido igualmente expressa (DE PAULA, 2017) nas três linhagens aqui estudadas de *T. reesei*, essa fosforilação pode ser mediada por ambas TMK1 e TMK2. Diferentemente dos achados de Soulard et al. (2010) para *S. cerevisiae*, foram identificados apenas dois sítios de fosforilação em PKAR1, Ser⁵⁶ e Ser⁶², para *T. reesei*, neste trabalho. Já de forma similar ao encontrado em nosso estudo, Nguyen et al. (2015) identificaram PKAR1 como sendo fosforilada em sofrorose, fonte indutora da produção de celulases. Nesse mesmo trabalho, o grupo encontrou outros componentes da via cAMP-PKA fosforilados em sofrorose em *T. reesei*, como a adenilato-ciclase. Previamente, foi demonstrado que PKA responde a outros sinais além da disponibilidade de glicose no meio, uma vez que, em *T. atroviridiae*, essa via pode regular as respostas celulares à presença ou ausência de luz (CASAS-FLORES et al., 2006), e que esse mesmo estímulo participa da regulação da produção de celulases de forma positiva ou negativa, respectivamente, em *T. reesei* (SCHMOLL; ESQUIVEL-NARANJO; HERRERA-ESTRELLA, 2010; SCHUSTER et al., 2012). Em *A. nidulans*, a ausência de PKA permitiu um aumento na secreção de celulases e xilanases, e os mutantes *knockout* para PKA apresentaram incapacidade de responder à presença de glicose extracelular e dificuldade em manter CreA no núcleo da célula (DE ASSIS et al., 2015). Desse modo, Nguyen et al. (2015) propuseram que os mecanismos de controle da secreção de enzimas celulolíticas, apesar de poderem ser estimulados de formas diferentes, podem compartilhar de mesmos membros das vias de sinalização.

Outra proteína cuja fosforilação pode ter sido mediada, de alguma forma, por TMK2 sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar foi uma proteína predita como sendo uma MAPK de resposta a estresse celular Sin1p (ID 66985). Em *Schizosaccharomyces pombe*, *sin1* codifica uma SAPK (stress-activated MAP kinase), a qual participa das vias de sinalização por MAPK e por TOR, sendo parte do complexo TORC2, e responsável pela seleção de seus alvos através de processos de ubiquitinação (TATEBE et al., 2017; WILKINSON et al., 1999). Sin1, em *S. pombe*, é fosforilada por Sty1, na presença de estresse, e facilita a entrada de Sty1 no núcleo celular, para que esta fosforile Atf1 (WILKINSON et al., 1999). Sin1 é homóloga de Avo1 em *S. cerevisiae*, a

qual, juntamente com Avo3 e Lst8, mantém a integridade do complexo TORC2, que, diferentemente de TORC1, não é sensível à rapamicina, e desempenha funções na regulação da integridade da parede celular, do metabolismo de esfingolipídeos e no remodelamento de actina (PAN; MATSUURA, 2012; SCHONBRUN et al., 2009). Em *T. reesei*, foi proposto que TMK2 regula negativamente a produção de celulases, sendo envolvida em processos de resposta a estresses de parede celular e em processos de esporulação (WANG et al., 2014b). Assim, nosso trabalho sugere que pode haver uma interação entre Sin1p e TMK2 como parte de uma via de sinalização de resposta ao estresse celular, sendo esse um dos papéis dessa MAPK demonstrados por De Paula (2017), além do remodelamento de cromatina e na regulação de fatores de transcrição em *T. reesei*.

Além dessas e outras proteínas envolvidas nas vias de sinalização intracelular identificadas como sendo fosforiladas sob influência de TMK1 e TMK2 em *T. reesei*, também observamos, dentre outras funções, a fosforilação diferencial em proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos. Verificamos que, sob cultivo em glicose, uma glicogênio sintase (ID 44529), uma glicosidase da família GH63 (ID 75036) e uma trealase da família GH37 (120676) foram fosforiladas sob possível influência de TMK1. Essas proteínas foram identificadas como fosforiladas nessa espécie no estudo de Nguyen et al. (2016), porém no cultivo em fonte de carbono indutora de celulases, sorbose e DDGS. De Paula (2017) verificou que em glicose, TMK1 pode participar da desrepressão de genes que codificam exoglicanases, manosidases e galactosidases, indicando uma atuação dessa MAPK na repressão catabólica. Sendo assim, nós supomos que TMK1 pode exercer um mecanismo regulatório dessas enzimas na presença de glicose, por meio de fosforilação em diferentes resíduos aminoácidos.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi analisado o papel da fosforilação mediada pelas MAPK TMK1 e TMK2 em *T. reesei*, no que tange o controle da produção de celulasas por essa espécie de fungo filamentososo. Nossos resultados nos permitem afirmar que: 1. TMK1 e TMK2 estão envolvidas em diversos tipos de processos celulares, pois participam da fosforilação direta ou indireta de proteínas com diversas funções na célula. 2. A grande quantidade de sítios de fosforilação diferentes em uma mesma proteína pode permitir a regulação mais fina da função da mesma; 3. As vias de sinalização em *T. reesei* trabalham de forma interconectada para que diversas funções celulares possam ser desempenhadas de maneira eficiente, inclusive o controle da produção de enzimas celulolíticas. 4. A análise fosfoproteômica em fontes de carbonos diferentes reafirmaram o fato de que a regulação da produção de celulasas é dependente do substrato disponível no meio, uma vez que foram encontradas proteínas fosforiladas de forma diferente em glicose e bagaço de cana-de-açúcar para as linhagens parental QM6a e mutantes $\Delta tmk1$ e $\Delta tmk2$. 5. A proteína TMK1 participa principalmente do controle da produção de celulasas pelas vias mediadas por TORC1 e de Ras-AMPC. 6. As proteínas TMK1 e TMK2 podem participar da fosforilação da subunidade regulatória de PKA, regulando a expressão de celulasas. 7. A proteína TMK2 possui papel na via de resposta a estresse celular, uma vez que participa da fosforilação de Sin1p, importante na via de SAPK e TORC2. 8. A proteína TMK1 tem papel no mecanismo regulatório direto de celulasas, por participar da fosforilação em enzimas CAZy. Nosso trabalho permite a identificação de novos alvos e possíveis mecanismos regulatórios de vários processos celulares relacionados com a produção das enzimas celulolíticas do fungo *Trichoderma reesei* no cultivo em bagaço de cana-de-açúcar e glicose, ampliando, assim, os conhecimentos acerca do sistema celulolítico dessa espécie de grande importância biotecnológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALBATAINEH, M. T.; KADOSH, D. Regulatory roles of phosphorylation in model and pathogenic fungi. n. July, p. 333–352, 2018.
- ALURU, M. et al. Mitogen-activated protein kinases, Fus3 and Kss1, regulate chronological lifespan in yeast. **Aging (Albany NY)**, v. 9, n. 12, p. 2587–2609, 21 dez. 2017.
- 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.
- 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.
- BALBUENA, T. S.; DEMARTINI, D. R.; THELEN, J. J. Global Quantitative Proteomics Using Spectral Counting: An Inexpensive Experimental and Bioinformatics Workflow for Deep Proteome Coverage BT - Plant Proteomics: Methods and Protocols. In: JORRIN-NOVO, J. V et al. (Eds.). . Totowa, NJ: Humana Press, 2014. p. 171–183.
- 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. 106, 2016.
- BOS, J. L.; REHMANN, H.; WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 865–877, 2007.
- BROWN, N. A. et al. Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 91, 25 jun. 2013.
- BUDOVSKAYA, Y. V et al. The Ras/cAMP-dependent Protein Kinase Signaling Pathway Regulates an Early Step of the Autophagy Process in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20663–20671, 14 maio 2004.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

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.

CASAS-FLORES, S. et al. Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 3, p. 499–506, mar. 2006.

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.

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.

CHEN, R. E.; THORNER, J. Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways: Lessons Learned from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1773, n. 8, p. 1311–1340, 22 ago. 2007.

COLLOPY, P. D. et al. High-throughput construction of gene deletion cassettes for generation of *Neurospora crassa* knockout strains. **Methods Mol Biol**, v. 638, 2010.

COLOT, H. V et al. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, 2006.

D'SOUZA, C. A.; HEITMAN, J. Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 349–64, maio 2001.

DE ASSIS, L. J. et al. *Aspergillus nidulans* protein kinase A plays an important role in cellulase production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 213, 18 dez. 2015.

DE PAULA, R. G. **Caracterização da via de sinalização dependente de MAPK na regulação da expressão de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

DE SOUZA, W. R. et al. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 40, 2011.

DERNTL, C. et al. Novel Strategies for Genomic Manipulation of *Trichoderma reesei* with the Purpose of Strain Engineering. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6314–6323, set. 2015.

DICKMAN, M. B.; YARDEN, O. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 26, n. 2, p. 99–117, mar. 1999.

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.

ENGHOLM-KELLER, K.; LARSEN, M. R. Technologies and challenges in large-scale phosphoproteomics. **Proteomics**, v. 13, n. 6, p. 910–931, mar. 2013.

FITZGIBBON, G. J. et al. Genetic Analysis of the TOR Pathway in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 9, p. 1595–1598, 4 set. 2005.

FRANCK, W. L. et al. Phosphoproteome Analysis Links Protein Phosphorylation to Cellular Remodeling and Metabolic Adaptation during *Magnaporthe oryzae* Appressorium Development. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 6, p. 2408–2424, jun. 2015.

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.

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nat Protoc**, v. 2, 2007.

GOLDMAN, G. H. et al. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 1, p. 34–48, fev. 2003.

GRIFFIOEN, G. et al. Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 2, p. 511–523, jan. 2001.

GRIMSRUD, P. A. et al. Phosphoproteomics for the masses. **ACS chemical biology**, v. 5, n. 1, p. 105–119, jan. 2010.

GRUBER, F. et al. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a pyrG-negative mutant strain. **Current genetics**, v. 18, n. 1, p. 71–76, jul. 1990.

GRUBER, S.; ZEILINGER, S. The Transcription Factor Ste12 Mediates the Regulatory Role of the Tmk1 MAP Kinase in Mycoparasitism and Vegetative Hyphal Fusion in the Filamentous Fungus *Trichoderma atroviride*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111636, 30 out. 2014.

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, 2016.

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.; 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.

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.

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.

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.

HUANG, P. H.; WHITE, F. M. Phosphoproteomics: Unraveling the Signaling Web. **Molecular Cell**, v. 31, n. 6, p. 777–781, 2008.

HUANG, Y. et al. A quantitative mass spectrometry-based approach for identifying protein kinase clients and quantifying kinase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 402, n. 1, p. 69–76, 2010.

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.

IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753–764, out. 2005.

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.

KILBANE, J. J. Future applications of biotechnology to the energy industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 4–7, 2016.

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.

KOPPRAM, R. et al. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: Challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 46–53, 2014.

KRONSTAD, J. et al. Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. **Archives of microbiology**, v. 170, n. 6, p. 395–404, nov. 1998.

LARANCE, M.; LAMOND, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 5, p. 269–280, 2015.

LEBERER, E. et al. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular microbiology**, v. 42, n. 3, p. 673–687, nov. 2001.

LEE, N.; D'SOUZA, C. A.; KRONSTAD, J. W. Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. **Annual review of phytopathology**, v. 41, p. 399–427, 2003.

LENDENFELD, T.; KUBICEK, C. P. Characterization and properties of protein kinase C from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **The Biochemical journal**, v. 330 (Pt 2, p. 689–94, mar. 1998.

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. Comparative phosphoproteome analysis of *Magnaporthe oryzae*-responsive proteins in susceptible and resistant rice cultivars. **Journal of Proteomics**, v. 115, p. 66–80, 2015.

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.

LUNDGREN, D. H. et al. Role of spectral counting in quantitative proteomics. **Expert Review of Proteomics**, v. 7, n. 1, p. 39–53, fev. 2010.

LV, X. et al. *Trichoderma reesei* Sch9 and Yak1 regulate vegetative growth, conidiation, and stress response and induced cellulase production. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 53, n. 4, p. 236–242, abr. 2015.

MACH-AIGNER, A. R. et al. Transcriptional regulation of *xyl1*, 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.

MACH-AIGNER, A. R. et al. d-Xylose concentration-dependent hydrolase expression profiles and the function of CreA and XlnR in *Aspergillus niger*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3145–3155, maio 2012.

MART, H. Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. n. May, p. 503–511, 2010.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553–560, 2008.

MEHRABI, R. et al. The cAMP Signaling and MAP Kinase Pathways in Plant Pathogenic Fungi BT - Plant Relationships. In: DEISING, H. B. (Ed.). . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 157–172.

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.

MORAWETZ, R. et al. Cloning and characterisation of genes (*pkc1* and *pkcA*) encoding protein kinase C homologues from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 250, n. 1, p. 17–28, jan. 1996.

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.

MUMBY, M.; BREKKEN, D. Phosphoproteomics: new insights into cellular signaling. **Genome biology**, v. 6, p. 230, 2005.

NAKARI-SETALA, T. et al. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 14, p. 4853–4860, 2009.

NEGRONI, L. et al. Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 891–892, p. 109–112, 2012.

NGUYEN, E. V et al. Quantitative Site-Specific Phosphoproteomics of *Trichoderma reesei* Signaling Pathways upon Induction of Hydrolytic Enzyme Production. **Journal of proteome research**, v. 15, n. 2, p. 457–467, fev. 2016.

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. Evidence of cAMP involvement in cellobiohydrolase expression and secretion by *Trichoderma reesei* in presence of the inducer sophorose. **BMC Microbiol**, v. 15, p. 195, jan. 2015.

OMANN, M.; ZEILINGER, S. How a mycoparasite employs g-protein signaling: using the example of trichoderma. **Journal of signal transduction**, v. 2010, p. 123126, 2010.

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.

PAN, D.; MATSUURA, Y. Structures of the pleckstrin homology domain of *Saccharomyces cerevisiae* Avo1 and its human orthologue Sin1, an essential subunit of TOR complex 2. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 68, n. Pt 4, p. 386–392, 1 abr. 2012.

PAULOVA, L. et al. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1091–1107, 2015.

PAYNE, C. M. et al. Fungal Cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 11 fev. 2015.

PEARSON, G. et al. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153–183, abr. 2001.

PEREIRA, S. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnol. Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 44, 2015.

PITARELO, A. et al. Effect of moisture content in the steam treatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502–1509, 2012.

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. 2011a.

PORTNOY, T. et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 269, dez. 2011b.

QI, M.; ELION, E. A. MAP kinase pathways. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 16, p. 3569–3572, 2005.

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.

REN, S. et al. Global Phosphoproteomic Analysis Reveals the Involvement of Phosphorylation in Aflatoxins Biosynthesis in the Pathogenic Fungus *Aspergillus flavus*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 34078, 26 set. 2016.

RIBEIRO, L. F. C. et al. Insights regarding fungal phosphoproteomic analysis. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 104, p. 38–44, jul. 2017.

ROCHA-RAMIREZ, V. et al. Trichoderma atroviride G-protein alpha-subunit gene *tgal1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 4, p. 594–605, ago. 2002.

ROHDE, J. R. et al. Nutritional Control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 2, p. 153–160, 8 abr. 2008.

ROOSEN, J. et al. PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. **Molecular microbiology**, v. 55, n. 3, p. 862–880, fev. 2005.

ROUX, P. P.; THIBAUT, P. The coming of age of phosphoproteomics--from large data sets to inference of protein functions. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 12, n. 12, p. 3453–64, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. . **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. v. 2 ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTANGELO, G. M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 70, n. 1, p. 253–282, mar. 2006.

SCHAEFFER, H. J.; WEBER, M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 4, p. 2435–2444, 1999.

SCHMIDT, M. C. Signaling Crosstalk: Integrating Nutrient Availability and Sex. **Science signaling**, v. 6, n. 291, p. pe28–pe28, 3 set. 2013.

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 G-alpha protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) regulates cellulase gene expression in the presence of light. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 3, p. 410–420, 2009.

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.

SCHMOLL, M.; ESQUIVEL-NARANJO, E. U.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* in the light of day – Physiology and development. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 11–2, p. 909–916, 22 nov. 2010.

SCHONBRUN, M. et al. TOR complex 2 controls gene silencing, telomere length maintenance, and survival under DNA-damaging conditions. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 16, p. 4584–4594, ago. 2009.

SCHUSTER, A. et al. Roles of protein kinase A and adenylylase 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.

SEGATO, F. et al. **Genomics Review of Holocellulose Deconstruction by Aspergilli**. [s.l.: s.n.]. v. 78

SEIBEL, C. et al. Light-dependent roles of the G-protein alpha subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). **BMC Biol**, v. 7, p. 58, 2009.

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.

SESTAK, S.; FARKAS, V. Metabolic regulation of endoglucanase synthesis in *Trichoderma reesei*: participation of cyclic AMP and glucose-6-phosphate. **Can J Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 342–347, 1993.

SHASHKOVA, S.; WELKENHUYSEN, N.; HOHMANN, S. Molecular communication: crosstalk between the Snf1 and other signaling pathways. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 4, p. fov026, jun. 2015.

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, 2016a.

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. 80, n. 9, p. 1712–1729, set. 2016b.

SHIMIZU, K. et al. Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)2Cys6 transcription factor in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 165, n. 3, p. 1095–1104, nov. 2003.

SILVA, R. DO N. **Estudos de sinalização celular em *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) durante a expressão dos genes de celulasas (cbh1 e cbh2) em presença de celulose e sofrose 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.

SMETS, B. et al. Genome-wide expression analysis reveals TORC1-dependent and -independent functions of Sch9. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 8, p. 1276–1288, dez. 2008.

SOULARD, A. et al. The Rapamycin-sensitive Phosphoproteome Reveals That TOR Controls Protein Kinase A Toward Some But Not All Substrates. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n.

19, p. 3475–3486, 1 out. 2010.

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.

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.

TAMAKI, H. Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 104, n. 4, p. 245–250, out. 2007.

TAMANOI, F. Ras Signaling in Yeast. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 210–215, mar. 2011.

TATEBE, H. et al. Substrate specificity of TOR complex 2 is determined by a ubiquitin-fold domain of the Sin1 subunit. **eLife**, v. 6, p. e19594, 2017.

TISCH, D.; SCHMOLL, M. Targets of light signalling in *Trichoderma reesei*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 657, 2013.

TYANOVA, S. et al. Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. **Proteomics**, v. 15, n. 8, p. 1453–1456, abr. 2015.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature methods**, v. 13, n. 9, p. 731–740, set. 2016.

VINOD, P. K. et al. Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of FLO11. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1663, fev. 2008.

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, 2013a.

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. 2013b.

WANG, M. et al. Identification of the role of a MAP kinase Tmk2 in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Scientific Reports**, v. 4, p. 6732, 2014a.

WANG, M. et al. Identification of the role of a MAP kinase Tmk2 in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Scientific reports**, v. 4, p. 6732, out. 2014b.

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, P.; NUSS, D. L. Induction of a *Cryphonectria parasitica* cellobiohydrolase I gene is suppressed by hypovirus infection and regulated by a GTP-binding-protein-linked signaling pathway involved in fungal pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 25, p. 11529–11533, dez. 1995.

WANG, Z.-K. et al. Proteomic and Phosphoproteomic Insights into a Signaling Hub Role for Cdc14 in Asexual Development and Multiple Stress Responses in *Beauveria bassiana*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153007, 7 abr. 2016.

WAUGH, M. S. et al. Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 1, p. 191–201, jan. 2002.

WILKINSON, M. G. et al. Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 15, p. 4210–4221, 2 ago. 1999.

WOLSCHIN, F.; WECKWERTH, W. Combining metal oxide affinity chromatography (MOAC) and selective mass spectrometry for robust identification of in vivo protein phosphorylation sites. **Plant Methods**, v. 1, n. 1, p. 9, 2005.

WOLSCHIN, F.; WIENKOOP, S.; WECKWERTH, W. Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). **Proteomics**, v. 5, n. 17, p. 4389–4397, 2005.

XIONG, Y. et al. The proteome and phosphoproteome of *Neurospora crassa* in response to cellulose, sucrose and carbon starvation. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 72, p. 21–33, nov. 2014.

YADAV, R. K. P. et al. Potential Cellulosic Ethanol Production from Organic Residues of Agro-Based Industries in Nepal. **ISRN Renewable Energy**, v. 2014, n. JANUARY 2014, p. 1–6, 2014.

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, B. et al. Mechanism of the guanine nucleotide exchange reaction of Ras GTPase--evidence for a GTP/GDP displacement model. **Biochemistry**, v. 44, n. 7, p. 2566–2576, fev. 2005.

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.

ZHENG, Y.; QUILLIAM, L. A. Activation of the Ras superfamily of small GTPases: Workshop on Exchange Factors. **EMBO Reports**, v. 4, n. 5, p. 463–468, 25 maio 2003.

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.

ANEXO DE PUBLICAÇÕES

Artigo completo publicados em periódico:

NOGUEIRA, K.M.V.; DE PAULA, R.G.; ANTONIÊTO, A.C.C.; DOS REIS, T.F.; **CARRARO, C.B.**; SILVA, A.C.; ALMEIDA, F.; RECHIA, C.G.V.; GOLDMAN, G.H.; SILVA, R.N. Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Biofuels**. 2018, Apr 2;11:84. doi: 10.1186/s13068-018-1084-1

Artigos completos submetidos à publicação:

RIBEIRO, M.S.; DE PAULA, R.G.; VOLTAN, A.R.; DE CASTRO, R.G.; **CARRARO, C.B.**; STEINDORFF, A.S.; SILVA, R.N.; ULHOA, C.J; MONTEIRO, V.N. Endo- β -1,3-glucanase (GH16 family) from *Trichoderma harzianum* participates in self-cell wall biogenesis but is not essential for antagonism against plant pathogens. **Microbiological Research**. ISSN: 0944-5013

DE PAULA, R.G.; ANTONIÊTO, A.C.C.; RIBEIRO, L.F.C.R.; **CARRARO, C.B.**; NOGUEIRA, K.M.V.; LOPES, D.C.B.L.; SILVA, A.C.; ZERBINI, M.T.; PEDERSOLI, W.R.; COSTA, M.N.; SILVA, R.N. New Approaches in Postgenomic era to enhance biomass degradation by the industrial fungus *Trichoderma reesei*. **International Journal of Genomics**. ISSN: 2314-4378

DE PAULA, R.G.; ANTONIÊTO, A.C.C.; **CARRARO, C.B.**; PERSINOTI, G.F.; PERES, N.T.A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; SILVA-ROCHA, R.; SILVA, R.N. The Duality of MAPK Signaling Pathway in the Control of Metabolic Processes and Cellulases Production in *Trichoderma reesei*. **Scientific reports**. ISSN: 2045-2322

APÊNDICE

Tabela 11. Fosfoproteínas identificadas na linhagem QM6a de *T. reesei*, sob cultivo em glicose.

Tabela 12. Fosfoproteínas identificadas no mutante *Atmk1* de *T. reesei*, sob cultivo em glicose.

Tabela 13. Fosfoproteínas identificadas no mutante *Atmk2* de *T. reesei*, sob cultivo em glicose.

Tabela 14. Fosfoproteínas identificadas na linhagem QM6a de *T. reesei*, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 15. Fosfoproteínas identificadas no mutante *Atmk1* de *T. reesei*, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 16. Fosfoproteínas identificadas no mutante *Atmk2* de *T. reesei*, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 17. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas na linhagem QM6a de *T. reesei*, com relação à TMK1, sob cultivo em glicose.

Tabela 18. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas no mutante *Atmk1* de *T. reesei*, sob cultivo em glicose.

Tabela 19. Fosfoproteínas igualmente fosforiladas na linhagem QM6a e no mutante *Atmk1* de *T. reesei*, sob cultivo em glicose.

Tabela 20. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas na linhagem QM6a de *T. reesei*, com relação à TMK2, sob cultivo em glicose.

Tabela 21. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas no mutante *Atmk2* de *T. reesei*, sob cultivo em glicose.

Tabela 22. Fosfoproteínas igualmente fosforiladas na linhagem QM6a e no mutante *Atmk2* de *T. reesei*, sob cultivo em glicose.

Tabela 23. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas na linhagem QM6a de *T. reesei*, com relação à TMK1, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 24. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas no mutante $\Delta tmk1$ de *T. reesei*, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 25. Fosfoproteínas igualmente fosforiladas na linhagem QM6a e no mutante $\Delta tmk1$ de *T. reesei*, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 26. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas na linhagem QM6a de *T. reesei*, com relação à TMK2, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 27. Fosfoproteínas diferencialmente fosforiladas no mutante $\Delta tmk2$ de *T. reesei*, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 28. Fosfoproteínas igualmente fosforiladas na linhagem QM6a e no mutante $\Delta tmk2$ de *T. reesei*, sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.