

**Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho**  
**Instituto de Química**  
**Departamento de Bioquímica e Química Orgânica**

**JONATAS ERICK MAIMONI CAMPANELLA**

**Caracterização funcional, bioquímica e na resposta a estresse das  
ATPases RVB-1 e RVB-2 e da ciclina PCL-1 no fungo filamentoso  
*Neurospora crassa***

**Araraquara**  
**2022**

**JONATAS ERICK MAIMONI CAMPANELLA**

**Caracterização funcional, bioquímica e na resposta a estresse das  
ATPases RVB-1 e RVB-2 e da ciclina PCL-1 no fungo filamentoso  
*Neurospora crassa***

**Doutorado em Biotecnologia:**

Tese apresentada ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dr. Maria Célia Bertolini

**Coorientadora:** Profa. Dr. Fernanda Zanolli Freitas

**Araraquara**

**2022**

C186c

Campanella, Jonatas Erick Maimoni

Caracterização funcional, bioquímica e na resposta a estresse das ATPases RVB-1 e RVB-2 e da ciclina PCL-1 no fungo filamentosso *Neurospora crassa* / Jonatas Erick Maimoni Campanella. -- Araraquara, 2022

228 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Maria Célia Bertolini

Coorientadora: Fernanda Zanolli Freitas

1. Bioquímica. 2. Espectrometria de massa. 3. Proteínas de choque térmico. 4. Western blotting. 5. *Neurospora crassa*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** "Caracterização funcional e bioquímica e na resposta a estresse das ATPases RVB-1 e RVB-2 e da ciclina PCL-1 no fungo filamentosso *Neurospora crassa*"

**AUTOR: JONATAS ERICK MAIMONI CAMPANELLA**

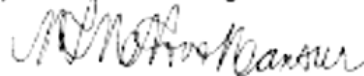
**ORIENTADORA: MARIA CELIA BERTOLINI**

**COORDINADORA: FERNANDA ZANOLLI FREITAS**

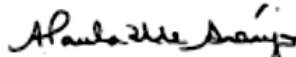
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA CELIA BERTOLINI (Participação Virtual)  
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Profa. Dra. MARIA TERESA MARQUES NOVO MANSUR (Participação Virtual)  
Departamento de Genética e Evolução / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UFSCar - São Carlos



Profa. Dra. ANA PAULA ULIAN DE ARAUJO (Participação Virtual)  
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física - USP - São Carlos



Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE INÁCIO RAMOS (Participação Virtual)  
Departamento de Bioquímica / Instituto de Biologia - UNICAMP - Campinas

Dra. PAULA ABOUD BARBUGLI (Participação Virtual)  
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP - Araraquara



Araraquara, 25 de agosto de 2022

## **Súmula Curricular**

**Jonatas Erick Maimoni Campanella**

Av. Mario Ybarra de Almeida, 1791, Araraquara, SP 14800-436

(19) 99829-5959

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6558061346770006>

### **1. Formação**

#### ***Doutorado em Biotecnologia***

**Área de atuação:** Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos

**Instituição:** Instituto de Química – UNESP / Araraquara-SP

**Conclusão:** 08/2022

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr. Maria Célia Bertolini.

**Bolsista:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

#### ***Mestrado em Biotecnologia***

**Area de atuação:** Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos

**Instituição:** Instituto de Química – UNESP / Araraquara-SP

**Ano de conclusão:** 2018

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr. Maria Célia Bertolini.

**Bolsista:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

#### ***Bacharelado em Química***

**Instituição:** Instituto de Química – UNESP / Araraquara-SP

**Conclusão:** 2016

**Bolsista:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

(Iniciação Científica - Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr. Maria Célia Bertolini).

#### ***Auxiliar Técnico em Química***

**Instituição:** Centro Paula Sousa – ETEC Prof. Fernando Febeliano da Costa, Piracicaba, SP.

**Conclusão:** 2012

### **2. Histórico profissional, serviços e distinções acadêmicas e prêmios**

SBBq AWARD for best poster, 20th IUPAB Congress, 45th Annual SBBf Meeting, and 50th Annual SBBq Meeting, 2021.

SBBq AWARD for best poster, 48th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2019.

Menção honrosa pela participação no Prêmio INICIAÇÃO CIENTÍFICA com o trabalho na área de Genética de Microrganismos. 61º Congresso Brasileiro de Genética, 2015.

2020-2021 – Membro suplente do Conselho de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química da UNESP, Araraquara, SP.

2021-Atual – Membro titular do Conselho de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química da UNESP, Araraquara, SP.

### 3. Artigos publicados, submetidos ou em preparação

Campanella JEM, Ramos Junior SL, Rodrigues Kiraly VT, Severo Gomes AA, de Barros AC, Mateos PA, Freitas FZ, Fontes MRM, Borges JC, Bertolini MC. **Biochemical and biophysical characterization of the RVB-1/RVB-2 protein complex, the RuvBL/RVB homologues in *Neurospora crassa***. *Biochimie*. 2021. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.08.002.

Arroyos G, da Silva CM, Theodoroviez LB, Campanella JEM, Frem RCG. **Insights on Luminescent Micro- and Nanospheres of Infinite Coordination Polymers**. *Chemistry*. 2022. DOI: 10.1002/chem.202103104.

Barbosa LCB, Dos Santos Carrijo R, da Conceição MB, Campanella JEM, Júnior EC, Secches TO, Bertolini MC, Marchetto R. **Characterization of an OrtT-like toxin of *Salmonella enterica* serovar Houten**. *Braz J Microbiol*. 2019. DOI: 10.1007/s42770-019-00085-3.

Campanella JEM, Candido TS, Severo Gomes AA, Barbosa LCB, Leite CA, Higashi ES, Fontes MRM, Bertolini MC. **The *Neurospora crassa* PCL-1 protein is a cyclin with multifunctional activities and together with PHO85-1 (PGOV) protein kinase directs the complex to glycogen metabolism**. *Microbiol. Spectr*. 2022. (Submetido – *Under review*).

Marin-Dett FH, Campanella JEM, Trovatti E, Bertolini MC, Vergani CE, Barbugli PA. **Lipids of *Candida albicans* biofilms influence oral carcinoma cells behavior**. *Biofouling*. 2022 (Submetido - *Under review*).

Arroyos G, Campanella JEM, da Silva CM, Frem RCG. **Detection of anthrax biomarker and metallic ions in aqueous media using spherical shaped lanthanide infinite coordination polymers**. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. 2022. (Submetido - *Under review*).

Campanella JEM, Garcia JS, Barbugli PA, Bertolini MC. **The *Neurospora crassa* RVB-1 and RVB-2 proteins play a functional role in stress response and immunoprecipitation studies reveal new interactors of RVB-1**. (Manuscrito em preparação).

### 4. Financiamentos à pesquisa

**Bolsa de Iniciação Científica (2014-2015):** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp - 14/11310-3). Projeto: Localização subcelular da proteína RUV-1 de *Neurospora crassa*.

Orientação: Profa. Dr. Maria Célia Bertolini

**Bolsa de Mestrado (2016-2018):** Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Projeto: Caracterização funcional e biofísica das proteínas RVB-1 e RVB-2 pertencentes a família AAA+ do fungo *Neurospora crassa*.

Orientação: Profa. Dr. Maria Célia Bertolini

**Bolsa de Doutorado (2018-2022):** Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Projeto: Estudo funcional do complexo RVB-1/RVB-2 de *Neurospora crassa* na resposta a estresse através de análises de expressão proteica e coimunoprecipitação.

Orientação: Profa. Dr. Maria Célia Bertolini

Coorientação: Profa. Dr. Fernanda Zanolli Freitas

## 5. Indicadores quantitativos:

Trabalhos apresentados em Congressos Internacionais: 4

Participação em Congressos Internacionais: 2

Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais: 8

Participação em Congressos Nacionais: 5

Participação em eventos: 17

Artigos Publicados: 3

Artigos Submetidos: 3

Artigos em preparação: 2

6. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5858-7041>

## 7. Outras informações

**Supervisão Científica:** Júlia da Silva Garcia (Iniciação científica): Estudos sobre o papel do fator de transcrição CSP-1 na regulação da expressão circadiana das proteínas RVB-1 e RVB-2 no fungo *Neurospora crassa*. (Coorientador de TCC)

**Participação em banca** de Mariana Sousa de Paula. Estudos de localização celular da proteína TMP-1 do fungo *Neurospora crassa* e avaliação de condições que influenciam sua localização. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP).

## Trabalhos apresentados em Congressos Internacionais:

Campanella JEM, Ramos Junior SL, Barros AC, Freitas FZ, Fontes MRM, Borges JC, Bertolini MC. The *Neurospora crassa* RVB-1/2 protein complex, two proteins belonging to the AAA+ ATPase protein family, plays a functional role in heat stress response. In: 30th Fungal Genetics Conference, 2019, Pacific Grove, CA, USA.

Campanella JEM, Ramos Junior SL, Borges JC, Freitas FZ, Bertolini MC. A novel functional role for two ATP-dependent DNA helicases in *Neurospora crassa* stress response. In: III International Symposium on Fungal Stress, 2019, São José dos Campos, SP.

Silva MC, Campanella JEM, Bertolini MC, Freitas FZ. Deciphering the *Neurospora crassa* lignin secretome. In: III International Symposium on Fungal Stress, 2019, São José dos Campos, SP.

Mateos PA, Campanella JEM, Freitas FZ, Bertolini MC. The RUV-1/2 proteins have a functional role in heat shock response in *Neurospora crassa*. In: 29th Fungal Genetics Conference, 2017, Pacific Grove, CA, USA.

#### **Participação em Congressos Internacionais:**

30th Fungal Genetics Conference. The *Neurospora crassa* RVB-1/2 protein complex, two proteins belonging to the AAA+ ATPase protein family, plays a functional role in heat stress response. 2019. (Apresentação de Poster)

International Symposium on Fungal Stress. A novel functional role for two ATP-dependent DNA helicases in *Neurospora crassa* stress response. 2019. (Apresentação de Poster).

#### **Atividades de Iniciação à docência no Ensino Superior:**

Monitoria “**Calculo I**” para o curso de Engenharia Química do IQAr – UNESP (2013).

Atuou como docente responsável pela disciplina “**Biologia**” para o 1º ano do curso de Licenciatura em Química do IQAr – UNESP, pelo Programa de Aperfeiçoamento à Docência no Ensino Superior – PAADES A (60h/2º semestre 2019).

Atuou como docente voluntário da disciplina “**Microbiologia Industrial**” para o 3º ano do curso de Engenharia em Química do IQAr – UNESP, pelo Programa de Aperfeiçoamento à Docência no Ensino Superior – PAADES A (60h / 2º semestre de 2020).

Atuou como Orientador Acadêmico Pós-graduando na Graduação na disciplina “**Bioquímica Geral e Experimental I**” para o 3º ano do curso de Bacharelado em Química e Bacharelado em Química Tecnológica do IQAr – UNESP (60h / 2º Semestre de 2021).

*Minha querida vó Ana, mãe, madrinha e conselheira...*

*Aos meus avós que se foram... Mauro, José e Olinda...Seu neto é Doutor!!!!!!*

*Este trabalho é dedicado a vocês...*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Celso e Fabiana, que sempre colocaram a educação de seus filhos em primeiro lugar, pela ajuda incalculável e confiança que depositaram. Também agradeço ao meu irmão Marcos, pela sua amizade, pelo seu carinho, pelo seu respeito como meu irmão mais novo. Que este trabalho sirva de exemplo e incentivo para que você continue estudando e sendo esse homem inteligente que você é! Sempre lute pelos seus sonhos meu filho! Amo todos vocês imensuravelmente.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Maria Célia, uma referência incrível do que considero uma excelente pesquisadora e professora universitária, pela confiança, oportunidades incríveis, sempre contribuindo muito para meu amadurecimento científico e pessoal. Acredito que fui um desafio, repleto de momentos em que você precisou ter muita paciência, mas espero que hoje estes momentos valham a pena e que eu seja alguém com quem você possa contar cientificamente e pessoalmente, pois sempre lembrarei com muito carinho de você. Tenho muito respeito por você e sou imensamente grato.

Deixo aqui também um agradecimento muito especial para minha coorientadora, a Fernanda, que me ajudou muito com os cafés e incontáveis discussões científicas e pessoais. Você merece um lugar de destaque e também sabe que pode contar comigo para o que você precisar!

Também agradeço a todos os colegas e amigos que passaram pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, Júlia, Mariana, Karina, Eduardo, Rodrigo, Stela (em especial pelos vários áudios trocados de 20 minutos!), Daniela, Juvana, Carla, André, Tiago, Erika, Carol, Susi e outros que posso deixar de ter mencionado, mas que sempre estarão na minha história científica...vocês me ajudaram desde minha Iniciação Científica até a conclusão desta tese. Tarcísio, você merece um lugar especial neste agradecimento, por ter aguentado minhas bagunças e me ajudado muito na organização do laboratório, prestando apoio técnico em equipamentos e sendo solidário sempre que precisei. Você é o cara!!!!

Agradeço também ao Prof. Júlio César Borges e seus alunos do Laboratório de Biofísica e Bioquímica de Proteínas (USP, São Carlos - SP), em especial o Serginho e a Vanessa, pela colaboração em experimentos de biofísica e bioquímica

que foram um diferencial para minha formação e para a conclusão deste trabalho. Também não poderia deixar de agradecer a Marina e o Prof. Dr. Iran Malavazi (UFSCar, São Carlos – SP) pela ajuda na padronização dos experimentos de qPCR e pelas discussões que foram essenciais para compreensão de resultados deste trabalho.

Agradeço novamente ao Prof. Dr. Malavazi e também a Profa. Dr. Danielle Biscaro Pedrolli (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara – SP), pela participação na minha banca de qualificação, contribuindo com seus conhecimentos para a finalização deste trabalho.

Ao meu namorado Maurício deixo uma citação do Dumbledore: *“Podemos encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se nos lembrarmos de voltar e acender a luz”*. Você foi um guia importante nestes 6 anos de relacionamento para que eu encontrasse luz em momentos que imaginei estar no escuro. Muito obrigado amor. Eu te amo.

Não posso deixar de agradecer formalmente aos meus amigos que me perseguem desde o ensino fundamental (Eloisa), médio (Mayara) e graduação (Maria, Granola, Arroyos e Carlola). Creio que palavras escritas não resume o carinho que sinto vocês...esse tipo de coisa deixo para falar pessoalmente em meio a alguns “litrões”. Em breve estaremos “bebemorando”.

Aos docentes e colegas do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, em especial a Profa. Dr. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado, pela confiança em dividir a disciplina “Biologia” para o curso de Licenciatura em Química pelo PAADES, permitindo que eu treinasse minhas habilidades como docente, o que considero essencial para atingir meu objetivo no futuro: ser um professor universitário. Muito obrigado.

Ao Instituto de Química e sua comunidade (minha eterna casa científica) e o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UNESP de Araraquara, em especial aos membros do Conselho do Programa, pelos ensinamentos, discussões enriquecedoras, por me receber e me dar todo o apoio possível.

À FAPESP e CNPq pelo financiamento ao laboratório onde desenvolvi esta Tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino".*

*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

O fungo *Neurospora crassa* está entre os organismos mais bem compreendidos, sendo um fungo filamentoso amplamente utilizado como organismo modelo. Em nosso laboratório, diferentes proteínas foram previamente identificadas como reguladoras do metabolismo de glicogênio em diferentes condições de crescimento. Neste trabalho, algumas destas proteínas foram mais detalhadamente caracterizadas do ponto de vista bioquímico e funcional. A função da ciclina PCL-1, anteriormente identificada como uma proteína parceira da quinase PHO85-1, foi mais amplamente investigada mostrando funções adicionais à regulação do ciclo celular e metabolismo de glicogênio. Foi demonstrado que esta ciclina atua também na resposta a estresse, principalmente aquele induzido por altas concentrações de cálcio extracelular, possivelmente através da fosforilação de CRZ-1, um fator de transcrição responsivo a cálcio. O conjunto de resultados mostra o papel multifuncional desta ciclina no fungo *N. crassa*, diferente da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na qual ciclinas de uma família são direcionadas às mesmas funções celulares. A proteína RVB-1, anteriormente identificada como capaz de se ligar ao promotor *gsn*, foi também amplamente caracterizada neste trabalho. RVB-1, juntamente com sua paróloga RVB-2, pertence à família AAA+ ATPases (*ATPases Associated with Diverse Cellular Activities*) conhecidas por interagir com múltiplos complexos proteicos incluindo remodeladores da cromatina e amplamente associadas ao desenvolvimento celular e câncer. Ambas as proteínas são essenciais ao fungo, tem localização nuclear e influenciam no seu desenvolvimento e produção de metabolitos secundários. O complexo RVB-1/RVB-2 foi produzido na forma recombinante em *E. coli* e caracterizado quanto aos aspectos estruturais e bioquímicos. O complexo mostrou atividade ATPase, capacidade de se ligar a fragmentos de DNA e apresentou diferentes formas oligoméricas em solução, sendo que a presença dos nucleotídeos ATP/ADP influencia no estado de oligomerização. A expressão de ambas as proteínas é modulada por diferentes estresses e ensaios de imunoprecipitação da proteína RVB-1 levaram à identificação de numerosas proteínas parceiras. Algumas interações foram caracterizadas neste trabalho. A interação *in vivo* com a proteína glicogenina (GNN), juntamente com a redução no conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes  $\Delta rvb-1^{het}$  e  $\Delta rvb-2^{het}$  indicou a participação do complexo na regulação do metabolismo de glicogênio. A interação *in vitro* com a parceira shugoshin (SGO-1), descrita como guardiã da resposta ao estresse térmico em mamífero, foi demonstrada comprovando o papel na resposta ao estresse. Finalmente, linhagens do fungo mutantes em componentes de complexos de remodelagem de cromatina, identificados como parceiros, são severamente sensíveis a estresse, evidenciando um papel funcional ainda não descrito para estas proteínas: a participação na resposta a estresse.

## ABSTRACT

*Neurospora crassa* is one of the most studied organisms being a filamentous fungus that is often used as a model organism. Several proteins have already been identified in our laboratory as regulators of glycogen metabolism under different growth conditions. In this work, some of these proteins were biochemically and functionally characterized. The function of the PCL-1 cyclin, previously identified as a partner protein of the PHO85-1 kinase, was investigated and the results revealed additional functions rather than those in cell cycle regulation and glycogen metabolism. This cyclin has shown to act on the stress response mainly the one triggered by high concentrations of extracellular calcium possibly through phosphorylation of CRZ-1, a calcium-responsive transcription factor. The results demonstrate the multifunctional role of this cyclin in *N. crassa*, unlike the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in which different cyclins from one family target to the same cellular functions. The protein RVB-1, previously identified as capable of binding to the *gsn* promoter, was also extensively characterized in this work. RVB-1, together with its RVB-2 paralog, belongs to the family of AAA + ATPases (ATPases Associated with Diverse Cell Activities), which are known to interact with several protein complexes, including chromatin remodelers, and are widely associated with cell development and cancer. Both proteins are essential for the fungus, have nuclear localization, and influence the fungus development and production of secondary metabolites. The recombinant RVB-1/RVB-2 complex was produced in *E. coli* and characterized under structural and biochemical aspects. The complex showed ATPase activity, ability to bind to DNA fragments, and presented different oligomeric states in solution depending on the presence or not of the ATP/ADP nucleotides. The *in vivo* expression of both proteins is modulated by various stress agents, and RVB-1 immunoprecipitation assays led to the identification of numerous proteins partners. Some interactions were characterized in this work. The *in vivo* interaction with the glycogenin protein (GNN) and the reduction of the glycogen levels in the mutant strains  $\Delta rvb-1^{het}$  and  $\Delta rvb-2^{het}$  suggest the involvement of the complex in the regulation of glycogen metabolism. The *in vitro* interaction with the Shugoshin partner (SGO-1), described as a guardian of the mammalian heat stress response, was detected demonstrating its role in the stress response. Finally, mutant strains in components of chromatin remodeling complexes, identified as partners, are highly sensitive to stress, indicating a functional role not yet described for these proteins: their involvement in stress response.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1. O fungo filamentoso <i>Neurospora crassa</i> como um modelo .....	17
<b>2. Mecanismos moleculares envolvidos na resposta a estresse</b> .....	<b>20</b>
2.1. Resposta a choque térmico .....	22
2.1.1. Proteínas de choque térmico (HSP) .....	23
2.2. Resposta a estresse osmótico .....	25
2.3. Resposta a estresse de pH .....	26
2.4. Resposta a estresse oxidativo .....	28
2.5. Estresse de parede celular .....	29
2.6. Estresse salino causado pelo cálcio .....	30
<b>3. Uma rede integrada: existe um núcleo comum para a resposta a estresse?</b> .....	<b>31</b>
<b>4. As proteínas RuvBL/Rvb e suas homólogas RVB-1 e RVB-2 de <i>N. crassa</i></b> .....	<b>32</b>
4.1 As proteínas RVBs na resposta a estresse .....	34
<b>OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS</b> .....	<b>37</b>
<b>Capítulo 1. Caracterização Bioquímica e Biofísica do complexo RVB-1/RVB-2</b> .....	<b>38</b>
<b>Biochemical and biophysical characterization of the RVB-1/RVB-2 protein complex, the RuvBL/RVB homologues in <i>Neurospora crassa</i></b> .....	<b>39</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>40</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>41</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>43</b>
2.1. <i>Neurospora crassa</i> strains and growth conditions .....	43
2.2. Subcellular localization of RVB-1 and RVB-2 proteins .....	44
2.3. Recombinant protein production and purification .....	44
2.4. Molecular modeling study .....	46
2.5. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	47
2.6. Analytical size-exclusion chromatography (aSEC) and SEC coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS) .....	47
2.7. ATPase activity quantification .....	48
2.8. Circular dichroism .....	49
2.9. Calorimetric assays .....	49
<b>3. RESULTS</b> .....	<b>50</b>
3.1. The ORFs NCU03482 and NCU06854 encode the <i>Neurospora crassa</i> RVB-1 and RVB-2 proteins, respectively .....	50
3.2. RVB-1 and RVB-2 are essential proteins in <i>N. crassa</i> .....	53

3.3. RVB-1 and RVB-2 are oligomer proteins, interact with each other and the oligomerization states are influenced by nucleotides .....	55
3.4. Molecular modeling suggests an intermonomer cooperativity of RVB-1 and RVB-2 in the presence of nucleotides .....	64
3.5. RVB-1-RVB-2 complex binds dsDNA and exhibits ATPase activity .....	66
3.6. RVB-1 and RVB-2 are nuclear proteins and their NLSs bind to <i>N. crassa</i> Importin $\alpha$ (NclIMP $\alpha$ ). .....	70
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>75</b>
<b>Funding .....</b>	<b>77</b>
<b>Author contributions .....</b>	<b>77</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>77</b>
<b>Conflicts of interest.....</b>	<b>77</b>
<b>Author agreement.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO 2. Estudos do envolvimento do complexo RVB-1/RVB-2 na resposta a estresse em <i>Neurospora crassa</i> .....</b>	<b>84</b>
<b>The <i>Neurospora crassa</i> RVB-1 and RVB-2 proteins are involved in stress response and immunoprecipitation assay reveals new interactors of the <i>Neurospora crassa</i> RVB-1 .....</b>	<b>85</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>86</b>
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>88</b>
<i>Neurospora crassa</i> strains and growth conditions.....	88
Microscopy analyses under stress .....	89
Protein expression analyses and nuclear protein isolation .....	90
Immunoprecipitation assays and mass spectrometry analysis.....	90
Cloning, co-expression and direct interaction of SGO-1 with RVBs.....	91
Stress granules isolation from <i>N. crassa</i> .....	92
Co-immunoprecipitation assay .....	93
Glycogen quantification .....	93
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>96</b>
1. As proteínas RVB-1 e RVB-2 de <i>Neurospora crassa</i> desempenham uma função na resposta ao estresse .....	96
<b>2. A expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2 e a localização celular são influenciadas pelo estresse .....</b>	<b>100</b>
2.1 Análise <i>in silico</i> da região promotora dos genes <i>rvb-1</i> e <i>rvb-2</i> .....	100
2.2 Expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2 em diferentes condições de estresse.....	101
2.3 Localização subcelular das proteínas RVB-1/RVB-2-GFP por microscopia confocal e análise dos extratos nucleares submetidos a estresse térmico e osmótico .....	103

<b>3. Experimentos de imunoprecipitação revelaram prováveis alvos de interação com a proteína RVB-1 durante estresse térmico e osmótico .....</b>	<b>107</b>
3.1 Proteínas identificadas após estresse térmico.....	110
3.2 Proteínas identificadas após estresse osmótico .....	111
<b>4. Componentes de complexos de remodelagem a cromatina podem estar envolvidos com a resposta a estresse em <i>N. crassa</i> .....</b>	<b>111</b>
4.1. Caracterização das linhagens mutantes homocárias $\Delta arp-6$ e $\Delta arp-8$ .....	111
4.2. Caracterização das linhagens mutantes heterocárias $\Delta arp-4$ , $\Delta arp-5$ e $\Delta crc-1$ ( <i>swc-4</i> ) .....	115
<b>5. A proteína shugoshin é uma proteína nuclear, exerce uma função na resposta a estresse em <i>N. crassa</i> e interage diretamente com RVB-1 <i>in vitro</i>.....</b>	<b>117</b>
5.1. A ORF NCU01842 de <i>N. crassa</i> codifica para uma proteína shugoshin .....	117
5.2. Análise fenotípica da linhagem mutante $\Delta sgo-1$ e sensibilidade a diferentes estresses .....	119
5.3. A localização nuclear da proteína SGO-1-GFP é influenciada por estresse térmico e osmótico .....	121
5.4 A proteína SGO-1 interage <i>in vitro</i> com a proteína RVB-1.....	123
<b>6. As proteínas RVB-1 e RVB-2 são componentes de grânulos de estresse em <i>N. crassa</i> .....</b>	<b>127</b>
<b>7. A proteína RVB-1 interage com glicogenina (GNN) durante estresse e o complexo RVB-1/RVB-2 pode exercer uma função no metabolismo de glicogênio.....</b>	<b>129</b>
<b>8. A ausência de proteínas componentes do complexo R2TP/PAQossomo sugere diferenças na interação entre a proteína RVB-1 e HSP90-1 em <i>N. crassa</i>.....</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>137</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>148</b>
<b>CAPÍTULO 3. Estudo do envolvimento da ciclina multifuncional PCL-1 na resposta a estresse em <i>Neurospora crassa</i>.....</b>	<b>161</b>
<b>The <i>Neurospora crassa</i> PCL-1 protein is a cyclin with multifunctional activities and together with PHO85-1 (PGOV) protein kinase directs the complex to glycogen metabolism .....</b>	<b>162</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>163</b>
<b>IMPORTANCE .....</b>	<b>164</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>165</b>
<b>RESULTS .....</b>	<b>168</b>
Molecular cloning of the <i>Neurospora crassa</i> <i>pcl-1</i> and molecular modeling of the PCL-1.....	168
PCL-1 controls glycogen levels by affecting the glycogen synthase phosphorylation status. ....	170
PCL-1 together with the PHO85-1 protein kinase phosphorylates <i>in vitro</i> GSN.....	172
PCL-1 influences the germination rate and cell cycle progression and localizes in different cellular compartments.....	177
PCL-1 plays a role in the regulation of calcium metabolism and influences the expression and localization of the CRZ-1 transcription factor. ....	180
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>188</b>

<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>193</b>
Neurospora crassa strains and culture conditions.....	193
Construction of the $\Delta$ pcl-1 pcl-1+ complemented strain.....	193
Germination and cell cycle progression assays.....	194
Quantification of glycogen and glycogen synthase activity. ....	195
GSN phosphorylation analysis by 2-DE. ....	195
Production and purification of recombinant proteins.....	196
In vitro phosphorylation assay.....	197
Construction of V5- and GFP-tagged proteins. ....	197
Gene and protein expression. ....	198
Cellular localization. ....	199
Molecular modeling study of PCL-1 and PHO85-1.....	199
<b>ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>201</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>202</b>
<b>REFERÊNCIAS FINAIS.....</b>	<b>211</b>

## INTRODUÇÃO

### 1. O fungo filamentosso *Neurospora crassa* como um modelo

Os fungos filamentosos são eucariotos multicelulares com uma grande contribuição para o entendimento dos processos genéticos, bioquímicos e moleculares em organismos eucariotos. Dentre os fungos filamentosos, *Neurospora crassa* se destaca como um excelente organismo modelo, não só pela sua facilidade de manipulação e desenvolvimento, como também pelos seus aspectos genéticos e sistemas bioquímicos bem estabelecidos [1]. É um fungo filamentosso com hifas tubulares ramificadas e septadas que permitem a passagem de organelas e núcleos entre os septos. Esta passagem permite a formação de heterocários, nos quais múltiplos genomas contribuem para o metabolismo de um único micélio.

É um organismo saprófito e não patogênico que apresenta ambos os ciclos sexuado e assexuado, com coloração laranja devido a produção de carotenoides e está amplamente distribuído na natureza, crescendo principalmente em cascas de árvores, madeira em podridão, bagaço de cana de açúcar e também é comum nas casas das pessoas, principalmente em pães velhos (Figura 1). Em laboratório seu cultivo é realizado em meio de cultura quimicamente definido [2], no qual os únicos constituintes orgânicos obrigatórios são uma fonte de carbono e a vitamina biotina que desempenha um papel importante para o crescimento do fungo, cuja colônia madura apresenta aspecto cotonoso e alaranjado, com hifas contendo os conídios (Figura 2).

*N. crassa* é também um fungo que responde a uma variedade de mudanças ambientais. Os fatores mais proeminentes são a luz e a temperatura, os quais afetam o seu sistema circadiano. A luz é conhecida por afetar a expressão de genes que influenciam os eventos como carotenogênese e conidiação. O efeito da luz deriva de seu papel central no relógio circadiano e mesmo a ausência de luz pode influenciar na expressão de grande parte do genoma [3]. Além disso, *N. crassa* apresenta uma classe de proteínas de choque térmico conservadas, as quais funcionam como chaperonas que orientam e estabilizam a conformação de outras proteínas, tornando este organismo um bom modelo de estudo em estresse térmico [3];

**Figura 1** - O fungo *Neurospora crassa* encontrado na natureza.

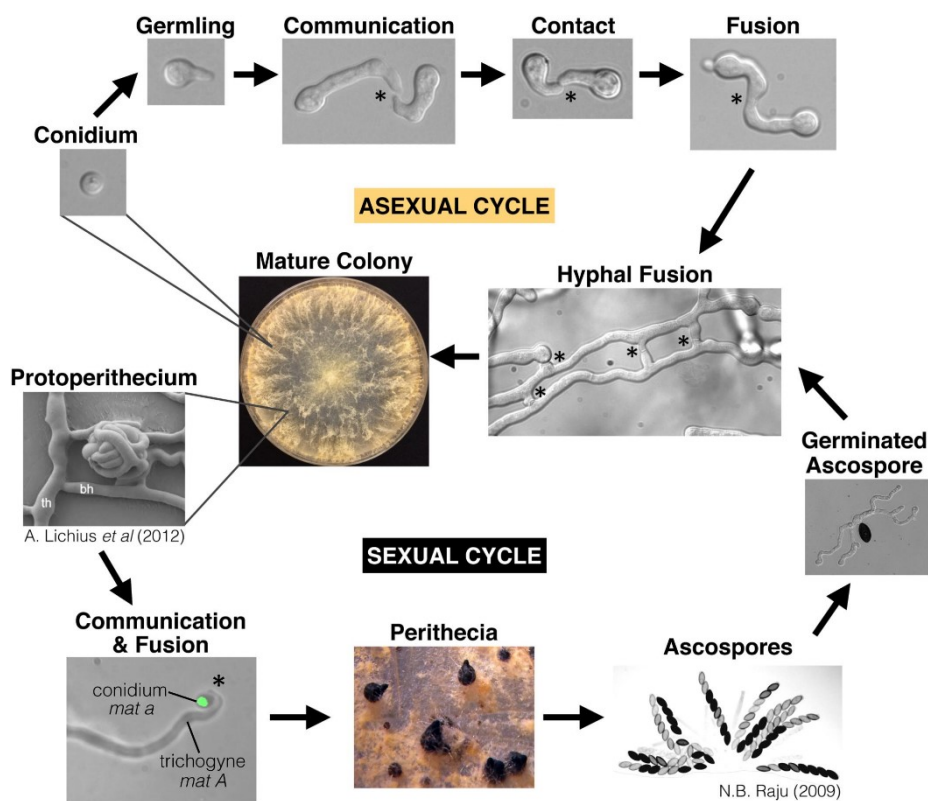


**Fonte:** Adaptado de <https://www.fgsc.net/Neurospora/sectionB4.htm>

O ciclo de vida de *N. crassa* (Figura 2) compreende duas fases, uma fase vegetativa em que aparecem as estruturas denominadas conídios que são destinados à propagação do fungo e a fase sexual, na qual se observa a presença dos corpos de frutificação [4]. Os conídios podem ser produzidos por duas vias distintas a macroconidiação e a microconidiação. A macroconidiação é controlada pelo relógio circadiano e promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos, as quais se encontram localizadas nas extremidades das hifas aéreas que permitem a formação de cadeias de macroconídios multinucleados. Na microconidiação, os esporos mononucleados são formados dentro das hifas basais e expelidos a partir da parede quando o processo de maturação se completa [5].

Sendo um fungo heterotálico, *N. crassa* possui dois tipos de compatibilidade sexual, *mating type* A e a. Não é observado nenhuma diferença morfológica em linhagens de *mating type* diferentes e ambas podem se comportar como “macho” (doador de núcleos) ou “fêmea” (receptora de núcleos) [4]. A fase sexual acontece quando dois micélios de compatibilidade opostas crescem juntos (A e a) sob condições limitantes de nitrogênio. Em resposta à privação deste nutriente, são originadas estruturas sexuais (protoperitécios) que vão abrigar as hifas recém-formadas originando o peritécio. Os núcleos de *mating type* opostos localizados nas extremidades das hifas entram em divisão, há formação de septos na hifa dando origem a uma célula central contendo os dois núcleos de tipos opostos denominada asco inicial.

**Figura 2** – Ciclo de vida do fungo *Neurospora crassa*. Os asteriscos representam os pontos de fusão entre duas hifas que são regulados pela compatibilidade entre as linhagens (mesmo *mating type* e origem parental) que se fundem dando origem ao micélio (ciclo assexuado). Caso sejam de *mating type* diferentes, elas iniciam o processo sexual.



Fonte: [6]

Após fusão das hifas, os núcleos se fundem (cariogamia) e ocorre meiose, originando quatro núcleos haploides. Estes núcleos sofrem mitose, originando oito núcleos dentro do asco maduro, sendo quatro núcleos de cada tipo de acasalamento (**A** e **a**). Esses núcleos originarão esporos (ascósporos) que sob eventuais circunstâncias formarão um novo micélio [4]

O genoma do *N. crassa* está organizado em sete cromossomos que variam entre 4 a 10 Mb de tamanho [3], o qual foi sequenciado por [7], revelando ser constituído por aproximadamente 40 Mb, maior quando comparado a outros organismos modelos clássicos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Uma grande quantidade de seus genes não possui ortólogos em *S. cerevisiae*, o que sugere uma relação mais estreita entre fungos

filamentosos e eucariotos superiores, se comparado com leveduras e outros eucariotos inferiores [8].

A presença de um grande número de genes no genoma de *N. crassa* ainda com funções desconhecidas aponta este organismo como um promissor modelo para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos não identificados até o momento [8]. O grande número de genomas de fungos filamentosos finalizados vem permitindo o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos nos diferentes processos celulares nestes organismos e informações importantes vêm sendo descritas na literatura científica. O sequenciamento do genoma aliado aos avanços das metodologias para a inativação de genes específicos [9,10] permitiram que análises de genômica funcional neste fungo fossem iniciadas.

Em nosso laboratório, *N. crassa* vem sendo utilizado como um organismo modelo para o estudo de mecanismos celulares básicos, tal como a regulação do metabolismo dos carboidratos de reserva (glicogênio e trealose), resposta a estresse, processos celulares conectados ao relógio circadiano e desenvolvimento celular. Alguns fatores de transcrição e proteínas quinases foram identificados como reguladores do metabolismo de carboidratos em *N. crassa* [11,12] e os resultados obtidos vem permitindo que análises comparativas do papel funcional destas proteínas entre diferentes microrganismos sejam realizadas [13–19] e outros. Um dos focos principais do presente estudo é a função de proteínas de *N. crassa* na resposta a estresse e, por este motivo, os principais mecanismos celulares envolvidos nesta resposta serão descritos a seguir.

## **2. Mecanismos moleculares envolvidos na resposta a estresse**

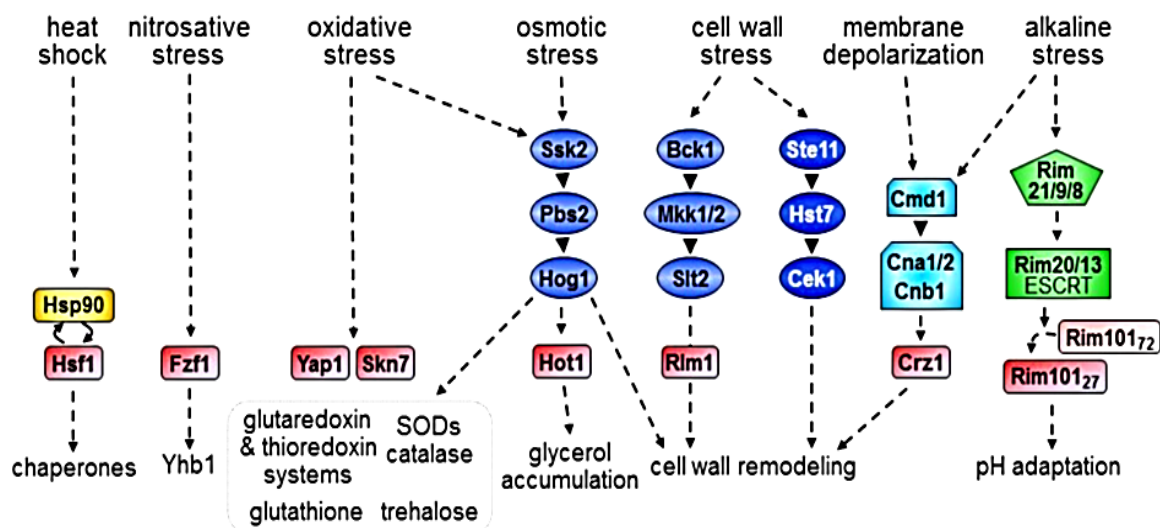
A resposta a estresse é um mecanismo celular que envolve um grande conjunto de mudanças moleculares resultantes de alterações ambientais, como o aumento ou diminuição repentino na temperatura fisiológica, exposição à radiação ultravioleta, diferenças de pH, osmolaridade, exposição a quantidades excessivas de sais e outros fatores. Mamíferos também sofrem de estresse causado pela pressão física, mental e emocional, o que leva ao aumento da pressão arterial, frequência cardíaca, alteração nos níveis de açúcar no sangue e o estresse prolongado pode dar origem a câncer [20]. Esta complexidade de fatores que influenciam as células de mamíferos gera mecanismos moleculares complexos e difíceis de serem individualmente interpretados. Neste sentido, a utilização de microrganismos, como

os fungos, é promissora na dissecação das vias de resposta a estresse e vem revelando mecanismos moleculares conservados até mamíferos [20,21].

Uma resposta celular rápida é crucial na defesa celular contra o estresse, a depender do tipo e da intensidade aplicada e o fato de a sobrevivência celular depender criticamente da capacidade de responder ao estresse por meio de estímulos bioquímicos pode explicar por que essa reação é altamente conservada na evolução. Em vias de regra, a capacidade adaptativa da célula determina seu destino: sobrevivência ou morte. [20–22]. Os mecanismos nos quais as células sentem e respondem a estresse segue uma cascata de sinalização semelhante para os diversos tipos de estresse, embora possam divergir no número de proteínas envolvidas e na complexidade de interações proteicas [20]. De uma maneira geral, estes processos iniciam por sensores de membrana que sentem o agente de estresse e ativam uma cascata de fosforilação celular causada por proteínas quinases, que fosforilam diferentes substratos e promovem a ativação gênica e consequente síntese de proteínas que atuam contra o estresse.

Uma das cascatas mais bem estudadas são as proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs), membros da família de proteínas ativadas por mitógenos (MAP), sendo importantes moléculas sinalizadoras de estresse em todas as células eucarióticas. No geral, as vias MAP SAPKs compreendem três camadas de proteínas quinases: a própria MAP SAPK (MAPK), uma MAP quinase (MAPKK) e uma quinase MAPKK (MAPKKK). MAPKKK fosforila e ativa MAPKK, que posteriormente fosforila SAPK, o que resulta em uma ativação de sua atividade quinase resultando na fosforilação de diversos substratos, incluindo fatores de transcrição, quinases, reguladores do ciclo celular e proteínas de membrana. Esta rede integrada, resulta na ativação de diferentes vias de maneira estresse-dependente, agindo na resposta ao aumento da temperatura, estresse causado por espécies reativas de nitrogênio ou oxigênio, mudanças na osmorregulação celular, perturbação na parede celular, depolarização da membrana (principalmente causada por cálcio ou outros íons) e mudanças do pH. Estes processos estão exemplificados na figura 3 [20].

**Figura 3.** As vias de estresse em *S. cerevisiae*. Os componentes de sinalização MAPK são destacados em azul, fatores de transcrição em vermelho, componentes da via calmodulina-calcineurina em ciano, componentes da via de resposta ao pH em verde e a chaperona molecular Hsp90 em amarelo. A via de *C. albicans* MAPK Cek1, que contribui para a remodelagem da parede celular neste fungo está incluído (círculos ovais azuis escuros com letras brancas).



Fonte: [20]

## 2.1. Resposta a choque térmico

Um dos mais bem caracterizados mecanismos de resposta a estresse foi descrito como a resposta bioquímica ao aumento da temperatura acima do normal em células de *Drosófila*: a resposta ao choque térmico [23]. Esta resposta leva à ativação de uma variedade de genes por fatores de transcrição importantes para resposta a estresse. Em *S. cerevisiae* e *Candida albicans*, o choque térmico é responsável pela indução de cerca de 10-20% dos genes no genoma destes organismos [24,25]), sendo grande partes deles ativados pelos fatores de transcrição de choque térmico (HSFs) [20]. Estes fatores estão amplamente distribuídos entre os seres vivos e variam em quantidade de maneira espécie específica, sendo HSF-1 o mais bem caracterizado entre os membros da família HSFs.

Em humanos, por exemplo, existem seis membros conhecidos desta família de fatores de transcrição, sendo HSF-1 não essencial para a viabilidade das células ([26,27]). Ao contrário, leveduras possuem apenas um Hsf que é essencial para a sobrevivência da célula porque garante a expressão basal de chaperonas soli. Em

fungos filamentosos, como *N. crassa* e *A. fumigatus*, estão bem caracterizados pelo menos dois fatores de choque térmico: HSF-1/HsfA que também é um fator de transcrição essencial envolvido na resposta a estresse, enquanto HSF-2/HsfB está relacionado ao desenvolvimento assexuado. Outro gene codifica para uma proteína com domínio HSF e está relacionado à resposta a estresse oxidativo em *Neurospora*, sugerindo uma relação mais estreita entre o fungo filamentoso e organismos superiores [28]. Hsf1/A também desempenha um papel crucial na virulência de fungos patogênicos como *C. albicans* e *A. fumigatus*, principalmente ativando genes envolvidos na termotolerância frente à resposta do hospedeiro [29,30].

Em *S. cerevisiae*, Hsf1 é mantido inativo em sua forma monomérica no citoplasma por meio da interação com Hsp90 (*Heat shock protein 90*) e co-chaperonas. Se a célula é exposta a condições estressantes, há acúmulo de proteínas desenoveladas que competem com Hsf1 pela ligação de Hsp90. Assim, o Hsf1 é liberado do complexo transitando de monômero para trímero, o qual é fosforilado via cascata MAPK [26,31,32] e é transportado para o núcleo, ligando às sequências *upstream* regulatórias chamadas elementos de choque térmico (HSE, GAAnnTTCnnGAA, na qual n é qualquer nucleotídeo. [33–35]) nos promotores dos genes responsivos a estresse térmico [21,26] (Figura 3).

Vale ressaltar que além dos HSFs são conhecidos uma série de fatores de transcrição que auxiliam no processo adaptativo frente a uma variedade de estresses em fungos, como os fatores de transcrição Msn2/4p em leveduras [36] e o fator de transcrição SEB-1/SebA em fungos filamentosos como *N. crassa* [16], *A. fumigatus* [37] e *Trichoderma atroviride* [38], os quais são translocados para o núcleo durante diferentes tipos de estresse e ligam a regiões conhecidas como STRE (*Stress Response Element*, CCCCT, [39], agindo como transativadores de genes envolvidos na expressão de proteínas de choque térmico e outras vias metabólicas como manutenção da estrutura celular, termotolerância e virulência em *A. fumigatus* [37] e acúmulo de glicogênio e trealose em *N. crassa* [16].

### 2.1.1. Proteínas de choque térmico (HSP)

As HSP ou chaperonas moleculares são um conjunto de proteínas conservadas evolutivamente que são agrupadas em subfamílias com pesos moleculares que variam de aproximadamente 15 a 100 kDa. Por definição, uma

chaperona molecular é uma proteína que interage com outra proteína, estabilizando-a e ajudando-a a atingir seu estado conformacional, mas sem fazer parte de sua estrutura final [40]. Frequentemente atribui-se o termo HSP por ter sido descobertas no contexto do choque térmico e por apresentarem expressão aumentada sob estresse celular, uma condição na qual há aumento de proteínas desenoveladas e/ou propensas à agregação. [41]. Porém, algumas delas são expressas constitutivamente e agem intracelularmente prevenindo o enovelamento prematuro de polipeptídios nascentes e na montagem de grandes complexos proteicos. Outras, geralmente são expressas em níveis basais baixos e aumentam em resposta a estresses ambientais e fisiológicos e, portanto, são denominadas HSP induzíveis e fazem parte da resposta ao choque térmico [41].

As chaperonas moleculares são divididas em seis famílias principais, de acordo com suas massas moleculares: HSP90, HSP70, HSP40, HSP60, HSP100 e sHSPs (HSP pequenas). As famílias HSP90, HSP70 e HSP60 são ativamente envolvidas nos processos de enovelamento e renovelamento proteico, ligam-se a resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos por proteínas em conformação não nativa e promovem o enovelamento proteico através de ciclos de ligação e hidrólise de ATP. Estas chaperonas dependentes de ATP trabalham em cooperação com outras que funcionam independentemente de ATP, como aquelas das famílias HSP40 e sHSP que atuam ancorando a proteína cliente não enovelada na prevenção de agregação. Além disso, muitas outras proteínas auxiliares possuem um papel regulatório sobre as funções das chaperonas sendo denominadas co-chaperonas [42].

Em fungos, a expressão de HSPs é induzida por dois mecanismos: mecanismo específico e mecanismo geral. O primeiro é induzido por choque térmico e o segundo por outros estresses como pH, estresse oxidativo, estresse osmótico, privação de nutrientes ou antifúngicos [41]. As HSPs estão diretamente envolvidas na biologia fúngica, desempenhando papéis no desenvolvimento sexuado e assexuado, bem como na resposta a diferentes estresses. Estudos mostraram que as HSPs predominantes do reino fúngico são as HSP90, HSP70 e HSP20-40, as quais desempenham um papel crucial nas mudanças morfogênicas, nos processos de replicação, transcrição, pós-transcrição, tradução, pós-tradução, ativação de vias de sinalização, adaptação ao estresse e resistência antifúngica e muitas dessas

funções são auxiliadas e reguladas por processos celulares, tal como modificações pós-traducionais e por co-chaperonas [41].

A família de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70s) desempenham um papel central no controle de qualidade proteico [43]. As proteínas dessa família são monoméricas, ubíquas e ATP-dependentes, e embora essas proteínas apresentem em estrutura alto grau de conservação entre as espécies, elas diferem entre si em quantidade, nível de expressão, localização subcelular e possuem características funcionais particulares de maneira espécie específica [44].

As HSP90 são proteínas essenciais e abundantes perfazendo de 1-3% do proteoma solúvel nas células em condições normais, além de serem altamente conservadas, com similaridade da estrutura primária de mais de 50% entre proteínas ortólogas de *E. coli* e *Homo sapiens*. Dentre as proteínas clientes assistidas por HSP90 encontram-se proteínas quinase, fatores de transcrição, ubiquitina E3 ligases, entre outras [45]. É bem estabelecido que a HSP90 é importante no controle da qualidade celular afetando vias de transdução de sinal, transporte intracelular, degradação de proteínas, estabilidade genômica e processamento de mRNA [46].

A HSP90 interage em estados tardios de enovelamento de uma proteína cliente quando encontra-se parcialmente enovelada, favorecendo seu enovelamento final e interação com outras proteínas, tudo isso à custa de ATP. O envolvimento em processos celulares centrais faz com que esta chaperona esteja diretamente envolvida na progressão de patologias, como o câncer, desempenhando um papel importante em doenças degenerativas como Parkinson, Huntington, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica, bem como também estão associadas à ansiedade, depressão e esquizofrenia [47].

## **2.2. Resposta a estresse osmótico**

Gerenciar mudanças no balanço hídrico representa outro desafio fundamental para a célula, especialmente os microrganismos, que estão diretamente expostos ao meio ambiente. Fungos são modelos muito utilizados em laboratório para estudar esta resposta, principalmente pela imposição de choque hiperosmótico através da adição de sorbitol ou sais como NaCl [48]. Isso resulta em uma perda repentina na pressão de turgescência intracelular que é necessária para o crescimento e por isso ocorre o acúmulo de glicerol para restaurar essa turgescência [20]. Este mecanismo está muito bem caracterizado em leveduras como *S. cerevisiae* [49–51]

A resposta osmótica em levedura se inicia via ativação de SAPKs, chamada de via HOG (*High Osmolarity Glicerol*). Esta via inicia pela MAPKK Pbs2, cuja atividade é controlada por dois osmossensores de membrana Sho1 e Sln1. Sho1 é um osmossensor que regula diretamente o complexo MAP quinase Pbs2-Hog1, enquanto Sln1 controla um sistema de transferência de grupos fosfatos e regula negativamente Hog1 na ausência de estresse osmótico. Em resposta ao estímulo, Pbs2 é fosforilado, levando à ativação de três MAPKKs (Ste11p, Ssk2p e Ssk22p) o que promove o acúmulo nuclear de Hog1 e indução de mecanismos protetores como o acúmulo de glicerol (Figura 3). Esta MAPK regula o acúmulo de glicerol aumentando o fluxo da glicólise para o glicerol por meio da indução dos genes que codificam a glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD1) e glicerol-3-fosfato fosfatase (GPP1) em resposta ao estresse osmótico, por meio da ativação dos fatores de transcrição Hot1, Msn2 e Msn4 controlando a atividade da aquagliceroporina Fps1 [52,53].

Em *N. crassa*, a via de transdução de sinal de resposta osmótica pode ser semelhante à de levedura, uma vez que o gene *os-2* codifica uma MAP quinase homóloga a *HOG1* e *os-1* codifica uma histidina quinase semelhante a *SLN1* [54]. Além disso, o gene *os-5* codifica uma MAPKK homóloga a de *S. cerevisiae* PBS2. No entanto, a deleção de *SLN1* é letal em levedura [55] enquanto que em *N. crassa* os mutantes *os-1* são viáveis [54]. Esses resultados indicam que existem diferenças entre as vias de osmorregulação de *N. crassa* e *S. cerevisiae* e embora muitos dos componentes possam ser conservados, outras proteínas podem exercer papéis importantes neste processo [56]. Além disso, está amplamente relatado que a proteína HOG-1 de *N. crassa* não desempenha papéis importantes apenas na resposta ao estresse osmótico, mas no relógio ricardiano do fungo [57] e ainda, responde ao choque térmico regulando genes para chaperonas moleculares [54]. Isso mostra que as vias de regulação de estresse osmótico e térmico estão relacionadas, agindo juntas contra os danos causados pelo estresse.

### **2.3. Resposta a estresse de pH**

A resposta causada pela mudança de pH no cultivo talvez seja o mecanismo mais bem estudado em fungos filamentosos. O pH alcalino impõe vários estresses ao microrganismo relacionados à aquisição de nutrientes, uma vez que, em pH extracelular elevado, o estabelecimento de gradiente através da membrana

plasmática para transporte de nutrientes e síntese de ATP é mais difícil e a solubilidade e disponibilidade biológica de elementos essenciais são drasticamente reduzidos [58]. Um aspecto importante dos fungos é a sua capacidade de regular a expressão gênica em resposta ao pH ambiental, o que permite a síntese de proteínas que são secretadas, regulando por exemplo, a produção de metabólitos secundários e a patogenicidade em hospedeiros vegetais ou animais. O pH ambiental também tem efeitos profundos sobre desenvolvimento como, por exemplo, em *C. albicans* uma mudança de pH ácido a alcalino ou neutro promove a transição da forma leveduriforme para crescimento filamentosos [59,60].

Uma das vias mais bem estudadas em resposta ao pH alcalino é a via Pal/Rim em fungos filamentosos e leveduras, respectivamente (Figura 3). Em *A. nidulans*, a via Pal envolve os componentes PalH, Pall, PalF, PalC, PalA e PalB e a ativação por pH alcalino inicia-se pela clivagem proteolítica C-terminal do fator de transcrição PacC [61]. Este fator de transcrição medeia a adaptação celular ao pH alcalino neutro ativando genes que são preferencialmente expressos em pH alcalino e reprimindo aqueles preferencialmente expressos em pH ácido [61]. PacC é ativado por duas etapas sucessivas de clivagem proteolítica C-terminal, sendo a primeira dependente de pH e ativada pelos produtos de seis genes pal, enquanto a segunda é mediada pelo proteassoma e independente de pH [62]. A proteólise leva à proteína ativa PacC<sup>27</sup> que contém um domínio de ligação ao DNA formado por três C2H2 zinc-finger capazes de se ligar *motif* 5'-GCCARG-3' presente nos promotores de genes regulados por pH [63,64]

Embora os principais componentes da via de sinalização de pH sejam conservados entre diferentes organismos existem diferenças entre as vias Pal/Rim quanto ao processamento do fator de transcrição e os meios nos quais as vias são ativadas. Por exemplo, em *A. nidulans* PacC sofre duas proteólises dando origem a três formas, na qual uma é translocada para o núcleo e ativa genes de resposta ao pH alcalino e reprime genes de pH ácido [61]. Em *S. cerevisiae* Rim101 sofre uma proteólise, dando origem a duas formas, na qual uma age como um repressor da transcrição frente as mudanças de pH [65]; e em *C. albicans* Rim101 é processado de maneira pH específica (tanto ácido como alcalino) e regula a expressão genica em ambas condições [60]. Em *N. crassa*, a via PAL/PAC3 é uma cascata de sinalização semelhante com *A. nidulans*, porém a proteína sofre apenas uma proteólise, dando origem a duas formas da proteína, na qual a menor é translocada

para o núcleo em resposta ao pH alcalino, ativando genes de resposta ao pH alcalino e reprimindo componentes da via PAL [13,14,66]. Este fator de transcrição também regula fortemente genes envolvidos em metabolismo de glicogênio, trealose e expressão da tirosinase [66], bem como uma análise do transcriptoma do mutante  $\Delta pac-3$  revelou sua importância para o metabolismo e desenvolvimento em fungos patogênicos [67,68].

#### **2.4. Resposta a estresse oxidativo**

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são altamente prejudiciais para a célula e suas formas incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ), os quais são gerados naturalmente durante os processos aeróbicos na mitocôndria, mas também podem ser gerados no ambiente após exposição à luz UV, a diferentes drogas, bem como quando fungos patogênicos são expostos aos subprodutos da respiração aeróbica de seus hospedeiros. Essas moléculas reativas danificam proteínas, DNA e lipídios e podem desencadear vias de morte celular [20,69].

Este estresse ocorre quando os níveis de ROS excedem a capacidade antioxidante natural da célula que trabalha para manter o ambiente REDOX controlado. Uma resposta bem caracterizada é a indução rápida da transcrição de genes codificadores para proteínas antioxidantes que agem na desintoxicação e reparação celular, as quais incluem a catalase (*CAT1*), glutathione peroxidase (*GPX*) e superóxido dismutase (*SOD*), além de glutathione/glutaredoxina (*GSH1*, *TTR1*) e tioredoxina (*TSA1*, *TRX1*, *TRR1*) (Figura 3). Uma resposta adicional e muito rápida ao estresse oxidativo é o redirecionamento dinâmico do fluxo metabólico da glicólise para a via das pentoses fosfato. Esta mudança metabólica é desencadeada pela oxidação e ativação da enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GA3PDH*), que promove a geração de energia redutora na forma de NADPH, ajudando na manutenção do ambiente REDOX [20,70],

Entre os fatores de transcrição mais bem estudados em *S. cerevisiae*, encontra-se Yap1 e Skn7. Yap1 possui um domínio rico em aminoácidos cisteínas, os quais são rapidamente oxidados após exposição ao peróxido de hidrogênio o que desencadeia uma mudança conformacional que expõe seu sinal de localização nuclear (NLS) e promove seu direcionamento para o núcleo, levando à ativação dos genes de resposta a estresse. Em *S. cerevisiae*, Yap1 colabora com Skn7 para

regular genes de resposta ao estresse oxidativo e achados semelhantes foram relatados em *Candida glabrata* [71] e *S. pombe* [72]. Pouco é conhecido sobre a ativação de Skn7 após estresse, mas em *C. glabrata* Yap1 e Skn7 ligam cooperativamente na região promotora dos genes centrais do estresse oxidativo [71]. Outros fatores de transcrição também desempenham papéis na expressão gênica mediada por estresse oxidativo e incluem Atf1 em *Cryptococcus neoformans* [73], MoAP1 em *Magnaporthe oryzae* [74], AtfA em *A. nidulans* e *A. fumigatus* [75,76], Msn2p/4p em *S. cerevisiae* [77] e SEB-1 em *Neurospora crassa* [16].

## 2.5. Estresse de parede celular

A arquitetura da parede celular fúngica envolve uma complexa rede de polissacarídeos e glicoproteínas com composição que varia entre as espécies. Geralmente é composta por uma matriz de quitina formada por  $\beta$ -1,3-glicana e  $\beta$ -1,6-glicana, que constituem a camada interna da parede, misturadas com outros açúcares, como mananas, glicanas e glicoproteínas na camada mais externa [20]. A parede celular fornece proteção contra mudanças ambientais e em fungos patogênicos ativam uma variedade molecular diversa no reconhecimento imunológico do hospedeiro e na resistência antifúngica. Com isso, a perturbação da arquitetura da parede, pode potencializar as respostas imunes e induzir um estresse letal na parede celular do fungo. Entre o grupo de moléculas capazes de inibir a biossíntese da parede celular encontram as equinocandinas, as quais são moléculas naturais cujos derivados sintéticos são utilizados como primeira linha de tratamento contra fungos patogênicos como *C. albicans* e *A. fumigatus* [20].

Os fungos desenvolveram circuitos celulares complexos para sentir e responder ao estresse da parede celular. Embora também variem entre as espécies, a arquitetura central é amplamente conservada. O estresse da parede celular é tipicamente detectado na membrana plasmática através de sensores de superfície celular, que incluem Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 e Mtl1 em *S. cerevisiae* [78]. Este estímulo provoca a troca de nucleotídeos na proteína G pequena Rho1, que orchestra a sinalização de integridade da parede celular [79]. Como consequência, ocorre a síntese de  $\beta$ -glucanos, controle transcricional de genes da parede celular, polarização do citoesqueleto de actina e direcionamento de vesículas secretoras. O caminho mais bem estabelecido através do qual os sinais de integridade da parede celular são transduzidos de Rho1 é a cascata MAPK que inclui Pkc1, Bck1, Mkk1/2 e

Mpk1/Slit2 em *S. cerevisiae* [80]. Esta cascata leva à fosforilação e ativação do fator de transcrição Rlm1, o qual é translocado para o núcleo e ativa genes para síntese de componentes importantes para a remodelagem da parede frente a uma perturbação (Figura 3).

Embora esta cascata forneça um poderoso mecanismo para amplificar os sinais da superfície celular e coordenam respostas que dão robustez adicional à parede, esta fisiologia só é alcançada por complexas redes de interação genética. Essas redes podem permitir respostas compensatórias à parede celular frente a perturbações, por exemplo, a ativação da síntese de quitina suprime a atividade antifúngica das equinocandinas [81], as quais inibem a biossíntese de  $\beta$ -1,3-glucano. Por isso, hubs de sinalização celular muito organizados são cruciais para esta orquestra envolvendo a remodelagem da parede em fungos, necessitando da ajuda de chaperonas. A Hsp90, por exemplo, modula a estabilidade e função de diversos reguladores da sinalização celular, permitindo repostas à uma variedade de estresses, incluindo o de parede celular [82,83]. A fosfatase calcineurina e a quinase Hog1, também regulam coordenadamente a síntese de quitina em resposta ao estresse induzido na parede ou na membrana celular.

## 2.6. Estresse salino causado pelo cálcio

O cálcio é um íon essencial para organismos vivos, pois ele é responsável pela ativação de diversas proteínas de sinalização celular, podendo ser armazenado em organelas ou captados pela membrana plasmática, agindo em múltiplos eventos celulares. Neste sentido, quando exposta a altas concentrações de cálcio, a célula precisou desenvolver mecanismos que permitissem que cascatas de sinalização fossem ativadas levando à síntese de transportadores de cálcio [20]. Estas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases mantêm a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre citosólico em um nível basal baixo e fornece  $\text{Ca}^{2+}$  às organelas para aliviar a tensão intracelular e promover a homeostase. Um mecanismo bem conhecido é a ativação de fatores de transcrição do tipo *Calcineurin-Responsive-Zinc-fingers* (CRZ), que no reino fúngico é o principal regulador na resposta ao estresse de cálcio [84–86]. CrzA é descrito como uma proteína altamente fosforilada em *A. fumigatus* (Kayingo et al. 2009), e várias proteínas quinases foram identificadas na fosforilação de Crz1 em *S. cerevisiae*, como o complexo quinase/ciclina Pho85/Pho80 [87]. Sob estresse de cálcio, a

calcineurina desfosforila Crz1 levando-a para o núcleo, o que desencadeia a expressão de genes responsáveis ao cálcio (Figura 3).

### **3. Uma rede integrada: existe um núcleo comum para a resposta a estresse?**

Esta talvez seja uma questão central em estudiosos da resposta ao estresse: existe um núcleo que une todas as respostas? O que temos são várias evidências, algumas delas já descritas acima, nas quais diferentes estímulos de estresse ativam, em parte, vias de sinalização iguais. Estudos de perfil transcricional do genoma de *S. cerevisiae*, revelaram a existência de núcleos de resposta ao estresse ou CSRs (*Core Stress Response*) [24]. Os mesmos núcleos também foram descritos em *S. pombe* [72] e em fungos patogênicos, tais como *C. glabrata* [88] e *C. albicans* [89]. Formalmente, o CSR apresenta um conjunto de genes que são comumente regulados em resposta a diversos tipos de estresse, atuando conjuntamente nestas respostas. Estes conjuntos de genes, os quais representam cerca de 14% do genoma de *S. cerevisiae*, envolvem principalmente os componentes das vias de estresse osmótico, oxidativo, danos de DNA e choque térmico [20,72]. Por exemplo, a via HOG aparenta exercer múltiplas funções na ativação de genes de resposta ao estresse osmótico, térmico, oxidativo, de parede celular e pH [90].

Recentemente, em células humanas, [91] identificaram um regulador central da resposta ao estresse chamado C16orf72/HAPSTR1, um gene conservado evolutivamente e envolvido na regulação de múltiplas vias de estresse. Este gene codifica duas isoformas proteicas abundantes que se oligomerizam e ligam a proteínas ubiquitina ligases controlando a sinalização celular e diversos genes de resposta a estresse. Estas proteínas agem em hubs celulares interagindo com outras proteínas importantes como quinases, chaperonas e fatores de transcrição, evidenciados por ensaios de imunoprecipitação [91]. Um complexo de proteínas identificadas como interagindo com HAPSTR1 durante estresse em células humanas são as AAA+ ATPases RuvBL1/ RuvBL2, as quais interagem geneticamente (seus genes são regulados por HAPSTR1) bem como interagem fisicamente (foram imunoprecipitadas juntas com HAPSTAR1).

Neste contexto, as AAA+ ATPases RuvBL1 e RuvBL2, as quais formam um complexo proteico envolvido em múltiplas funções celulares, podem exercer papéis cruciais na célula, inclusive ajudando a manter o núcleo da resposta ao estresse via

suas múltiplas funções e interações. Este complexo foi alvo de estudo deste trabalho no contexto de estresse em *N. crassa* e mais detalhes sobre estas proteínas serão descritas a seguir.

#### 4. As proteínas RuvBL/Rvb e suas homólogas RVB-1 e RVB-2 de *N. crassa*

Um dos principais objetivos do nosso grupo é o estudo dos mecanismos moleculares associados à resposta a estresse em *N. crassa*, sendo uma delas o estresse térmico. Estudos previamente realizados identificaram a proteína RVB-1 (produto da ORF NCU03482) em extratos nucleares do fungo submetidos a choque térmico, possivelmente ligando à região promotora do gene que codifica a enzima glicogênio sintase, regulatória da síntese de glicogênio [92]. Em *N. crassa*, o choque térmico causa uma redução no conteúdo de glicogênio das células e essa redução é acompanhada pela repressão de gene *gsn* [35], resultado este contrário ao que ocorre na levedura *S. cerevisiae* [93], a qual sob estresse térmico acumula glicogênio e ocorre a ativação da expressão do gene que codifica a glicogênio sintase.

A proteína RVB-1 está anotada no banco de dados do fungo como uma RuvB-like helicase 1 (RuvBL1), uma DNA helicase dependente de ATP, nomeada como RVB-1 [19] RuvBL1 é uma proteína ubiquamente expressa que está envolvida em muito processos celulares, tais como regulação da expressão gênica, processamento do RNA ribossomal, apoptose, divisão e proliferação celular [94]. A conservação evolutiva de RuvBL1 de leveduras ao homem sugere que esta proteína desenvolve funções essenciais para a viabilidade e desenvolvimento da célula. RuvBL1, juntamente com a proteína paróloga RuvBL2, pertence à família das ATPases conhecidas como AAA+ (*ATPases Associated with Diverse Cellular Activities*) que apresentam domínios TBP (TATA *binding protein*)-*interacting protein*) e motivos conservados de ligação e hidrólise de ATP como o Walker A, Walker B e Arg finger. As proteínas RuvBL1 e RuvBL2 são também conhecidas, respectivamente, como Pontin e Reptin ou ainda como TIP49 e TIP48 [TBP (TATA *binding protein*)-*interacting protein*] TBP),

O produto da ORF NCU06854 foi identificado como a proteína ortóloga a RuvBL2, a qual está anotada no banco de dados do fungo como uma RuvB-like helicase 2 e nomeada como RVB-2 [19]. Vários trabalhos afirmam que as duas

proteínas (RVB-1 e RVB-2) atuam conjuntamente na maioria dos processos acima mencionados, originando estruturas hexaméricas e/ou dodecaméricas participantes de grandes complexos proteicos, devido as suas atividades ATPase e helicase [94–96].

As proteínas RuvBL1 e RuvBL2 formam o complexo proteico RuvBL1/RuvBL2 que atua em conjunto com vários outros complexos proteicos multimoleculares no núcleo celular de maneira ATP-dependentes, incluindo complexos de remodelagem de cromatina, o complexo HAT (Histona Acetil Transferase), complexos de ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP), complexo da transcriptase reversa da telomerase e regulam a transcrição através da interação com fatores de transcrição [94]. Embora sejam proteínas predominantemente nucleares, também foram detectadas no citoplasma, onde desempenham papéis como estabilizadoras de outras proteínas e complexos [97].

Uma das funções mais descritas para estas proteínas é a participação conservada nos complexos INO80 e SWR/SRCAP de *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* e células de mamíferos, os quais possuem função como remodeladores da cromatina que catalisam e modificam de maneira ATP-dependente a arquitetura dos nucleossomos e estão envolvidos com o reparo de DNA de cadeia dupla, regulação transcricional e diferenciação celular. Sabe-se que, além das RuvBL1/RuvBL2, estes complexos também se associam a proteínas acessórias relacionadas com a actina (Arps, *Actin related proteins*), as quais foram descritas modular a ligação dos complexos de remodelagem na cromatina, estimular a atividade ATPase de maneira dependente de DNA, facilitar a montagem e estabilidade do complexo, ligação às histonas e na remodelação e translocação nos nucleossomos [98,99].

O papel das RuvBL1/RuvBL2 na sinalização celular também já foi caracterizado. Estudos revelaram que elas são reguladoras das proteínas relacionadas com fosfatidilinositol 3-quinase (PIKK), as quais são proteínas serina/treonina quinases com domínios catalíticos homólogos aqueles de fosfatidilinositol 3-quinases. PIKKs regulam a respostas a danos no DNA, sinalização dependente de nutrientes, silenciamento gênico e estresse [94,97,100]. Elas também foram descritas como essenciais à viabilidade e desenvolvimento celular em organismos tais como *S. cerevisiae* [101], *D. melanogaster* [102] e *N. crassa* [19], muito provavelmente em consequência de suas naturezas oligoméricas e interação

com diversas proteínas importantes. Além disso, em humanos, os genes codificando estas proteínas foram demonstrados serem super expressos em vários tipos de câncer, como hepático, colorretal, mama, pulmão, gástrico, esofágico, pancreático, rim, bexiga, bem como linfático e leucêmico e a literatura é muito rica em estudos com estas proteínas relacionadas a diferentes tipos de câncer [103,104]

Em *S. cerevisiae*, um complexo co-chaperona muito estudado e conservado em eucariotos é composto pelas proteínas Tah1 (TPR-containing protein associated with HSP90), Pih1 (Protein interacting with HSP90) e as proteínas Rvbs, chamado de R2TP/PAQossomo (Particle for Arrangement of Quaternary structure) [105]. Este complexo desempenha papéis importantes na biogênese do RNA ribossomal, diferenciação celular e transcrição e está relacionado a várias patologias em células de mamíferos, principalmente relacionadas com vias de diferenciação celular, sinalização celular e câncer, sendo as Rvbs importantes para as funções do complexo R2TP-HSP90 devido a sua atividade ATPase e natureza oligomérica [103]. Pih1 e Tah1 não são essenciais em *S. cerevisiae* e proteínas ortólogas a ambas, ou pelo menos a uma delas, não foram identificadas em algumas leveduras, fungos e plantas. Por outro lado, as RVBs são encontradas em todos os eucariotos e são proteínas essenciais [105].

Como mencionado acima, proteínas ortólogas às proteínas Phi1/Tah1 não são identificadas no genoma dos fungos filamentosos, sugerindo que a interação entre Rvb1/2 e HSP90 pode ocorrer de maneira independente de Pih1/Tah1 ou por mecanismos ainda desconhecidos. Uma interação direta entre as Rvbs e HSP90 foi identificada em estudos de imunoprecipitação realizados em duplo-mutantes para Phi1/Tah1 em *S. cerevisiae*, sugerindo que as funções do complexo R2TP-HSP90 ainda podem ser mantidas, mas por vias interativas diferentes envolvendo alvos de RVBs e Hsp90 [106].

#### **4.1 As proteínas RVBs na resposta a estresse**

Existem evidências de que o complexo RVB-1/RVB-2, em humanos, pode regular a resposta a estresse mediada por meio de interações físicas com PIKKs e pelo controle dos seus níveis de mRNA [97]. Em *S. cerevisiae*, [107] identificaram Rvb1 em agregados proteicos celulares submetidos a estresse térmico e [108] descreveram a presença de condensados perinucleares de ambas as proteínas em células de levedura em fase estacionária e sob algumas condições de estresse. No

entanto, nem a expressão da proteína nem sua localização foram significativamente alteradas sob diferentes condições de estresse para ambas as proteínas [108].

Utilizando uma abordagem de silenciamento de RNA (siRNA), [109] mostraram que as proteínas RuvBL1 e RuvBL2 estão envolvidas na formação do complexo do agressomo em humano, interagindo diretamente com seus componentes. O agressomo é um grande complexo formado por chaperonas, co-chaperonas e proteínas mal dobradas que não são degradadas pelo proteassomo e acabam por ser encapsuladas e transportadas pelos microtúbulos via ATP-dineína para a região perinuclear da célula, diminuindo a citotoxicidade causada pelas proteínas desnoveladas. Estão amplamente envolvidos em doenças como Alzheimer e Parkinson (Corpos de Lewis). Células expressando baixa quantidade das proteínas RuvBLs mostraram possuir mais agregados intracelulares durante estresse, sugerindo que as RuvBLs de humanos podem agir como desagregases celulares, possuindo atividade chaperona-*Like* [109].

Além disso, as proteínas RVBs foram encontradas em ensaios de imunoprecipitação de componentes de grânulos de estresse isolados por centrifugação diferencial, tanto em células de mamíferos, como em *S. cerevisiae*, sugerindo um papel amplo e conservado para estas proteínas na regulação traducional em resposta ao estresse [110], no entanto seu envolvimento não foi comprovado experimentalmente. Os grânulos de estresse são grandes complexos super estáveis de mRNA/proteínas, localizados em grânulos citoplasmáticos discretos no citoplasma que regulam a tradução de mRNAs de maneira sincrônica com a parada traducional induzida por estresse [111–113].

Curiosamente, por meio de ensaios de *pull-down* DNA-proteína, as proteínas RVBs foram identificadas ligando de maneira dependente de HSE ao promotor do gene da proteína HSP70 de camundongo após estresse térmico [114]. Além disso, ensaios de imunoprecipitação revelaram as RuvBLs como proteínas capazes de interagir com a proteína SGO2 (shugoshin2) em células de camundongo também submetidas a estresse térmico, desempenhando, muito provavelmente, um papel como regulador da transcrição nesta condição [114], porém esta interação não foi comprovada no trabalho. As shugoshin são uma classe de proteínas ubíquas em eucariotos, com função conservada ligada à coesão cromossômica da mitose e na meiose, estando amplamente relacionadas a diversas doenças neurodegenerativas e câncer [169]. O papel de SGO2 no estresse está relacionado à interação com

HSF-1, agindo como ativadoras da expressão gênica, recebendo o título de guardiã no choque térmico em camundongos [115]. Além disso, as proteínas RVBs mostraram serem reguladas e interagirem com um regulador central da resposta ao estresse em células de humanos, HAPSTAR1, como já descrito acima [91].

Este conjunto de dados justificou a presente proposta de trabalho, a qual gerou resultados que consolidam as proteínas RVBs como importantes ATPases envolvidas na resposta ao estresse em *N. crassa*. Este é o primeiro trabalho de caracterização funcional destas proteínas em fungos filamentosos e traz luz a novas funções para estas proteínas extraordinárias, principalmente relacionadas à resposta ao estresse.

## OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização funcional e bioquímica do complexo AAA+ ATPase RVB-1/RVB-2 e da ciclina multifuncional PCL-1 na resposta a estresse em *Neurospora crassa*. Por este motivo, este trabalho foi dividido em três capítulos, de acordo com os objetivos específicos propostos para cada etapa do desenvolvimento deste projeto.

### **Capítulo I- Caracterização bioquímica e biofísica do complexo RVB-1/RVB-2:**

Neste capítulo, nosso objetivo é combinar técnicas bioquímicas e biofísicas para caracterizar as proteínas RVB-1 e RVB-2 de *N. crassa*, tais como a produção e purificação das proteínas recombinantes e realização de análises biofísicas com o objetivo de compreender o estado oligomérico do complexo RVB-1/RVB-2. Ensaio bioquímico de atividade ATPásica e ligação a DNA também serão realizados. Além disso, análises funcionais utilizando linhagens mutantes heterocárias para os genes *rvb-1* e *rvb-2* serão estudadas para investigar as funções dessas proteínas no desenvolvimento do fungo, além do estudo de suas localizações subcelulares.

### **Capítulo II- Caracterização funcional das proteínas complexo RVB-1 e RVB-2 na resposta ao estresse, por meio de análises de expressão e imunoprecipitação:**

Neste capítulo, nós pretendemos conectar as proteínas RVBs como importantes ATPases envolvidas na resposta ao estresse em *N. crassa*. Para isso, nosso objetivo é analisar a expressão e localização das proteínas sob estresse, bem como realizar uma busca por proteínas parceiras por meio de ensaios de imunoprecipitação (IP) da proteína RVB-1. A comprovação de interação de algumas proteínas parceiras identificadas na IP será analisada.

### **Capítulo III- Caracterização funcional da ciclina PCL-1 na resposta ao estresse:**

Neste capítulo, o objetivo principal é investigar o envolvimento da proteína na resposta a estresse com o objetivo de comprovar o papel multifuncional desta ciclina PCL-1 em *N. crassa*. Além disso, propomos realizar estudos da localização celular da ciclina durante o desenvolvimento do fungo e caracterizar sua função na resposta ao estresse por cálcio e na modulação da regulação do fator de transcrição CRZ-1.

## Capítulo 1. Caracterização Bioquímica e Biofísica do complexo RVB-1/RVB-2

Neste capítulo, nós caracterizamos os produtos das ORFs NCU03482 e NCU06854, nomeados RVB-1 e RVB-2 num ponto de vista bioquímico e biofísico. Estas caracterizações tiveram início durante as atividades do Mestrado e foram finalizadas durante os objetivos iniciais do projeto de Doutorado. Análises cromatográficas revelaram que as proteínas interagem formando um complexo proteico que na forma APO (sem nucleotídeos) existe predominantemente como um dímero em solução, embora também tenham sido observados hexâmeros. Os nucleotídeos influenciam o estado de oligomerização, enquanto o ATP favorece a formação de hexâmeros, o ADP favorece a formação de estados multiméricos, provavelmente dodecâmeros, e as simulações de Dinâmica Molecular (MD) revelaram a contribuição de certos resíduos de aminoácidos na estabilização dos nucleotídeos. O complexo RVB-1/RVB-2 liga a fragmentos de DNA, exibe atividade ATPase e a atividade é fortemente aumentada na presença de DNA. Além disso, o complexo se liga à importina- $\alpha$  (NclIMP $\alpha$ ) através dos sinais de localização nuclear (NLS). Nossos achados mostram que algumas propriedades são específicas das proteínas do fungo, apesar de sua alta identidade com proteínas ortólogas. São proteínas essenciais em *N. crassa*, e os defeitos fenotípicos exibidos pelas linhagens heterocarióticas, principalmente relacionados ao crescimento e desenvolvimento, indicam *N. crassa* como um organismo promissor para investigar funções biológicas adicionais dessas proteínas.

Este trabalho foi publicado na revista *Biochimie* em 2021

DOI 10.1016/j.biochi.2021.08.002

Segundo INSTRUÇÃO NORMATIVA No 01, de 29 de abril de 2022, que dispõe sobre as normas para apresentação de dissertações e teses do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, despacho nº 083/2022 – CoPGB/IQ-CAr, aprovada pelo Conselho do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Reunião de 13/04/2022, esta tese será apresentada na forma de capítulos contendo os manuscritos gerados a partir dos resultados obtidos durante as atividades de doutorado.

**Biochemical and biophysical characterization of the RVB-1/RVB-2 protein complex, the RuvBL/RVB homologues in *Neurospora crassa***

Jonatas Erick Maimoni Campanella<sup>a</sup>, Sergio Luiz Ramos Junior<sup>b</sup>, Vanessa Thomaz Rodrigues Kiraly<sup>b</sup>, Antoniel Augusto Severo Gomes<sup>c</sup>, Andrea Coelho de Barros<sup>c</sup>, Pablo Acera Mateos<sup>a</sup>, Fernanda Zanolli Freitas<sup>a</sup>, Marcos Roberto de Mattos Fontes<sup>c</sup>, Júlio Cesar Borges<sup>b</sup> and Maria Célia Bertolini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 14.800-060, Araraquara, SP, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP, 13.560-970, São Carlos, SP, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Biofísica e Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 18.618-689, Botucatu, SP, Brasil

\*Corresponding author: Maria Célia Bertolini  
Instituto de Química, UNESP  
Araraquara, SP, Brazil  
E-mail: mc.bertolini@unesp.br

## ABSTRACT

The RVB proteins, composed of the conservative paralogs, RVB1 and RVB2, belong to the AAA+ (ATPases Associated with various cellular Activities) protein superfamily and are present in archaea and eukaryotes. The most distinct structural features are their ability to interact with each other forming the RVB1/2 complex and their participation in several macromolecular protein complexes leading them to be involved in many biological processes. We report here the biochemical and biophysical characterization of the *Neurospora crassa* RVB-1/RVB-2 complex. Chromatographic analyses revealed that the complex (APO) predominantly exists as a dimer in solution although hexamers were also observed. Nucleotides influence the oligomerization state, while ATP favors hexamers formation, ADP favors the formation of multimeric states, likely dodecamers, and the Molecular Dynamics (MD) simulations revealed the contribution of certain amino acid residues in the nucleotide stabilization. The complex binds to dsDNA fragments and exhibits ATPase activity, which is strongly enhanced in the presence of DNA. In addition, both GFP-fused proteins are predominantly nuclear, and their nuclear localization signals (NLS) interact with importin- $\alpha$  (NcIMP $\alpha$ ). Our findings show that some properties are specific of the fungus proteins despite of their high identity to orthologous proteins. They are essential proteins in *N. crassa*, and the phenotypic defects exhibited by the heterokaryotic strains, mainly related to growth and development, indicate *N. crassa* as a promising organism to investigate additional biological and structural aspects of these proteins.

**Keywords:** RVB-1 and RVB-2 proteins, SEC-MALS, ATPase activity, molecular modeling.

## 1. INTRODUCTION

The RVB proteins, also known as RUVBL1/RUVBL2, Pontin/Reptin, and TIP48/TIP49 belong to the AAA+ (ATPases Associated with various cellular Activities) protein superfamily that are present in archaea and eukaryotes. They are essential proteins in eukaryotes [1-3] and are described to participate in a wide range of cellular processes [4,5]. They are composed of two paralogs, Rvb1 and Rvb2 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, that interact with each other forming the Rvb1/2 complex. According to structural studies, both proteins are organized in three domains, in which the I and III domains comprise the catalytic ATPase core, while the II domain is a DNA binding domain also involved in protein-protein interactions [6,7].

The proteins from different organisms have been extensively characterized either individually or as a protein complex. In general, both orthologs are described to exhibit ATPase and helicase activities; however, some controversial results are described by different groups depending on if they are characterized individually or not. For example, very low levels of ATPase activity and no helicase activity were described for the human RUVBL1/RvbBL1 [1,6]; however, the ATPase, but not the helicase activity, was detected when the RUVBL1/ RUVBL2 complex was characterized [8,9]. The three-dimensional crystal structure was first solved for the human RuvBL1 showing a hexameric ring-shaped structure [6]. Later, the crystal structure of the human truncated protein complex (R1 $\Delta$ DII/R2 $\Delta$ DII) revealed a dodecamer consisting of two heterohexameric rings with alternating unities of each monomer [7]. The crystal structure of the full-length Rvb1/Rvb2 protein complex was solved with proteins from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* (ctRvb1/ctRvb2), which showed that both proteins assemble in dodecameric states consisting of alternating Rvb1 and Rvb2 molecules [10]. Two possible dodecameric assemblies were described depending on the region of interaction, suggesting that the capability of both proteins of forming different oligomeric states may affect the cellular pathways in which they are involved.

Although described as associated to a large variety of cellular processes, the exact molecular function of the proteins remains unclear. They are known as components of large protein complexes, such as the INO80, SWR-C/SRCAP, and TIP60/NuA4 chromatin remodeling complexes [11-14]. In addition to DNA remodeling, the Rvbs proteins are described as associated to transcriptional

processes, since they interact with the TATA-box binding protein, TBP [15], and various transcription factors resulting in the regulation of a variety of downstream processes. In humans, they are described to modulate the activity of transcriptional regulators such as c-Myc and  $\beta$ -catenin, which play roles in cancer development and progression [16]. Additionally, they are overexpressed in multiple types of cancer, and thus are considered as targets for the development of new therapeutic anticancer drugs [13,17].

In a previous study, we identified the RuvB-like helicase protein (ORF NCU03482, the *S. cerevisiae* Rvb1 ortholog, named here as RVB-1) in *Neurospora crassa* using an approach to search for proteins able to bind to the *gsn* promoter, the gene encoding glycogen synthase, the regulatory enzyme in glycogen synthesis [18]. In the present work, we performed the characterization of the RVB-1 and RVB-2 proteins and of the RVB-1/RVB-2 complex from *N. crassa*. Both are essential proteins in *N. crassa*, and the mutant strains ( $\Delta rvb-1^{het}$  and  $\Delta rvb-2^{het}$ ) show several phenotypic defects. Both proteins were individually and co-expressed in *E. coli*, and their biochemical and biophysical characteristics were analyzed. The RVB-1/RVB-2 complex exhibits ATPase activity and requires the *N. crassa* importin- $\alpha$  (NclMP $\alpha$ ) to be translocated to nucleus since their nuclear localization sites (NLS) showed high *in vitro* affinity to NclMP $\alpha$ . In addition, the complex binds dsDNA and DNA largely increases its low ATPase activity. The analytical size-exclusion chromatography (aSEC) and the aSEC coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS) analyses revealed that the APO complex predominantly exists as a dimer in solution although hexamers were also observed. Nucleotides strongly influence the oligomerization state, while ATP favors the formation of hexamers, ADP favors the formation of multimeric states, likely dodecamers. Supporting this, MD simulations suggest that ADP or ATP may induce the oligomerization of RVB-1 and RVB-2 by an intermonomer cooperativity mechanism. The findings reported here extend the information regarding these proteins and reveal the fungus as a potential organism to investigate additional functions of this protein family.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. *Neurospora crassa* strains and growth conditions

The FGSC #2489 (A), FGSC #9718 (*mus52::bar<sup>+</sup>*, a) and FGSC #9568 (*mus52::hyg<sup>+</sup>*, a) strains used as wild-type, and the FGSC #13658 (*hel-1*, NCU03482,  $\Delta$ *rvb-1*<sup>het</sup>) and FGSC #13216 (*hel-2*, NCU06854,  $\Delta$ *rvb-2*<sup>het</sup>) heterokaryon mutant strains were purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC, University of Missouri, Kansas City, MO, USA, <http://www.fgsc.net>) [19]. The strains were maintained on solid Vogel's minimal (VM) medium [20], pH 5.8 containing 2 % sucrose at 30 °C. Growth of mutant strains at 30 °C was compared to the FGSC 9568 (*mus52::hyg<sup>+</sup>*, a) strain. For this, conidia were collected from the strains grown in VM medium in the presence of hygromycin (200 µg/ml), counted and used in the experiments. Growth rate was analyzed in Race tubes under constant darkness (DD) in VM medium plus hygromycin in a Percival incubator (Percival Scientific, Inc. Boone) for different times.

For protein expression and localization, strains individually expressing C-terminus either V5- or GFP-tagged RVB-1 and RVB-2 proteins were constructed. The pZERO-*hph-V5* and pZERO-*hph-gfp* plasmids (gently donated by Michael Freitag from Oregon State University, Corvallis, OR, USA) were used as template and the splitmarkers were obtained using the methodology described by Honda and Selker [21] and the oligonucleotides listed in Table S1. The splitmarkers were obtained by PCR using the 3482Gly-F/R, 6854Gly-F/R, 3482Lox-F/R, and 6854Lox-F/R oligonucleotide pairs (Table S1). The *hph-V5* and *hph-gfp* nucleotide sequences were amplified from pZERO plasmids using the 10xGly-F/LoxP-R pair (Table S1). The PCR fragments amplified using oligonucleotides corresponding to each ORF were fused to the *hph-V5* or *hph-gfp* fragments by fusion PCR using the 3482Gly-F/Hph-R, Hph-F/3482Lox-R, 6854Gly-F/Hph-R, Hph-F/6854Lox-R oligonucleotide pairs. (Table S1). Fusion DNA fragments were individually transformed into #9718 strain and transformants were selected in the presence of hygromycin. Homokaryons were isolated either by crossing with the 2489 strain in 0.5% Westergaard's medium [22] or by microconidiation induction from 10 to 15-day conidia after filtration using Millex SV (5 µm) filters [23] leading to the *rvb-1::rvb-1-v5*, *rvb-2::rvb-2-v5*, *rvb-1::rvb-1-gfp* and *rvb-2::rvb-2-gfp* wild-type strains. The segregantes were confirmed by PCR

using the primers RVB1-F, RVB2-F, V5-R, and GFP-R (Table S1). *N. crassa* transformation and other molecular techniques were performed as previously described [24] or using the protocols available at the Neurospora homepage (<http://www.fgsc.net/Neurospora/NeurosporaProtocolGuide.htm>). To analyze RVB-1-V5 and RVB-2-V5 expression in *N. crassa*, mycelium grown for 24 h were lysed with liquid nitrogen, and the proteins were extracted and quantified the Hartree method [25]. An amount of 20 µg of total protein was separated by 10% SDS-PAGE gels, electro-transferred to nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare) and probed with a monoclonal anti-V5 antibody (Invitrogen). Blots were subsequently probed with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed with luminol reagent.

## 2.2. Subcellular localization of RVB-1 and RVB-2 proteins

To determine the subcellular localization of the fluorescent RVB-1-sfGFP and RVB-2-sfGFP proteins, 200 µl of a conidial suspension ( $2 \times 10^6$  conidia/ml) from the *rvb-1::rvb-1-gfp* and *rvb-2::rvb-2-gfp* strains were inoculated onto coverslips, covered with VM liquid plus 2% sucrose and incubated at 30 °C for 8 h. For nuclei analysis, mycelia were fixed in 3.7% formaldehyde, 1% phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0, 0.2% (v/v) Tween 80, washed twice with PBS and stained with 100 µl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 0.5 mg/ml) for 5 min. DAPI fluorescence was visualized using a fluorescence microscope with excitation and emission wavelengths of 359 nm and 461 nm, respectively, and the GFP fluorescence was visualized using excitation and emission wavelengths of 490 nm and 525 nm, respectively. The images were captured using an AXIO Imager.A2 Zeiss microscope coupled to an AxioCam MRm camera and processed using the AxioVision software, version 4.8.2. Further processing was performed using Corel®PHOTO-PAINT™ X7.

## 2.3. Recombinant protein production and purification

To clone and express the *rvb-1* (ORF NCU03482) and *rvb-2* (ORF6854) genes, the 1,387 bp full-length *rvb-1-V5* cDNA sequence was amplified by RT-PCR using the *rvb-1::rvb-1-V5* strain cDNA and the primers RVB1-duet-F and V5-R (Table S1). The entire ORF was inserted into the *NdeI/KpnI* sites of the pRSFduet-1 MCS2

expression vector leading to the pRSFduet-1-*rvb-1-V5* construction. After this, the 1,446 bp full-length *rvb-2* cDNA was amplified by RT-PCR using the *N. crassa* cDNA and the primers RVB-2-duet-F and RVB-2-duet-R (Table S1). The DNA fragment was cloned into the *Bam*HI/*Not*I sites of the pRSFduet-1-*rvb-1-V5* MCS-1, leading to the pRSFduet-1-*his6-rvb-2 rvb-1-V5* construction, to produce the N-terminus His<sub>6</sub>-tagged RVB-2 and the C-terminus V5-tagged RVB-1 recombinant proteins. Both recombinant proteins were also individually produced by cloning the *rvb-1* (RVB-1-F/R oligonucleotides pair, Table S1) and *rvb-2* (RVB-2-F/R oligonucleotides pair, Table S1) cDNAs into the *Nde*I/*Bam*HI sites of the pET28a (Novagen) expression vector leading to the pET-*rvb-1* and pET-*rvb-2* constructions. To express the His<sub>6</sub>-RVB-1 and His<sub>6</sub>-RVB-2 individually and the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 protein complex, the plasmid constructions were transformed into *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS competent cells grown in 2YT media (1.6% tryptone, 1% yeast extract and 0.5% NaCl) containing 25 µg/ml chloramphenicol and 25 µg/ml kanamycin at 37 °C until absorbance of 0.6 at 600 nm. Protein expression was induced using 0.4 mM IPTG (final concentration) at 18 °C, 180 rpm for 16 h.

After protein induction, cells were harvested by centrifugation and suspended in L buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 50 mM Imidazole, 0.01% triton X-100 with 0.01 mg/ml of lysozyme e 5 U of DNase). Cell lysis was performed by sonication in ice bath using ten pulses of 30 sec ON (35% amplitude) and 60 sec OFF using the Vibra-Cell VCX 750 W cell disrupter (Sonics). The cell extract was centrifuged (20.000 X g, 20 min, 4 °C), and the supernatant used for protein purification. The soluble lysate was applied to a HisTrap Chelating HP 5 mL (GE Helthcare Lifesciences) followed by washing with 5 column volume (CV) of buffer A (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 50 mM Imidazole). The proteins were eluted in buffer B (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 500 mM Imidazole). After affinity chromatography, the proteins were dialyzed against GF buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol) and subjected to preparative molecular size exclusion chromatography (pSEC) at 4 °C performed on HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade column (GE Helthcare Lifesciences) coupled to FPLC system ÄKTA Prime Plus (GE Helthcare Lifesciences) previously equilibrated with GF buffer. Protein expression was confirmed by Western blot analyses using either the monoclonal anti-V5 antibody (Invitrogen) or the monoclonal anti-His (Sigma). Blots were subsequently

probed with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed with luminol reagent.

Recombinant *N. crassa* importin  $\alpha$  (NcIMP $\alpha$ ) used in the ITC experiments was prepared as previously described [26].

## 2.4. Molecular modeling study

RVB-1/RVB-2 3D model was generated using the Swiss-Model web-server [27] (<https://swissmodel.expasy.org/>) selecting a homologous RVB crystallographic structure from *Chaetomium thermophilum* (PDBid: 4WW4), which shows high identity (89.69%) and coverage (0.99). The heterododecameric model of RVB-1/RVB-2 was obtained from the heterodimeric model by symmetry, maintaining the ADP molecules in each monomer. The heterohexameric model was modified to obtain the apo-, ADP- or ATP-bound forms, which each one was submitted to molecular dynamics simulations to stabilize and inspect the accommodation of ADP or ATP molecules into the protein. For that, GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulation) [28] v.5.0.5 was used under the CHARMM36 force field [29]. Protonation states of residues were set to pH 7.0 according to PROPKA3 server [30]. A triclinic box of 10 Å from the farthest atom was applied to each system, followed by solvation and equilibration with 100 mM of NaCl. Systems were minimized until reach energy below 100 kJ/mol/nm using the Steepest Descent algorithm. Further, a 1-ns NVT ensemble was applied generation velocities randomly at 298.15 K using the V-rescale thermostat [31]. Then, a 1-ns NPT ensemble with Berendsen barostat [32] at 1 bar was applied. Both NVT and NPT steps were performed restraining the backbone atoms of RVB. A further step was employed to release such restraints gradually from a force constant of 1000 to 0 kJ/mol/nm<sup>2</sup> in short steps of 100 ps. Finally, an unrestrained 100-ns NPT step was performed for each system using the Nose-Hoover thermostat [33,34] and Parrinello-Rahman barostat [35]. The ADP topology was retrieved directly from the CHARMM36 force field, and ATP molecules were obtained by adding the third phosphate group to each ADP molecule.

To identify the most important residues of RVB-1 and RVB-2 in contact to ADP or ATP molecules, all frames obtained from MD trajectories were used to calculate the percentage of contacts of each amino acid residue of the protein within a cutoff distance of 4 Å. As the hexamer has three copies of each monomer, the

values for each residue were averaged to determine the final percentage of contacts. These calculations were performed using tcl scripting implemented in VMD [36].

## **2.5. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

To verify if the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 protein complex binds to double-stranded DNA, an agarose gel shift assay was performed. For this, increased amounts (3-10  $\mu$ M) of the recombinant proteins were incubated with 150 ng of a double-stranded DNA for 1 h in binding buffer (43 mM Tris-HCl, pH 7.5, 115 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g/mL BSA, 5% glycerol, 5 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 2 mM TLCK, and 1  $\mu$ g/mL of aprotinin and pepstatin A) at 30 °C. The DNA fragments used in the assays were the 156 bp double-stranded DNA sequences (*Pgsn* and *mPgsn*) [37]. The *Pgsn* fragment was amplified from genomic DNA using the Stre1-F/R oligonucleotides pair and the *mPgsn* fragment was previously constructed [37]. The *mPgsn* fragment corresponds to the mutated *Pgsn* fragment. The samples were fractionated on a 3% agarose gel in 0.5 X TBE buffer with ethidium bromide (5  $\mu$ g/ml) under 20 V for approximately 12 h. Gel shift analyses were also performed in the presence of either ATP or ADP or ATP $\beta,\gamma$ -imido (Sigma) in a final concentration of 2 mM.

## **2.6. Analytical size-exclusion chromatography (aSEC) and SEC coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS)**

Analytical size exclusion chromatography (aSEC) was performed at room temperature using a prepacked Superdex 200 GL 10/30 (GE Healthcare LifeSciences) equilibrated with GF buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol) as previously described [38]. Aliquots of 100  $\mu$ l of 10  $\mu$ M His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 were injected and eluted using a 0.8 ml/min flow rate. Apoferritin (480 kDa),  $\gamma$ -globulin (160 kDa), BSA (67 kDa/Rs), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), and cytochrome C (12 kDa) (Sigma-Aldrich) were used as standards for Molecular Mass (MM), whereas the Blue Dextran 2000 was used for the determination of the void volume of the column.

The retention volumes of each standard protein as well as His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 were determined by the maximum of each peak in the chromatogram and then converted by Equation 1 into partial retention volumes ( $k_{av}$ ).

$$k_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{Equation 1}$$

Where  $V_e$  is the retention volume of the protein,  $V_0$  is the void volume of the column (Bluedextran's  $V_e$ ) and  $V_t$  is the total volume of the column. Finally, the values of MM for the standard protein were then plotted on a graph versus  $-\log k_{av}$  from which the apparent MM ( $MM_{app}$ ) for the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 fractions were estimated.

Size exclusion chromatography-multiangle light scattering (SEC-MALS) measurements were performed in a static light scattering module at multiple angles miniDAWS TREOS, with Wyatt QELS detector for DLS measurements and OptiLABr EX refractive index detector for sample concentration measurements (Wyatt Technology Corporation). The modules were connected in line to a high-pressure liquid chromatograph (HPLC - Waters) connected to a Superdex 200 GL 10/30 column (GE Healthcare Lifesciences) for aSEC. The experiments were performed with GF buffer containing MgCl<sub>2</sub> in the absence and in the presence of either 2 mM ATP or ADP. The proteins were purified as previously described and used in the concentration of 4.5 mg/ml. The refractive index of the buffers was measured using a Quimis refractometer and the refractive index increment  $dn/dc$  value (0.1780) was obtained by the Sedfit software [39] version 16.1c, based on the amino acid sequence of the proteins. Data were analyzed by the ASTRA VI software package (Wyatt).

## 2.7. ATPase activity quantification

The ATPase activity of the recombinant His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 protein complex was investigated by monitoring the concentration of P<sub>i</sub> (inorganic phosphate) released after ATP hydrolysis. P<sub>i</sub> quantification was performed on a 96-well plate and the absorbance was quantified by the Varioskan® LUX (Thermo Scientific) at 650 nm. For the reaction, fixed volumes of protein in GF buffer were pipetted into two triplicates in a final protein concentration of 2 μM for each triplicate. Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) in a final concentration of 2 mM and increased ATP concentrations

were then added. A control reaction in the absence of protein complex was performed also in triplicate. The 96-well plate was incubated at 30 °C for 20 min under gentle shaking. The phosphate released after ATP hydrolysis was compared to a phosphate curve, constructed in duplicate, using the PiColorLock kit (Innova Biosciences) [40]. The colorimetric reaction is based on the interaction between the malachite green chromophore (orange) and the P<sub>i</sub> released after ATP hydrolysis. We also analyzed the influence of DNA on the ATPase activity of the RVB-1/2 proteins complex. For this, different concentrations of the same dsDNA fragment used in the EMSA experiments were added to the reaction and a fixed ATP concentration (0.5 mM) was used.

## 2.8. Circular dichroism

CD experiments were performed in J-815 spectropolarimeter (JASCO Inc.) coupled with Peltier system for temperature control. The spectra were obtained with 10 μM His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 protein complex in GF buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol) using a 0.1 cm circular cuvette of optical path and the data were normalized to mean residual molar ellipticity ( $[\theta]_{MRW}$ ) according to Equation 2. The protein secondary structure content was estimated using the Dichroweb software deconvolution program [41]. For analysis in the presence of either ATP or ADP, 2 mM of the nucleotides was added to the proteins.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta(\lambda)}{10 \cdot [c] \cdot l \cdot n} \quad \text{Equation 2}$$

Where  $\theta(\lambda)$  is the ellipticity, [c] is the molar protein concentration, l, the path length and n are the total amount of amino acids residues.

## 2.9. Calorimetric assays

ITC experiments were carried out to verify the binding affinity of *N. crassa* importin-α (NcIMPα) to either the putative RVB-1 [RVB-1 NLSs, <sup>199</sup>GACKRVGRSDA<sup>210</sup> (site A) and <sup>370</sup>EEIKRIVKIRS<sup>380</sup> (site B)] or the putative RVB-2 (RVB-2 NLS, <sup>410</sup>ICAKRKAKQVG<sup>420</sup>) NLS peptides. The experiments were performed with a MicroCal iTC200 microcalorimeter (GE Healthcare). NcIMPα protein and RVB peptides were diluted in buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 100 mM NaCl) at a

concentration of 30  $\mu\text{M}$  and 600  $\mu\text{M}$  for protein and peptide (protein:peptide molar ratio of 1:20), respectively. Twenty successive injections (2  $\mu\text{L}$ ) of NLS peptides were carried out into the calorimetric cell, in an interval of 240 s for each titration and 800 rpm homogenization speed. The heat of the dilution was determined in a control assay by titration of the peptide sample into the protein sample buffer and was subtracted from the corresponding titrations. Titrations were performed in duplicate, and the heat dilution of each peptide was determined from control experiments and subtracted from their binding titrations prior to data analysis. The data were processed using MicroCal Origin Software to obtain values for stoichiometry (N), dissociation constants ( $K_d$ ), and enthalpy ( $\Delta H$ ). The binding-type input parameters were adjusted to obtain the best fitting model.

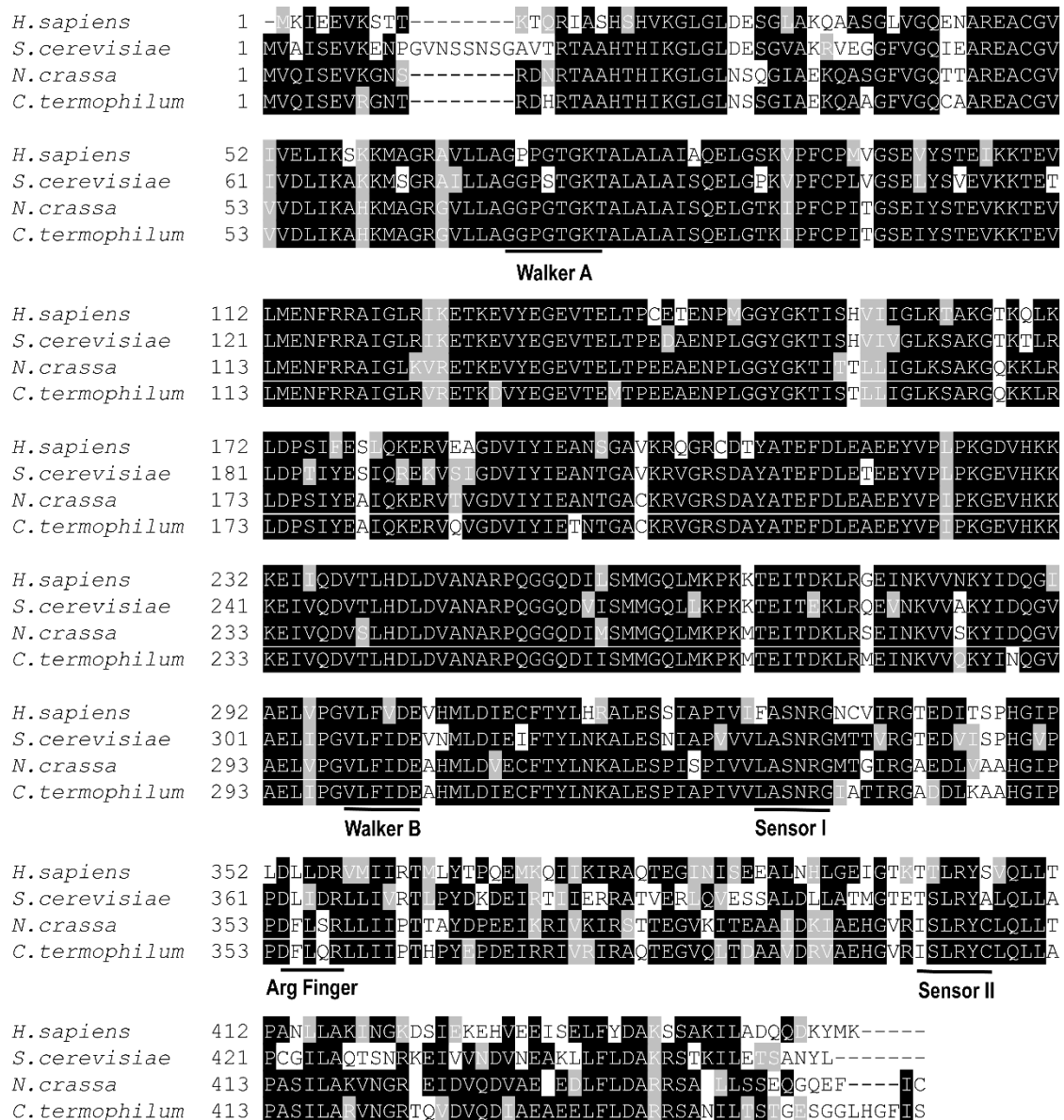
### 3. RESULTS

#### 3.1. The ORFs NCU03482 and NCU06854 encode the *Neurospora crassa* RVB-1 and RVB-2 proteins, respectively

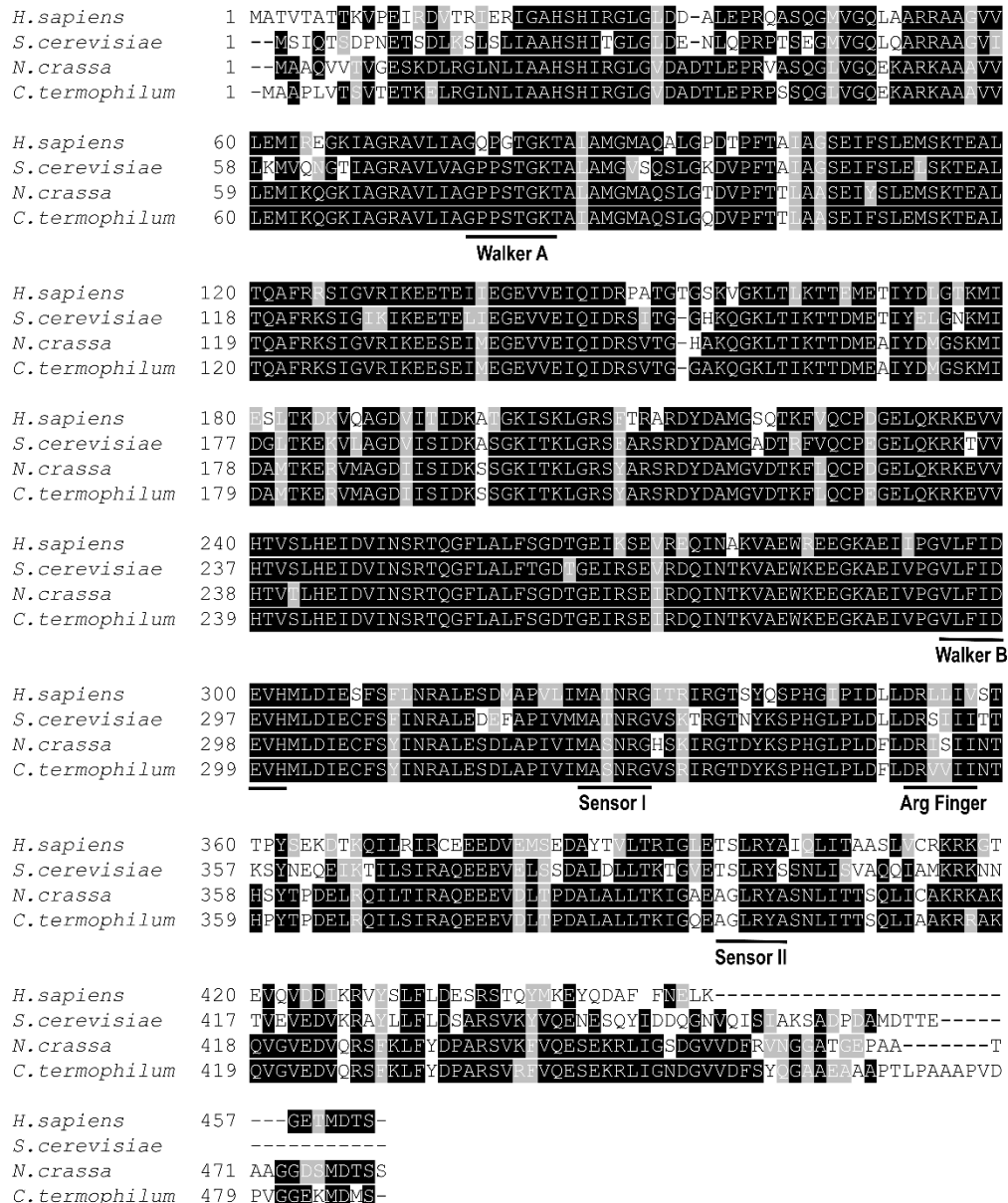
The NCU03482 protein was previously identified in a biochemical approach designed to isolate proteins able to bind to the *gsn* promoter, which encodes glycogen synthase [18]. The gene is annotated as “RuvB-like helicase 1” in the *N. crassa* genome database (<http://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/NCU03482>). To identify the RVB-2 paralog, a BLASTP search in the *N. crassa* genome database using the *Saccharomyces cerevisiae* Rvb2 protein as query, retrieved the ORF NCU06854 as encoding the fungus orthologous protein.

The gene is annotated as “RuvB-like helicase 2” in the *N. crassa* genome database (<http://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/NCU06854>). The proteins were named in this work as RVB-1 and RVB-2, according to the *Neurospora* nomenclature [42], and they are composed of 458 (RVB-1) and 481 (RVB-2) amino acid residues. Sequence alignment of RVB-1 and RVB-2 and orthologous proteins from fungi and human (Fig. S1 and Fig. S2) showed that they are highly conserved proteins with identities approximately of 69 to 89% for RVB-1 and of 72 to 89% for RVB-2. The highest identity was observed for the *Chaetomium thermophilum* *ctRvb1* and *ctRvb2* proteins, being of 89% for both proteins. The *Neurospora* proteins showed higher identity to human proteins (70% for both proteins) than the *S. cerevisiae* proteins

(65%). The regions of homology contain the Walker A and Walker B motifs, which are involved in ATP binding and/or hydrolysis. In addition, the highly conserved sensor I and II and the arginine finger motifs, common in this protein family, are also present [5].



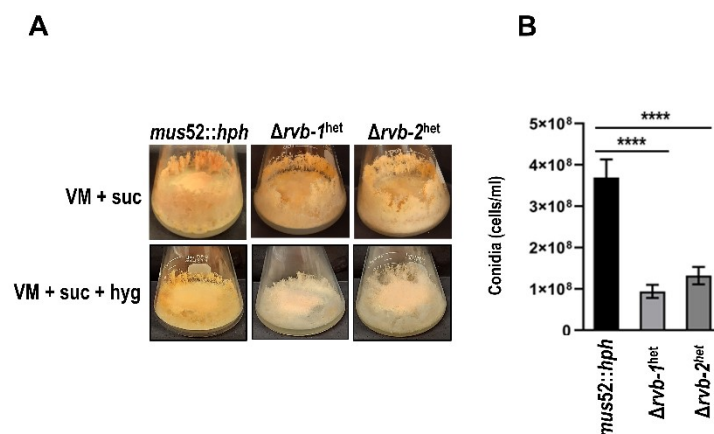
the ORF NCU03482 and the sequences of human RuvB1 (NP\_003698.1), *Saccharomyces cerevisiae* Rvb1 (KZV1249.1), and *Chaetomium thermophilum* Rvb-1 (4WW4-A). The sequence alignment was performed by ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and the identical and conserved amino acids were identified using the Boxshade.



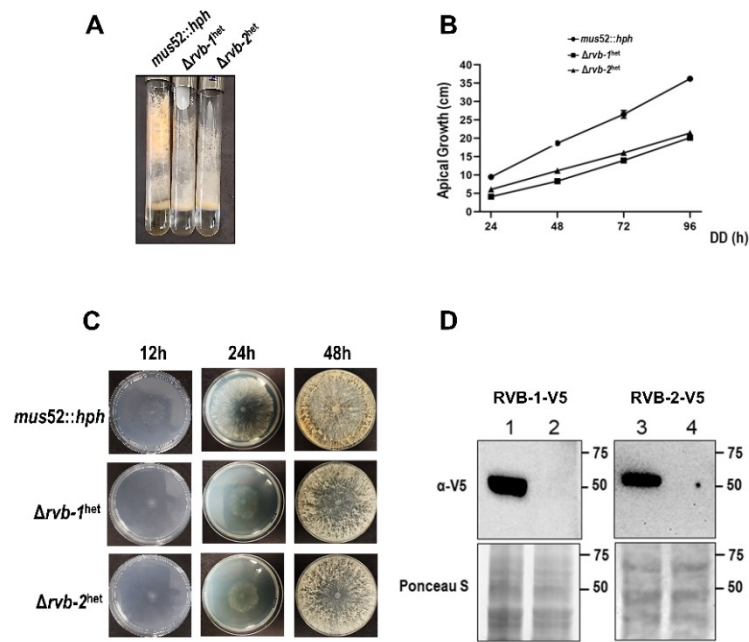
**Fig. S2.** Multiple alignment of the polypeptide sequences of the *Neurospora crassa* protein encoded by the ORF NCU06854 and the sequences of human RuvBL2 (NP\_006657.1), *Saccharomyces cerevisiae* Rvb2 (KZV07276.1), and *Chaetomium thermophilum* Rvb-2 (4WW4-B). The sequence alignment was performed by ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and the identical and conserved amino acids were identified using the Boxshade.

### 3.2. RVB-1 and RVB-2 are essential proteins in *N. crassa*

The  $\Delta rvb-1$  and  $\Delta rvb-2$  strains, purchased from FGSC, are heterokaryon strains, which means that they possess both wild-type and knockout nuclei. Different approaches (induction of microconidiation and crossing with a wild-type strain) were performed to try to isolate homokaryon strains from the FGSC #13658 and #13216 heterokaryon strains; however, the strains were non-viable suggesting that the genes are essential for growth, like what is described for *Saccharomyces cerevisiae* [1,2] and *Drosophila melanogaster* [3]. Growth analyses of the heterokaryon strains in the presence of hygromycin showed that they present several phenotypic defects related to growth and development (Fig. 1 and S3). A mutant strain (*mus52::hph*) able to grow in the presence of hygromycin was used as a wild-type strain for comparison. They exhibit less aerial hypha and a paled phenotype suggesting defective production of  $\beta$ -carotene (Fig. 1A and S3A) and low production of conidia (Fig. 1B) after 10 days culture. Growth in race tubes in a constant darkness (DD) and in plates under day light condition showed that they exhibit a low growth rate compared to the wild-type strain (Fig. S3B and S3C). Wild-type strains individually expressing V5-tagged proteins (RVB-1-V5 and RVB-2-V5) were constructed and both proteins were detected in mycelia grown for 24 h (Fig. S3D).



**Fig. 1. The  $\Delta rvb-1$  and  $\Delta rvb-2$  heterokaryon mutant strains exhibit defects related to growth and development.** (A) Strains growth in VM medium plus 2% sucrose in the absence and in the presence of hygromycin (150  $\mu$ g/ml). (B) Production of conidia by the wild-type and mutant strains after 10 days growing in the presence of hygromycin. Total conidia were collected, suspended in equal volume of water, and counted in a Neubauer camera. Values from three different experiments were used to compare the strains by the T-student test (\*\*\*\* $p < 0.001$ ).

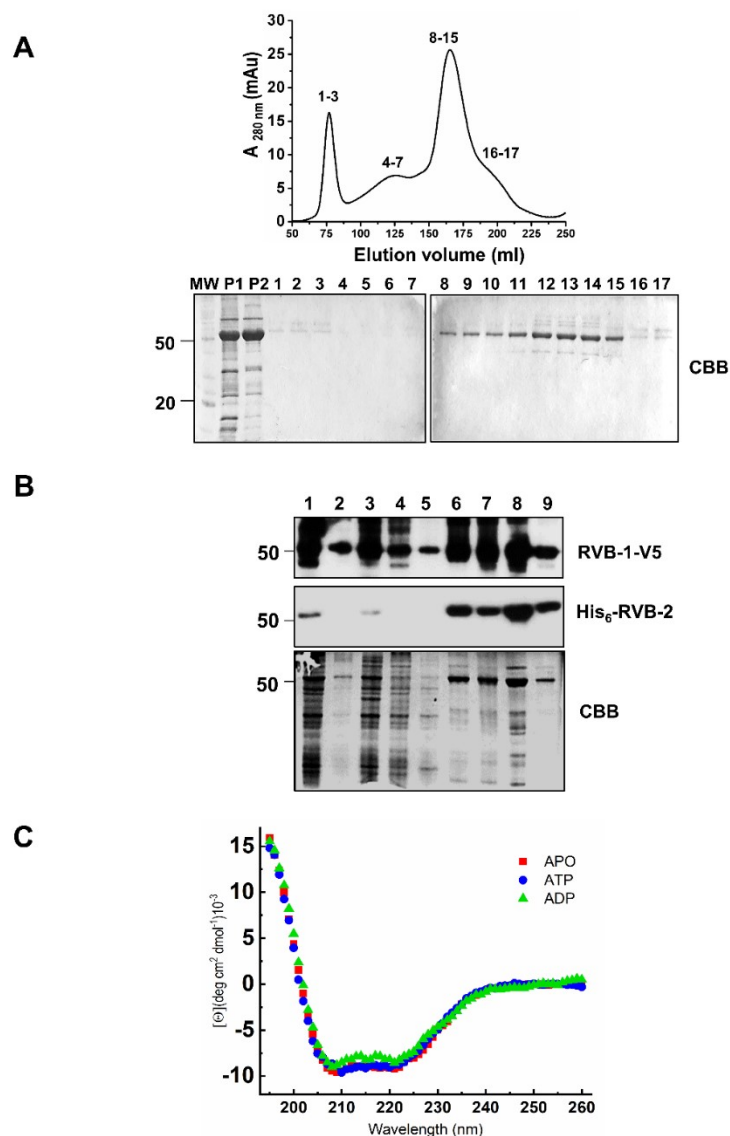


**Fig. S3.** Phenotypic analysis of the *mus52::hph* (control) and the  $\Delta rvb-1^{het}$  and  $\Delta rvb-2^{het}$  mutant strains. **(A)** Vegetative growth without agitation in VM liquid medium plus 2% sucrose and 150  $\mu$ g/ml of hygromycin. About  $10^4$  conidia were inoculated in the first day and aerial hypha extension was evaluated after 10 days at room temperature. **(B)** Race tubes assay of the *mus52::hph* and mutant strains. The strains growth was evaluated every 24 h after transferring from constant light for 12 h to constant dark (DD). Growth was performed in VM solid medium supplemented with 0.1% glucose, 0.17% arginine and 150  $\mu$ g/ml of hygromycin. **(C)** Plate growth assays.  $10^7$  conidia were inoculated at the center of plates containing VM solid medium and 150  $\mu$ g/ml of hygromycin and growth was evaluated after 24 and 48 h. **(D)** RVB-1-V5 and RVB-2-V5 expression in mycelium of strains producing V5-tagged proteins grown for 24 h. Western blot analyses using 20  $\mu$ g of total protein fractionated in a 12% SDS-PAGE and blotted with  $\alpha$ -V5 monoclonal antibody (upper panel). Ponceau S-stained gels were used as loading control (bottom panel). The numbers on the right side represent the MM in kDa. **(1)** and **(3)**, fungus strains producing V5-tagged RVB-1 and RVB-2 proteins, respectively; **(2)** and **(4)**, wild-type strain.

### **3.3. RVB-1 and RVB-2 are oligomer proteins, interact with each other and the oligomerization states are influenced by nucleotides**

To perform biochemical and biophysical assays, the *rvb-1* and *rvb-2* cDNAs were co-expressed in *E. coli* leading to the production of the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex. Due to the fact the RVB-1 and RVB-2 proteins have close MM (50 kDa for RVB-1 and 52 kDa for RVB-2), which impairs their independent visualization in SDS-PAGE gels, differently tagged-fused recombinant proteins were co-produced. Proteins were purified by affinity chromatography in a Ni<sup>2+</sup> column, based on the His<sub>6</sub>-RVB-2 affinity to the column, showing a high degree of purity (results not shown). As these proteins are described to exist in solution in different oligomerization states [43], the affinity-purified proteins were submitted to a pSEC, which allowed to obtain a protein preparation in a high purity grade (Fig. 2A). Fractions 8-15 were pooled, and the proteins further used in biochemical and biophysical assays. The proteins showed a MM slightly higher than 50 kDa in SDS-PAGE gel, consistent with the theoretical MM of both individual proteins (54 kDa for His<sub>6</sub>-RVB-2 and 52 kDa for RVB-1-V5) (Fig. 2B). The interaction between RVB-1 and RVB-2 was analyzed by Western blot using samples eluted from the affinity and size exclusion chromatography and specific antibodies for each protein. Both proteins were identified after both chromatographic procedures (Fig. 2B, lanes 6-9) confirming that RVB-1-V5 and His<sub>6</sub>-RVB-2 interact with each other.

The secondary structure content of His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex was investigated by CD experiments, and the spectrum (Fig. 2C) showed a characteristic  $\alpha$ -helix profile with minimums at 208 and 222 nm. Spectral deconvolution with Dichroweb software indicated an  $\alpha$ -helix content of approximately 30%,  $\beta$ -sheet content of 27% and 43% of random coil. The CD assays performed in the presence of ADP indicated slight changes in the spectrum, and the ATP presence does not influence the secondary structure of the protein complex (Fig. 2C). Furthermore, the

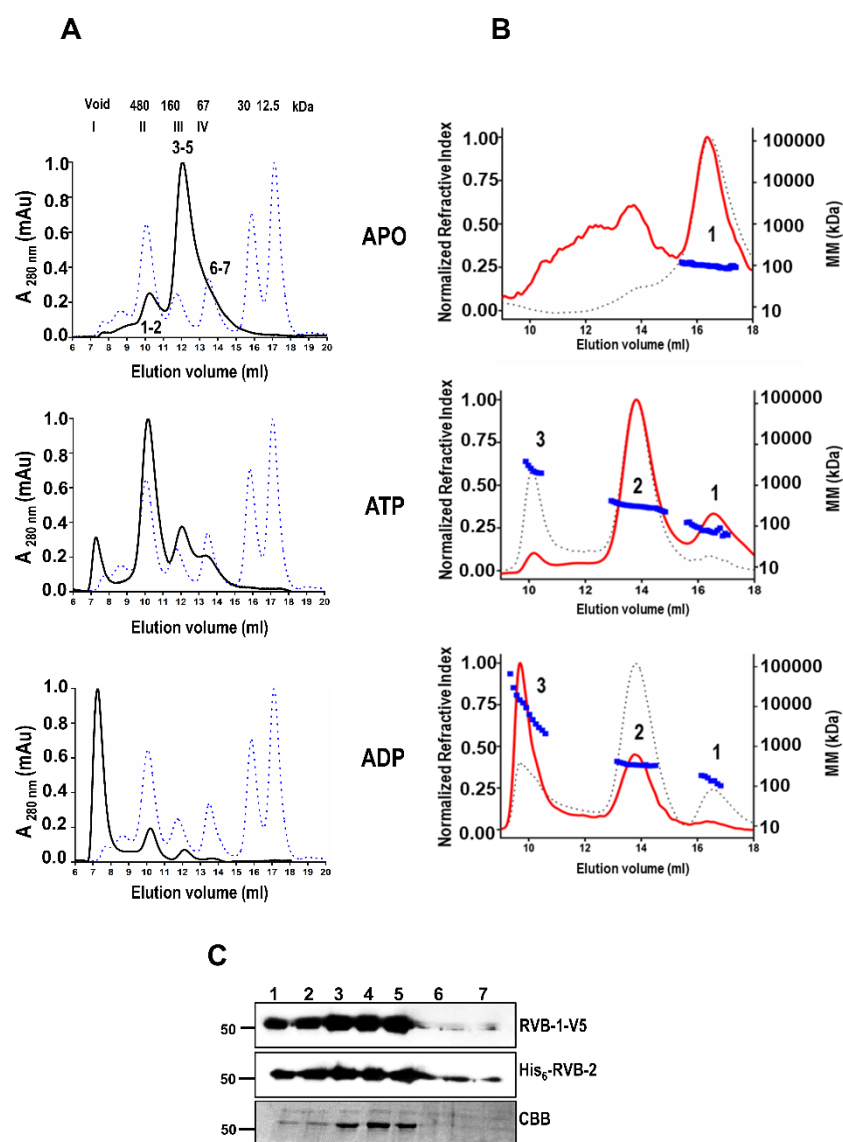


**Fig. 2. Biochemical and biophysical characterization of the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 protein complex.** (A) Preparative size-exclusion chromatography with His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 performed on HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade column coupled to FPLC system ÄKTA Prime Plus. The lower panel shows the Coomassie Brilliant Blue (CBB) stained 12% SDS-PAGE gel of the chromatographic samples indicated in the upper panel. P1 and P2 are fractions from affinity chromatography. (B) Chromatographic fractions after His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 copurification using HisTrap Chelating HP 5 ml (GE Healthcare Lifesciences). The eluted proteins after affinity chromatography were subjected to pSEC after dialysis. The steps of expression and purification were analyzed by 12% SDS-PAGE gel followed by Western blot using either the monoclonal  $\alpha$ -V5 or  $\alpha$ -His antibodies. 1. crude cell extract after sonication, 2. insoluble proteins after cell extract centrifugation, 3. supernatant after centrifugation, 4. column flow throw, 5. washing buffer, 6. eluted proteins from affinity purification, 7 and 8. protein fractions after dialysis, and 9. eluted proteins from pSEC. The numbers on the left side represent the MM in kDa. The lower panel shows the Coomassie Brilliant Blue (CBB) stained 12% SDS-PAGE gel. (C) Circular dichroism of the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex performed in the J-815 spectropolarimeter coupled with Peltier system for temperature control. The spectra were obtained in GF buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol) using 10  $\mu$ M of protein complex and a 0.1 cm circular cuvette of optical path. The data was normalized to mean residual molar ellipticity (EMR). The analyses in the presence of ATP and ADP were performed using 2 mM of each nucleotide.

secondary structure content of the RVB-1/RVB-2 complex *in silico* model agrees with the experimental assays, presenting approximately 37.3% of  $\alpha$ -helix, 21.4% of  $\beta$ -sheet and 41.3% of random coil.

To investigate the oligomeric states of the complex and the influence of nucleotides in the oligomerization we performed aSEC (Fig. 3). The elution profile (Fig. 3A, upper panel) shows the existence of two protein fractions for the complex (dark line), the major fraction showing an experimental  $MM_{app}$  of approximately 160 kDa (likely a dimer) and the minor fraction showing  $MM_{app}$  below 480 kDa (likely a hexamer), both exhibiting experimental  $MM_{app}$  higher than the theoretical for both oligomeric states (Table 1), most probably due to an elongated shape of proteins, which causes changes in the elution profile. These results suggest that the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex may predominantly exist as a dimer after the pSEC. Moreover, high MM species, likely hexamers, may also exist in solution, although at low levels. The addition of either ATP or ADP strongly affects the observed elution profile. While ATP shifts to a major specie showing an experimental  $MM_{app}$  of approximately 420 kDa (Fig. 3A, middle panel, Table 1), in the presence of ADP the major peak corresponds to proteins showing higher  $MM_{app}$ , which were eluted in the column void volume (Fig. 3A, bottom panel, Table 1). These results suggest that the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex predominantly exists as a hexamer in the ATP presence and, more likely, as a dodecamer in the ADP presence. The presence of both proteins in the chromatographic fractions corresponding to the elution peaks was confirmed by Western blot using specific antibodies for each protein (Fig. 3C).

The influence of the protein complex concentration on the oligomerization state was also investigated by varying the protein concentration from 0.1 to 10 mg/ml. We observed a major and broad peak showing a  $MM_{app}$  of 98 kDa at low



**Fig. 3. Biophysical characterization of the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 protein complex.** (A) aSEC performed on Superdex 200 GL 10/30 column in GF buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol) with and without of either ATP or ADP. Aliquots of 100  $\mu$ l of 10  $\mu$ M protein complex pre-incubated or not with either ATP or ADP were injected and eluted using a 0.8 mL/min flow rate. Apoferritin (480 kDa),  $\gamma$ -globulin (160 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), and cytochrome C (12 kDa) (Sigma-Aldrich) were used as standards for MM (represented in the upper graph), whereas Blue Dextran 2000 was used for determination of the column void volume. The dotted blue line represents the MM standards. (B) SEC-MALS performed in a static light scattering module at multiple angles miniDAWS TREOS, with Wyatt QELS detector for DLS measurements and OptiLABr EX refractive index detector for sample concentration measurements (Wyatt Tecnology Corporation). The modules are connected in line to a high-pressure liquid chromatograph (HPLC - Waters) connected to a Superdex 200 GL 10/30 column (GE Helthcare Lifesciences) for aSEC. The experiments were performed with GF buffer with or without 2 mM of ATP (middle panel) or ADP (bottom panel) and MgCl<sub>2</sub>, at a final protein concentration of 4.5 mg/ml. The runs were carried out in duplicates, at a flow rate of 0.33 ml/min. The samples were purified at 4 °C and kept on ice for the entire waiting time and the aSEC runs were carried out at 20 °C. The dotted line represents the Refractive Index, the red line the Light Scattering and the blue line the experimental Molecular Mass (kDa). (C) aSEC fractions from the APO form chromatography were fractionated by CBB stained 12% SDS-PAGE gel and subjected to Western blot using either  $\alpha$ -V5 or  $\alpha$ -His antibodies. The numbers on the left side are the MM in kDa.

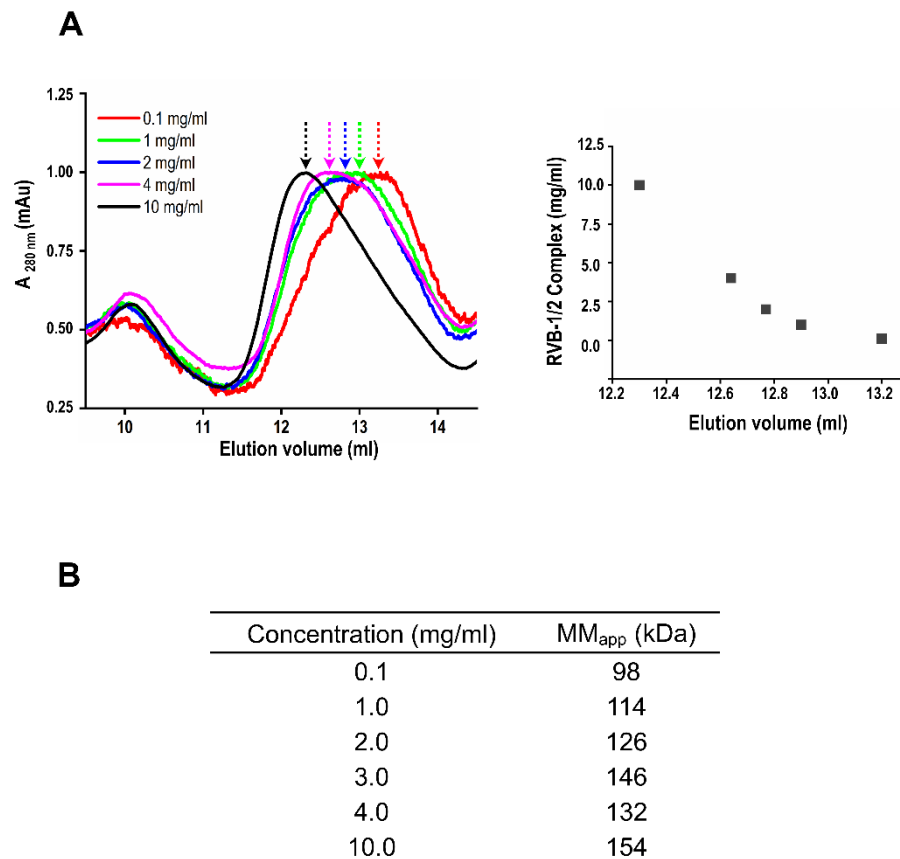
**Table 1.** Analytical size-exclusion chromatography of His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 recombinant protein complex.

Conditions	Theoretical		Experimental		
	Oligomeric State	MM (kDa)	Species <sup>a</sup>	MM <sub>app</sub> (kDa) <sup>b</sup>	MM (kDa) <sup>c</sup>
APO	Hexamer RVB-1/2	319.5	II	390 ± 20	-
	Dimer RVB-1/2	106.5	III	160 ± 10	100 ± 10
ATP	*		I	Void	Void
	Hexamer RVB-1/2	319.5	II	420 ± 20	310 ± 10
	Dimer RVB-1/2	106.5	III	170 ± 10	80 ± 40
	Monomers RVB-1 and RVB-2	52.1	IV	80 ± 05	-
ADP	*		I	Void	Void
	Hexamer RVB-1/2	319.5	II	420 ± 20	330 ± 10
	Dimer RVB-1/2	106.5	III	160 ± 10	120 ± 20
	Monomers RVB-1 and RVB-2	52.1	IV	75 ± 05	-

<sup>a</sup>Peaks eluted from aSEC experiments. <sup>b</sup>Apparent MM estimated by aSEC. <sup>c</sup>MM estimated by SEC-MALS.

concentration (0.1 mg/ml) suggesting that the complex exists in an equilibrium of dimer-monomers in solution. At higher concentration (10 mg/ml), the peak was asymmetric and eluted at lower volumes indicating that the majority form may correspond to the heterodimer with a  $MM_{app}$  of 154 kDa and suggesting that the oligomeric state of the complex may be dependent on protein concentration (Fig. S4A and S4B).

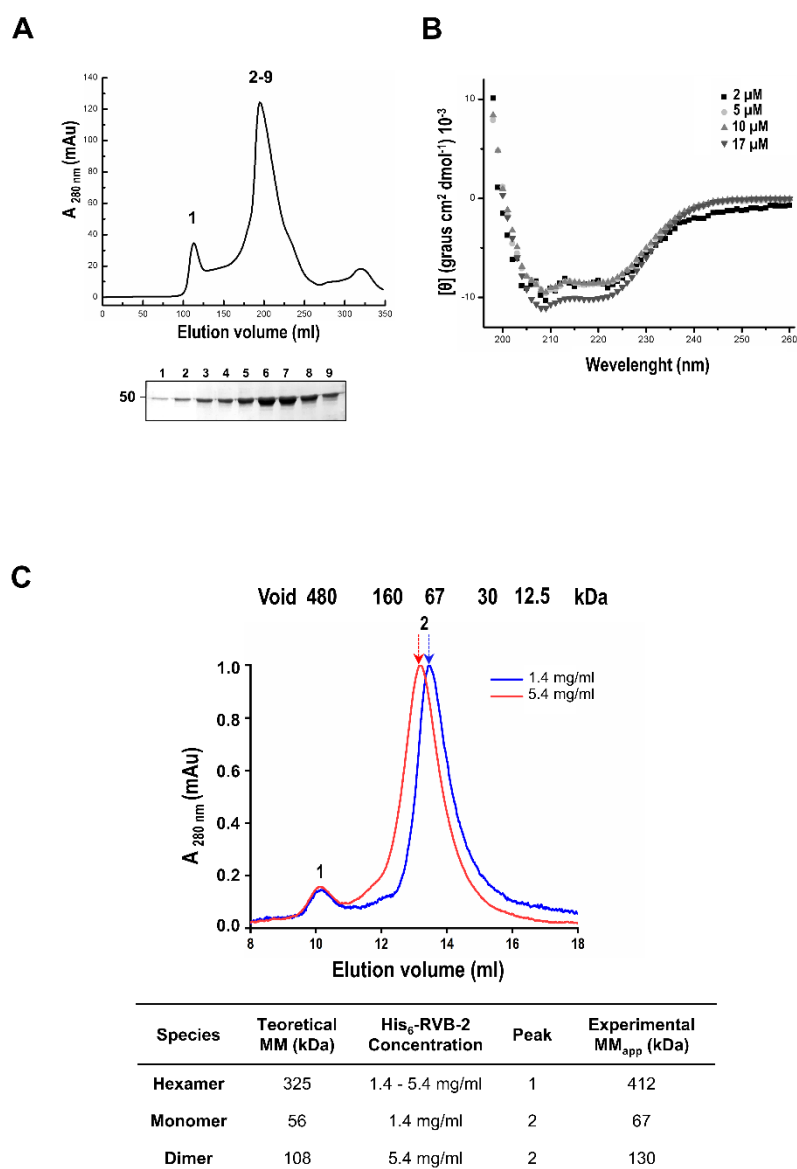
Since the qualitative nature of the aSEC experiments do not show accurate MM values when compared to the theoretical data and considering the elongated shape of RVB-1 and RVB-2 proteins, we investigated the oligomeric state of the complex by SEC-MALS experiments. In the absence of nucleotides, we observed that the samples are in an equilibrium of dimers and monomers, with an average MM of  $100 \pm 10$  kDa and polydispersity of 20% (Fig. 3B, upper panel, peak 1). This MM value is an indication that the average MM of the species present is more displaced to the dimer. In the presence of ATP, the chromatographic profile changes, as expected based on the result shown in Fig. 3A, eluting with an average MM of  $310 \pm 10$  kDa and polydispersity of 5% (Fig. 3B, middle panel, peak 2). This profile indicates that in the presence of ATP, the RVB-1/2 complex is organized mainly in the form of a hexamer (theoretical MM of 318 kDa), representing 94.5% of the injected mass. However, about 5% of the sample eluted on the void volume form a large oligomer, with a MM greater than 1,000 kDa (Fig. 3B, middle panel, peak 3). A small fraction elutes in a volume likely corresponding to dimer-monomer peak, with MM  $80 \pm 30$  kDa and polydispersity of 20%. The MM values in the presence of ATP agree with the elution profile observed in the aSEC assay, suggesting that in the presence of ATP the complex is organized mainly as a hexamer.



**Fig. S4.** The oligomeric state of His6-RVB-2-RVB-1-V5 complex is dependent on protein concentration. **(A)** Different concentrations of protein complex were fractionated by aSEC experiments in GF buffer. The arrows point to the elution of the major peak (left panel). Concentration protein vs. elution volume was plotted (right panel). **(B)** Calculated  $MM_{app}$  obtained for each complex concentration.

In the presence of ADP, we observed an elution profile like the one in the presence of ATP with a MM of the order  $330 \pm 10$  kDa (Fig. 3B, bottom panel, peak 2) and polydispersity of 6.7%, which represents about 60% of the injected mass. However, there is a considerable increase in the high fraction eluting in the column void volume with MM ( $\sim 10,000$  kDa) (Fig. 3B, bottom panel, peak 3) estimated to be about 20% of the injected mass. In addition, about 4% of the recovered mass elutes with a MM of  $120 \pm 20$  kDa (Fig. 3B, bottom panel, peak 1) and polydispersity of 24%, which most likely correspond to a dimeric fraction.

The His<sub>6</sub>-RVB-1 and His<sub>6</sub>-RVB-2 recombinant proteins were also individually produced in *E. coli*; however, because His<sub>6</sub>-RVB-1 was highly unstable during the purification steps, only His<sub>6</sub>-RVB-2 was partially characterized (Fig. S5). Recombinant His<sub>6</sub>-RVB-2 was produced at high levels in a highly homogenous preparation as shown by the presence of one major elution peak (Fig. S5A). CD results showed a characteristic  $\alpha$ -helix profile, which was slightly influenced by the protein concentration (Fig. S5B). Due to the instability under the experimental conditions used to analyze the ATPase activity, we were not able to precisely quantify such activity for the His<sub>6</sub>-RVB-2 protein. The aSEC profile showed the presence of a predominant peak of approximately 67 kDa when a protein concentration of 1.4 mg/ml was used suggesting that the protein predominantly exists as a monomer in solution. However, a protein fraction exhibiting higher MM<sub>app</sub> (130 kDa) was achieved at higher concentration (5.4 mg/ml), and a minor peak of high MM<sub>app</sub> (412 kDa) was observed in all protein concentrations suggesting that it may also exist in solution as a hexamer (Fig. S5C). All results indicate that, similar to what was described for the complex, the His<sub>6</sub>-RVB-2 oligomerization is dependent on protein concentration.

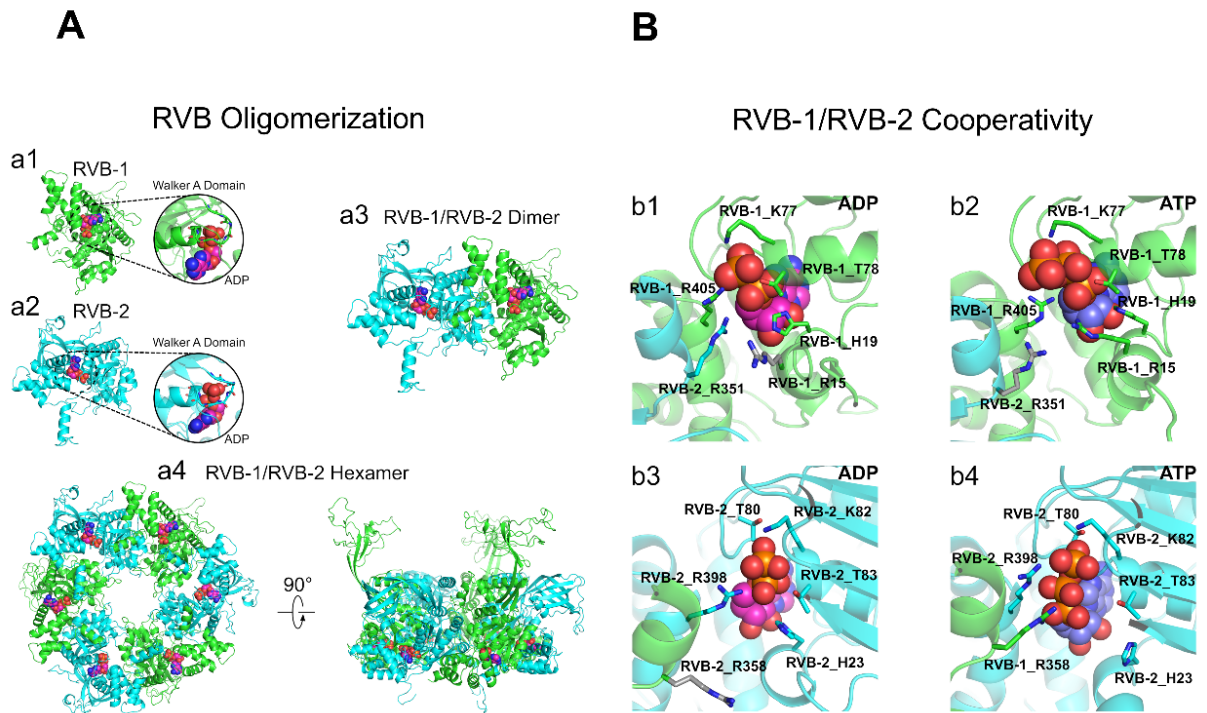


**Fig. S5.** Partial characterization of His<sub>6</sub>-RVB-2 recombinant protein. The protein was produced in *E. coli* and purified by Ni<sup>+2</sup> affinity purification. **(A)** Preparative size-exclusion chromatography with His<sub>6</sub>-RVB-2 performed on HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade column coupled to FPLC system ÄKTA Prime Plus. The chromatographic samples 1 to 9 were fractionated in 12% SDS-PAGE gel stained with Coomassie Brilliant Blue (lower panel). The number on the left side is the MM in kDa. **(B)** CD experiments performed in J-815 spectropolarimeter coupled with Peltier system. The spectra were obtained in GF (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol) buffer using 2, 5, 10 and 17 μM of His<sub>6</sub>-RVB-2 protein and a 0.1 cm circular cuvette of optical path. The data were normalized to mean residual molar ellipticity (EMR). **(C)** Analytical size-exclusion chromatography performed on Superdex 200 GL 10/30 in GF buffer using 1.4 and 54 mg/ml of His<sub>6</sub>-RVB-2. Apoferritin (480 kDa), γ-globulin (160 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), and cytochrome C (12 kDa) (Sigma-Aldrich) were used as standards for the MM, and Blue Dextran 2000 was used for the determination of the void volume of the column, represented upper the graph. The numbers represent de species eluted from aSEC and the values above the graph represent the theoretical MM standard proteins. The experimental MM<sub>app</sub> from aSEC experiment under different His<sub>6</sub>-RVB-2 protein concentrations is represented below the graph.

### **3.4. Molecular modeling suggests an intermonomer cooperativity of RVB-1 and RVB-2 in the presence of nucleotides**

The structural model of RVB-1/RVB-2 was built by molecular modeling using the *Chaetomium thermophilum* ctRvb1 and ctRvb2 as a template (PDB id 4WW4) [10], as it showed the higher identity among RVB proteins. In agreement with that, Swiss-Model results showed an identity of 89.69 % and coverage 0.99, yielding a high-quality model. The missing loops were modeled, and ADP molecules were added to obtain the final monomeric models of RVB-1 and RVB-2. The ability of RVB-1 and RVB-2 to oligomerize is reported by experimental results, resulting in heterodimers or hexamers. The structural organization of these oligomeric forms was obtained by crystallographic symmetry and can be visualized in detail in Fig. 4A.

The hexameric model was used to study how the ATP-binding sites of RVB-1 and RVB-2 behave in the presence of either ADP or ATP using Molecular Dynamics (MD) simulations. The Walker A domain of RVB proteins is the binding site of ATP molecules [6]. In the present work, MD simulations revealed that this domain binds to either ADP or ATP molecules by embracing their phosphate substitutions through their mainchain nitrogen atoms, maintaining them tightly bound to the protein (Fig. 4A1-4). According to this, the prevalence of contacts of the segments corresponding to the Walker A domain, G71-A79 for RVB-1 and G75-A84 for RVB-2, showed values above 95%, emphasizing the participation of this region to stabilize either ADP or ATP molecules. The stabilization of either ADP or ATP inside the sites of RVB-1 and RVB-2 induced different conformational changes in the proteins, and such changes can be important to understand how the ligand affects the dimeric interface of both proteins. MD simulations also showed that some residues are important to stabilize



**Fig. 4. Structural aspects of the *N. crassa* RVB proteins.** (A) RVB-1 and RVB-2 proteins were modeled as dimers using the *C. thermophilum* RVB proteins as templates, resulting in a high-quality model. RVB-1 and RVB-2 are shown as cartoons in green (a1) and cyan (a2), respectively. Both RVB-1 and RVB-2 possess a common ATP-binding site called Walker A domain, which was modeled as ADP molecules, shown as spheres in magenta (a1 and a2). These proteins have the ability to oligomerize in heterodimers (a3) and further hexamers (a4). (B) MD simulation study suggests that RVB-1 and RVB-2 cooperate to stabilize either ADP or ATP molecules. For each RVB protein, the ATP-binding site was filled with ADP or ATP molecules, shown as spheres in magenta (b1 and b3) or purple (b2 and b4), respectively.

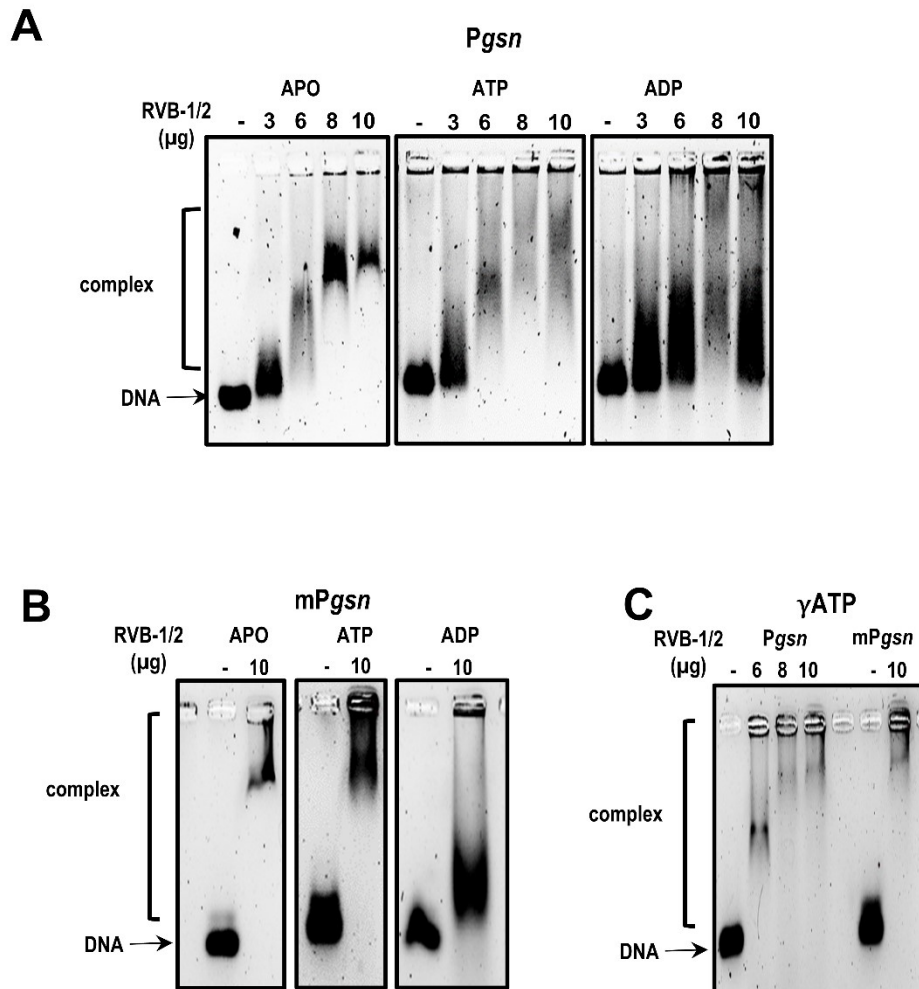
both nucleotides, the H19, K77, T78 and R405 residues in RVB-1 and the H23, S79, T80, K82 and T83 residues in RVB-2 (Fig. 4B1-4). However, depending on the molecule bound in the ATP-binding site, RVB monomers can cooperate to stabilize either ADP or ATP molecules. When ADP is bound to RVB-1, the R351 residue in RVB-2 contacts with ADP in 26.8% of the time, while when ATP is bound, the participation of the same residue decreases to 4.4% (Fig. 4B1). Rearrangements inside RVB-1 are also observed, with R15 changing from a conformation that never interacts with ADP to one in contact with ATP during 11.4% of time (Fig. 4B2). Similarly, when ATP is bound to RVB-2, the participation of RVB-1 R358 residue increases from 2.9 to 22.6% (Fig. 4B3, 4B4).

### **3.5. RVB-1-RVB-2 complex binds dsDNA and exhibits ATPase activity**

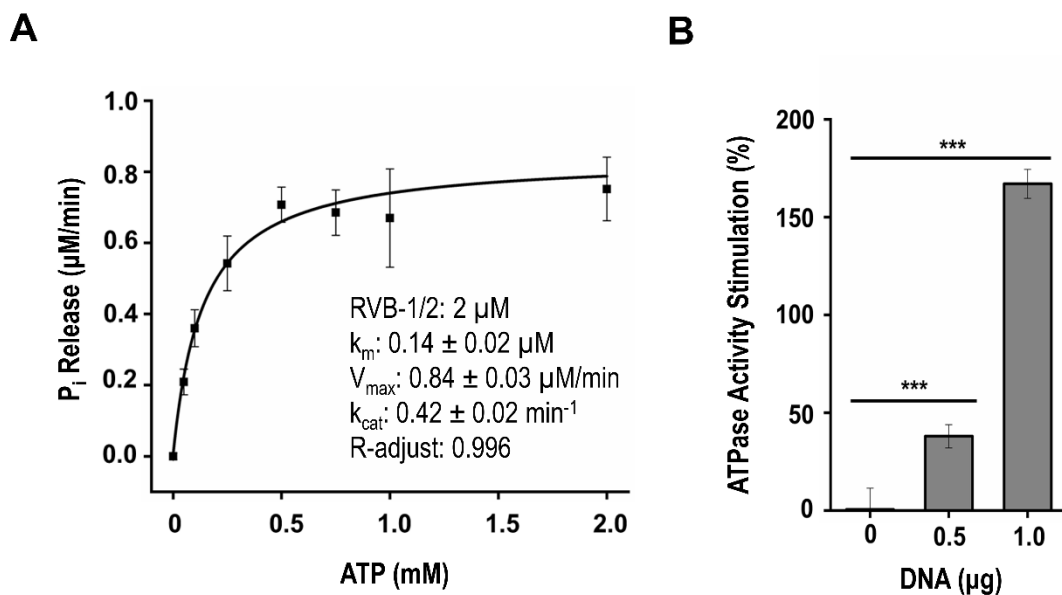
As previously mentioned, the RVB-1 was identified as a protein present in *N. crassa* crude nuclear extract and was reported to bind to DNA fragments of the *gsn* (glycogen synthase gene) promoter [18]. Binding ability was previously demonstrated by analyzing the formation of DNA-protein complex using a fragment of the *gsn* promoter containing the STRE motif (5'-AGGGG-3'). In *S. cerevisiae*, this motif is present in promoters of stress responsive gene [44]. In this work, we investigated the dsDNA binding ability of the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex by gel mobility shift assay using the same oligonucleotide (*Pgsn*) as before [18] and different protein concentrations. A DNA-protein complex started to be observed at low protein concentration (3 μg), and the complex levels increased up to a maximum of 8 μg (Fig. 5A, left panel). The presence of ATP, which favors the hexamer oligomerization state (see Fig. 3B, middle panel), seems not to influence the protein complex binding to the dsDNA fragment (Fig. 5A, middle panel). This result suggests that the ATPase activity may not influence the binding ability of the protein complex to the dsDNA fragment. On the other hand, the ADP presence, which shifts the oligomerization state from a dimer to large oligomers (see Fig. 3B, bottom panel), seems to impair the formation of dsDNA-protein complex (Fig. 5A, right panel). The gel shift performed in the presence of a mutant DNA fragment (*mPgsn*), in which the STRE motif core sequence (5'-AGGGG-3') was mutated to 5'-CTTTT-3', showed that the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex binds dsDNA in a sequence unspecific manner (Fig.

5B). In addition, the complex formation was also impaired in the ADP presence. We confirmed the result that the dsDNA binding was independent of the energy from the hydrolysable ATP by performing the reaction in the presence of a non-hydrolysable ATP (ATP $\beta,\gamma$ -imido) (Fig. 5C). In this case, similar results to those in the absence of ATP (Fig. 5A, APO) were observed, and the protein binding to dsDNA was again independent of the DNA fragment used in the binding reaction (either *Pgsn* or *mPgsn*) (Fig. 5C).

As the protein members of the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex belong to the AAA+ protein family, we evaluated the ATPase activity of the complex by quantifying the P<sub>i</sub> released after ATP hydrolysis. The Fig. 6A shows the experimental data for the ATPase activity as a function of the ATP concentration, and the fitting of the experimental data for a Michaelis-Menten. The fitting routine yielded a V<sub>max</sub> of 0.84 ± 0.03 μM/min, a k<sub>cat</sub> of 0.42 ± 0.02 min<sup>-1</sup> and a K<sub>M</sub> of 0.14 ± 0.02 μM (Fig. 6A, inset). The data also shows the adjustment from the experimental data to a Lineweaver-Burk plot presenting a good relation to a linear model, as can be observed by the R-adjust value (Fig. 6A, inset). The ATPase activity was also quantified in the presence of DNA using the same fragment used in the EMSA at concentrations of 0.5 and 1.0 μg and 0.5 mM ATP. The activity was highly increased in the presence of DNA, reaching almost 170% of stimulation at 1.0 μg of DNA (Fig. 6B).



**Fig. 5. The His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex binds *in vitro* to dsDNA in an ATP/ADP-independent manner. (A-C).** Binding of the protein complex to DNA fragments by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **(A)** Binding assay to the *Pgsn* DNA fragment. Increased amounts (3-10  $\mu$ M) of the protein complex were incubated for 1 h at 30 °C with the 156 bp double-stranded DNA fragment. Assay was performed in the absence (APO) and in the presence of either ATP or ADP (2 mM). **(B)** Binding assay to the *mPgsn* DNA fragment. An amount of 10  $\mu$ M of the protein complex was incubated with the DNA fragment and the assay was performed in the absence (APO) and in the presence of either ATP or ADP (2 mM). **(C)** Binding assay to the *Pgsn* and *mPgsn* DNA fragments in the presence of non-hydrolysable ATP (ATP $\beta,\gamma$ -imido). After incubation, all samples were fractionated in a 3% agarose gels in 0.5% TBE buffer stained with ethidium bromide.

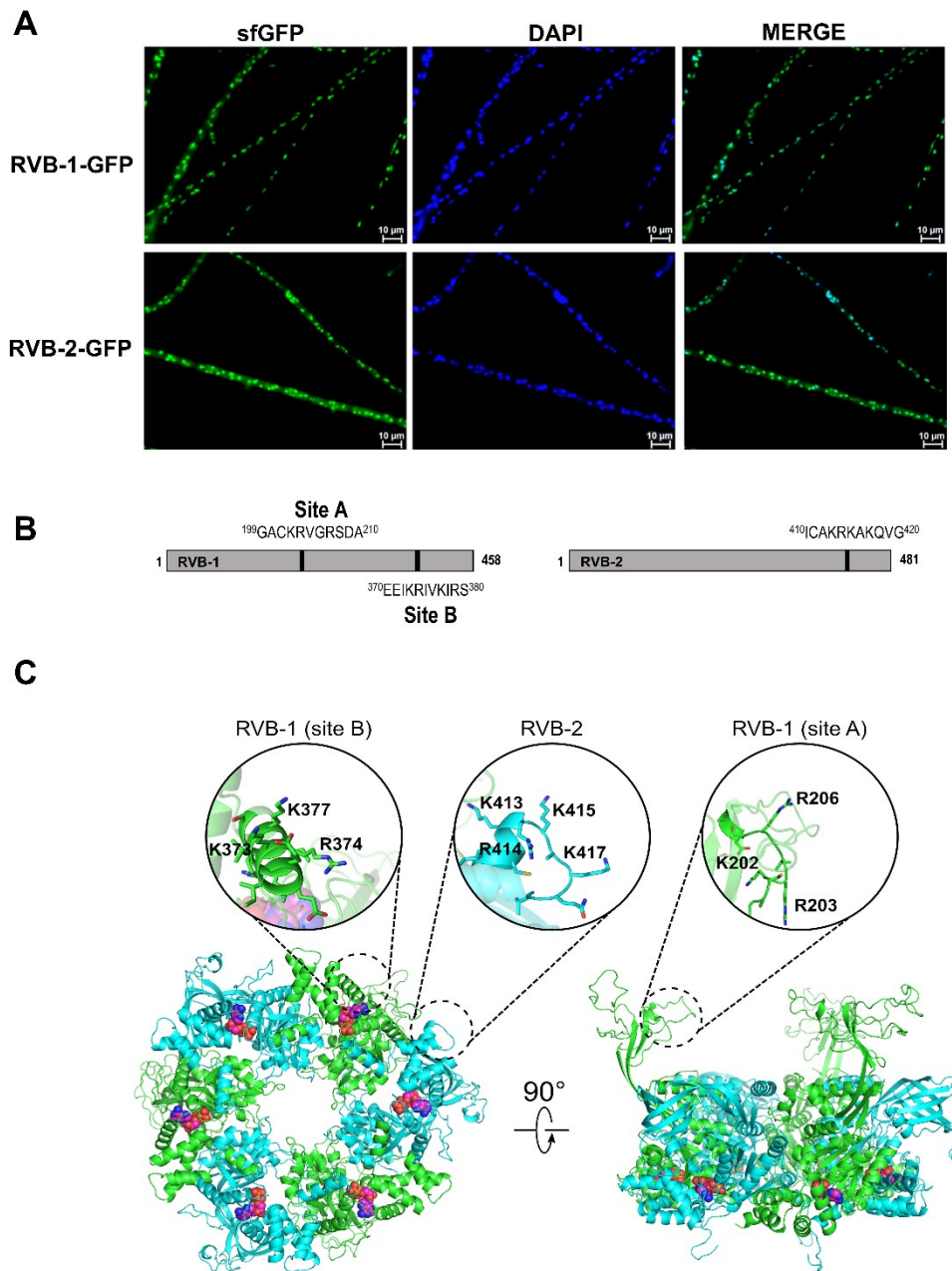


**Fig. 6. The His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex exhibits ATPase activity and the activity is stimulated by DNA.** (A) ATPase activity of the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex. The amount of 2 μM (approximately 1 μM of each RVB-1/2 proteins) protein complex was incubated with ATP (0-2 mM) for 25 min at 30 °C, and the P<sub>i</sub> released as a result of ATP hydrolysis was quantified. The data were treated through Michaelis-Menten fitting for determination of the kinetic parameters, which are presented in the graph. (B) ATPase activity of the His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex in the presence of DNA. The amount of 2 μM (approximately 1 μM of each RVB-1/2) protein complex was incubated with 0.5 mM of ATP and different concentrations of the 156 bp dsDNA for 25 min at 30 °C. The P<sub>i</sub> released as a result of ATP hydrolysis was quantified and compared to the reaction without DNA. The experiment was performed in triplicate and the results represent the percentage of activity stimulation in the presence of DNA. Triplicate values from two independent experiments were used for comparison by the T-student test (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

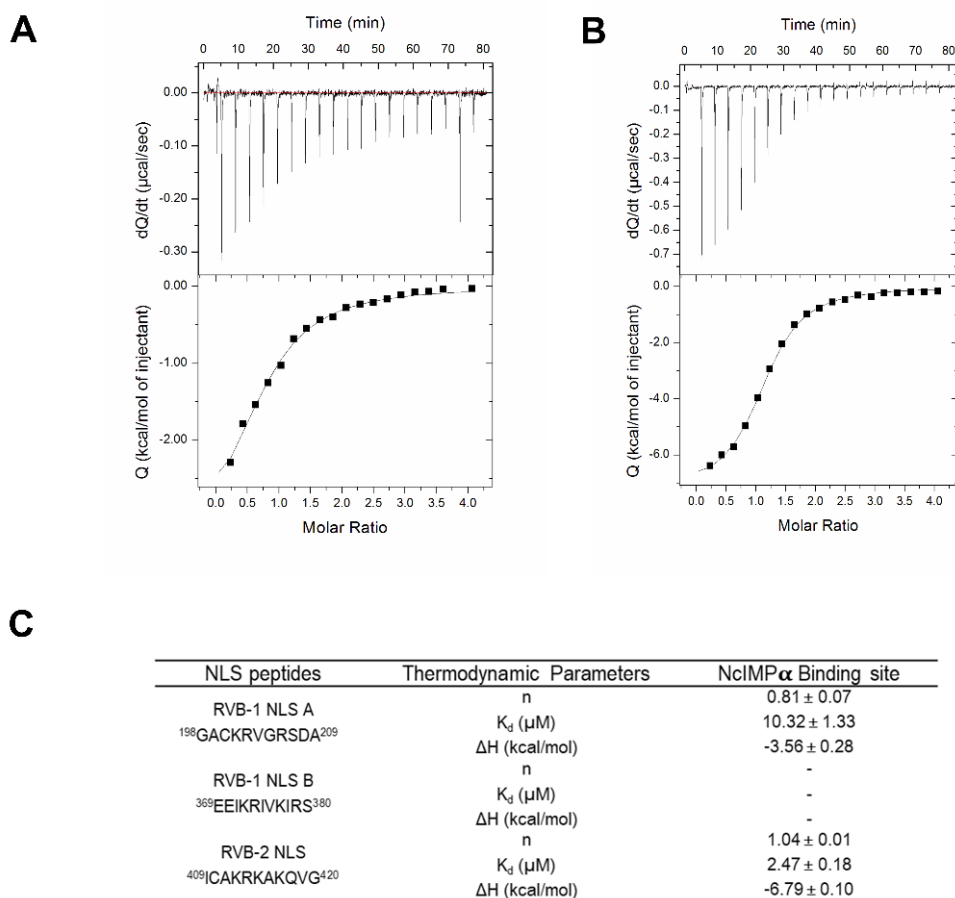
### 3.6. RVB-1 and RVB-2 are nuclear proteins and their NLSs bind to *N. crassa* Importin $\alpha$ (NcIMP $\alpha$ )

To investigate the protein location, we constructed wild-type strains endogenously expressing GFP-tagged RVB-1 and RVB-2 proteins (*rvb-1-gfp* and *rvb-2-gfp*). No phenotypic changes were observed in the tagged strains compared to the wild-type (results not shown). Both proteins predominantly localized in the cell nucleus under normal growth conditions (Fig. 7A). Protein translocation from cytoplasm to nucleus involves the importin  $\alpha$  and  $\beta$  proteins, which recognize cargo proteins that contain nuclear localization signal (NLS) and translocate them into the nucleus. We identified two putative NLSs in RVB-1 and one in RVB-2 (Fig. 7B). The localization of the RVB-1 and RVB-2 NLSs at the 3D protein structure revealed that all studied NLSs (RVB-1 sites A and B and RVB-2 site) are exposed to the solvent. However, RVB-1 NLS-site B sequence is located in an  $\alpha$ -helix, which prevents its binding to importin- $\alpha$  since the sequence needs to be in an extended conformation to interact with the importin- $\alpha$  (Fig. 7C).

We also *in vitro* analyzed the interaction between *N. crassa* importin- $\alpha$  (NcIMP $\alpha$ ) and peptides corresponding to putative nuclear localization signals (NLSs) of both proteins. In this assay, the interaction of recombinant NcIMP $\alpha$  with the three NLSs peptides was analyzed by ITC to obtain the dissociation constant and the thermodynamic values for the formation of this complex. ITC data revealed a sigmoidal isotherm for the NcIMP $\alpha$  binding to RVB-1 NLS <sup>199</sup>GACKRVGRSDA<sup>209</sup> (site A) and for the NcIMP $\alpha$  binding to RVB-2 NLS <sup>410</sup>ICAKRKAKQVG<sup>420</sup> (Fig. 8A and 8B), resulting in dissociation constants (Kd) of  $10.32 \pm 1.33 \mu\text{M}$  (RVB-1 NLS) and  $2.47 \pm 0.18 \mu\text{M}$  (RVB-2 NLS) with a stoichiometry of  $0.81 \pm 0.07$  (RVB-1 NLS) and  $1.04 \pm 0.01$  (RVB-2 NLS) (Fig. 8C). The titration data of the RVB-1 and RVB-2 NLS peptides to NcIMP $\alpha$  showed similar Kd values to ITC assays of NcIMP $\alpha$  and NLS peptides from proteins previously analyzed [45-47]. ITC data also demonstrated exothermic  $\Delta\text{H}$  values for the binding of both peptides with NcIMP $\alpha$  (Fig. 8C). NcIMP $\alpha$  was not able to bind to RVB-1 NLS <sup>370</sup>EEIKRIVKIRS<sup>380</sup> (site B) indicating that only site A is a real NLS, supporting the structural data shown in Fig. 8C. In summary, the RVB-1 and RVB-2 NLSs are able to bind to NcIMP $\alpha$  indicating that both proteins can be translocated to the nucleus using the classical import pathway [48].



**Fig. 7. RVB-1 and RVB-2 are nuclear proteins.** (A) Conidia from the *rvb-1-gfp* and *rvb-2-gfp* strains were grown on coverslips in liquid VM medium containing 2% sucrose at 30°C for 8 h. Mycelia were fixed in PBS with formaldehyde, the nuclei were stained with DAPI (0.5 mg/ml), and the fluorescence was evaluated using the AXIO Imager.A2 microscope (Zeiss) at a magnification of 100 X. (B) Schematic representation of RVB-1 and RVB-2 and the localization of their putative NLSs sequences. (C) NLS regions of the RVB proteins. The structural localization of NLS regions identified in both RVB-1 and RVB-2 are shown in the hexameric form of RVB bound to ADP. RVB-1 showed two NLS sites, called site A and site B, while RVB-2 showed only one site. Every site is shown in detail, evidencing the positively charged residues that are conserved in NLS of proteins. RVB-1, RVB-2 and ADP are shown in green, cyan and purple, respectively.



**Fig. 8. RVB-1 and RVB-2 NLS peptides bind to NcIMP $\alpha$ .** (A) ITC of RVB-1 NLS <sup>199</sup>GACKRVGRSDA<sup>209</sup>. The upper panel shows the analysis of the RVB-1 NLS peptide binding to NcIMP $\alpha$ . Raw power output ( $\mu$ cal/s) per unit time (min) of replicate titrations (thermal power as a function of time). The bottom panel displays the integrated data (kcal/mol of injectant versus molar ratio of RVB-1 NLS to NcIMP $\alpha$ ). (B) ITC of RVB-2 NLS <sup>410</sup>CAKRKAKQVG<sup>420</sup>. The upper panel shows the analysis of the RVB-2 NLS peptide binding to NcIMP $\alpha$ . Raw power output ( $\mu$ cal/s) per unit time (min) of replicate titrations (thermal power as a function of time). The bottom panel displays the integrated data (kcal/mol of injectant versus molar ratio of RVB-1 NLS to NcIMP $\alpha$ ). These data were obtained from the raw power output as the area underneath each peak, which was then corrected for baseline heat injections and NIT-2 NLS dilution heat and mixing. The solid lines represent the best fit of the data. (C) ITC data showing the dissociation constant and the thermodynamic values for the three peptides analyzed.

## 4. DISCUSSION

Since their first identification, the RVB proteins are described as apparently involved in distinct biological events, with focus in the cancer context; however, their precise functional roles are not completely understood. As members of the AAA+ protein superfamily, they are active ATPases; moreover, they may also exhibit DNA helicase activity. A number of studies have reported their characterization using recombinant proteins produced either individually or together in a complex and the influence of tags on their biochemical properties and structural organization. The comparison to untagged versions may explain the contradictory results reported mainly regarding their structural organization. For example, the *Saccharomyces cerevisiae* untagged Rvb1 and Rvb2 proteins were individually produced, and when mixed the complex assembled predominantly as a single heterohexameric ring with a low proportion of dodecamers [49,50]. In addition, the complex exhibits both ATPase and DNA helicase activities [50]. On the other hand, the yeast His-tagged complex was characterized as heterododecamers after cryo-electron microscopy and exhibited ATPase activity [50,51]. The human RUVBL1/TIP49 and RUVBL2/TIP48 proteins, on the other hand, which share high identity to the yeast orthologs proteins, were characterized using complexes containing either tagged or untagged proteins. While the single-tagged complex (RUVBL1/ RUVBL2-His) assembled as a high molecular mass oligomer, probably a dodecamer [8], the untagged protein complex contained single and double hexamers, were shown to exist in different oligomeric forms, whose assembly could be regulated by the II domain [9]. Cryo-electron microscopy structures of the untagged complex revealed the coexistence of two conformations of the dodecameric complex, a compact and a stretched conformation, which could regulate the exposition of DII domain [52]. The lack of DNA helicase activity was also reported for the human complex [8] and for the RUVBL1/TIP49 [6]; however, a robust DNA helicase activity was described for the rat RUVBL1 (TIP49a) protein individually produced [2,53].

In the present study, we characterize the RVB-1 and RVB-2 proteins from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. They are both essential proteins, and the heterokaryotic cells exhibit several phenotypic defects suggesting their participation in cellular processes related to growth and development. Although orthologous

proteins are described to be involved in diverse cellular processes, the most studied biological function for this protein family regards to transcriptional control as they are components of several chromatin remodeling complexes, such as the INO80, SWR-C/SRCAP, and TIP60/NuA4 complexes [54]. They are also component of the R2TP complex described in yeast and in higher eukaryotes. In yeast, besides the Rvb proteins, the R2TP complex is formed by two additional proteins, Pih1 (*Protein interacting with Hsp90*) and Tah1 (*TPR-containing protein associated with Hsp90*), both interactors of Hsp90, a molecular chaperone involved in folding and assembly of proteins and complexes [5,55]. However, Pih1 and Tah1 orthologous proteins were not identified in the *N. crassa* genome, which makes this fungus an excellent model organism to investigate the RVB-1 and RVB-2 partners proteins; therefore, to identify cellular functions not yet described for these proteins.

In this work, the proteins were individually produced and co-expressed in *E. coli* fused to short tags (His<sub>6</sub>-RVB-2-RVB-1-V5 complex). Both proteins exhibited low stability when individually expressed, mainly His<sub>6</sub>-RVB-1, impairing its characterization. However, when co-expressed, the protein complex showed high stability and displayed ATPase activity suggesting that they may exist as an active complex in the cellular environment and that the complex is required for function. Although both proteins exhibited high identity when compared to the yeast and human orthologs, differences in the oligomerization states of the *N. crassa* proteins were observed. While the yeast and human orthologs exhibit a high molecular mass oligomer, as above mentioned, the *N. crassa* proteins exist as low molecular mass oligomer, most likely a dimer, under the experimental conditions used in our aSEC and SEC-MALS experiments (Figure 2, Table 1). In addition, our results clearly demonstrate that, similar to the human protein [9], the ATP and ADP nucleotides influence the complex oligomerization state, shifting the oligomerization state to high molecular mass forms. In yeast, nucleotides do not influence the proteins oligomerization; rather than, the proteins undergo nucleotide-dependent conformational changes as shown by electron microscopy [49]. The hugely increased ATPase activity in the presence of a linear dsDNA fragment exhibited by the *N. crassa* RVB-1/2 complex is a very interesting property of the fungus proteins that requires further investigation. It is important to mention that the ATPase activity of yeast proteins is not affected by different DNA molecules; dsDNA with 5' or 3'

overhangs only allowed to support activity for longer times [49]. On the other hand, the RUVBL1 (TIP49a) human protein, individually produced, exhibited a weak ATPase activity that was strongly stimulated by the presence of ssDNA [53].

The structural effect induced by nucleotides bound to RVB proteins is evidenced by crystallographic studies in complex to ADP or ATP molecules. Such molecules promote a rearrangement of the nucleotide-binding site caused by an approximation of a region from the adjacent monomer containing an arginine, called arginine finger [6,10]. The arginine finger is a domain conserved in many members of AAA+ proteins, highlighting its relevance in the activity of these proteins by participating in ATP hydrolysis and hexamer stability [56]. Further, mutagenesis studies in a bacterial AAA+ ATPase showed the importance of this region to promote global structural changes in the proteins necessary to express their activity [57]. In the present work, MD simulations showed how the arginine finger can behave differently according to the nucleotide bound to either RVB-1 or RVB-2, suggesting cooperativity between monomers (Fig. 4b). In RVB-2, we observed that the arginine finger from the adjacent monomer (R358 in RVB-1) tends to approximate to the site when ATP is bound (Fig. 4b4), being able to participate in ATP stabilization for hydrolysis. However, in RVB-1, the arginine finger of RVB-2 (R351) was preferentially near to the ATP-binding site in the presence of ADP (Fig. 3b1). Interestingly, the arginine finger interacts with ADP in some other AAA+ proteins like p97 [58] and human RUVBL1 [59], which could explain the ability of the arginine finger to interact with the nucleotide-binding site even when ADP is present. These local alterations of the ATP-binding site may lead to large conformational changes [60] that can be related to relevant functional activities for these proteins, such as binding to partner proteins [58] or to DNA fragments, modulating their ATPase activity, as we show here for the dsDNA fragment (Fig. 4a, b).

## 5. CONCLUSIONS

In the present study we characterize the RVB-1 and /RVB-2 proteins from the *N. crassa* filamentous fungus. They are essential proteins, and the heterokaryotic strains exhibit phenotypic defects related to growth and development. The high instability of the individually produced recombinant proteins suggests that they may

function *in vivo* as a protein complex. Biochemical and biophysical approaches, used to evaluate their structural properties, show that they are mainly present as a dimer in solution, and the ATP/ADP nucleotides strongly influence the complex oligomerization. Molecular Dynamics (MD) studies revealed that ATP/ADP nucleotides induce conformational changes in the proteins, which affect the complex dimeric interface and may explain the differences in oligomerization. In addition, also revealed the contribution of amino acid residues important for nucleotides stabilization. Although both proteins show high identity to orthologous proteins, some of biochemical properties exhibited by the fungus proteins, such as the influence of nucleotides on the oligomerization state and the strong activation of DNA in the ATPase activity of the complex suggest that the fungus proteins may be more correlated to orthologous proteins from higher eukaryotes. The RVB-1 protein was previously identified in an approach to search for proteins involved in stress response, and the phenotypic defects exhibited by the fungus mutant strains indicate that *N. crassa* might be an excellent model organism for further investigating additional biological functions of this protein complex.

## **Funding**

Funding for this work was provided by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2008/57566-8 and 2013/24705-3 (to MCB) and 2017/26131-5 (to JCB) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for fellowship to JEMC. MCB is a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellow.

## **Author contributions**

JEMC performed most of the experiments and analyzed data. JEMC, VTRK and SLRJ performed the CD, aSEC, ATPase and SEC-MALS experiments under supervision of JCB. JEMC and PAM worked on proteins cloning and expression. ACB worked on ITC experiments and analyses under supervision of MRMF. AASG worked on molecular modeling and molecular dynamic simulations under supervision of MRMF. FZF contributed to cloning and protein expression. MCB wrote the manuscript with contributions of JCB, MRMF and AASG. MCB provided financial support to the work. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## **Acknowledgements**

We would like to thank the Fungal Genetics Stock Center (Manhattan, Kansas, MO, USA) for the *N. crassa* strains. We also thank Dr. Ana Paula Ulian Araújo, Instituto de Física de São Carlos, USP, São Carlos, SP, Brazil, for providing the pRSFDuet-1 plasmid and for the discussions. We also thank Antonio Tarcisio Delfino for technical assistance.

## **Conflicts of interest**

The authors declare no competing interest related to this manuscript.

## **Author agreement**

All authors read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

- 1 Qiu, X.B., Lin, Y.L., Thome, K.C., Pian, P., Schlegel, B.P., Weremowicz, S., Parvin, J.D., Dutta, A. (1998) An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J. Biol. Chem.* **273**, 27786-27793
- 2 Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Matsu-ura, T., Makino, Y., Masani, A., Okazaki, K., Morishita, T., Tamura, T.A. (1999) TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a. *J. Biol. Chem.* **274**, 22437-22444
- 3 Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O., Usseglio, F., Rothbacher, U., Aragnol, D., Kemler, R., Pradel, J. (2000) Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signaling activity. *EMBO J.* **19**, 6121-6130
- 4 Huen, J., Kakihara, Y., Ugwu, F., Cheung, K.L., Ortega, J., Houry, W.A. (2010) Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes. *Biochem. Cell Biol.* **88**, 29-40
- 5 Nano, N., Houry, W.A. (2013) Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* **368**, 20110399
- 6 Matias, P.M., Gorynia, S., Donner, P., Carrondo, M.A. (2006) Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.* **281**, 38918-38929
- 7 Gorynia, S., Bandejas, T.M., Pinho, F.G., McVey, C.E., Vonrhein, C., Round, A., Svergun, D.I., Donner, P., Matias, P.M., Carrondo, M.A. (2011) Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine-the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J. Struct. Biol.* **176**, 279-291
- 8 Puri, T., Wendler, P., Sigala, B., Saibil, H, Tsaneva, I.R. (2007) Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J. Mol. Biol.* **366**, 179-192
- 9 Niewiarowski, A., Bradley, A.S., Gor, J., McKay, A.R., Perkins, S.J., Tsaneva, I.R. (2010) Oligomeric assembly and interactions within the human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 complexes. *Biochem. J.* **429**, 113-125
- 10 Lakomek, K., Stoehr, G., Tosi, A., Schmailzl, M., Hopfner, K.P. (2015) Structural basis for dodecameric assembly states and conformational plasticity of the full-length AAA+ ATPases Rvb1·Rvb2. *Structure* **23**, 483-495

- 11 Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., Wu, C. (2000) A chromatin remodeling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* **406**, 541-544
- 12 Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., Rine, J. (2004) A Protein Complex Containing the Conserved Swi2/Snf2-Related ATPase Swr1p Deposits Histone Variant H2A.Z into Euchromatin. *PLoS Biol.* **2**, e131
- 13 Jha, S., Dutta, A. (2009) RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *J. Mol. Cell* **12**, 521-533
- 14 Nguyen, V.Q., Ranjan, A., Stengel, F., Wei, D., Aebersold, R., Wu, C., Leschziner, A.E. (2013) Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1. *Cell* **12**, 1220-1231
- 15 Kanemaki, M., Makino, Y., Yoshida, T., Kishimoto, T., Koga, A., Yamamoto, K., Moncollin, V., Egly, J.M., Muramatsu, M., Tamura, T. (1997) Molecular cloning of a rat 49-kDa TBP-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the bacterial RuvB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 64-68
- 16 Huber, O., Menard, L., Haurie, V., Nicou, A., Taras, D, Rosenbaum, J. (2008). Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res.* **68**, 6873-6876
- 17 Mao, Y.Q., Houry, W.A. (2017) The role of Pontin and Reptin in cellular physiology and cancer etiology. *Front. Mol. Biosci.* **4**, 58
- 18 Freitas, F.Z., Chapeaurouge, A., Perales, J., Bertolini, M.C. (2008) A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. *Proteomics* **8**, 2052-2061
- 19 McCluskey K., Wiest, A., Plamann, M. (2010) The Fungal Genetics Stock Center: a repository for 50 years of fungal genetics research. *J. Biosci.* **35**, 119-126
- 20 Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiol. Gene Bull.* **13**, 42-43
- 21 Honda, S., Selker, E.U. (2009) Tools for fungal proteomics: multifunctional *Neurospora* vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics* **182**, 11-23
- 22 Westergaard, M., Mitchell, H.K. (1947) *Neurospora*. V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Am. J. Bot.* **34**, 573-577

- 23 Ebbole D., Sachs M.S. (1990) A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. *Fungal Gen. Rep.* **37**, 7
- 24 Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., Weiss, R.L., Borkovich, K.A, Dunlap, J.C. (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 10352-10357
- 25 Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427
- 26 Takeda, A.A.S., Freitas, F.Z., Magro, A.J., Bernardes, N E., Fernandes, C A.H., Gonçalves, R.D., Bertolini, M.C., Fontes, M.R.M. (2013) Biophysical characterization of the recombinant importin-  $\alpha$  from *Neurospora crassa*. *Prot. Peptide Lett.* **20**, 8-16
- 27 Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296-W303
- 28 Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., Lindahl, E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1-2**, 19-25
- 29 Huang, J., Mackerel Jr., A.D. (2013) CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **34**, 2135-2145
- 30 Olsson, M.H., Sondergaard, C.R., Rostkowski, M., Jensen, J.H. (2011) PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525-537
- 31 Bussi, G., Donadio, D., Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101
- 32 Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Van Vangunsteren, W.F., Dinola, A., Haak, J.R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684-3690
- 33 Nosé, S. (1983) A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* **52**, 255-268

- 34 Hoover, W.G. (1985) Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* **31**, 1695-1697
- 35 Parrinello, M., Rahman, A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182-7190
- 36 Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33-38
- 37 Freitas, F.Z., Bertolini, M.C. (2004) Genomic organization of the *Neurospora crassa gsn* gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock. *Mol. Gen. Genom.* **272**, 550-561
- 38 Dores-Silva, P.R., Silva, ER., Gomes, F. E.R., Silva, K.P., Barbosa, L.R.S., Borges, J.C. (2012) Low resolution structural characterization of the Hsp70-interacting protein - Hip - from *Leishmania braziliensis* emphasizes its high asymmetry. *Arch. Biochem. Biophys.* **520**, 88-98
- 39 Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606-1619
- 40 Silva, N.S.M., Seraphim, T.V., Minari, K., Barbosa, L.R.S., Borges, J.C. (2018) Comparative studies of the low-resolution structure of two p23 co-chaperones for Hsp90 identified in *Plasmodium falciparum* genome. *Int. J. Biol. Macromol.* **108**, 193-204
- 41 Whitmore, L., Wallace, B.A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392-400
- 42 Perkins, D.D. (1999) *Neurospora* genetic nomenclature. *Fungal Gen. New.* **46**, 34-41
- 43 Jeganathan, A., Leong, V., Zhao, L., Huen, J., Nano, N., Houry, W.A., Ortega, J. (2015) Yeast Rvb1 and Rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency. *J. Mol. Biol.* **427**, 1875-1886
- 44 Martinez-Pastor, M., Marchler, G., Schuller, C., Marchler, B.A., Ruis, H., Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**, 2227-2235

- 45 Virgilio, S., Cupertino, F.B., Bernardes, N.E., Freitas, F.Z., Takeda, A.A.S., Fontes, M.R.M., Bertolini, M.C. (2016) Molecular components of the *Neurospora crassa* pH signaling pathway and their regulation by pH and the PAC-3 transcription factor. *PLoS ONE* **11**, e0161659
- 46 Bernardes, N.E., Takeda, A.A.S., Dreyer, T.R., Cupertino, F.B., Virgilio, S., Pante, N., Bertolini, M.C., Fontes, M.R.M. (2017) Nuclear transport of the *Neurospora crassa* NIT-2 transcription factor is mediated by importin- $\alpha$ . *Biochem. J.* **474**, 4091-4104
- 47 Bernardes, N.E., Fukuda, C.A., da Silva, T.D., de Oliveira, H.C., Barros, A.C., Dreyer, T.R., Bertolini, M.C., Fontes, M.R.M. (2020) Comparative study of the interactions between fungal transcription factor nuclear localization sequences with mammalian and fungal importin-alpha. *Scientific Rep.* **10**, 1458
- 48 Christie, M., Chang, C-W., Róna, G., Smith, K.M., Stewart, A.G., Takeda, A.A.S., Fontes, M.R.M., Stewart, M., Vértessy, B.G., Forwood, J.K., Kobe, B. (2016) Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J. Mol. Biol.* **428**, 2060-2090
- 49 Gribun, A., Cheung, K.L., Huen, J., Ortega, J., Houry, W.A. (2008) Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *J. Mol. Biol.* **376**, 1320-1333
- 50 Torreira, E., Jha, S., López-Blanco, J.R., Arias-Palomo, E., Chacón, P., Cañas, C.O., Ayora, S., Dutta, A., Llorca, O. (2008) Architecture of the pontin/reptin complex, essential in the assembly of several macromolecular complexes. *Structure* **16**, 1511-1520
- 51 Cheung, K.L.Y., Huen, J., Kakihara, Y., Houry, W.A., Ortega, J. (2010) Alternative Oligomeric States of the Yeast Rvb1/Rvb2 Complex Induced by Histidine Tags. *J. Mol. Biol.* **404**, 478-492
- 52 López-Perrote, A., Muñoz-Hernandez, H., Gil, D., Llorca, O. (2012) Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL-RuvBL-2 complex. *Nucleic Acids Res.* **40**, 11086-11099
- 53 Makino, Y., Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Koji, T., Tamura, T. (1999) A rat RuvB-like protein, TIP49a, is a germ cell-enriched novel DNA helicase. *J. Biol. Chem.* **274**, 15329-15335

- 54 Gallant, P. (2007) Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell. Biol.* **17**, 187-192
- 55 Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y.C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A.B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., Boone, C., Emili, A., Houry, W.A. (2005) Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* **120**, 715-727
- 56 Wendler, P., Ciniawsky, S., Kock, M., Kube, S. (2012) Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 2-14
- 57 Chen, B., Sysoeva, T.A., Chowdhury, S., Guo, L., De Carlo, S., Hanson, J.A., Yang, H., Nixon, B.T. (2010) Engagement of arginine finger to ATP triggers large conformational changes in NtrC1 AAA+ ATPase for remodeling bacterial RNA polymerase. *Structure* **18**, 1420-1430
- 58 Davies, J.M., Brunger, A.T., Weis, W.I. (2008) Improved structures of full-length p97, an AAA ATPase: implications for mechanisms of nucleotide-dependent conformational change. *Structure* **16**, 715-726
- 59 Aramayo, R.J., Willhoft, O., Ayala, R., Bythell-Douglas, R., Wigley, D B., Zhang, X. (2018) Cryo-EM structures of the human INO80 chromatin-remodeling complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 37-44
- 60 Ewens, C.A., Su, M., Zhao, L., Nano, N., Houry, W.A., Southworth, D.R. (2016) Architecture and Nucleotide-Dependent Conformational Changes of the Rvb1-Rvb2 AAA+ Complex Revealed by Cryoelectron Microscopy. *Structure* **24**, 657-666

## **CAPÍTULO 2. Estudos do envolvimento do complexo RVB-1/RVB-2 na resposta a estresse em *Neurospora crassa***

Neste capítulo, as proteínas RVB-1 e RVB-2 foram estudadas no contexto da resposta a estresse em *N. crassa*. Uma busca por proteínas que provavelmente estariam envolvidas na regulação da resposta a estresse levou à identificação da proteína RVB-1 como capaz de se ligar a um fragmento de DNA da região promotora do gene que codifica a enzima glicogênio sintase (*gsn*). A proteína RVB-1, envolvida em muitos processos celulares, interage com sua paróloga RVB-2 formando complexos de maneira dependente de ATP. Uma análise *in silico* do promotor destas proteínas, revelou diversos *motifs* de ligação a fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresse, luz, desenvolvimento e relógio circadiano, bem como estas proteínas mostraram ser diferencialmente expressas dependentes nestes processos biológicos. Ensaio de imunoprecipitação da proteína RVB-1 revelaram que muitos papéis descritos para estas proteínas também estão conservados em *N. crassa*, principalmente os relacionados à participação de complexos de remodelagem de cromatina, como INO80 e SWR-1. Após estresse térmico e osmótico, condições que ativam a expressão desta proteína, componentes de grânulos de estresse como proteínas ribossomais 40S, fatores eucarióticos de alongamento da tradução e a presença da proteína glicolítica GAPDH foram identificados como prováveis proteínas parceiras. Além disso, na condição de choque térmico, identificamos a proteína ortóloga a shugoshin, recentemente identificada como essencial para a resposta ao choque térmico em células de camundongos e a proteína glicogenina (GNN), envolvida na síntese de glicogênio. Com base nestes resultados, linhagens mutantes para proteínas alvo de RVB-1 envolvidas nos complexos INO80 e SWR-1 foram analisadas sob estresse e revelaram serem sensíveis, bem como uma linhagem mutante para o gene *sgo-1* revelou ser sensível ao estresse, principalmente térmico e osmótico. Ensaio de interação proteína-proteína *in vitro* mostraram que a RVB-1 interage diretamente com SGO-1 e ensaios de localização subcelular da proteína SGO-1 mostraram que ela é majoritariamente nuclear em condições vegetativas de crescimento, mas responde ao estresse apresentando forte marcação citoplasmática, mesmo que ainda presente no núcleo. Linhagens mutantes heterocárias para ambas as proteínas RVBs mostraram menor acúmulo de glicogênio, e ensaios de imunoprecipitação mostraram que a proteína RVB-1 interage com GNN *in vivo*. Também demonstramos que as proteínas RVB-1 e RVB-2 são componentes de grânulos de estresse em *N. crassa*, nos quais GA3PDH também participa no fungo, mostrando que esta interação pode ocorrer via complexos envolvidos na montagem e desmontagem destes grânulos. Por fim, este trabalho mostra que funções muito conservadas das proteínas RVBs de leveduras até mamíferos, também estão presentes em *N. crassa* e traz luz para novas funções relacionadas à resposta ao estresse.

**Manuscrito em redação:** as seções Introdução e Materiais e Métodos serão apresentadas em formato de manuscrito e Resultados e Discussão de maneira convencional.

Segundo INSTRUÇÃO NORMATIVA No 01, de 29 de abril de 2022, que dispõe sobre as normas para apresentação de dissertações e teses do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, despacho nº 083/2022 – CoPGB/IQ-CAR, aprovada pelo Conselho do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Reunião de 13/04/2022, esta tese será apresentada na forma de capítulos contendo os manuscritos gerados a partir dos resultados obtidos durante as atividades de doutorado.

**The *Neurospora crassa* RVB-1 and RVB-2 proteins are involved in stress response and immunoprecipitation assay reveals new interactors of the *Neurospora crassa* RVB-1**

Jonatas Erick Maimoni Campanella<sup>1</sup>, Paula Aboud Barbugli<sup>2</sup>, and Maria Célia Bertolini<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 14.800-060, Araraquara, SP, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 14801-903, Araraquara, SP, Brazil

\*Corresponding author: Maria Célia Bertolini

E-mail: [mc.bertolini@unesp.br](mailto:mc.bertolini@unesp.br)

## INTRODUCTION

All organisms respond to stresses by activating stress defense mechanisms that stimulate physiological responses. The understanding of the mechanisms used by the organisms to sense external signals and to properly respond and adapt their cellular and metabolic state still needs investigation. Stresses are considered as environmental signals that induce changes in gene expression and protein synthesis leading cells to a rapid and robust stress adaptation. In general, response to the stresses requires a complex network of sensing and signaling mechanisms, and in microorganisms the fundamental aspects involved in the adaptative processes are largely influenced by the evolutionary pressure exerted by the different niches [53]. However, in fungi the molecular mechanisms involved in the adaptative responses to different stresses have highly diverged across the fungal kingdom and even in fungi closely related [29,116,117]. Although major advances have been achieved in the understanding of how fungi respond to the different stresses imposed by the natural environment, many aspects still need to be investigated.

The RVB proteins, known as RUVBLs, Pontin/Reptin and TIP48/TIP49, belong to the AAA+ (ATPases Associated with various cellular Activities) protein superfamily described to participate in a wide range of cellular processes [94,118]. They are essential proteins [19,101,102,119] and composed of two paralogs, which interact with each other forming a complex that participates in several macromolecular complexes. We previously identified the *Neurospora crassa* RVB-1 in heat-shocked mycelium using an approach to search for proteins able to bind to the STRE (Stress Responsive Element) motif (5'-AGGGG-3') [120]. In *S. cerevisiae*, this motif is present in promoters of stress responsive genes and is bound by the Msn2p and Msn4p (Msn2/4p) transcription factors [36], which mediate cellular response to multiple stress conditions. The *N. crassa* genome lacks Msn2/4p orthologs, suggesting that the stress response in filamentous fungi may have evolved differently from yeast and requires alternative cellular proteins. Recently, we identified the *N. crassa* RVB-2 paralog, and the RVB-1/2 complex was characterized [19]. We demonstrated that the complex exhibits biochemical and biophysical characteristics common to the yeast and human complexes; however, it shows specific features to the fungus proteins despite of their high identity to orthologous proteins.

The first indications of the RVBs involvement in stress response have been reported for the Rvb1/2 yeast protein complex. They have been identified in aggregates of cells upon heat stress [107] and both are present in perinuclear condensates, independently of other proteins, in yeast cells in the stationary phase and under some stress conditions [108]. However, neither protein expression nor protein localization were significantly changed under different stressing conditions for both proteins [108]. More recently, the RUVBL1 and RUVBL2 proteins from mouse embryonic fibroblasts (MEF) cells submitted to heat shock were identified as partners of the *Anolis sagrei* AsHSF1 heat shock factor in an *in vitro* evolutionary approach involving comparative analysis of HSF1 paralogs in vertebrates [114]. Using such approach, the authors demonstrated that the RUVBL1 and RUVBL2 proteins are HSE-dependent components of the AsHSF1 complexes formed on the human *HSP70* promoter. In addition, the same study demonstrated that under heat stress both proteins are partners of the SGO2 shugoshin protein. This protein, together with SGO1, was originally identified as protectors of centromeric cohesion during meiosis and mitosis in mice [121]. Although a direct interaction of RUVBLs and HSF1 and shugoshin was not demonstrated, this study implies both proteins in the context of heat stress response.

In the present work, we investigated the *N. crassa* the RVB-1 and RVB-2 involvement in stress response and using an immunoprecipitation assay we aimed to identify RVB-1 partners under the stress condition. We report, for the first time, that they are both required for a proper response when cells from both heterokaryon strains are cultured under different stress inductive environmental conditions. Their expression levels are significantly increased under salt and heat stresses, and they are detected both in cytoplasm and nucleus under normal growth conditions. In addition, their nuclear location is slightly increased when cells were exposed to the same stress conditions. Immunoprecipitation assay successfully identified conservative partners already described to interact with RVB proteins, such as components of the INO80/SWR-1 complexes, and mutant strains in some of these proteins exhibited sensitivity to stress. New interactors were also identified, implicating these proteins as likely involved in a wide range of cellular processes. The findings reported here provide new insight into the functional role of these proteins and expand our knowledge of their function in the stress response context.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Neurospora crassa* strains and growth conditions**

The strains used in this work are listed in Table S1 [122]. They were maintained on solid Vogel's minimal (VM) medium [2], pH 5.8 containing 2 % sucrose at 30 °C. All mutant homokaryon strains were confirmed by PCR using the oligonucleotides listed in Table S2. Conidia from 10-day old culture were suspended in sterile water, counted and used in the experiments. Growth of mutant strains was analyzed under different stress conditions and compared to growth of either the FGSC 9568 (*mus52::hyg<sup>+</sup>*, a) or FGSC#2489 strains. For this, conidia were collected from the strains grown in VM medium in the presence of hygromycin (200 µg/ml) for the heterokaryon strains and without hygromycin for the homokaryon strains and inoculated ( $10^7$  conidia) onto Petri dishes containing solid FGS (0.05% fructose, 0.05% glucose and 2% sorbose) medium plus hygromycin or not depending on the strain and the stressors agents: NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and Congo Red (CR). Sorbose medium was used to allow colonial growth [123]. Conidial growth was also analyzed in VM medium pH 4.2 and 7.8 (pH stress) and by transferring the plates to 45 °C (heat stress). The sensitivity of mutant strains to stressors was also evaluated by spotting 10-fold serial dilution conidial samples in plates containing the stressors or after exposing the plates to heat stress. Colony growth and size were analyzed after 24 and 48 h of growth at 30 °C.

For protein expression and microscopy analyses, strains expressing C-terminus either V5- or GFP-tagged proteins were constructed as previously described [19] using the oligonucleotides listed in Table S2. After transformation, homokaryons were isolated either by crossing with the #2489 strain in 0.5% Westergaard's medium or by microconidiation induction and filtration using Millex SV (5 µm) filters [124]. The segregantes were confirmed by PCR using the primer pairs described in Table S2. *N. crassa* transformation and molecular techniques were performed as previously described [10] or using the protocols available at the Neurospora homepage. (<http://www.fgsc.net/Neurospora/NeurosporaProtocolGuide.htm>).

For protein expression analyses under stress conditions, 10-day conidia ( $1 \times 10^8$  conidia) were inoculated into 1 L of VM medium containing 2 % sucrose, pH 5.8, at 30 °C, 200 rpm. After 24 h, the mycelia were harvested by filtration and divided in

samples. One sample was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use (control sample). The remaining samples were individually transferred into 150 ml of fresh VM liquid medium containing either 0.5% sucrose preheated at 45 °C (for heat stress), or VM containing 0.5% sucrose and 1.5 M NaCl (for osmotic stress), or VM containing 0.5% sucrose at pH 7.8 (for alkaline pH stress), or VM containing 0.5% sucrose at pH 4.2 (for acid pH stress), or VM containing 0.5% sucrose and 20 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (for oxidative stress), or VM without carbon source (for carbon starvation stress). Cultures were incubated at 250 rpm for different times. For light stress experiments, samples were transferred to 150 ml of fresh VM liquid medium containing 0.5% sucrose and incubated in the dark for 24 h, at 30 °C with shaking (100 rpm). Subsequently, the flasks were transferred to light and incubated in a Percival incubator (Percival Scientific, Inc. Boone) for different times. All samples were harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for further use.

### **Microscopy analyses under stress**

To analyze the subcellular localization of the fluorescent RVB-1-GFP, RVB-2-GFP and SGO-1-GFP proteins under heat and osmotic stress, 200 µl of a conidial suspension ( $2 \times 10^6$  conidia/ml) from the *rvb-1::rvb-1-gfp*, *rvb-2::rvb-2-gfp* and *sgo-1::sgo1-gfp* strains were inoculated onto coverslips, covered with VM liquid plus 2% sucrose and incubated at 30 °C for 8 h. After incubation, the coverslips were transferred to fresh VM media containing 0.5% sucrose either pre-heated at 45 °C or containing 0.5% sucrose plus 1.5 M NaCl and incubated for up to 1 h. For nuclei analysis, mycelia were fixed in 3.7% formaldehyde, 1% phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0, 0.2% (v/v) Tween 80, washed twice with PBS and stained with 100 µl Hoechst (0.5 µg/ml) or DAPI (0.5 µg/ml) for 5 min. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) was performed using a CARLS ZEISS LSM 800 Confocal Microscopy with Airyscan and GaAsp detector, Germany) with a Plan Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 objective. The images were analyzed using the ZEN Blue 2.3. Conventional Fluorescent Microscopy was carried out using AXIO Imager.A2 Zeiss coupled with an AXIOCam MR3 camera. Images were collected and processed using AxioVision software. GFP fluorescence was visualized with excitation and emission at wavelengths of 490 and 525 nm (FITC filter), respectively, and DAPI/Hoechst

fluorescence at excitation wavelengths at 358 nm (UV) and emission at 461 nm, respectively. Further processing was performed using Corel®PHOTO-PAINT™ X7. The Pearson correlation coefficient was used to estimate the degree of nuclear localization [125].

### **Protein expression analyses and nuclear protein isolation**

Protein expression was analyzed by Western blot. Mycelial pads from strains submitted or not to different stress conditions were disrupted by grinding in a mortar with liquid nitrogen, and proteins were extracted with extraction buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 0.1 mM TCLK, 1 mM benzamidine, and 1 µg/ml of each pepstatin and antipain) plus 200 µL of glass beads (710-1180 µm, Sigma). Proteins were quantified [126] using BSA as standard, and separated by 10% SDS-PAGE gels, electro-transferred to nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare) and probed with a monoclonal anti-V5 antibody (Invitrogen). Blots were subsequently probed with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed with luminol reagent. Blots were visualized with the ChemiDoc Imaging System (BioRad). The polyclonal anti-AfHsp90 antibody was gently donated by Dr. Iran Malavazi (UFSCar, São Carlos, SP, Brazil).

For nuclear protein analyses, the nuclei were isolated according to the procedure previously described [120]. Briefly, the nuclei were isolated, lysed in a high salt buffer, the proteins were quantified, and the protein expression was analyzed by Western blot as described above.

### **Immunoprecipitation assays and mass spectrometry analysis**

To identify RVB-1 binding partners, mycelia from the wild-type (FGSC #2489) and *rvb-1::rvb-1-v5* strains were used in co-immunoprecipitation (CoIP) assays, according to [127] procedure with modifications. Mycelia grown at 30 °C for 24 h, submitted or not to heat (45 °C, 1 h) or osmotic (1.5 M, NaCl) stress were ground in a pre-chilled mortar in liquid nitrogen and suspended in 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 buffer containing 137 mM NaCl, 10% glycerol, 0.4% IGEPAL, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM benzamidine and 1 µg/ml pepstatin A. Cell extracts were cleared by centrifugation, and approximately 10 mg of protein were incubated with *Anti-V5 Agarose Affinity Gel* (Sigma) at 4 °C for 12 h. Beads were washed four times in the

suspension buffer without IGEPAL and proteins were eluted in a minimal volume of 8 M urea. Immunoprecipitated proteins were reduced by adding DTT to 5 mM and alkylated with iodoacetamide to 15 mM final concentration. The solution was diluted in ammonium bicarbonate (10 mM final concentration), CaCl<sub>2</sub> was added (1 mM final concentration) and proteins were digested with Trypsin Gold (Promega) for 16 h at 37 °C. Purified peptides were separated by the Easy NLC-LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer, and the proteins identified against the *N. crassa* database (<http://fungidb.org/fungidb>) using the MASCOT MS/MS ion search tool (<http://www.matrixscience.com>). Common proteins that were detected in the wild-type and *rvb-1::rvb-1-v5* experiments were discounted.

### **Cloning, co-expression and direct interaction of SGO-1 with RVBs**

To analyze the *in vitro* interaction of SGO-1 with either RVB-1 or RVB-2, the *sgo-1* cDNA was amplified by RT-PCR using the SGO1duet-F1/R1 and SGO1duet-F2/R2 primers pairs leading to *sgo-1* (*NdeI/KpnI*) and *sgo-1* (*BamHI/NotI*) sequences, respectively (Table S2). The SGO1duet-R1 prime removes the *sgo-1* stop codon leading to the production of a S-tag fused recombinant protein. The plasmid pRSFduet-1-*his6-rvb-2* (MCS1) *rvb-1-V5* (MCS2) construction [19], which leads to production of the N-terminus His6-tagged RVB-2 and the C-terminus V5-tagged RVB-1 recombinant proteins, was used for cloning the *sgo-1* cDNAs. To produce SGO-1-S and His6-RVB-2 proteins, the entire sequence of *sgo-1* (*NdeI/KpnI*) replaced the *rvb-1-V5* (MCS2) sequence leading to pRSFduet-1-*his6-rvb-2* (MCS1) *sgo-1-s* (MCS2) construction. To produce His6-SGO-1 and RVB-1-V5 proteins, the entire sequence of *sgo-1* (*BamHI/NotI*) replaced the *his6-rvb-2* (MCS1) leading to pRSFduet-1-*his6-sgo-1* (MCS1) *rvb-1-V5* (MCS2). The plasmids constructions were individually transformed into *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS competent cells and cultivated in LB media. The recombinant protein expression and extraction were performed as previously described (Campanella et al. 2021). Briefly, bacterial pads were disrupted by sonication in lysis buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 buffer containing 200 mM NaCl, 10% glycerol, 0.4% IGEPAL, 1 mM PMSF, and 1 µg/ml pepstatin A, 0.01 mg/ml of lysozyme e 5 U of DNase and 25 mM imidazole), centrifuged and the soluble cell lysate was filtered in 0.2 µm filter (Sigma).

The *in vitro* interaction between either RVB-1-V5 and His-6-SGO-1 or His6-RVB-2 and SGO-1-S was performed using HisTrap Chelating HP 1 ml (GE Healthcare Lifesciences). The columns were washed 10 CV (column volumes) in wash buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 buffer containing 200 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin A and 50 mM of Imidazole) and the proteins were eluted in the same buffer using a gradient of imidazole concentration (200, 600, 800 mM and 1 M). The samples were dialyzed against elution buffer without imidazole and the proteins were co-purified again using cobalt beads (Talon, Sigma) for the His-tagged proteins, for 2 h and washed four times with elution buffer contained 50 mM imidazole. To verify if RVB-1-V5 was able to co-purify His-SGO-1, the dialyzed sample was incubated with Anti-V5 Agarose Affinity Gel (Sigma) for 2 h and washed four times with elution buffer. Proteins were eluted from the beads using 1 X Laemmli buffer (Laemmli, 1970), boiled for 5 min and analyzed by Western blot using anti-His6 fused to alkaline phosphatase (Sigma) and revealed using BCIP/NBT reagents. Blots were also probed with either anti-V5 (Invitrogen) or anti-S (Sigma) primary antibodies and subsequently with HRP-conjugated antibodies and revealed with the ECL substrate (BioRad). Blots were visualized by either colorimetric or chemiluminescence using the ChemiDoc Imaging System (BioRad).

### **Stress granules isolation from *N. crassa***

To analyze if RVB-1 and RVB-2 are components of stress granules in *N. crassa* we performed a differential centrifugation of the cellular extracts from the *rvb-1::rvb1-gfp* and *rvb-2::rvb-2-gfp* strains submitted or not to heat stress (45 °C, 1 h) or osmotic stress (1.5 M NaCl, 1 h). The stress granules isolation was performed following the isolation procedure described for yeast and mammalian cells [128]. Briefly, the mycelia were ground to a fine powder in liquid nitrogen and suspended in 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 buffer containing 137 mM NaCl, 10% glycerol, 0.4% IGEPAL, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM benzamidine and 1 µg/ml pepstatin A and centrifuged at 2,000 X *g* for 2 min at 4 °C. The supernatant was transferred to a new Eppendorf tube and centrifuged at 18,000 X *g* for 10 min at 4 °C. The pellet was washed with the same buffer containing RNase (1 µg/ml) and DNase (1 µg/ml) for 10 min at 14 000 X *g*. The pellet was suspended in a minimal volume of the last buffer, centrifuged at 850 X *g* for 2 min and the supernatant collected and transferred to a

new Eppendorf tube. Aliquots of extracts enriched of stress granules core were visualized under fluorescent microscopy to identify the presence of either GFP-tagged RVB-1 or RVB-2. To confirm the presence of the RVB-1-GFP or RVB-2-GFP in the enriched stress granules extract, Western blot was performed using anti-GFP antibody (Sigma), and to confirm the nature of the stress granules the hybridization was performed with anti-GAPDH antibody (Sigma) (Jain et al., 2016). Blots were subsequently probed with HRP-conjugated antibodies, revealed with the ECL substrate (BioRad) and visualized with the ChemiDoc Imaging System (BioRad).

### **Co-immunoprecipitation assay**

Protein extracts from heat and osmotic stresses of the *rvb-1::rvb-1-v5* strain were used to assay the *in vivo* interaction between RVB-1, HSP90 and GNN proteins. For that, the extracts were incubated with either Anti-V5 Agarose Affinity Gel (Sigma), polyclonal anti-GNN or polyclonal anti-A $\beta$ Hsp90 antibodies raised in rabbit coupled to magnetic beads (Invitrogen) at 4 °C for 16 h under gentle rotation. The beads were collected by centrifugation 1000 X *g* and washed with 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 buffer containing 137 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM benzamidine and 1  $\mu$ g/ml pepstatin A. The beads were suspended in Laemmli buffer and heated for 5 min at 98 °C, and the proteins were assayed by Western blot using the primary anti-V5, anti-GNN or anti-A $\beta$ Hsp90 antibodies and secondary anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG, respectively, coupled to peroxidase and revealed using ECL reagent. Images were captured using ChemiDoc (BioRad).

### **Glycogen quantification**

Growth conditions and glycogen quantification was performed in the wild-type #9568,  $\Delta$ *rvb-1* and  $\Delta$ *rvb-2* strains in the presence of hygromycin (200  $\mu$ g/ml) under dark condition in HGV media as previously described [17]. Briefly, glycogen was precipitated with cold ethanol and digested with  $\alpha$ -amylase (Sigma) and amyloglucosidase (Sigma). Free glucose was quantified with a glucose oxidase kit (Labtest) and the glycogen concentration was normalized to the total protein concentration [129].

**Table S1.** Strains used in this work.

<b>Strain</b>	<b>Genotype</b>	<b>Reference</b>
WT2489	WT	FGSC #2489
WT9718	<i>mus52::bar+</i>	FGSC #9718
WT9568	<i>mus52::hyg+</i>	FGSC #9568
$\Delta rvb-1$	<i>rvb-1::hyg+</i> , NCU03482 (heterokayon)	FGSC #13658
$\Delta rvb-2$	<i>rvb-2::hyg+</i> , NCU06854 (heterokayon)	FGSC #13216
$\Delta arp-4$	<i>arp-4::hyg+</i> , NCU02555 (heterokayon)	FGSC#16358
$\Delta arp-5$	<i>arp-5::hyg+</i> , NCU06394 (heterokayon)	FGSC#14901
$\Delta crc-1$	<i>crc-1::hyg+</i> , NCU04002 (heterokayon)	FGSC#12086
$\Delta arp-6$	<i>arp-6::hyg+</i> , NCU05587 (homokayon)	FGSC#12182
$\Delta arp-8$	<i>arp-8::hyg+</i> , NCU06232 (homokayon)	FGSC#11910
$\Delta sgo-1$	<i>sgo-1::hyg+</i> , NCU01842 (homokayon)	FGSC#13858
RVB-1-V5	<i>rvb-1::rvb-1-V5::hyg+</i>	Campanella et al. 2021
RVB-2-V5	<i>rvb-2::rvb-2-V5::hyg+</i>	Campanella et al. 2021
RVB-1-GFP	<i>rvb-1::rvb-1-gfp::hyg+</i>	Campanella et al. 2021
RVB-2-GFP	<i>rvb-2::rvb-2-gfp::hyg+</i>	Campanella et al. 2021
SGO-1-V5	<i>sgo-1::sgo-1-V5::hyg+</i>	<i>this work</i>
SGO-1-GFP	<i>sgo-1::sgo-1-gfp::hyg+</i>	<i>this work</i>
ARP-6-GFP	<i>arp-6::arp-6-gfp::hyg+</i>	<i>this work</i>
ARP-8-GFP	<i>arp-8::arp-8-gfp::hyg+</i>	<i>this work</i>

**Table S2.** Oligonucleotides used in this work. The start and stop codons are represented in red. The 10xGly and Lox sequences are represented in bold. The restriction sites are underlined.

<b>Name</b>	<b>Sequence (5'→3')</b>
<b><i>N. crassa strains constructions</i></b>	
SGO-1-F	<b>ATG</b> GCCCCGCTCAACG
SGO-1-R	<b>TCA</b> AAGCATCATGCTTCTCC
ARP-6-F	<b>ATG</b> ACCGGACGAGGAGGG
ARP-6-R	<b>TCA</b> GGGGTCGAGTCCGAGC
ARP-8-F	<b>ATG</b> GTCTGGGAAAGTCAGCG
ARP-8-R	<b>TCA</b> GTAAGTCCACAGCGC
SGO-1-GLY-F	GGCTCTGGAACCTACTCC
SGO-1-GLY-R	<b>CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCCA</b> AAGCATCATGCTTCTCCTCC
SGO-1-LOX-F	<b>TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG</b> ATGGACCTTGGCAGAGCTGG
SGO-1-LOX-R	CGGTAGGTATAGACTATGTC
ARP-6-GLY-F	GGAGACCTGAAAAGACTTGG
ARP-6-GLY-R	<b>CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCC</b> GGGGTCGAGTCCGAGCCC
ARP-6-LOX-F	<b>TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG</b> GCATTTGCTTGGAGTCTATTATTGC
ARP-6-LOX-R	GGCAGATTGAGCAGCTG
ARP-8-GLY-F	CTACCAGGAAATCAATCTACGC
ARP-8-GLY-R	<b>CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCC</b> GTAAGTCCACAGCGCCTTGTGG
ARP-8-LOX-F	<b>TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG</b> TTGGTCTCTCTGTCATCATGTG
ARP-8-LOX-R	GCTATAGCAGCACGTAAGCAGC
10Gly-F	GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG
LoxP-R	TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG
Hph-F	AAAAAGCCTGAACTACCGCGACG
Hph-R	GGTCATTGACTGGAGCGAGGCCGA
<b><i>Shugoshin cDNA cloning</i></b>	
SGO1duet-F1 (BamHI)	CGCGGATCCGGCCCCGCCTCAACGAACAA
SGO1duet-R1 (NotI)	TTTATAGCGGCCGC <b>T</b> TAAGCATCATGCTTCTCCTCC
SGO1duet-F2 (NdeI)	GGGAATTCCAT <b>A</b> TGCCCCGCCTCAACGAACAA
SGO1duet-R2 (KpnI)	CGGGGTACCAAGCATCATGCTTCTCCTCC

## RESULTADOS

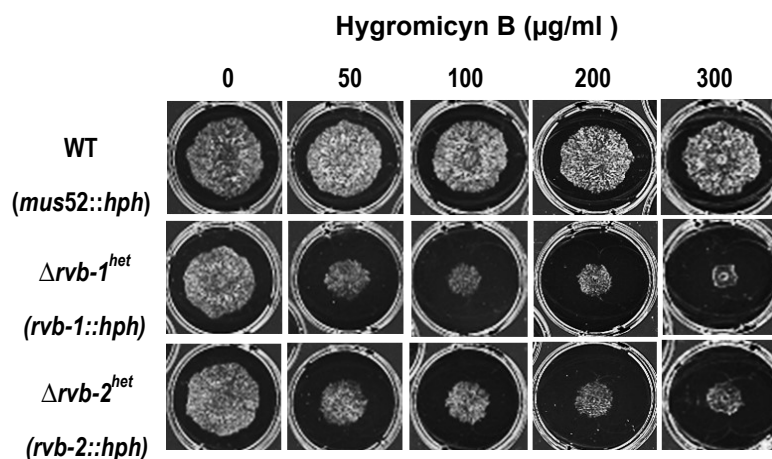
### 1. As proteínas RVB-1 e RVB-2 de *Neurospora crassa* desempenham uma função na resposta ao estresse

A proteína RVB-1 de *N. crassa* foi previamente identificada em nosso laboratório em uma abordagem bioquímica para isolar proteínas capazes de se ligar ao elemento STRE do promotor *gsn*, um motivo de DNA presente em promotores de genes responsivos ao estresse [120]. Posteriormente, sua proteína paróloga foi identificada e tanto as proteínas individuais RVB-1 e RVB-2, quanto o complexo RVB-1/RVB-2 foram caracterizados bioquímica e biofísicamente [19].

Para estudos do envolvimento destas proteínas na resposta ao estresse, linhagens mutantes heterocárias para os genes *rvb-1* e *rvb-2* foram utilizadas nas análises, uma vez que ambas são proteínas são essenciais. As análises foram realizadas na presença de higromicina para selecionar células com núcleos mutantes, utilizando uma linhagem selvagem para os genes *rvb-1* e *rvb-2*, mas resistente à higromicina (*mus52::hph*) como controle. Esta linhagem controle é amplamente utilizada como linhagem selvagem em laboratórios, pois o gene *mus52* codifica para uma proteína envolvida em recombinação não homóloga, sendo esta linhagem mutante importante para realização de ensaios envolvendo recombinação homóloga (construção de mutantes). Ela não apresenta fenótipo alterado sendo os mesmos semelhantes à linhagem selvagem FGSC#2489 [9].

Para definir a melhor concentração de higromicina, primeiro realizamos um ensaio de crescimento em placa com as linhagens sob diferentes concentrações de higromicina, variando de 0 a 300 µg/ml (Figura 1A). O crescimento das linhagens mutantes heterocárias foi afetado pela presença de higromicina mesmo em baixas concentrações (50 µg/ml), apresentando redução considerável de crescimento quando comparadas ao controle (Figura 1A). A linhagem *mus52::hph* parece não ser afetada pela presença de higromicina (Figura 1A, *mus52::hph*), sugerindo que os fenótipos nas linhagens mutantes foram devidos à seleção de núcleos mutados e consequente redução das proteínas da célula (Figura 1A,  $\Delta rvb-1^{het}$  e  $\Delta rvb-2^{het}$ ).

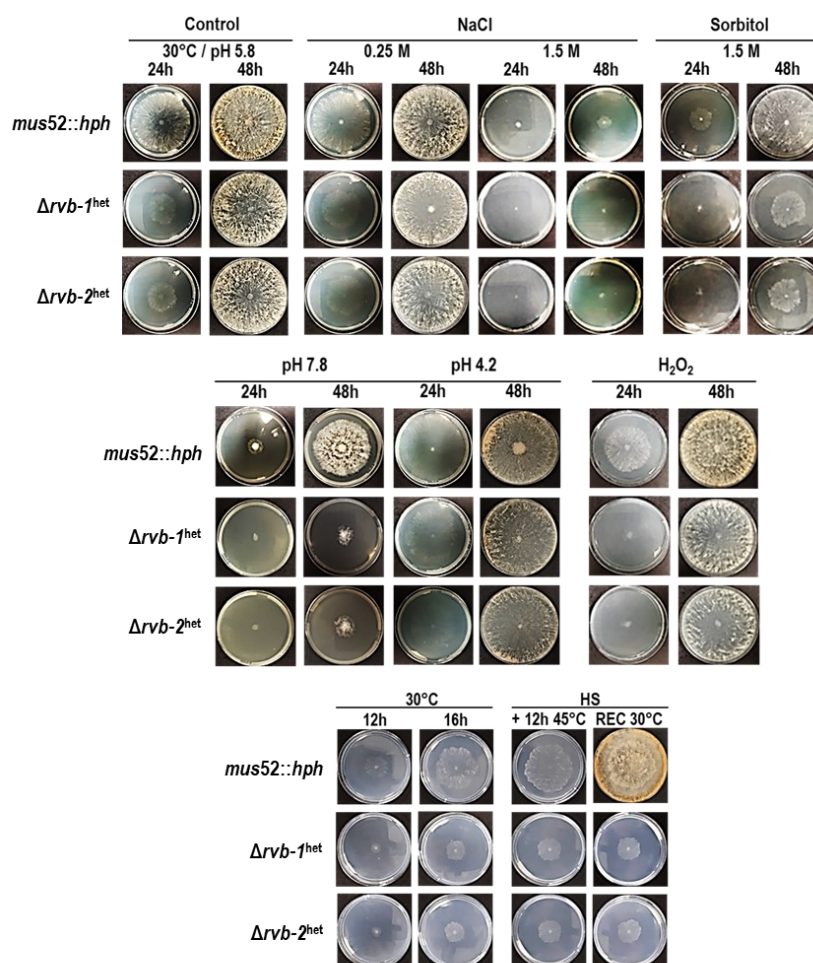
**Figura 1.** Crescimento das linhagens mutantes heterocárias  $\Delta rvb-1^{het}$  e  $\Delta rvb-2^{het}$  na presença de higromicina. Cerca de  $5 \times 10^4$  conídios de cada linhagem foram inoculados no centro da placa de Petri contendo meio VM 1X, 2% sacarose e concentrações crescentes de higromicina. Como controle, foi utilizado uma linhagem selvagem do fungo resistente a higromicina (*mus52::hph*).



Para investigar se as proteínas estão envolvidas na resposta ao estresse, ensaios de crescimento radial em placa das linhagens  $\Delta rvb-1^{het}$  e  $\Delta rvb-2^{het}$  foram realizados na presença de diferentes agentes indutores de estresse, como NaCl, sorbitol, alta temperatura (45 °C), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH. Conídios de cada linhagem, bem como da linhagem controle, foram inoculados em placa em meio VM contendo 2% sacarose e a presença dos agentes estressores, cultivados a 30 °C e os resultados analisados após 24 e 48 h de crescimento (Figura 2). O crescimento das linhagens mutantes a 30 °C foi afetado na presença de higromicina após 24 h (Figura 2, controle), assim como esperado, mas também foi severamente afetado na presença dos estresses de NaCl 1.5 M, sorbitol 1,5 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.8 e térmico (Figura 2). Alguns agentes estressores, como a presença de alta concentração de NaCl (1,5 M) e estresse térmico inibiram o crescimento das linhagens mesmo após 48 h de crescimento (Figura 2, NaCl 1,5 M, HS REC), sugerindo alta sensibilidade das linhagens mutantes frente a estes agentes de estresse. A presença de sorbitol, outro agente causador de estresse osmótico, afetou o crescimento das linhagens, assim como a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como indutor de estresse oxidativo. Entretanto, ambos não inibiram o crescimento uma vez que as linhagens continuaram a crescer após 48 h, mas com considerável redução de densidade radial ou micelial, respectivamente (Figura 2, sorbitol 1,5 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM). A presença de pH ácido e

baixa concentração de NaCl parece não afetar o crescimento das linhagens, quando comparado ao controle (Figura 2, NaCl 0,25 M e pH 4.8).

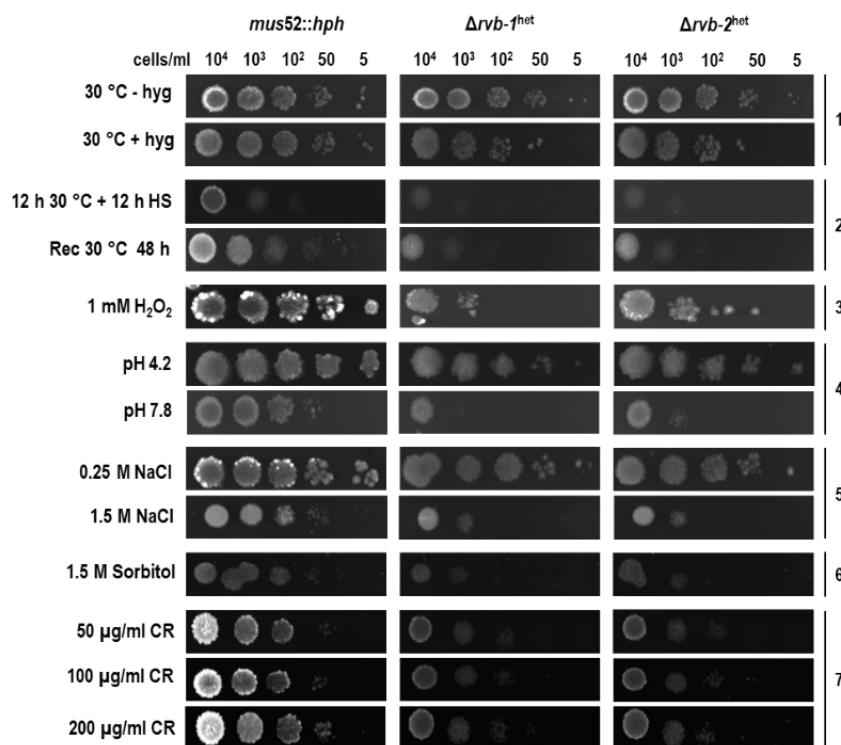
**Figura 2. Análise do crescimento das linhagens mutantes  $\Delta rvb-1^{het}$  e  $\Delta rvb-2^{het}$ .** Crescimento em placa após 24 e 48 h das linhagens mutantes e WT (controle) crescidas na presença de higromicina e agentes ou situação estressante. Para os experimentos de estresse térmico, as linhagens foram crescidas por 12 h a 30 °C, transferidas para 45 °C por mais 12 h e então deixadas recuperar por 48 h a 30 °C. Para estresse oxidativo foi utilizado 1 mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Os controles de crescimento a 30 °C por 12, 16, 24 e 48 h já foram previamente publicados [19].



Para confirmar a sensibilidade ao estresse, experimentos de diluição seriada com conídios de cada linhagem ( $5 \times 10^4$  a 5 conídios) foram realizados em placas de Petri contendo meio VM suplementado com FGS 1x. A presença de sorbose como fonte de açúcar inibe a formação de hifas aéreas e estimula o crescimento colonial em *N. crassa* [124]. Uma concentração fixa de cada agente estressante foi utilizada. As placas foram mantidas a 30 °C por 48 h, exceto para os experimentos de

estresse térmico. Os resultados observados nos testes em placas reproduziram os ensaios de crescimento radial, indicando uma resposta pronunciada em estresse térmico (Figura 3, linha 2), osmótico (Figura 3, linhas 5 e 6), pH alcalino (Figura 3, linha 4) e oxidativo (Figura 3, linha 3). Outro dado interessante foi que as linhagens foram sensíveis à presença de Congo Red (CR), o qual interfere na construção e manutenção da parede celular, agindo como um indutor de estresse de parede.

**Figura 3. Ensaio de sensibilidade das linhagens em diferentes condições de estresse.** Amostras de conídios da diluição em série das linhagens selvagem e mutantes foram inoculadas em meio FGS (0,05% de frutose, 0,05% de glicose e 2% de sorbose) e higromicina (200 µg/ml) com e sem os agentes estressantes NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e CR. As amostras também foram expostas ao estresse térmico (45 °C) e a pH 4,2 e 7,8. O crescimento foi avaliado após 24 e 48 h. **1.** Controle de crescimento a 30 °C, pH 5,8 na ausência e na presença de higromicina após 48 h. **2.** Crescimento sob estresse térmico. Os conídios foram cultivados a 30 °C por 12 h e as placas foram transferidas a 45 °C por 12 h. Recuperação do estresse térmico (REC). Os conídios foram cultivados por 12 h a 30 °C, as placas foram transferidas para 45 °C por mais 12 h e permitidas recuperar por 48 h a 30 °C. **3.** Crescimento na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM por 48 h. **4.** Crescimento em pH 4,2 (estresse ácido) e 7,8 (estresse alcalino) por 24 h. **5.** Crescimento na presença de NaCl 0,25 M e 1,5 M durante 48 h. **6.** Crescimento na presença de 50, 100 e 200 µg/ml CR por 48 h.

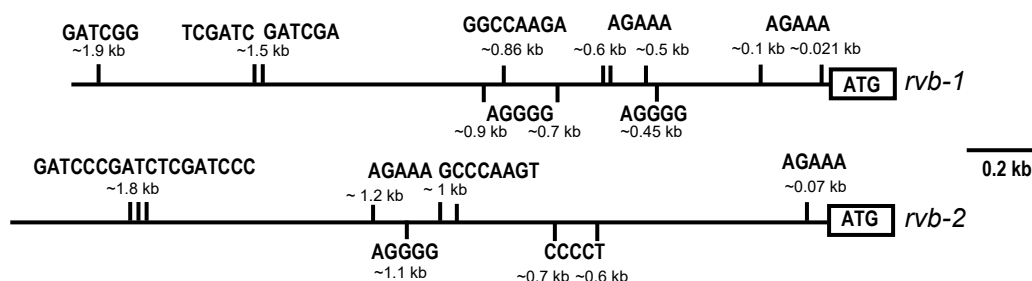


## 2. A expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2 e a localização celular são influenciadas pelo estresse

### 2.1 Análise *in silico* da região promotora dos genes *rvb-1* e *rvb-2*

Como as linhagens apresentaram sensibilidade frente à presença de agentes causadores de estresse, a expressão dessas proteínas na presença de alguns destes agentes foi investigada. Para isso, utilizamos linhagens de *N. crassa* expressando endogenamente proteínas fusionadas ao tag V5 (linhagens *rvb-1-v5* e *rvb-2-v5*, [19]). Primeiramente, realizamos uma análise *in silico* em ambos os promotores (aproximadamente 2 kb *upstream* ao ATG) para identificar a presença de *motifs* para fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresse, como o *motif* STRE (5'-AGGGG-3' [39]), HSE (5'-AGAAA-3' [35]) e PAC-3 (5'-GGCCAAGA-3'). Identificamos três STREs em ambos os promotores (Figura 4) nas posições de aproximadamente -450, -700 e -900 bp para o promotor *rvb-1* e nas posições de -600, -700 e -1.100 bp para o promotor *rvb-2* (Figura 4, STRE, 5'-AGGGG-3'). Também identificamos a presença de *motifs* HSE nas regiões -21, -181, -500, -600 e -603 no promotor *rvb-1* e -68, -1090 e -1249 no promotor *rvb-2* (Figura 4, HSE, 5'-AGAAA-3'). Curiosamente, também identificamos a presença de *motifs* para o fator de transcrição PAC-3 nas regiões -863 e -1063 nos promotores *rvb-1* e *rvb-2*, respectivamente (Figura 4, PAC-3 *motif*, 5'-GG/CCCAAGA/T-3'). *Motifs* correspondentes a elementos de resposta à luz (LRE, *Light Responsive Element*, 5'-RGATCR-3'; [130,131] também estão presentes. Eles são reconhecidos pelos fatores de transcrição white color-1 e white color-2 (complexo heterodimérico WCC-1/2), os quais regulam a expressão transcricional de genes responsivos à luz. Foram identificados três LREs em ambos os promotores, dois nas posições de aproximadamente -1,5 kb e -1,9 kb para o promotor *rvb-1* e três nas posições de aproximadamente -1,8 kb para o promotor *rvb-2* (Figura 4, LRE, 5'-RGATCR-3').

**Figura 4. Representação esquemática dos promotores *rvb-1* e *rvb-2* e os possíveis sítios de ligação a diferentes fatores de transcrição.** Representação esquemática dos promotores *rvb-1* e *rvb-2* e a localização dos motivos STRE (*Stress Responsive Element*, 5'-AGGGG-3'), HSE (*Heat shock element*, 5'-AGAAA), PAC-3 (5'-GG/CCCAAGA/T-3') e LRE (*Light Responsive Element*, 5'-RGATCR-3'). As seqüências e posições dos motivos em relação ao ATG estão representadas.



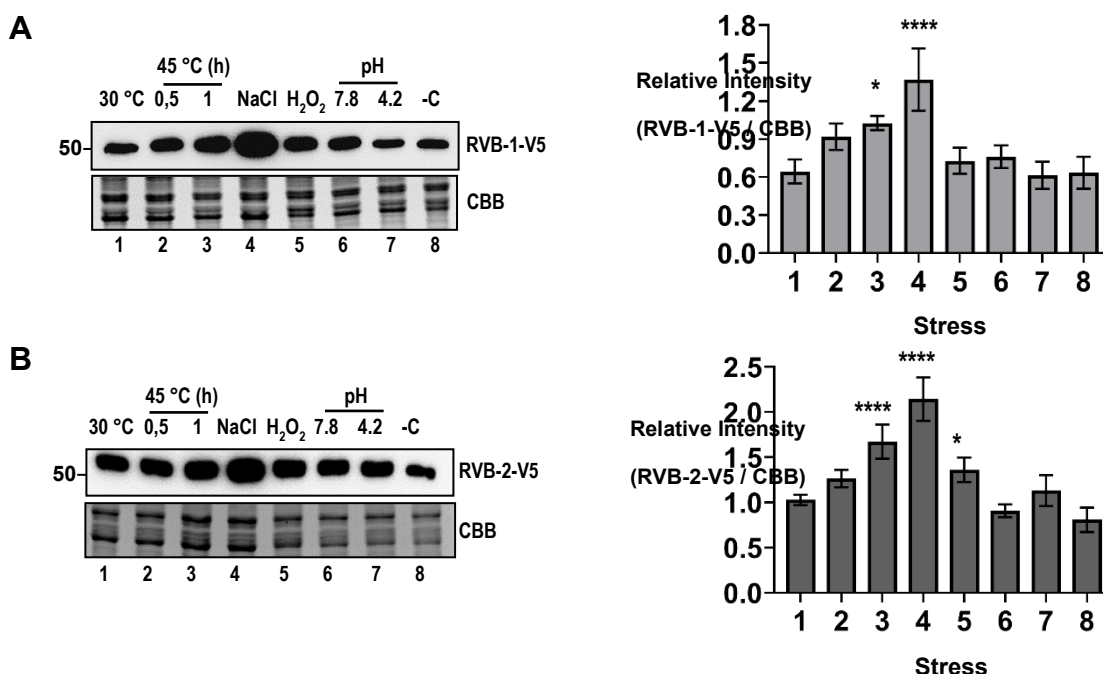
## 2.2 Expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2 em diferentes condições de estresse

Resultados previamente realizados mostraram que a expressão da proteína RVB-1-V5 aumentou significativamente após o fungo ser exposto a estresse térmico (45 °C) (CAMPANELLA, J. E. M; Dissertação. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/153234>). Para estudar o envolvimento das proteínas RVB-1 e RVB-2 em outros tipos de estresse, além do térmico, análises de expressão proteica foram realizados utilizando linhagens construídas que produzem as proteínas RVB-1-V5 e RVB-2-V5. Para isso, suspensões de conídios das linhagens foram individualmente inoculadas em meio VM líquido e crescidas a 30 °C por 24 h. Após esse período, os micélios foram submetidos a diferentes estresses: 1,5 M NaCl (para o estresse osmótico), pH 7,8 (estresse alcalino), pH 4,2 (estresse ácido), 20 mM de peróxido de hidrogênio (estresse oxidativo) e na ausência de fonte de carbono e mantidos por 1 h na situação estressante. Experimentos de choque térmico também foram realizados, transferindo a massa micelial crescida a 30 °C para meios previamente aquecidos a 45 °C e mantidos por 30 e 60 min.

Os resultados mostraram que a expressão de ambas as proteínas foi regulada positivamente sob estresse térmico e osmótico, sendo o NaCl um forte agente indutor destas proteínas (Figuras 5A e 5B, canaletas 3 e 4, respectivamente). A expressão de RVB-1 não foi afetada pelo estresse oxidativo, no entanto, os níveis de RVB-2 aumentaram significativamente sob a mesma condição de estresse

(Figuras 5A e 5B, canaleta 5). A expressão de ambas as proteínas não foi influenciada pelo estresse de pH ácido e alcalino e nem pela falta de carbono (Figuras 5A e 5B, canaletas 6, 7 e 8, respectivamente).

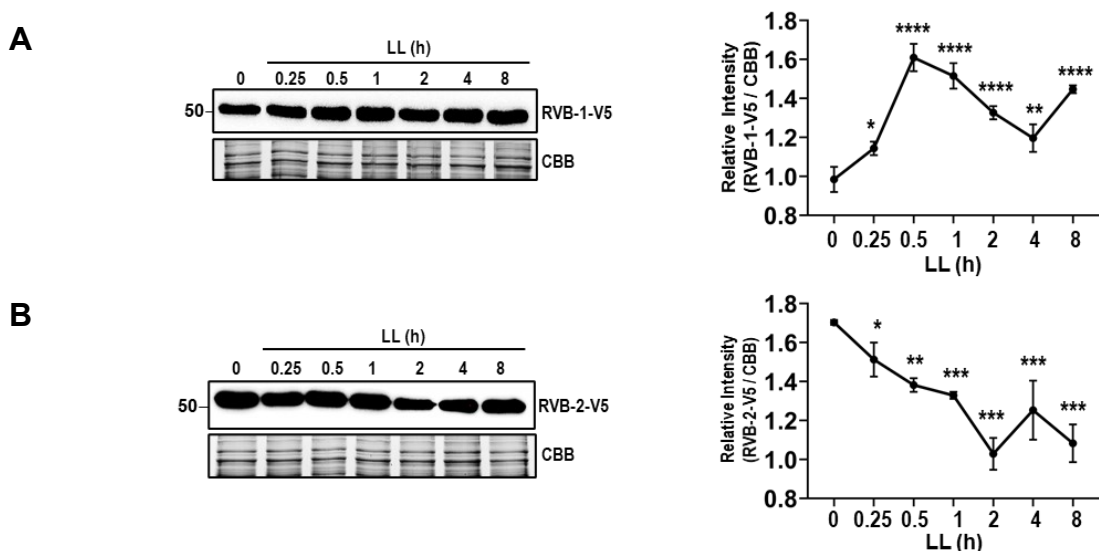
**Figura 5. A expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2 é regulada sob estresse. A e B.** Expressão das proteínas RVB-1-V5 (**A**) e RVB-2 (**B**) sob diferentes condições de estresse. As amostras miceliais foram incubadas sob condições normais de crescimento a 30 °C por 24 h e, em seguida, submetidas a estresse térmico (45 °C), osmótico (NaCl 1,5 M), ácido (4,2) e alcalino (7,8), oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e falta de carbono. As amostras foram removidas em tempos diferentes. Análises de *Western blot* usando 20 µg de proteína total fracionada em 12% de SDS-PAGE e anticorpo monoclonal anti-V5 (Invitrogen). CBB. Gel corado com Coomassie Brilliant Blue usado como controle de carregamento. Os asteriscos indicam diferenças significativas em comparação com os micélios crescidos a 30 °C (teste de correlação de Tukey, \* P <0,05, \*\* P <0,01 e \*\*\* P <0,001, n=3). Os números ao lado esquerdo representam a MM em kDa.



Devido à presença de *motifs* LRE nos promotores de ambos os genes que codificam as proteínas RVBs (Figura 4), ensaios de estresse causado por luz também foram realizados, nos quais o micélio foi previamente cultivado no escuro e transferidos para a luz por diferentes tempos. A modulação da expressão de ambas as proteínas mostrou ser regulada de maneira oposta pela luz (Figura 6). Enquanto a expressão da proteína RVB-1 foi ativada pela luz na primeira 0,5 h, a expressão da proteína RVB-2 foi reprimida pela luz no mesmo tempo (Figuras 6A e 6B). A identificação de elementos de resposta à luz (LRE) nos promotores *rvb-1* e *rvb-2*, e

este resultado de expressão proteica, reforça que os genes, bem como as proteínas RVB-1 e RVB-2, podem ser regulados pela luz.

**Figura 6. A expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2 é regulada por luz.** Expressão das proteínas RVB-1-V5 (A) e RVB-2 (B) após exposição à luz. As amostras miceliais foram incubadas no escuro a 30 °C por 24 h e depois transferidas para luz constante (LL). Análises de *Western blot* usando 20 µg de proteína total fracionada em 12% de SDS-PAGE e anticorpo monoclonal anti-V5 (Invitrogen ). **CBB.** Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue* usado como controle de carregamento. Os asteriscos indicam diferenças significativas em comparação com os micélios crescidos a 30 °C (teste de correlação de Tukey, \* P <0,05, \*\* P <0,01 e \*\*\* P <0,001, n=3). Os números no lado esquerdo representam a MM em kDa.



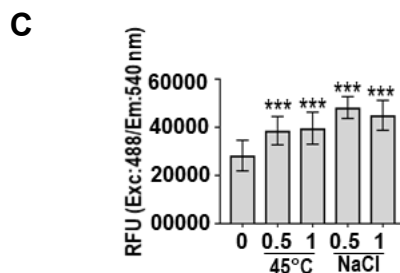
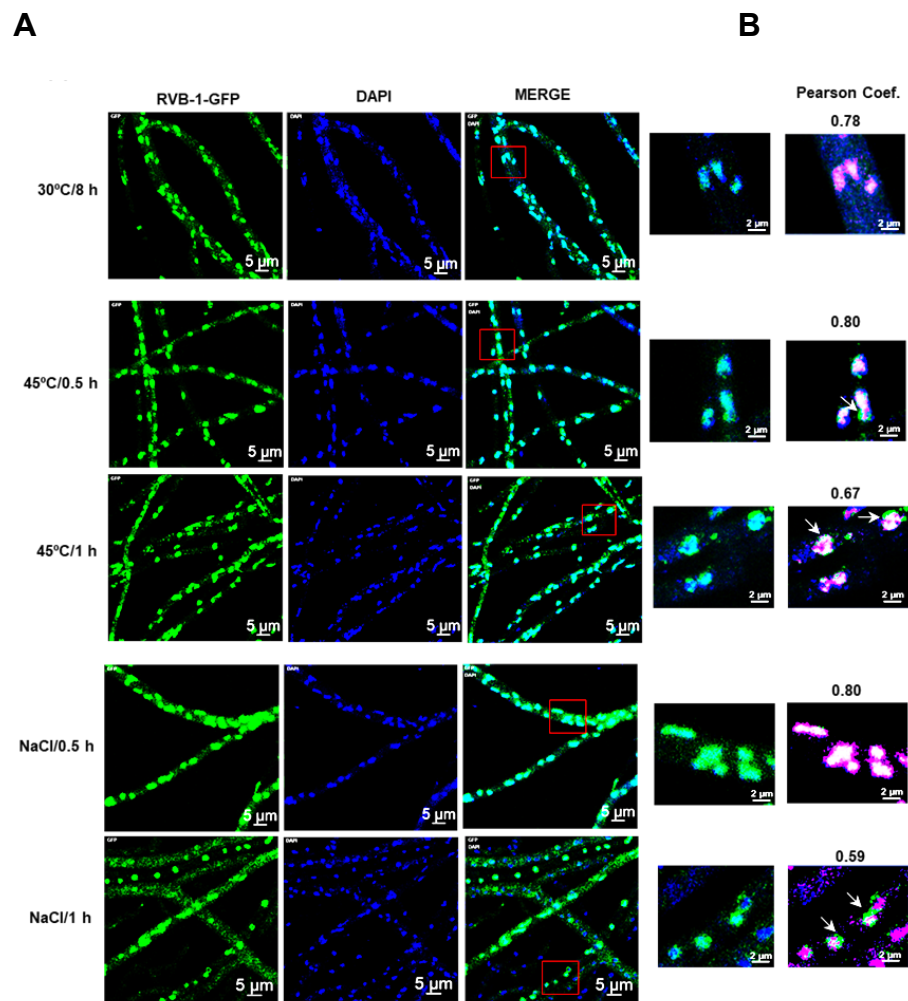
### 2.3 Localização subcelular das proteínas RVB-1/RVB-2-GFP por microscopia confocal e análise dos extratos nucleares submetidos a estresse térmico e osmótico

As análises de localização celular foram realizadas sob estresse térmico e osmótico, condições indutoras destas proteínas (Figura 5) em micélios das linhagens expressando endogenamente ambas as proteínas fusionadas a GFP (*rvb-1-sfgfp* e *rvb-2-sfgfp*). Os conídios foram germinados a 30 °C e os micélios foram então transferidos para VM pré-aquecido a 45 °C para o choque térmico ou VM contendo 1,5 M de NaCl para estresse osmótico. As células foram fixadas com formaldeído, os núcleos corados com DAPI e as lâminas analisadas por microscopia confocal em

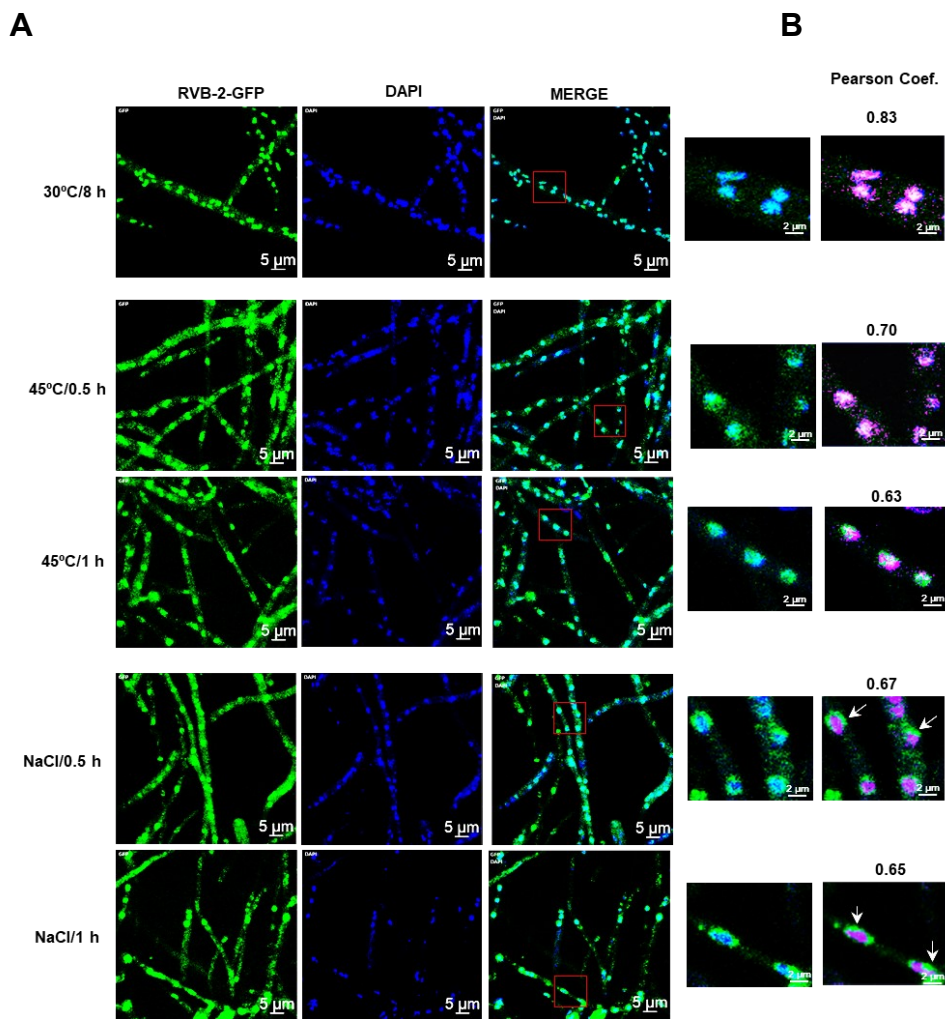
colaboração com a Dr. Paula A. Barbugli do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, na Faculdade de Odontologia, UNESP, Araraquara.

Os resultados mostraram que ambas as proteínas mostraram ser predominantemente localizadas no núcleo (Figuras 7A e 8A) com um coeficiente de correlação de Pearson (PCC) de 0,78 e 0,83 para RVB-1-GFP e RVB-2-GFP, respectivamente (Figuras 7B e 8B). Após a indução do estresse, observamos um leve decréscimo na localização nuclear com um PCC variando de 0,59 a 0,67 para ambas as proteínas (Figuras 7B e 8B). Os níveis de expressão foram quantificados medindo primeiramente a intensidade de fluorescência da GFP de ambas as proteínas nos núcleos (em aproximadamente 20) de cada cepa após exposição ao calor e estresse osmótico. Núcleos pertencentes à interfase do ciclo celular foram utilizados nos ensaios de quantificação. Observamos níveis de fluorescência de RVB-1-GFP e RVB-2-GFP significativamente maiores após a exposição ao estresse (Figuras 7C e 8C) e também a presença de condensados proteicos na região perinuclear (indicada pelas setas) sob estresse induzido por sal e temperatura (Figuras 7B e 8B). Além disso, também validamos a presença de quantidades maiores das proteínas no núcleo, realizando a quantificação de seus níveis de expressão em extratos enriquecidos com a fração nuclear das células, preparados a partir de micélios das linhagens *rvb-1-v5* e *rvb-2-v5* expostos ao estresse, nos quais as células foram lisadas em condições que não promovem a ruptura nuclear e os núcleos foram separados por centrifugação diferencial, lisados e analisados por Western blot. Níveis de expressão mais elevados foram observados nos extratos enriquecidos com a fração nuclear para ambas as proteínas após a indução de estresse (Figuras 9A e 9B, painéis esquerdos e direitos). Estes resultados corroboram os dados de expressão proteica aumentada mostrados na Figura 5.

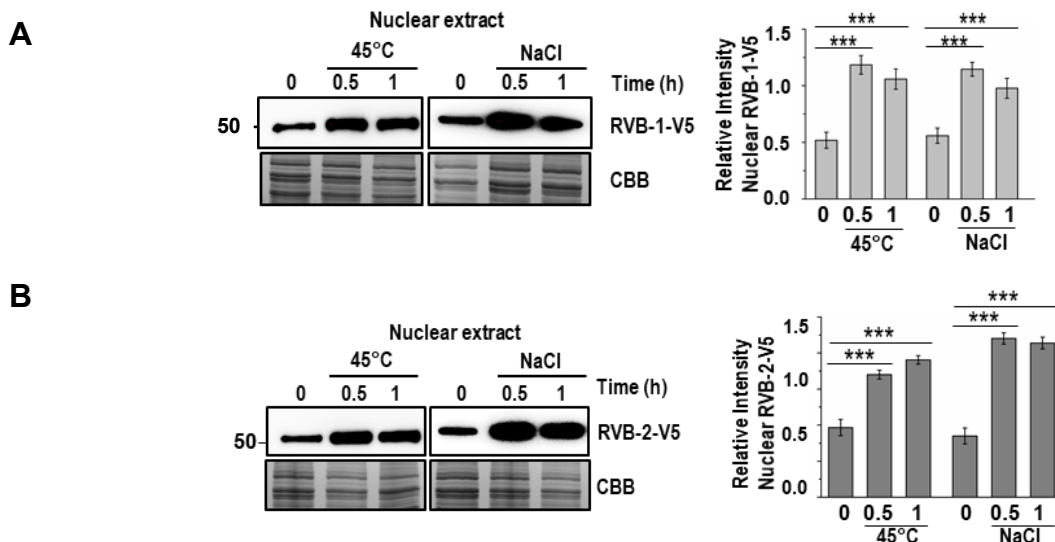
**Figura 7. A. Localização subcelular da proteína RVB-1-sfGFP sob estresse térmico e osmótico.** Conídios da linhagem expressando a proteína foram cultivados em meio VM líquido contendo sacarose a 2% a 30 °C por 10 h. Após esse período, os micélios foram transferidos para o meio VM pré-aquecido a 45 °C (estresse térmico) ou para o meio VM contendo NaCl 1,5 M (estresse osmótico) e incubados por 1 h. O micélio cultivado em meio VM líquido a 30 °C por 8 h foi utilizado como controle. Os micélios foram fixados em PBS com formaldeído, os núcleos foram corados com DAPI (0,5 mg/ml) e a fluorescência foi avaliada usando a microscopia de varredura a laser confocal CARLS ZEISS LSM 800 com detector Airyscan e GaAsp (Alemanha) com um Apocromat plano 63x / 1.40 Objetiva do óleo DIC M27. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes. **B.** Visualização aproximada da área representada em A e o coeficiente de Pearson calculado para mostrar a co-localização entre sfGFP e DAPI (roxa). **C.** Análises densitométricas das áreas de co-localização mostradas em B. As intensidades de fluorescência foram quantificadas com o software Image J em aproximadamente 20 núcleos de cada amostra. Teste de correlação de Tukey, \*\*\* P <0,001, n=20).



**Figura 8. A. Localização subcelular da proteína RVB-2-sfGFP sob estresse térmico e osmótico.** Conídios da linhagem expressando a proteína foram cultivados em meio VM líquido contendo sacarose a 2% a 30 °C por 10 h. Após esse período, os micélios foram transferidos para o meio VM pré-aquecido a 45°C (estresse térmico) ou para o meio VM contendo NaCl 1,5 M (estresse osmótico) e incubados por 1 h. O micélio cultivado em meio VM líquido a 30 °C por 8 h foi utilizado como controle. Os micélios foram fixados em PBS com formaldeído, os núcleos foram corados com DAPI (0,5 mg/ml) e a fluorescência foi avaliada usando a microscopia de varredura a laser confocal CARLS ZEISS LSM 800 com detector Airyscan e GaAsp (Alemanha) com um Apocromat plano 63x/1.40 Objetiva do óleo DIC M27. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes. **B.** Visualização aproximada da área representada em A e o coeficiente de Pearson calculado para mostrar a co-localização entre sfGFP e DAPI (roxa). **C.** Análises densitométricas das áreas de co-localização mostradas em B. As intensidades de fluorescência foram quantificadas com o software Image J em aproximadamente 20 núcleos de cada amostra. Teste de correlação de Tukey, \*\*\* P <0,001, n=20).



**Figura 9. Expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2-V5 no núcleo sob estresse térmico e osmótico. A. RVB-1-V5. B. RVB-2-V5.** Análises de *Western blot* usando proteínas nucleares de micélios submetidos a estresse térmico e osmótico em diferentes tempos. O gel corado com CBB foi utilizado como controle de carregamento e os números no lado esquerdo representam o MW em kDa. A quantificação da expressão (gráfico à direita) foi realizada usando ImageJ. Asteriscos indicam diferenças significativas em comparação com os micélios cultivados a 30 °C (teste de correlação de Tukey, \* P <0,05, \*\* P <0,01 e \*\*\* P <0,001, n=3).



### 3. Experimentos de imunoprecipitação revelaram prováveis alvos de interação com a proteína RVB-1 durante estresse térmico e osmótico

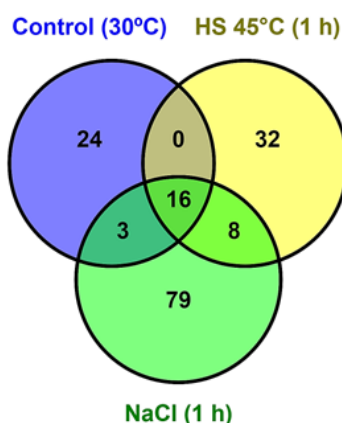
Buscando entender mais profundamente as funções das proteínas RVB-1 e RVB-2, principalmente associadas à resposta a estresse, ensaios de imunoprecipitação da proteína RVB-1-V5 foram realizados com extratos proteicos de micélios cultivados na condição vegetativa de crescimento e após estresse térmico (45°C, 1 h) e osmótico (1,5 M NaCl, 1h). Após incubação, a resina foi lavada, as proteínas tripsinizadas e analisadas por espectrometria de massas. Como controle, todos os experimentos também foram realizados paralelamente com uma linhagem selvagem do fungo (que não expressa nenhuma proteína de fusão) e as proteínas comuns entre os experimentos foram descartadas. Apenas proteínas que apareceram em ambas as réplicas foram consideradas. Uma análise comparativa entre as proteínas identificadas durante o crescimento normal do fungo e após estresse térmico e osmótico foi realizado, mostrando alvos comuns e específicos para cada situação (Figura 10A).

Um total de 16 proteínas foram identificadas como possíveis proteínas parceiras de RVB-1 tanto em condições vegetativas como após estresse e um total

de oito proteínas apareceram comuns após estresse térmico e osmótico (Figura 10A).

**Figura 10. Resultado da interpretação dos experimentos de espectrometria de massas.** (A) Diagrama de Venn mostrando o total de proteínas identificadas em cada uma das situações estudadas: crescimento normal (30 °C), após estresse térmico (45 °C/1h) e osmótico (1 M NaCl/1h). (B) Prováveis alvos identificados em todas as condições analisadas (30 °C/HS e NaCl) e identificados apenas nos estresses (HS/NaCl).

**A**



**B**

**Putative targets of RVB-1**

Protein	ORF
<b>Common proteins (30°/ HS / NaCl)</b>	
hypothetical protein NCU03858	NCU03858
hypothetical protein NCU07568	NCU07568
hypothetical protein NCU06395	NCU06395
Actin-related protein 4	NCU02555
RVB-2	NCU06854
C2H2 finger domain-containing protein	NCU03206
chromatin remodeling complex subunit	NCU06394
hypothetical protein NCU06928	NCU06928
Putative DNA helicase ino80 (Crf-2-1)	NCU08919
Actin-related protein 6	NCU05587
hypothetical protein NCU06453	NCU06453
RVB-1	NCU03482
helicase swr-1	NCU09993
conserved hypothetical protein	NCU01534
DUF1711 domain-containing protein	NCU01410
Actin-related protein 8	NCU06238
<b>Common proteins after stress (HS / NaCl)</b>	
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (cpg-7)	NCU01528
elongation factor 1-alpha	NCU02003
26S proteasome regulatory subunit rpn2	NCU09450
probable ribosomal protein RPL4A	NCU03757
ribosomal protein CRP7	NCU08627
translation elongation factor $\alpha$ EF-2	NCU07700
cytochrome P450 98A3	NCU10344
probable ribosomal protein L12	NCU01317
Glicogenin	NCU06698

Entre as proteínas identificadas (Figura 10B), destaca-se que a proteína RVB-1, seguido da proteína RVB-2, ambas tiveram o maior número de peptídeos identificados em todas as condições e em todos os experimentos (Tabela S3), o que valida o procedimento de imunoprecipitação utilizado. Foram também identificados componentes majoritários dos complexos de remodelagem de cromatina INO80 e SWR-1 bem como a presença de várias proteínas relacionadas a actina (*Actin-related proteins*, ARPs). A proteína INO80 (anotada como ATPase envolvida em remodelagem de cromatina, NCU08919) é homóloga à proteína Ino80p de *S. cerevisiae* (54% de identidade, *e-value* 0.0) conhecida por interagir com o complexo Rvb/RuvBLs formando uma unidade multimolecular envolvida na remodelagem de cromatina (Eustermann et al., 2018). Outras proteínas assessórias do complexo INO80 foram identificadas nos experimentos como prováveis homólogos em *N. crassa*, as proteínas IES-2 (NCU01534), IES-4 (NCU01410), ARP-4 (NCU02555), ARP-5 (NCU06394), e ARP-8 (NCU06238), todas anotadas como constituintes do complexo INO80 por meio de análise de BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou no banco de dados do fungo. Vale ressaltar que muitas dessas ORFs não foram caracterizadas em fungos filamentosos e estão anotadas como proteínas hipotéticas.

Também foram imunoprecipitadas proteínas do complexo SWR-1: a subunidade 4 do complexo SWR-1 (NCU04002), a helicase SWR-1 (NCU09993) e ARP-6 (NCU05587) e outras (Tabela S3) também conhecidas como participantes do complexo de remodelagem da cromatina SWR-C/SRCAP e descritas interagir com as proteínas Rvb/RuvBLs (NANO e HOURY, 2013; Dauden, López Perrote e Llorca, 2020). Outro alvo interessante é a presença de um fator de transcrição anotado como *C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger domain-containing protein* (ORF NCU03206) que mostrou alta homologia com o fator de transcrição Zap1p de *S. cerevisiae*.

Das proteínas identificadas como comuns nos estresses, destacam-se a presença da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GA3PDH, NCU01528), fatores de alongamento da tradução, como EF-1a (NCU02003) e aEF-2 (NCU07700), proteínas ribossomais e subunidades do proteassomo (Figura 10B, comuns HS e NaCl, Tabela S3). Curiosamente, identificamos proteínas envolvidas no metabolismo de glicogênio, como a proteína ramificadora de glicogênio (GBE, NCU05429) a 30°C (Tabela S3, Control) e a proteína glicogenina (GNN, NCU06698) durante estresse

(Figura 10B, Tabela S3), o que também pode sugerir um papel funcional destas proteínas no metabolismo do carboidrato de reserva.

### 3.1 Proteínas identificadas após estresse térmico

Especificamente após estresse térmico, foram identificados componentes do proteassomo, tais como RPT-1 (NCU02840), RPN-2 (NCU09450) e outras (Tabela S3), proteínas envolvidas no transporte de vesículas de maneira ATP-dependente (NCU04581), t-RNA sintetases (NCU06722), aminopeptidases (NCU00112) e proteínas envolvidas em poliubiquitinação (NCU08405), indicando que as proteínas RVBs podem estar associadas com constituintes de grânulos de estresse (proteínas 40S ribossomais e fatores de alongamento da tradução), mas também com o complexo do proteassomo e possivelmente no agressomo em *N. crassa*. Também chama a atenção a presença de um componente anotado como regulador da síntese de quitina (NCU02351) e actina (NCU04173) podendo indicar função das RVBs na remodelagem da parede celular, corroborando com os resultados de sensibilidade das mutantes RVBs a Congo Red (Figura 3). Curiosamente, foi identificado especificamente no estresse térmico e apenas por uma busca mais ampla (considerando proteínas que apareceram em baixo *score*) um peptídeo da proteína Shugoshin (ORF NCU01842). Esta proteína não foi encontrada utilizando o banco de dados de *Neurospora* pelo *Mascot*, mas foi identificada contra o banco de dados de *Sordariaceae* e nos chamou a atenção pois sua paróloga (SGO2) foi recentemente descrita como essencial para a resposta ao choque térmico em células de camundongos [114]. No que se refere a presença de chaperonas, foram identificadas diferentes HSPs em todos os experimentos, principalmente da família das HSP70, 40 e 30. No entanto, elas apareceram nos controles tanto a 30 °C como a 45 °C e apenas no estresse osmótico elas apareceram de forma exclusiva nos experimentos (Tabela S3). A lista completa de proteínas identificadas está relacionada na Tabela S3. Também foram identificadas proteínas envolvidas com o metabolismo de carboidratos, como glicogenina (GNN, NCU06698), mencionada anteriormente, glicogênio sintase (GSN, NCU06687) e glucosaminidases (NCU04726).

### 3.2 Proteínas identificadas após estresse osmótico

Nos experimentos de estresse osmótico, foram encontrados a presença de proteínas envolvidas em sinalização celular importantes, como a Ca/CaM-dependente quinase-1 (CAMK-1, NCU09123), fosfatidilinositol 3-quinase 3 (NCU09367), proteína de controle de divisão celular 25 (CDC-25, NCU06500), uma ciclina dependente de quinase (PCL-1, NCU08772) e uma *small* GTPase RHO-1 (NCU03407) envolvida na transdução do sinal, o que fortemente sugere o envolvimento das proteínas RVB-1 e RVB-2 em processos de sinalização celular, ou na estabilização de seus componentes. Além destas proteínas, também foram identificadas a presença de t-RNA sintetases, componentes do proteassomo, proteínas envolvidas na tradução, como fatores eucarióticos de alongamento (EFs e EIFs) e proteínas ribossomais, indicando uma função conservada como possíveis componentes de grânulos de estresse nesta condição. Além disso, a presença de subunidades de tubulina, reforça a importância da proteína RVB-1 na manutenção da estrutura celular durante estresse (Tabela S3). Também foram identificadas as chaperonas HSP70 (NCU02075, isoforma HSP70-2), HSP70-Like (NCU1581, Isoforma HSP70-4), HSP30 (NCU07232) e uma proteína com domínio DNAJ, similar a HSP40 (NCU07414) (Tabela S3), o que reforça a importância das RVBs na estabilização de proteínas nesta condição.

## 4. Componentes de complexos de remodelagem a cromatina podem estar envolvidos com a resposta a estresse em *N. crassa*

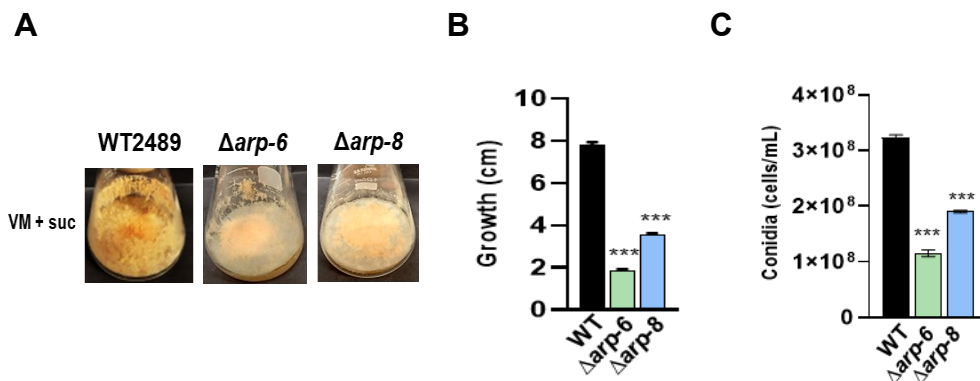
### 4.1. Caracterização das linhagens mutantes homocárias $\Delta$ arp-6 e $\Delta$ arp-8

Foram adquiridas do FGSC linhagens mutantes homocários para os genes NCU05587 (*arp-6::hph*) e NCU06238 (*arp-8::hph*), os quais foram identificados nos ensaios de interação com a proteína RVB-1 durante estresse (Figura 10B). Ambas ORFs estão anotadas no FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb>) como codificadoras para proteínas da família *Actin-like ATPase domain* e denominadas de *Actin-related proteins*, ARP-6 e ARP-8, respectivamente. A proteína ARP-6 de *N. crassa* compartilha 31% (*e-value* 4e-62) e 36% (*e-value* 1e-80) de identidade com as

proteínas de *S. cerevisiae* e humanos, respectivamente, e a proteína ARP-8, com identidade de 34% (*e-value* 1e-74) e 33% (*e-value* 1e-54) em relação às proteínas de levedura e humano, respectivamente. Ambas participam de complexos de remodelagem de cromatina distintos, SWR/SCAP e INO80, respectivamente, e já estão descritas interagir via estes complexos com as proteínas RVB-1 e RVB-2 [132]. O genótipo homocário destas linhagens foi confirmado por PCR utilizando oligonucleotídeos para regiões que anelam dentro da sequência de cada ORF (Tabela S2) e mostraram serem mutantes nulos.

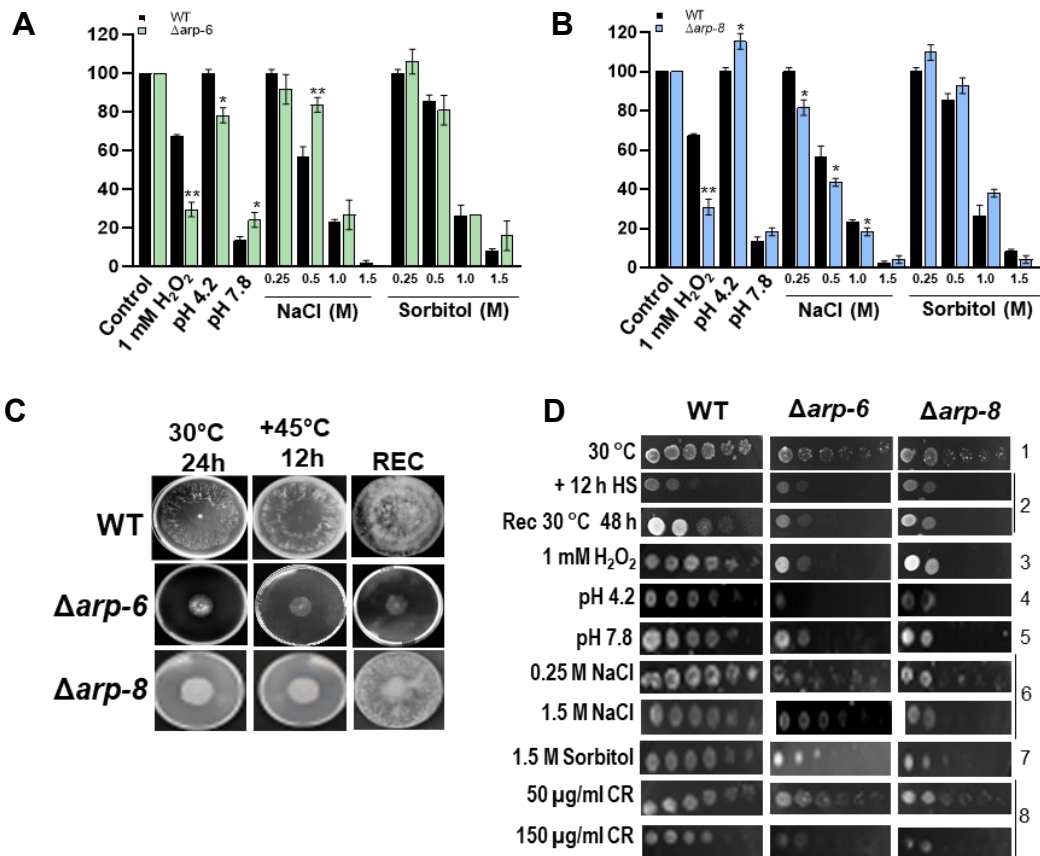
Alguns ensaios de crescimento na presença de agentes indutores de estresse, previamente realizados para os mutantes  $\Delta rvb-1^{het}$  e  $\Delta rvb-2^{het}$ , foram realizados para investigar o envolvimento destas proteínas em estresse. Os resultados mostraram que as linhagens apresentam consideráveis diferenças fenotípicas quando comparado à linhagem selvagem, sendo as mais expressivas a coloração mais pálida e baixa densidade micelial (Figura 11A), um atraso no crescimento radial da colônia quando crescida em placa (Figura 11B) e significativa redução na produção de conídios (Figura 11C). Ensaios de crescimento radial com estas linhagens em placa na presença de agentes estressantes mostraram que ambas apresentam significativa diminuição do crescimento na presença de estresse oxidativo por 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 11D e 11E), mas apresentaram resultados contrários frente a presença de pH ácido ou alcalino, bem como na presença de NaCl. Enquanto a linhagem  $\Delta arp-6$  apresentou certa sensibilidade a estresse ácido, a mesma apresentou uma leve tolerância ao pH alcalino (Figura 11D), bem como apresentou leve tolerância na presença de concentrações moderadas de NaCl (Figura 11D, 0,5 M NaCl). Entretanto, a linhagem  $\Delta arp-8$  mostrou certa tolerância ao pH ácido, mas não respondeu ao pH alcalino e mostrou sensibilidade a sal em todas as concentrações (Figura 11E). Não foram observadas diferenças significativas no crescimento na presença de sorbitol, indicando uma função possivelmente não relacionada ao estresse osmótico, mas na resposta a hiper salinidade. Ensaio de choque térmico em placa, revelou que a linhagem  $\Delta arp-6$  não recupera após ser submetida por 12 h a 45 °C, mas  $\Delta arp-8$  sim, embora seja possível verificar uma visível perda da massa micelial (Figura 10F).

**Figura 11. Análise fenotípica das linhagens mutantes  $\Delta arp-6$  e  $\Delta arp-8$ .** (A) Aspectos morfológicos, (B) de crescimento em placa e (C) quantidade de conídios produzidos pelas linhagens mutantes. Um total de  $5 \times 10^4$  conídios foram inoculados para todas as linhagens no centro da placa. Uma média de três experimentos biológicos foram realizadas.



Com base nestes resultados, decidimos realizar um ensaio de diluição seriada de sensibilidade destas linhagens ( $5 \times 10^5$  a 5 conídios) na presença de quantidades fixas de agentes estressantes e sorbose (Figura 12D). Ambas apresentaram considerável redução do crescimento colonial conforme a quantidade de conídios foi diminuindo (Figura 12D, linha 1) e apresentaram alta sensibilidade frente a presença dos diferentes estresses, praticamente inibindo o crescimento na diluição de  $5 \times 10^4$  conídios, principalmente após choque térmico (linha 2), presença de peróxido (linha 3), pH ácido e alcalino (linha 4 e 5) e osmótico por NaCl e sorbitol (linhas 6 e 7). As linhagens pareceram não ser muito sensíveis à baixa concentração de CR (50  $\mu\text{g/ml}$ , linha 8), mas mostraram certa sensibilidade em alta concentração (150  $\mu\text{g/ml}$ , linha 8).

**Figura 12. Análise das linhagens mutantes  $\Delta arp-6$  e  $\Delta arp-8$  na presença de agentes estressantes.** (A e B) Ensaio de crescimento em placa na presença de agentes estressantes para as linhagens  $\Delta arp-6$  e  $\Delta arp-8$ , respectivamente. Cerca de  $5 \times 10^4$  conídios foram inoculados no centro da placa e deixados crescer por 24h a 30°C na presença de agentes estressantes. Como controle, foi utilizada a linhagem selvagem WT FGSC#2489. As medidas de crescimento foram realizadas após 24 h e expressas em porcentagem. \* $p < 0.5$ , \*\* $p < 0.05$  (Teste T-student). (C) Choque térmico. Placas crescidas a 30°C por 24h foram transferidas para 45 °C por 12 h e fotografadas. Após isso, as placas submetidas a choque térmico foram deixadas recuperar a 30 °C por 48 h e fotografadas. (D) Ensaio de sensibilidade das linhagens mutantes em diferentes condições de estresse. Amostras de conídios diluídos em série ( $5 \times 10^5$  a 5) das linhagens selvagem e mutantes foram inoculadas em meio FGS com e sem os agentes estressantes NaCl, sorbitol,  $H_2O_2$  e CR. As amostras também foram expostas ao estresse térmico (45 °C) e em pH 4,2 e 7,8. O crescimento foi avaliado após 24 e 48 h. **1.** Controle de crescimento a 30 °C, pH 5.8 após 48 h. **2.** Crescimento sob estresse térmico (acima). **3.** Crescimento na presença de 1 mM  $H_2O_2$  por 48 h. **4.** Crescimento em pH 4,2 (estresse ácido) e **5.** Crescimento em pH 7,8 (estresse alcalino) por 24 h. **6.** Crescimento na presença de NaCl 0,25 M e 1,5 M durante 48 h. **7.** Crescimento na presença de 1.5 M de sorbitol. **8.** Crescimento na presença de 50 e 150  $\mu g/ml$  CR por 48 h.



## 4.2. Caracterização das linhagens mutantes heterocárias $\Delta arp-4$ , $\Delta arp-5$ e $\Delta crc-1$ (*swc-4*)

Linhagens mutantes heterocários para os genes NCU02555 (*arp-4*), NCU06394 (*arp-5*) e NCU04002 (*cfc-1*, *swc-4*) também foram adquiridas do FGSC e confirmadas serem homocários por PCR. Os genes *arp-4* e *arp-5* estão anotados do FungiDB como codificadores para as proteínas da família *Actin-like ATPase domain*, *Actin-related proteins*, ARP-4 e ARP-5, respectivamente, e o gene NCU04002 codifica para a subunidade 4 do complexo SWR-1, homóloga a Swc4p de *S. cerevisiae*.

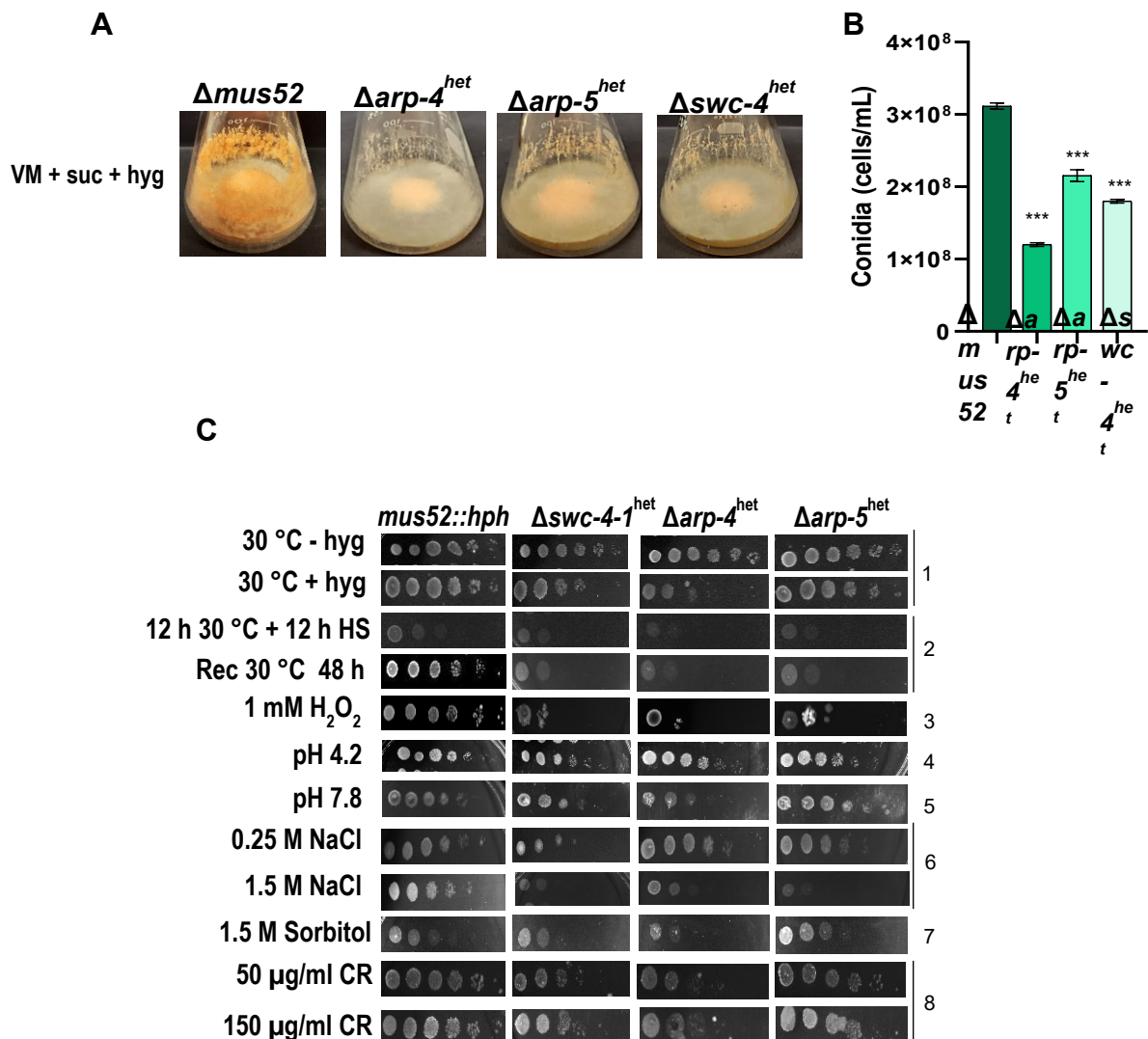
A proteína ARP-4 apresenta 30% (*e-value* 3e-29) e 33.76% (*e-value* 4e-80) de identidade com as proteínas de *S. cerevisiae* e *Homo sapiens*, respectivamente, enquanto ARP-5 apresenta 40% (*e-value* 8e-151) e 29% (*e-value* 7e-34), respectivamente, e SWC-4 29% (*e-value* 3e-29) e 35% (*e-value* 2e-19), respectivamente. O gene NCU04002 está anotado do FungiDB como *crc-1*, porém foi renomeando neste trabalho como *swc-4* para evitar confusões com outras proteínas do complexo SWR-1. Tentativas de isolar homocários para estas três linhagens foram realizadas, sem sucesso, sugerindo que são proteínas essenciais.

De uma maneira geral, as três linhagens mutantes apresentaram considerável perda da massa micelial quando crescidas em VM com higromicina por 10 dias em garrafas (Figura 13A), sendo que a linhagem  $\Delta arp-4$  apresentou uma considerável perda de coloração quando comparado à linhagem selvagem ou às outras mutantes, sugerindo um papel desta proteína na produção de metabolitos secundários como o  $\beta$ -caroteno.

Ensaio de diluição seriada para estas linhagens também foram realizados como descrito para as homocários, mas em meio VM contendo higromicina. O crescimento das linhagens foi levemente afetado pela presença de higromicina, considerando as placas na ausência do meio de seleção e da linhagem selvagem, sendo mais proeminente o crescimento da linhagem *arp-4* (Figura 13C, linha 1). Sob estresse, no entanto, o crescimento das linhagens foi severamente afetado, principalmente no estresse térmico, não sendo capazes de recuperar (Figura 13C, linha 2), bem como sensibilidade ao estresse oxidativo (linha 3), alta concentração de sal (linha 6) e presença de sorbitol (linha 7). Entretanto, não apresentaram

considerável sensibilidade ao pH (linhas 4 e 5), moderada concentração de sal (linha 6) e na presença de CR (linha 8).

**Figura 13. Caracterização das linhagens mutantes heterocárias  $\Delta arp-4$  e  $\Delta arp-6$  e  $\Delta crc-1$ .** (A) Aspectos morfológicos e (B) quantidade de conídios produzidos nas linhagens mutantes. Um total de  $5 \times 10^4$  conídios foram inoculados para todas as linhagens no centro da placa. Uma média de três experimentos biológicos foram realizadas. (C) Ensaio de sensibilidade das linhagens mutantes em diferentes condições de estresse. Amostras de conídios diluídos em série ( $5 \times 10^5$  a 5) das linhagens selvagem e mutantes foram inoculadas em meio FGS com e sem os agentes estressantes NaCl,  $H_2O_2$  e CR. As amostras também foram expostas ao estresse térmico ( $45^\circ C$ ) e em pH 4,2 e 7,8. O crescimento foi avaliado após 24 e 48 h. **1.** Controle de crescimento a  $30^\circ C$ , pH 5,8 após 48 h, na presença e ausência de higromicina. **2.** Crescimento sob estresse térmico. Os conídios foram cultivados a  $30^\circ C$  por 12 h e então as placas foram transferidas a  $45^\circ C$  por 12 h. Recuperação do estresse térmico (REC). Os conídios foram cultivados por 12 h a  $30^\circ C$ , as placas foram transferidas para  $45^\circ C$  por mais 12 h então permitidas recuperar por 48 h a  $30^\circ C$ . **3.** Crescimento na presença de 1 mM  $H_2O_2$  por 48 h. **4.** Crescimento em pH 4,2 (estresse ácido). **5.** Crescimento em pH 7,8 (estresse alcalino) por 24 h. **6.** Crescimento na presença de NaCl 0,25 M e 1,5 M durante 48 h. **7.** Crescimento na presença de 1,5 M de sorbitol. **8.** Crescimento na presença de 50 e 150  $\mu g/mL$  de CR por 48 h.



## 5. A proteína shugoshin é uma proteína nuclear, exerce uma função na resposta a estresse em *N. crassa* e interage diretamente com RVB-1 *in vitro*

### 5.1. A ORF NCU01842 de *N. crassa* codifica para uma proteína shugoshin

Como descrito anteriormente, a identificação de um peptídeo da proteína shugoshin de *N. crassa* nos ensaios de imunoprecipitação da proteína RVB-1 após estresse térmico, nos levou a investigar a função desta proteína na resposta ao estresse, levantando a hipótese de que a ortóloga de *N. crassa* (denominada de SGO-1) pode ser uma ortóloga funcional da paróloga SGO2 de camundongo. Em camundongos e em *S. cerevisiae*, estas proteínas estão descritas existir como duas parálogas (SGO1 e SGO2). No entanto, em eucariotos superiores, elas também são descritas em diferentes isoformas geradas por *splicing* alternativo possuindo baixa similaridade, mesmo dentro de uma mesma espécie. Uma análise no banco de dados de *N. crassa* expandido para outros fungos filamentosos não revelou a existência de outros genes codificantes da proteína SGO-1 no genoma e a proteína apresenta baixa identidade de sequência quando comparada com a SGO1 ou SGO2 de camundongos (Figura 14A e 14B) ou com as de *S. cerevisiae* (dados não mostrados). A predição da estrutura da proteína SGO-1 utilizando *AlphaFold* (<https://alphafold.ebi.ac.uk>) revelou que a proteína de *N. crassa* é mais parecida em tamanho e estrutura com a SGO2 do que com a SGO1 de camundongo (Figura 14C) e revelou que a mesma é composta pelo domínio N-terminal longo  $\alpha$ -hélice com boa predição da estrutura (>90%, regiões azuis), no entanto a mesma apresenta quase em sua totalidade regiões desprovidas de estrutura (Figura 14C, regiões amarelas ou laranjas), característica esta semelhante aos modelos de predição para as proteínas de camundongo (Figura 14C), *S. cerevisiae* e *Homo sapiens* (banco de dados do *AlphaFold*).

**Figura 14. O produto da ORF NCU01842 codifica para uma provável proteína ortóloga as Shugoshins. (A) Alinhamento de sequência com o produto da ORF NCU01842 e a proteína SGO-1 e (B) SGO2 de *Mus musculus*. O alinhamento foi realizado pelo ClustalW e analisado pelo programa Jalview. Os aminoácidos conservados estão representados por cores diferentes. (C) Modelo estrutural previsto para as proteínas SGO-1 de *N. crassa*, SGO1 e SGO2 de *Mus musculus*. O modelo foi gerado pelo banco de dados estruturais AlphaFold.**

**A**

```

SGO-1_N.crassa#1-77: 1 MAR-----LNE---QAMSSV-----ALSQNLLELRKFLRNRDITAE-----RVNSTSLRIRGLENECARLLSELELRSQVLRLEK-ELQDAAARVADHALE 86
SGO1_Mouse#1-517: 1 MAERQCKRSFODTLEDIKNRMKERRKKNLAGEKRRKSFIVAGQVPSNTATL-LVYQDNRLMLALENEKSVREADD-VILQLRKECYLYTCLLALKEKLSRSESETTOHNGG-----PS 121

SGO-1_N.crassa#1-77: 87 VKAKMETQLAELSLASLASEPFSKRRL-SEERRVAQRRPVRHRSPLLRARQEAQDELAEQGRLPPIYENKTVARATMNSSEILALCMQADDSNDSPIGPPVPRFVEDDMVIKCSPPFNKNA 212
SGO1_Mouse#1-517: 122 VVSSIQNTRRLSG-----KSLQQIAVEETCPYOTTEPSPAVVRETQGGD--FDSKWESTDEVLRRTISIRHL-----D-----FNIISHSTLEEDKASPRVAQ 214

SGO-1_N.crassa#1-77: 213 EAEEETETTEQVEESFALQVPPSLSPKLDYDRPMMILFSPKESRVAEFSKMFSPPPMPPKQSTAVFSERTRAGLKKK--LNQDN---NEFNKALKQQQKKEGNETE-----KKGLSAR 328
SGO1_Mouse#1-517: 215 SLEVK-----GSGCR-----EMTITLHLELVCLWNKQDI--SLCSRLLINPAKITETEVIKSKP-EOESKRRKARKRRAQRRTKRCSSLSLRKGNKIKDKQGLPPTLDGGIGSC 322

SGO-1_N.crassa#1-77: 329 DPKRKSIKETAKKRAPLISASG-----NEHIVPSKFAKHQVADDFKRVKVKHAKKQCKVDLPAPQKSAVEETQGNSTSAFKVEILPPALEPPEVAEIE 429
SGO1_Mouse#1-517: 322 DAYDF-NLK--GVHRTPEKMNNGKNETDSSNSEVSDLECSTSEDEDDLKPLPSK-----LRDRESER-AVTRPSRGRQGLYFDGKERKVEI-----SARTGIPPEPESKRLDK 433

SGO-1_N.crassa#1-77: 430 EIDLITIGTPEASESTVVTHDTPPAHISNGETSRPARRAAIIVYTERNLRDKMRRPKELFDVAVSGEGKFLHRRTSQGQQQKKGDESATSVKRVKVEFSFAVDISSLTSSALFEKEKE 556
SGO1_Mouse#1-517: 434 VNILQCRVKIIE-----KPLPKRRRSDSFAVALTKRGGSTIKKERTLASLRLRGGQFPT-----LCLFNSIIFKRRMCKPKR-----RDAQ----- 515

SGO-1_N.crassa#1-77: 557 PPDDEILSNGIILSSVDLERRRRASSFSTAAPAMTIEVQEQSTLNLAAEDDENAAVEAQIKELNSNITTRRGGKGRQMSRSRVEITIPENYEHEDAQLSTNSASVDLYDFASCASPSAA 683
SGO1_Mouse#1-517: 516 T----- 517

SGO-1_N.crassa#1-77: 684 QLEATTQDVEVNNKAKKSSRRSSAASSTETTATASAKERRSRKRASMLVKKSLWAEELAQEEDEEDVNDSSGSLSKRRASRRRSMML 774
SGO1_Mouse#1-517: ----- 774
    
```

**B**

```

SGO-1_N.crassa#1-77: 1 -----MARLNEQAM-----SVA-LSTDLELLRKLFRONRDIARVNSTSLRIRGLENECARLL--SENLELRGOVLRLEKELQDAAARRVADHALEVKKAKMETQLAEL 98
SGO2_Mouse#1-1164: 1 MEYPGIKVDVTVTSQIRRVKGRIAKTNLNVSLAKIKAKILNSSLFKISLKHNRALARALSKKENSRRITTEKMOLOKEVEKLNFEFTLRKLNTLN-----KKLVEIESHSNDLTA 118

SGO-1_N.crassa#1-77: 99 SSSLASLGEPPSKR-RLSE--ERRYAPRPSVHRSPLRARA-----EADQE-----LLAEQGRLPPIYENKTVARATMNSSEILALCMQADDSND 183
SGO2_Mouse#1-1164: 119 I-EISLSEFHQSFLLSATKORNSKCKPA--HLPYARVLLTSENDDDGADKQWTKCNRRTISKTSPOSTSVSRQPSLLHQCNLKAFPKEDNOKTECGSHLEHTSSVDLBNESHSD 239

SGO-1_N.crassa#1-77: 184 SPDI-----GPF-----VSRFVVEDDMVIKCSPPFNKLAEE--TETTEQVEESPR-ALQVPRSLPPKLDYORRNMIKFSPPKESRVAEFSKMFSPPPMEP 274
SGO2_Mouse#1-1164: 240 KPSLSEMKTARSRLRREKLSHNVNTRMKKCVSSTPDIILKVTLDHRTSPGSLWLNLEIHHHTNETSNNTRNACFELDRSE--SSPEQAK--RMELVQKNTD-SHFQKTVYDAOMEL 359

SGO-1_N.crassa#1-77: 275 PKQSTSAVP-----SETIRAGLKRKLNQDNQNEPKA--TKLQQKENGNET-----GKKGLSARDPKRKSIEKA-----KPAFLSAKSTNEHIVSKPKAK 364
SGO2_Mouse#1-1164: 360 TATDIGLVAVSKSKKNQNKKADCKETFRKLVGASSDKKRESKRECKDSVEGAEEDAAARAERAGVLDGRGDE--EENPCSSIEQSOVNIQKIRTLQNSDOENIQNTKQRQTYTD 482

SGO-1_N.crassa#1-77: 365 PHVADDKFKVVKHKSKEK-----VLPAPQKSAVEETQGNSTSAFTKV--EILPPALEPPEVAEIPETDILITPGETPERASESTVVTHDTP 454
SGO2_Mouse#1-1164: 483 EQEETNRSRNSKFLQDCKFDLCKQTLHHLNLSKQTFVIRK-SEKDNLEFNGEEDKDTISENLEVIN--EFHIDDLSIEA-----NENVQDEQTMLDLKKSVSAQGNQTKINNTKQKI 596

SGO-1_N.crassa#1-77: 455 -----PPAHISNGETSRP-----SRRARAAIIVYTERNLRDKMRRP-----TKELF-----DAVSGEGKFLHRRTSQGQQQQRK 518
SGO2_Mouse#1-1164: 597 NRRTKIIVSMQVYEDNDKDIHVLKDNFPFHQAQKETSNGLESKHEESPLLFTRDNGSLDCKTQNVLDLHKQIPDLYPRNSESISKIPRQKVNKRTEVIGVKCESDNDQVHC 715

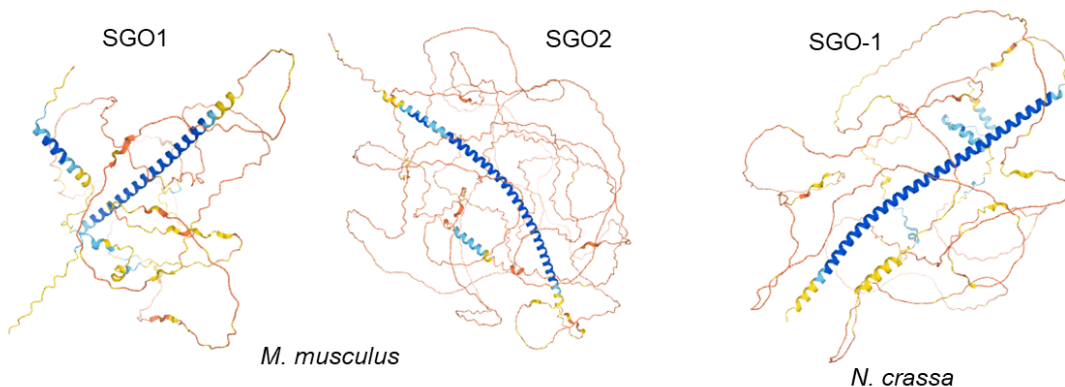
SGO-1_N.crassa#1-77: 519 GDESARTSVSRVVEFSFAVDISLTSALFEKEKEPEDEILSNGIILPSVDLGRRRASSFSTAAPAMTIEVQEQSTLNLAAEDDENAAVEAQI--QKELNSNITTRRGGKGR-R 639
SGO2_Mouse#1-1164: 716 SEKDKSLLOQNDPFTKDLKDFDPAFONKQSAKSCD-----KREMLGLKHH-----DPNQ-PACQD-----DKKAGKLRQKVNKRTEISKIQIENDRGSH 811

SGO-1_N.crassa#1-77: 640 QMSRSV-----ETI--ETENYEHEDAQLSTNSASVDLYDFASCASPSAAEQQL--EATTQGV-PVNRKAPKGRRASAASTETTATASAKPRSSRK--RASMLVKKLWAEELAQE 746
SGO2_Mouse#1-1164: 812 DNLNKLCKVNIISKIISQMNIIYETINEDGNFKSIKDGEDIKGDFEINSNKENVDRIQDPTLVKTKRKGCRAGCSLA-----SANNRCGLQLTDSQVQSVFLDGG--LR-H 924

SGO-1_N.crassa#1-77: 747 EEEDEEV-----GNDSGGSL--KGRASR-----R-----NTDLAKAVDSQOTEKENYLEKEIKAKRCKDFCTKVLKPLSETCSSNIKNS 1049
SGO2_Mouse#1-1164: 925 HFNEDSGPGEQTNLPMKMGQSAGRSLGDARVSLGEGSRPAKAVSKMTPKSKKPKLPLGCSPEHGTVEITPNTDLAKAVDSQOTEKENYLEKEIKAKRCKDFCTKVLKPLSETCSSNIKNS 1049

SGO-1_N.crassa#1-77: 771 -----SMLL----- 774
SGO2_Mouse#1-1164: 1050 LDMCKSSLLSISRRKTLMLSESSSLESTCIQVGDAAHEKITTRNHRHRTQKSTPSRSTSLVLDVTSVSDTNANENESSEQSHPMRRKRQCVLNLNTEPESLRKSMRR 1164
    
```

**C**

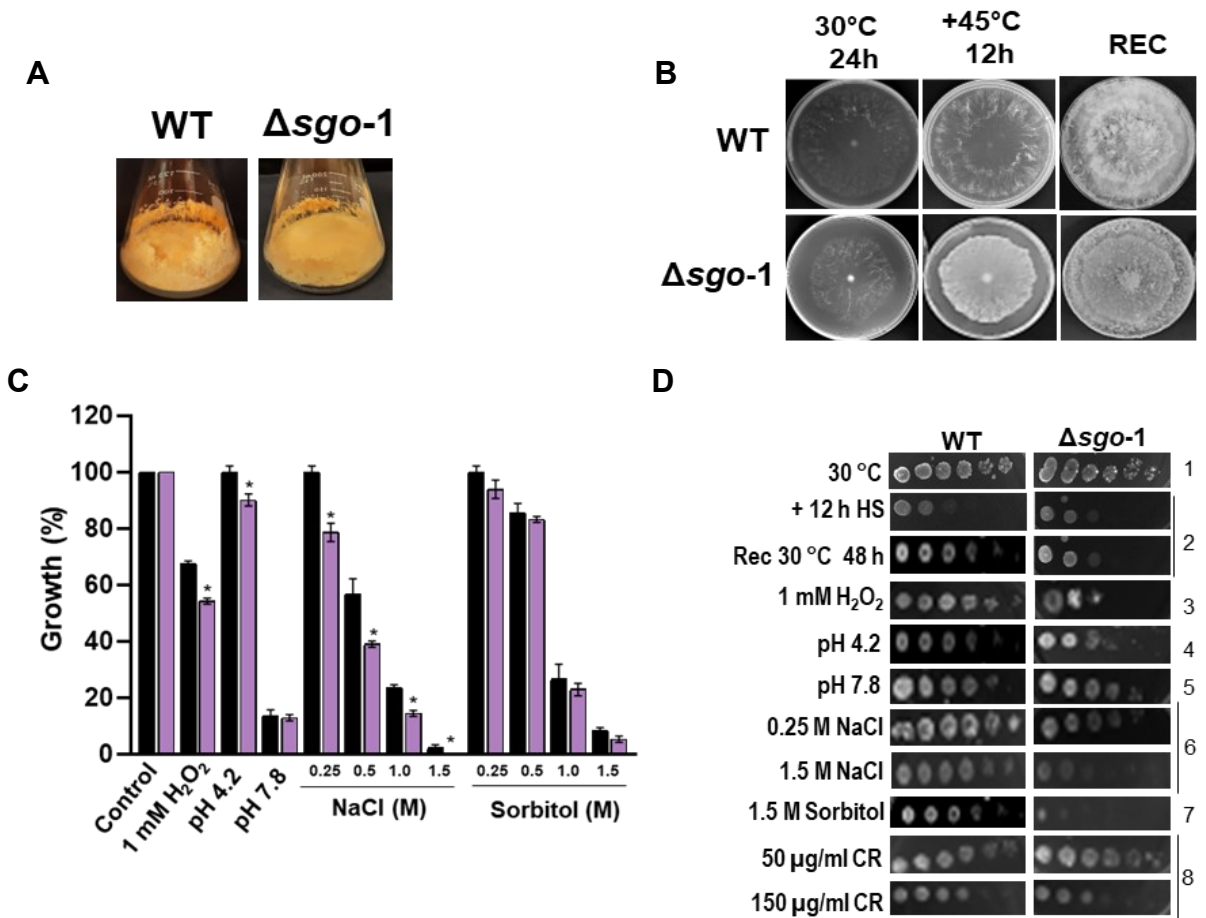


Fonte: <https://alphafold.ebi.ac.uk> (acesso em 28/07/2022).

## 5.2. Análise fenotípica da linhagem mutante $\Delta sgo-1$ e sensibilidade a diferentes estresses

A linhagem mutante para o gene *sgo-1* foi adquirida do FGSC como uma linhagem homocária e a mutação foi confirmada por meio de PCR utilizando os pares de primers SGO-1-F e SGO-1-R. O fenótipo da linhagem foi visualizado pelo crescimento em garrafa e apresentou um aspecto semelhante ao da linhagem selvagem, porém com aparente diminuição da massa micelial (Figura 15A). A quantidade de conídios não apresentou diferenças em relação à linhagem selvagem (dados não mostrados), o que indica que a proteína não está envolvida no desenvolvimento assexuado do fungo. Para os ensaios de crescimento sob estresse, primeiro realizamos um experimento em placa para verificar o comportamento da linhagem frente ao choque térmico. Conídios foram inoculados em placa e deixados crescer por 24 h a 30 °C, e não foi observado diferença significativa no diâmetro da colônia quando comparado à linhagem selvagem (Figura 15B). Em seguida, as placas foram submetidas a choque térmico (Figura 15B) e deixadas recuperar por mais 48 h a 30 °C, sendo que ambas linhagens selvagem e mutante foram capazes de recuperar nestas condições, embora com aparente diminuição da densidade micelial na mutante (Figura 15B, REC). Ensaios de crescimento em placa na presença de agentes estressores também foram realizados e a linhagem mutante apresentou significativa diminuição no crescimento na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH ácido e mostrou sensibilidade a NaCl em todas as concentrações utilizadas (Figura 15C). Ensaios de sensibilidade da linhagem em meios contendo quantidade fixa de agentes estressantes e variando a concentração de conídios mostrou sensibilidade da linhagem  $\Delta sgo-1$  frente ao choque térmico (Figura 15D, linha 2), estresse oxidativo (linha 3), estresse osmótico por sal (linha 6) e sorbitol (linha 7), mas não apresentou sensibilidade a CR e pH.

**Figura 15. Caracterização da linhagem mutante  $\Delta sgo-1$ .** (A) Aspectos morfológicos da linhagem  $\Delta sgo-1$ . Um total de  $5 \times 10^4$  conídios foram inoculados em garrafa e cultivados por 10 dias em meio VM. (B) Choque térmico. Placas crescidas a 30°C por 24h foram transferidas para 45 °C por 12 h e fotografadas. Após isso, as placas submetidas a choque térmico foram deixadas recuperar (REC) a 30 °C por 48 h e fotografadas. Análise das linhagens mutantes na presença de agentes estressantes. (C) Ensaio de crescimento em placa e de (D) sensibilidade na presença de agentes estressantes. Cerca de  $5 \times 10^4$  conídios foram inoculados no centro da placa e deixados crescer por 24 h/30 °C na presença dos agentes estressantes 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4,2 (ácido) e 7,8 (alcalino) e quantidades crescentes de NaCl e sorbitol. Como controle, foi utilizada a linhagem selvagem WT FGSC#2489 e os experimentos foram todos realizados na ausência de higromicina. As medidas de crescimento foram realizadas após 24 h e expressas em porcentagem. \*p<0.5, \*\*p<0.05 (Teste T-student). Para o ensaio de sensibilidade da linhagem mutante em diferentes condições de estresse, amostras de conídios diluídos em série (5 x 10<sup>5</sup> a 5) das linhagens selvagem e mutantes foram inoculadas em meio FGS com e sem os agentes estressantes NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e CR. As amostras também foram expostas ao estresse térmico (45 °C) e em pH 4,2 e 7,8. O crescimento foi avaliado após 24 e 48 h. **1.** Controle de crescimento a 30 °C, pH 5.8 após 48 h. **2.** Crescimento sob estresse térmico. Os conídios foram cultivados a 30 °C por 12 h e então as placas foram transferidas a 45 °C por 12 h. Recuperação do estresse térmico (REC). Os conídios foram cultivados por 12 h a 30 °C, as placas foram transferidas para 45 °C por mais 12 h então permitidas recuperar por 48 h a 30 °C. **3.** Crescimento na presença de 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 48 h. **4.** Crescimento em pH 4,2 (estresse ácido) e **5.** Crescimento em pH 7,8 (estresse alcalino) por 24 h. **6.** Crescimento na presença de NaCl 0,25 M e 1,5 M durante 48 h. **7.** Crescimento na presença de 1,5 M de sorbitol. **8.** Crescimento na presença de 50 e 150 µg/mL CR por 48 h.

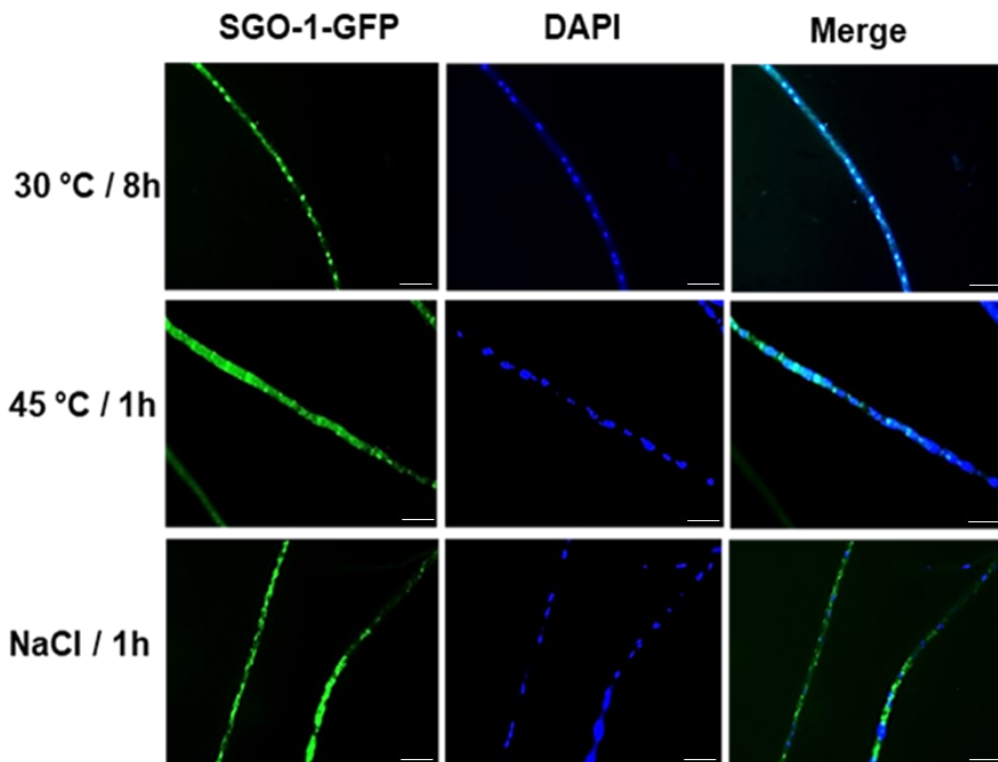


### **5.3. A localização nuclear da proteína SGO-1-GFP é influenciada por estresse térmico e osmótico**

Para ensaios de localização subcelular da proteína SGO-1, uma linhagem de *N. crassa* foi construída expressando a proteína SGO-1 fusionada a GFP na região C-terminal. Esta linhagem apresentou aspecto selvagem, sugerindo que a quimera SGO-1-GFP é funcional. Os resultados estão mostrados na Figura 16 e mostraram que a proteína SGO-1-GFP apresentou uma forte fluorescência colocalizada no núcleo em condições controle (Figura 16A, 30 °C, 8h) como descrito para outras proteínas ortólogas. A proteína de *N. crassa* apresenta em sua sequência a presença de dois sinais de localização nuclear (NLS) monopartidos e pelo menos sete bipartidos, previstos pelo programa NLS Mapper, corroborando com o resultado de microscopia (Figura 16B). No entanto, a proteína parece localizar majoritariamente no citoplasma após exposição a estresse térmico e osmótico (Figura 16A, HS e NaCl), embora ainda seja visível no núcleo nestas condições. Este resultado mostra que a localização da proteína muda em função do estresse o que sugere que ela pode ser requerida em diferentes compartimentos celulares nesta condição. Ensaios utilizando microscopia confocal deverão ser realizados para confirmar este resultado.

**Figura 16. A proteína SGO-1 é nuclear e sua localização é influenciada por estresse térmico (45°C) e osmótico (NaCl). (A)** Localização celular da proteína SGO-1-GFP. As imagens foram capturadas em um microscópio AXIO Imager.A2 Zeiss acoplado com uma câmera AXIOCam MR3. Imagens das lâminas foram coletadas e processadas pelo software AxioVision. A fluorescência da GFP foi visualizada com a excitação e emissão nos comprimentos de onda de 490 e 525 nm (filtro FITC), respectivamente, e a fluorescência do DAPI nos comprimentos de onda de excitação em 358 nm (UV) e emissão 461 nm, respectivamente. **(B)** Prováveis sinais de localização nuclear (NLS) na sequência da proteína SGO-1 preditos pelo programa NLS Mapper. As barras em **A** representam uma distância de 20 µm.

**A**



**B**

**cNLS Mapper Result**

Predicted NLSs in query sequence	
MARLNQAMSSVALSTDNLELLRRKFLQRNDIARVNSTQSLRIRGLENE	50
CARLLSENLELRGQVLRLEKELQDAAARRVADHALVAKMETQLAELSS	100
LLASLGEPPSKRRLSEERRYQPRPSVHRSPPLRRARQEQADQELLAEQEG	150
RLPPIYENKTYARATNNSSEILALCMQADSDNSPDIGPPVSRFVEDDM	200
VIPCSPPNKNAEAEETETTEQVEESPRALQVPPSLSPKLDYDRRPNMI	250
LFSPPKESRVAEPSKMFSPPPHPPKQSTSAVPSSETIRAGLKRKLNQ	300
NEPNKATLQQGKENGNETGKGLSARDPHKRKSIKETATKPRAPLSAK	350
STNEHIVSPKPKAKPHQVADDFKPKVKVHKASKGKEKVDLPADKKSAAVEE	400
TQGNSTSAFTKVEILPPALEPTPEVAEIPETDILITPGTPERASESTVVT	450
HDTPPPAAHISNGETSRPSRRARAASYSYTEPNLRDKMRRPTKELFDVAVG	500
EGKFLHRPTSQQQQQRKGDSEAPTSVSKVKEVSPAVDISLTSALFE	550
KEKEKQPQDEGILSPNGILPSSVDLGRRRRASSFSTAAPAMHTIPSVQEQ	600
STLNLPAADETDENAAVEAQIKELSNSITTRPRGGKGRQSHSRVPTIP	650
TENYHEDAQLSTNSASVDLYDFASCASPDAAAPQLEATTGDVPPVKKAP	700
KGSRRASSAASTETTATASAKPRSSRKRASMLVPKKSLWAEELAQEEDE	750
EDVGNDSGGSLKGRASRRRSMML	774

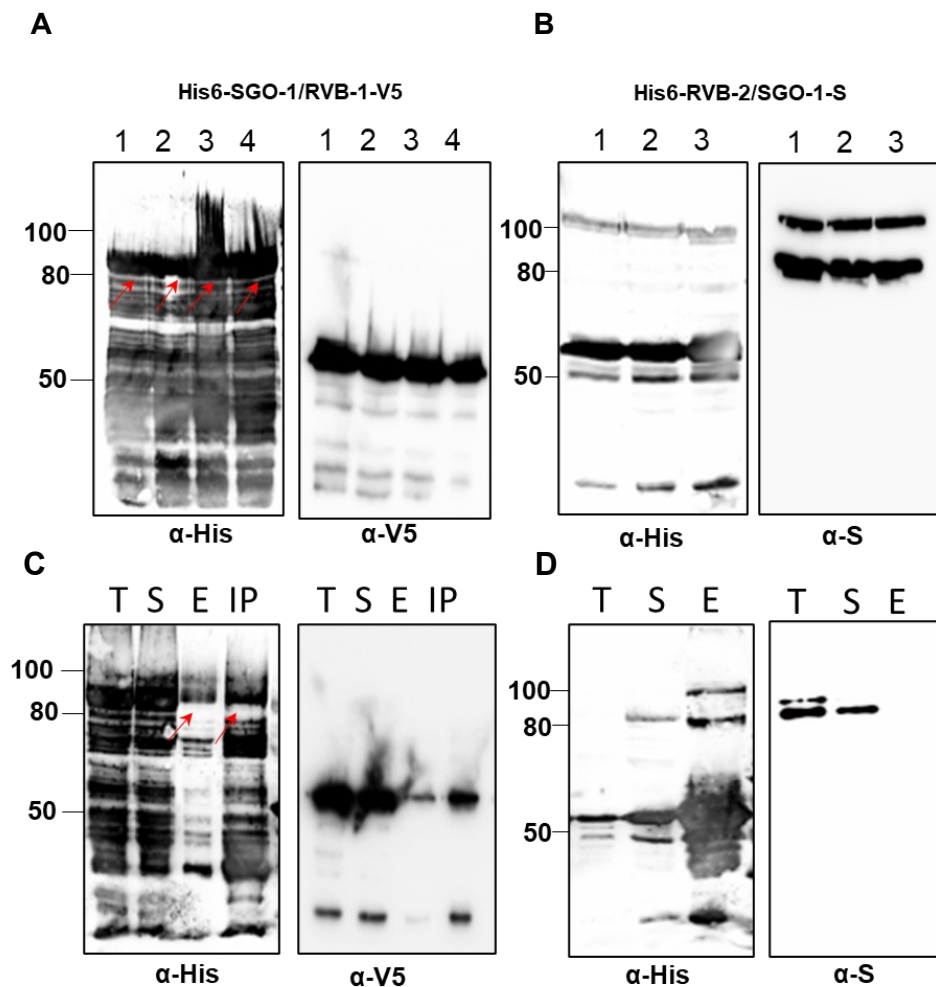
Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
107	EPPSKRRLSEE	12
288	RAGLKRKLNQD	8

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
107	EPPSKRRLSEERRYQPRPSVHRSPPLRRA	5.4
107	EPPSKRRLSEERRYQPRPSVHRSPPLRRAR	6.1
288	RAGLKRKLNQDNQNEPNKATKL	10.5
288	RAGLKRKLNQDNQNEPNKATLQQGK	9.4
356	IVSPKPKAKPHQVADDFKPKVKVHKAS	5.2
359	PKKPAKPHQVADDFKPKVKVHKAS	6.1
360	KKPAKPHQVADDFKPKVKVHKAS	6

#### 5.4 A proteína SGO-1 interage *in vitro* com a proteína RVB-1

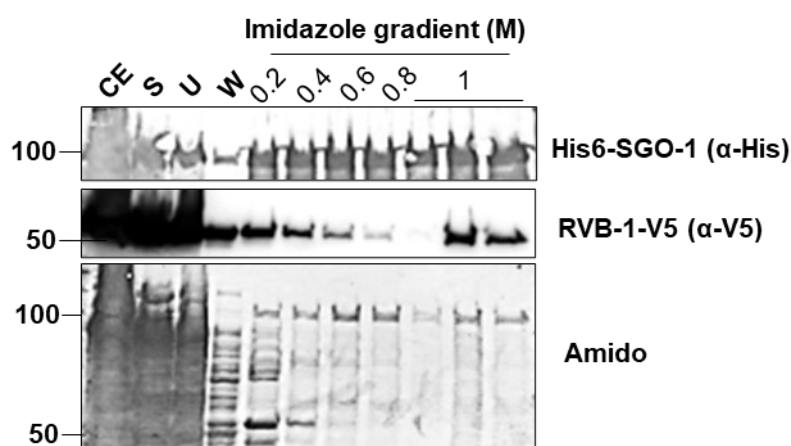
Para verificar se a proteína SGO-1 é capaz de interagir com a proteína RVB-1, ensaios de interação entre proteínas recombinantes foi realizado. Para isso, células de *E. coli* carregando uma construção plasmidial contendo o vetor pRSFduet-*rvb-1-v5/his6-sgo-1* foi induzida com IPTG para ensaios de co-expressão da proteína RVB-1-V5 e His-SGO-1, com metodologia semelhante à padronizada para o complexo RVB-1-V5/His6-RVB-2 (Campanella et al., 2021) (Figura 17A). O mesmo foi realizado para a proteína His6-RVB-2, porém co-expressando a proteína SGO-1-S (Figura 17B). Em ambas as construções, a proteína SGO-1 fusionada a His6 ou a *S-tag*, mostrou estar na fração solúvel e co-expressando RVB-1-V5 ou His6-RVB-2 (Figura 17A e 17B). Ensaios preliminares em pequena escala utilizando resina de Ni-NTA (Invitrogen) mostraram que a proteína RVB-1-V5 co-purifica com a proteína His6-SGO-1 (Figura 17C, E), assim como a proteína RVB-1-V5 co-imonoprecipita com His6-SGO-1 (Figura 17C, IP). Porém, neste primeiro ensaio a proteína SGO-1-S não co-purifica com a proteína His6-RVB-2, quando a mesma foi purificada com Ni-NTA (Figura 17D, E).

**Figura 17. Ensaio de co-expressão da proteína SGO-1 com RVB-1 ou RVB-2.** *Western blot* de extratos solúveis co-expressando as proteínas (A) His6-SGO-1 e RVB-1-V5 e (B) His6-RVB-2 e SGO-1-S. As proteínas foram induzidas em quatro clones diferentes (construção His6-SGO-1 e RVB-1-V5) e três clones (His6-RVB-2 e SGO-1-S). As células foram lisadas, centrifugadas e a fração solúvel de cada teste foi analisado por SDS-PAGE seguido de *Western blot* com anti-His (Sigma) e anti-V5 (Invitrogen) ou anti-S (Sigma). (C) Ensaio de purificação em pequena escala com resina de Ni-NTA ou *Anti-V5 Agarose Affinity Gel* com o extrato das células expressando His6-SGO-1 e RVB-1-V5. E. Proteínas eluídas da resina de Ni-NTA. IP, Proteínas eluídas da resina anti-V5 agarose. (D) Ensaio de purificação em pequena escala com resina de Ni-NTA com o extrato das células expressando His6-RVB-2 e SGO-1-S. T. extrato total. S. extrato solúvel aplicado as resinas. As setas em vermelho servem como referência para presença da proteína recombinante His6-SGO-1 nos *blottings*. Os números ao lado dos géis representam a MM em kDa. RVB-1-V5 (52 kDa), His6-RVB-2 (54 kDa), His6-SGO-1/SGO-1-S (85 kDa).



Em seguida, um ensaio em larga escala foi realizado utilizando extratos de bactérias co-expressando RVB-1-V5 e His6-SGO-1. Como pode ser observado, ambas as proteínas mantiveram ligadas à coluna e co-eluíram durante as etapas da purificação utilizando a coluna de 1 mL HP *HisTrap* (GE) (Figura 18). Baixas quantidades das proteínas foram eluídas na lavagem indicando saturação da resina, mas as mesmas foram co-eluído conforme o gradiente de imidazol foi aplicado. A maior eluição das proteínas foi observada com imidazol 1 M, indicando uma forte interação entre as proteínas (Figura 18, frações 1 M).

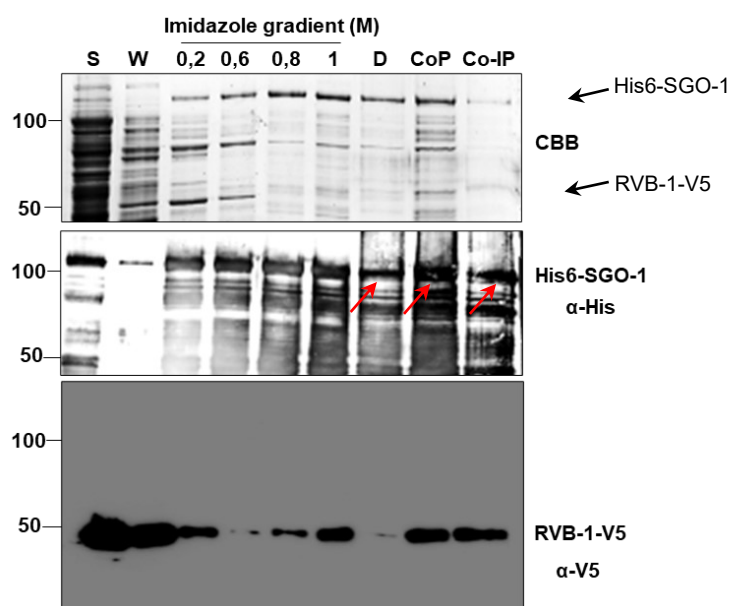
**Figura 18. Ensaio de purificação em larga escala do complexo His6-SGO-1/RVB-1-V5.** O extrato contendo as duas proteínas co-expressas e 25 mM de imidazol (**CE**) foi clarificado por centrifugação e filtragem (**S**) e submetido à cromatografia em uma coluna HisTrap HP 1mL para a purificação da proteína His6-SGO-1. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 CV (volumes de coluna) de tampão contendo 50 mM Imidazol (**W**) e as proteínas eluídas em um gradiente de imidazol variando de 0,2 a 1 M. **U**. Proteínas não ligadas à coluna. **Amido**. Membrana corada com solução de Amido Black. A presença do complexo nos extratos foi identificada por *Western blot* utilizando anticorpos anti-V5 (RVB-1-V5) e anti-His (His6-SGO-1).



Como descrito no capítulo I, a proteína RVB-1 quando expressa na forma recombinante em *E. coli* mostrou ser extremamente instável, precipitando durante as etapas de purificação ou diálise e apresentando estabilidade apenas na presença da sua parceira RVB-2 (Campanella et al. 2021). Por isso, um novo experimento foi realizado na qual as proteínas RVB-1-V5 e His6-SGO-1, após eluição da coluna foram unidas e dialisadas contra o tampão de eluição sem imidazol. Em seguida, elas foram purificadas novamente utilizando ou *Anti-V5 Agarose Affinity gel* (para purificar RVB-1-V5) ou *His-Select Cobalt Affinity Gel*. O resultado foi analisado por

SDS-PAGE corado com *Comassie brilliant blue* (CBB) e *Western blot* (Figura 19) e mostrou a presença das proteínas RVB-1-V5 e His6-SGO-1 nos extratos dialisados e após as etapas de co-purificação e co-imunoprecipitação (Figura 19, CoP e Co-IP). Isto indicou que a proteína RVB-1-V5, embora não muito abundante na fração dialisada (Figura 19, D), foi concentrada após purificação com ambas *His-Select Cobalt Affinity Gel* ou *Anti-V5 Agarose Affinity Gel*. Os extratos purificados da proteína His6-SGO-1 apresentam muitas bandas que marcam no gel de CBB ou nos ensaios de *Western blot* com anticorpo anti-His. Uma hipótese levantada é que esta proteína sofra algum tipo de proteólise durante o processo de purificação ou até mesmo nas células bacterianas. Curiosamente, a membrana contendo a mesma proteína, mas marcada com *S-tag* não apresenta este padrão de degradação (Figura 17B e 17E). É importante mencionar que o *S-tag* está fusionado na porção C-terminal da proteína ao passo em que o *His6-tag* está na porção N-terminal.

**Figura 19. Ensaio de co-purificação e co-imunoprecipitação do complexo His6-SGO-1/RVB-1-V5.** O extrato contendo as duas proteínas co-expressas e 25 mM de imidazol foi clarificado por centrifugação e filtragem (**S**) e submetido à cromatografia em uma coluna HisTrap HP 1mL para a purificação da proteína His6-SGO-1. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 CV (volumes de coluna) de tampão contendo 50 mM Imidazol (**W**) e as proteínas eluídas com um gradiente de imidazol variando de 0,2 a 1 M. Após cromatografia, as frações foram reunidas e dialisadas contra tampão de diálise sem imidazol (**D**) e co-purificadas novamente utilizando *His-select Cobalt Affinity Gel* (**CoP**) ou co-imunoprecipitadas utilizando resina anti-V5 agarose (**Co-IP**). CBB. Gel corado com *Comassie Brilliant Blue*. A presença do complexo nos extratos foi identificada por *Western blot* utilizando os anticorpos anti-V5 (RVB-1-V5) e anti-His (His6-SGO-1). As setas em vermelho servem como referência para presença da proteína recombinante His6-SGO-1 nos blottings.

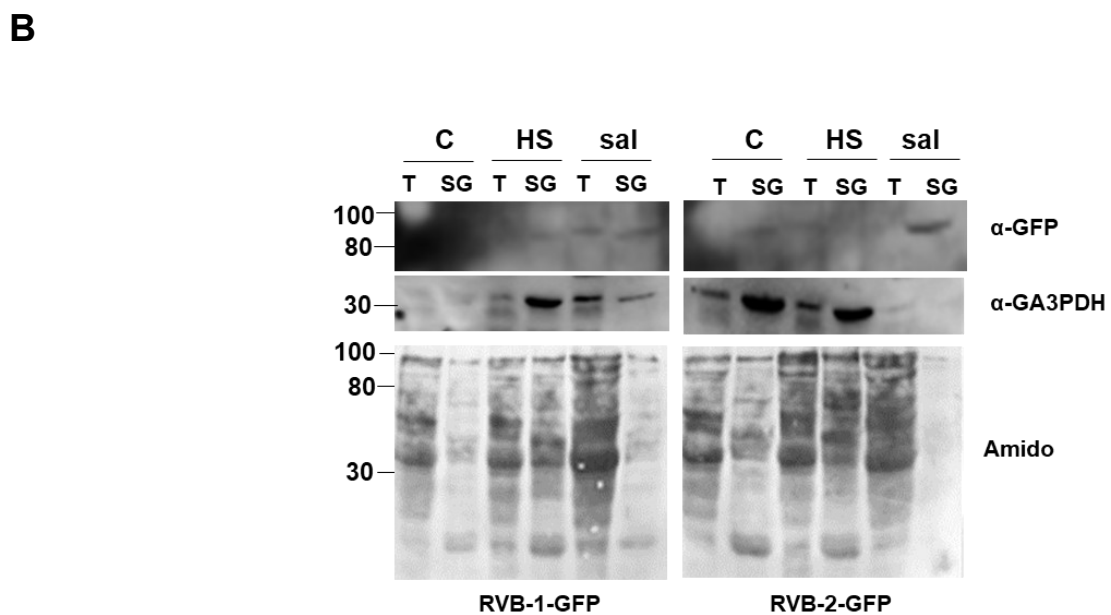
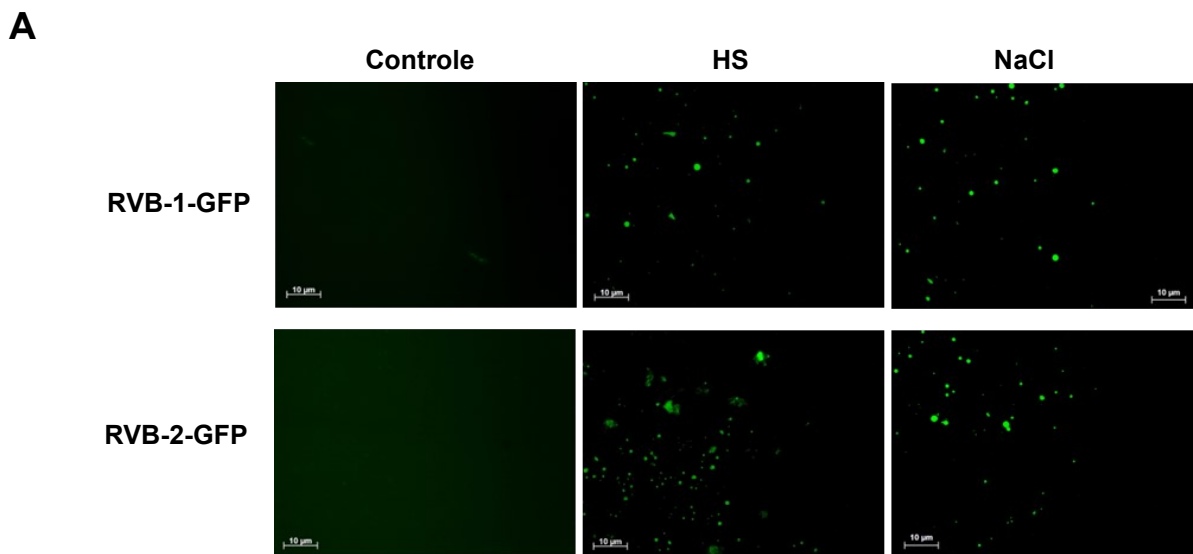


## **6. As proteínas RVB-1 e RVB-2 são componentes de grânulos de estresse em *N. crassa***

A presença no ensaio de imunoprecipitação de componentes envolvidos na tradução proteica, tais como fatores de alongamento da tradução e proteínas 40S ribossomais, além de componentes do proteassomo, nos levaram a investigar se as proteínas RVB-1 e RVB-2 poderiam ser componentes de grânulos de estresse (SGs) em *N. crassa*. Utilizando centrifugação diferencial, nós adaptamos um procedimento bem padronizado para *S. cerevisiae* e células de mamíferos, no qual é possível obter frações enriquecidas com grânulos de estresse e seus componentes, os quais quando marcados com proteínas fluorescentes são passíveis de serem visualizados por microscopia de fluorescência. Para isso, extratos foram realizados com as linhagens expressando as proteínas RVB-1-GFP ou RVB-2-GFP após exposição a estresse térmico e osmótico, mantendo uma amostra sem estresse como controle. O procedimento utilizado mostrou a presença de corpos de fluorescência em extratos enriquecidos para grânulos de estresse, os quais continham as proteínas RVB-1-GFP ou RVB-2-GFP (Figura 20A). Tais corpos fluorescentes variaram de tamanho médio de  $1,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$  para os SGs encontrados nos extratos de ambas as linhagens, embora também tenha sido possível observar uma quantidade significativa de grânulos menores ( $0,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ) considerando uma média de 25 grânulos analisados para cada linhagem.

Como a proteína GA3PDH está descrita imunoprecipitar com grânulos de estresse em células de mamífero [110] e considerando que a mesma foi identificada nos ensaios de IP, a presença das proteínas GA3PDH, RVB-1-GFP e RVB-2-GFP foi analisada por *Western blot* nos extratos obtidos. Como pode ser observado, foi possível identificar a presença de GA3PDH e das proteínas RVB-1-GFP e RVB-2-GFP nos extratos enriquecidos com grânulos de estresse (Figura 20B). Este resultado de hibridização é preliminar e deverá ser confirmado utilizando linhagens produzindo as proteínas RVBs fusionadas a V5, uma vez que a hibridização com o anticorpo anti-GFP não levou a resultados de boa qualidade. Entretanto, este resultado preliminar mostrou a presença das proteínas RVBs e GA3PDH nas frações de SGs analisadas (Figura 20B).

**Figura 20. Isolamento de grânulos de estresse em *N. crassa*.** (A) As proteínas RVB-1-GFP e RVB-2-GFP foram observadas em extratos enriquecidos de grânulos estresse provenientes de micélios das linhagens submetidas a estresse térmico e osmótico. Os extratos foram obtidos por centrifugação diferencial e as imagens foram capturadas em um microscópio AXIO Imager.A2 Zeiss acoplado com uma câmera AXIOCam MR3. Imagens das lâminas foram coletadas e processadas pelo software AxioVision. A fluorescência da GFP foi visualizada com a excitação e emissão nos comprimentos de onda de 490 e 525 nm (filtro FITC), respectivamente. (B) Análise de *Western blot* para confirmar a presença das proteínas RVB-1/2-GFP e GA3PDH nas frações enriquecidas com grânulos de estresse. **C**, Controle sem estresse. **HS**, Após 1h de estresse térmico a 45 °C. **Sal**, Após 1 h de estresse osmótico com 1,5 M NaCl. **T**, Extrato total. **SG**, Fração enriquecida com grânulos de estresse. O carregamento das proteínas não foi normalizado em concentração, mas em quantidades iguais dos extratos preparados a partir de uma mesma quantidade de micélio (~1 g/mL de tampão).



## 7. A proteína RVB-1 interage com glicogenina (GNN) durante estresse e o complexo RVB-1/RVB-2 pode exercer uma função no metabolismo de glicogênio

A presença de enzimas envolvidas no metabolismo de glicogênio no ensaio de IP nos levou a investigar se RVB-1 interage com GNN *in vivo* durante estresse, confirmando a presença da proteína nos resultados de espectrometria de massas (Figura 10, tabela S3). Os ensaios foram realizados conforme descrito em Materiais e Métodos e mostraram a interação entre RVB-1-V5 e GNN tanto antes como após estresse. Entretanto, os resultados mostraram uma maior interação entre as proteínas nas situações estressantes (Figura 21A). A interação entre as duas proteínas foi confirmada tanto quando a proteína RVB-1-V5 foi ligada à resina *Anti-V5 Affinity Gel* como quando anticorpos policlonais anti-GNN acoplados a proteína A foram utilizados para ligar GNN. Controles foram realizados e não mostraram ligação inespecífica da resina anti-V5 contra a proteína GNN (resultado não mostrado).

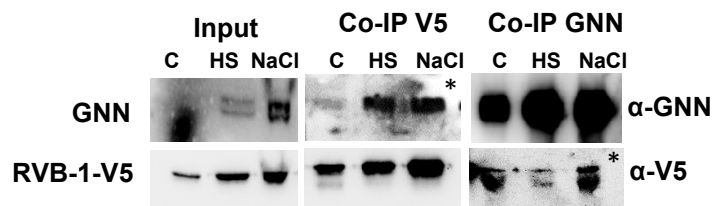
O resultado obtido também sugeriu que a expressão da proteína GNN poderia ser regulada de maneira dependente de estresse, uma vez que ela apresentou uma maior intensidade de expressão nas situações estressantes. Para comprovar que a expressão da proteína é ativada por estresse, um ensaio de expressão proteica com micélios submetidos a estresse térmico e osmótico foi realizado e o resultado mostrou que GNN é uma proteína com baixa expressão após 24 h de cultivo (Figura 21B, controle), mas possui níveis de expressão aumentados após estresse térmico (HS 45 °C, 1h) e osmótico com NaCl (1,5 M, 1 h) em *N. crassa* (Figura 21B, HS e NaCl).

Este resultado de interação proteica nos levou a investigar se as proteínas RVBs poderiam influenciar no conteúdo de glicogênio em *N. crassa*. Para isso, utilizamos as linhagens  $\Delta rvb-1^{het}$  e  $\Delta rvb-2^{het}$  cultivadas na presença de higromicina e os níveis de glicogênio foram quantificados na condição de escuro constante. Nesta condição, é conhecido que o acúmulo de glicogênio em uma linhagem selvagem é rítmico, ou seja, é regulado pelo relógio endógeno do fungo [17]. Como controle, utilizamos a linhagem  $\Delta mus52$ , crescida nas mesmas condições. O experimento revelou que ambas as linhagens mutantes acumulam níveis menores de glicogênio comparados à linhagem selvagem (Figura 21C) sugerindo um papel para ambas

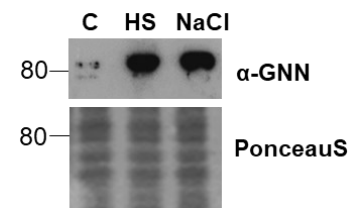
proteínas na regulação dos níveis do carboidrato. Um ponto importante foi que embora tenha sido possível observar diferenças no acúmulo de glicogênio entre as linhagens, a presença de higromicina parece ter afetado o conteúdo da linhagem  $\Delta mus52$ , uma vez que em experimentos sem higromicina a linhagem selvagem apresenta um conteúdo de glicogênio que varia de 400 a 600  $\mu\text{g}$  de glicogênio/mg [17].

**Figura 21. A proteína RVB-1 interage com GNN e as proteínas RVB-1 e RVB-2 atuam na regulação do metabolismo de glicogênio.** (A) Interação entre RVB-1-V5 e GNN *in vivo* em extratos de micélios submetidos ou não a estresse térmico (45 °C, 1 h) e osmótico (1,5 M NaCl, 1 h). Cerca de 5 mg de proteínas totais foram incubadas com *Anti-V5 Affinity Gel* (Sigma) ou com anticorpo policlonal anti-GNN acoplado à proteína A por 12 h, sob agitação branda a 4 °C. Em seguida, as resinas foram lavadas e resuspendidas em tampão de Laemmli e as amostras foram analisadas por *Western blot* utilizando anticorpo anti-V5 ou anti-GNN seguidos de anticorpos secundários anti-mouse IgG ou anti-rabbit IgG acoplados a peroxidase (Sigma). As imagens foram capturadas utilizando ChemiDoc (BioRad). As membranas foram superexpostas em alguns pontos para melhorar a visualização do *blotting* (\*). **Input**, alíquota retirada dos extratos antes da imunoprecipitação (IP). **C**, controle crescido 30 °C por 24 h. Estresse térmico (**HS** 45 °C, 1 h) e osmótico (**NaCl** 1,5 M, 1 h). (B) Análise da expressão da proteína GNN após estresse térmico e osmótico. Cerca de 50  $\mu\text{g}$  de proteínas totais provenientes de micélios submetidos ou não a estresse térmico e osmótico foram analisados por *Western blot* utilizando anticorpo policlonal anti-GNN. **C**, Controle sem estresse. (C) Acúmulo de glicogênio nas linhagens mutantes  $\Delta rvb-1^{het}$  e  $\Delta rvb-2^{het}$  e na linhagem  $mus52::hph$ . As linhagens foram cultivadas na presença de luz por 24 h em meio HGV (*high glucose media*) contendo 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina. Após este período, os frascos foram transferidos para o escuro e retirados nos pontos indicados, o micélio foi coletado e o conteúdo de glicogênio foi quantificado.

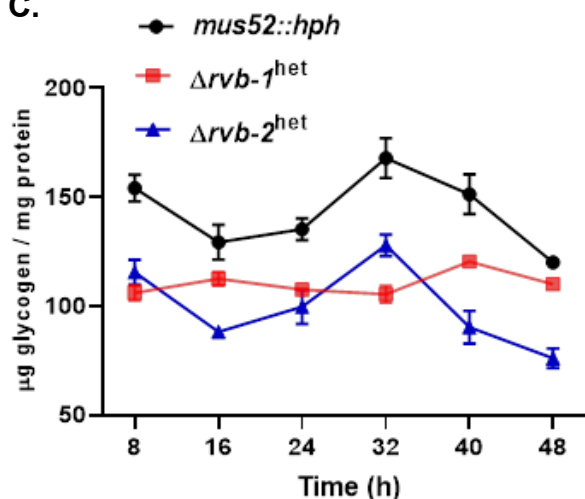
A.



B.



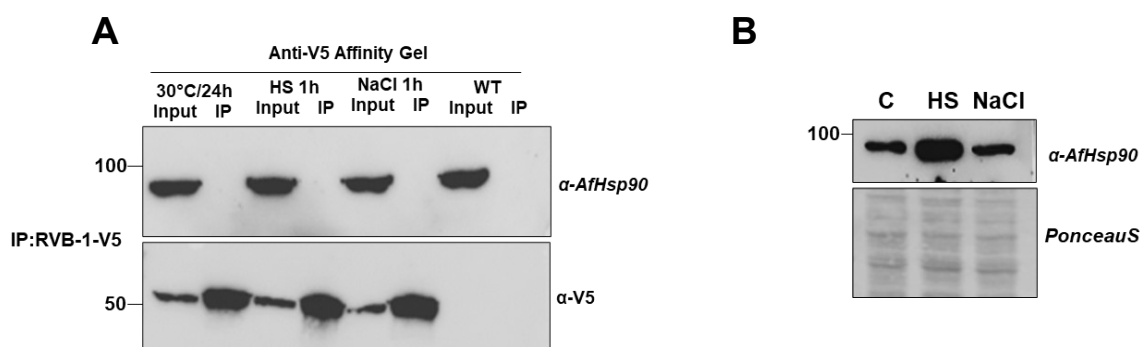
C.



## 8. A ausência de proteínas componentes do complexo R2TP/PAQossomo sugere diferenças na interação entre a proteína RVB-1 e HSP90-1 em *N. crassa*

Como descrito na Introdução geral e deste capítulo, fungos filamentosos incluindo *N. crassa* não possuem ortólogos anotados para as proteínas Pih1 e Tah1, componentes do complexo R2TP/PAQossomo, sugerindo a não existência deste complexo conservado nestes fungos. Como esperado, não identificamos as proteínas ortólogas a elas nos resultados de espectrometria de massas (Tabela S3) e também a ausência de HSP90 nas condições analisadas. Como está descrito na literatura que Hsp90 interage com Rvb1 em *S. cerevisiae* mesmo na ausência de Pih1 e Tah1 (Lakshminarasimhan et al., 2016), um ensaio preliminar de interação *in vivo* da proteína RVB-1 com HSP90 foi realizado utilizando o anticorpo anti-AfHsp90. Entretanto, resultados de interação entre as duas proteínas não foram observados (Figura 22A), corroborando com os resultados de espectrometria de massas (Tabela S3). No entanto, a HSP90 apresentou ser regulada positivamente em estresse térmico, mas não osmótico (Figura 22B). Novos experimentos estão sendo realizados, com o objetivo de comprovar se, de fato, esta interação não ocorre nas condições analisadas.

**Figura 22. Ausência de R2TP pode influenciar a interação entre HSP90-1 e RVB-1 em *N. crassa*.** (A) Imunoprecipitação da proteína RVB-1-V5 utilizando *Anti-V5 Affinity Gel* (Sigma) em extratos de proteínas totais provenientes de micélios crescidos a 30 °C por 24 h (controle, C) ou após estresse térmico (HS 45 °C, 1 h) ou osmótico (NaCl 1,5 M, 1 h). As proteínas foram eluídas da resina com tampão de Laemmli e analisadas por *Western blot* utilizando anticorpos anti-V5 e anticorpo policlonal anti-AfHsp90. O *Input* representa alíquota retirada dos extratos antes da imunoprecipitação (IP). As amostras não estão normalizadas em concentração de proteínas. (B) Ensaio de expressão da proteína HSP90-1 de *N. crassa* após estresse. Cerca de 25 µg de proteínas totais provenientes dos extratos de proteína controle (C) e submetidas a estresse térmico (HS) e osmótico (NaCl) foram analisadas por *Western blot* com anticorpo anti-AfHsp90. A membrana corada com *PonceauS* (Sigma) foi utilizada como controle de carregamento.



**Tabela S3. Proteínas identificadas por espectrometria de massas nos experimentos de imunoprecipitação da proteína RVB-1, durante crescimento vegetativo (30°C, 24 h) e após estresse térmico (HS 45°C, 1 h) ou osmótico (NaCl 1,5 M, 1 h).** Os resultados são representativos de dois experimentos, descontadas de proteínas comuns identificadas no experimento controle realizado na ausência da proteína de fusão RVB-1-V5.

Putative targets of RVB-1				
Control (30° C, 24 h)				
Gene	Gene name	Score	Maches	Sequences
NCU03482	RVB-1	3688	276 (167)	42 (34)
NCU06854	RVB-2	3496	579 (211)	49 (32)
NCU08919	related to DNA-dependent ATPase DOMINO B	1181	164 (54)	78 (25)
NCU08919	Putative DNA helicase INO80 (Crf-2-1)	1139	164 (59)	77 (24)
NCU06394	chromatin remodeling complex subunit	918	78 (36)	42 (21)
NCU06395	hypothetical protein NCU06395	405	26 (13)	10 (6)
NCU01534	conserved hypothetical protein	402	46 (18)	16 (8)
NCU07568	hypothetical protein NCU07568	179	10 (4)	7 (2)
NCU02555	Actin-related protein 4	169	28 (8)	19 (6)
NCU09993	helicase swr-1	138	102 (5)	36 (4)
NCU03206	C2H2 finger domain-containing protein	122	14 (3)	11 (2)
NCU05587	RecName: Full=Actin-related protein 6	96	16 (2)	12 (2)
NCU04002	conserved hypothetical protein	78	25 (3)	18 (2)
NCU01362	INO80 chromatin remodeling complex	68	27 (5)	15 (4)
NCU08296	mito ribosomal protein S4	63	17 (1)	10 (1)
NCU04770	TATA-binding protein	63	6 (1)	5 (1)
NCU03766	probable U6 snRNA-ASSOCIATED SM- LIKE	53	4 (3)	3 (2)
NCU03858	hypothetical protein NCU03858	48	21 (3)	10 (2)
NCU06453	hypothetical protein NCU06453	47	25 (1)	20 (1)
NCU03922	probable hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	43	14 (1)	12 (1)
NCU01410	DUF1711 domain-containing protein	42	12 (1)	9 (1)
NCU00567	arg-6	41	27 (1)	19 (1)
NCU02539	cell division control protein 54	40	38 (1)	20 (1)
NCU06928	hypothetical protein NCU06928	39	27 (3)	22 (3)
NCU05937	GDP-mannose pyrophosphorylase	38	33 (2)	10 (2)
NCU00212	histone H4	37	9 (3)	6 (2)
NCU01634				
NCU09221	HIT finger domain-containing protein	37	14 (1)	7 (1)
NCU04202	nucleoside diphosphate kinase	36	5 (2)	4 (1)
NCU01331	probable 13 kD U4/U6.U5 snRNP associate protein	34	5 (1)	2 (1)
NCU02437	histone H2A	33	16 (1)	6 (1)
NCU06238	chromatin remodeling complex subunit	31	14 (2)	10 (1)
NCU16005	RecName: Full=Ribosomal protein S5, mitochondrial	30	10 (1)	8 (1)
NCU08720	hypothetical protein	29	3 (1)	1 (1)

NCU00086	glycosyl hydrolase	28	10 (1)	5 (1)
NCU05429	probable branching enzyme (be1)	28	11 (1)	11 (1)
NCU04768	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	27	15 (1)	11 (1)
NCU02650	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	26	10 (1)	9 (1)
NCU05620	putative protein	25	4 (1)	4 (1)
NCU03241	FK506-binding protein 4	21	23 (1)	13 (1)
NCU00173	esterase D	20	14 (1)	10 (1)
NCU05392	hypothetical protein GE21DRAFT_1206658	20	45 (1)	19 (1)
NCU01767	related to Type 2C Protein Phosphatase	20	26 (1)	14 (1)
NCU01195	NADP-specific glutamate dehydrogenase	18	9 (1)	9 (1)
<b>After Heat Stress (45°C / 1 h)</b>				
<b>Gene</b>	<b>Gene name</b>	<b>Score</b>	<b>Maches</b>	<b>Sequences</b>
NCU03482	RVB-1	1278	269 (93)	47 (30)
NCU06854	RVB-2	436	138 (34)	39 (16)
NCU01534	conserved hypothetical protein	252	73 (17)	17 (6)
NCU08919	Putative DNA helicase INO80 (Crf-2-1)	225	129 (28)	63 (16)
NCU06238	chromatin remodeling complex subunit	221	77 (13)	28 (7)
NCU06394	chromatin remodeling complex subunit	155	53 (8)	20 (4)
NCU01528	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (ccg-7)	111	29 (5)	14 (3)
NCU01534	hypothetical protein, variant	104	33 (6)	15 (4)
NCU02003	elongation factor 1-alpha	98	68 (11)	20 (6)
NCU04173	actin	92	42 (8)	13 (5)
NCU06395	hypothetical protein NCU06395	87	35 (7)	12 (3)
NCU01410	DUF1711 domain-containing protein	82	12 (5)	7 (3)
NCU06698	glycogenin	79	13 (3)	11 (2)
NCU09993	helicase swr-1	70	43 (4)	24 (4)
NCU07568	hypothetical protein NCU07568	49	15 (4)	8 (2)
NCU02555	Actin-related protein 4	46	47 (6)	18 (4)
NCU06453	hypothetical protein NCU06453	44	18 (2)	9 (2)
NCU02840	probable 26S proteasome regulatory particle chain RPT1	37	10 (2)	8 (1)
NCU09450	26S proteasome regulatory subunit rpn2	36	17 (1)	12 (1)
NCU04581	probable kinesin-related protein KLPA	34	12 (1)	8 (1)
NCU03757	probable ribosomal protein RPL4A	33	14 (1)	12 (1)
NCU08627	ribosomal protein CRP7	32	4 (1)	1 (1)
NCU09788	endonuclease/exonuclease/phosphatase	30	19 (1)	5 (1)
NCU03964	hypothetical protein NCU03964	29	4 (1)	4 (1)
NCU04751	hypothetical protein NCU04751	29	8 (1)	6 (1)
NCU03739	ERp38	28	8 (1)	7 (1)
NCU09511	hypothetical protein NCU09511	27	17 (1)	8 (1)
NCU07700	translation elongation factor aEF-2	27	32 (1)	14 (1)
NCU16673	hypothetical protein NCU16673	26	5 (1)	2 (1)
NCU09711	hypothetical protein NCU09711	26	8 (1)	4 (1)
NCU03858	hypothetical protein NCU03858	25	23 (2)	13 (2)

NCU10344	cytochrome P450 98A3	25	11 (1)	4 (1)
NCU03206	C2H2 finger domain-containing protein	24	11 (1)	7 (1)
NCU00022	hypothetical protein NCU00022	24	8 (1)	6 (1)
NCU03011	related to hxB protein	23	8 (1)	6 (1)
NCU01317	probable ribosomal protein L12	23	7 (1)	4 (1)
NCU01064	hypothetical protein NCU01064	23	13 (1)	4 (1)
NCU04726	related to beta-N-acetylglucosaminidase	22	77 (1)	9 (1)
NCU03628	conserved hypothetical protein	21	7 (1)	5 (1)
NCU00112	aminopeptidase P	21	3 (1)	2 (1)
NCU08405	hypothetical protein NCU08405	20	7 (1)	5 (1)
NCU04487	hypothetical protein NCU04487	20	6 (1)	4 (1)
NCU02351	chitin synthase regulator 3	20	27 (1)	8 (1)
NCU03505	related to regulator of deoxyribodipyrimidine photo-lyase PHR1	20	34 (1)	14 (1)
NCU03107	MFS transporter	18	7 (1)	5 (1)
NCU06928	hypothetical protein NCU06928	18	20 (1)	13 (1)
NCU06722	tryptophanyl-tRNA synthetase	18	8 (1)	6 (1)
NCU06326	pectate lyase 1	18	5 (1)	2 (1)
NCU03128	hypothetical protein NCU03128	18	13 (1)	5 (1)
NCU01529	hypothetical protein	18	4 (1)	1 (1)
NCU06687	glycogen synthase	17	20 (1)	15 (1)
NCU05587	RecName: Full=Actin-related protein 6	17	10 (1)	8 (1)
NCU10258	transcription factor	16	14 (1)	6 (1)
NCU08294	pathway-specific regulatory protein	15	10 (1)	8 (1)
NCU03468	conserved hypothetical protein	15	20 (1)	4 (1)
NCU09063	nuclear condensin complex subunit Smc4	15	23 (1)	17 (1)
NCU01842	Shugoshin OS=Neurospora crassa	0	1 (1)	1 (1)

**After osmotic stress (NaCl / 1h)**

<b>Gene</b>	<b>Gene name</b>	<b>Score</b>	<b>Maches</b>	<b>Sequences</b>
NCU03482	RVB-1	4711	241 (157)	42 (35)
NCU06854	RVB-2	3899	339 (204)	52 (41)
NCU08919	related to DNA-dependent ATPase DOMINO B	1091	326 (84)	93 (35)
NCU08919	Putative DNA helicase INO80 (Crf-2-1)	1011	301 (80)	103 (33)
NCU06394	chromatin remodeling complex subunit	529	133 (35)	48 (17)
NCU01528	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (ccg-7)	450	78 (29)	18 (10)
NCU01534	conserved hypothetical protein	341	65 (19)	15 (5)
NCU06395	hypothetical protein NCU06395	324	31 (14)	11 (4)
NCU02555	Actin-related protein 4	300	95 (26)	30 (11)
NCU06238	chromatin remodeling complex subunit	282	93 (22)	39 (12)
NCU01362	INO80 chromatin remodeling complex	264	106 (13)	42 (8)
NCU03858	hypothetical protein NCU03858	228	68 (24)	26 (10)
NCU09993	helicase swr-1	220	130 (17)	49 (9)
NCU02003	elongation factor 1-alpha	191	81 (17)	28 (9)
NCU03206	C2H2 finger domain-containing protein	168	50 (15)	19 (9)
NCU07568	hypothetical protein NCU07568	154	54 (12)	14 (5)

NCU07700	translation elongation factor aEF-2	127	53 (6)	24 (4)
NCU06453	hypothetical protein NCU06453	108	55 (7)	21 (4)
NCU01410	DUF1711 domain-containing protein	99	26 (9)	11 (4)
NCU09450	26S proteasome regulatory subunit rpn2	93	29 (4)	22 (3)
NCU05587	Actin-related protein 6	78	26 (7)	16 (6)
-	probable 26S proteasome regulatory particle chain RPT1	66	22 (3)	16 (2)
NCU03297	Cytochrome c peroxidase, mitochondrial	62	15 (2)	9 (2)
NCU09221	HIT finger domain-containing protein	58	31 (6)	15 (4)
NCU02846	p63 related protein	58	25 (2)	12 (1)
NCU01224	probable 26S ATP/ubiquitin-dependent proteinase chain S4	53	22 (2)	14 (1)
NCU00775	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial	51	9 (1)	8 (1)
NCU09132	Tubulin alpha-A chain	46	11 (2)	10 (2)
NCU03608	alpha-keto-beta-hydroxylacyl reductoisomerase	45	21 (2)	12 (2)
NCU01552	probable ribosomal protein S28	44	3 (1)	3 (1)
NCU01317	probable ribosomal protein L12	43	8 (1)	6 (1)
NCU06928	hypothetical protein NCU06928	41	52 (5)	30 (5)
NCU00573	conserved hypothetical protein	41	12 (2)	9 (1)
NCU03757	probable ribosomal protein RPL4A	37	17 (1)	12 (1)
NCU07830	40S ribosomal protein S14	37	17 (3)	7 (2)
NCU08627	ribosomal protein CRP7	35	5 (1)	3 (1)
NCU02260	26S protease regulatory subunit 6B	34	10 (2)	7 (1)
NCU03982	glucose-regulated protein	33	33 (1)	12 (1)
NCU00137	ssDNA binding protein	31	7 (1)	3 (1)
NCU08893	60S ribosomal protein L1	31	16 (1)	8 (1)
NCU04002	Component of the SWR1 complex	30	40 (3)	23 (2)
NCU00768	mRNA binding post-transcriptional regulator	30	6 (1)	5 (1)
NCU00618	40S ribosomal protein S27	30	6 (1)	2 (1)
NCU06110	thiazole biosynthetic enzyme	30	11 (2)	8 (2)
NCU00502	ATP synthase subunit 4	30	7 (1)	7 (1)
NCU02016	hypothetical protein NCU02016	29	4 (2)	3 (1)
NCU03181	hypothetical protein	29	7 (1)	5 (1)
NCU03394	related to ribosomal protein S15 precursor (mitochondrial)	29	15 (3)	6 (1)
NCU01581	related to mitotic apparatus protein p62	29	18 (1)	11 (1)
NCU01444	rheb small monomeric GTPase RhbA	28	3 (1)	3 (1)
NCU08693	hsp70-like protein	27	22 (2)	14 (2)
NCU07922	elongation factor 3	27	11 (1)	9 (1)
NCU06003	mannose-1-phosphate guanyltransferase	27	2 (1)	2 (1)
NCU03806	put. ribosomal protein	27	2 (1)	1 (1)
NCU00359	YEATS family protein	26	11 (1)	7 (1)
NCU06500	cell division control protein 25	26	23 (1)	17 (1)
NCU07366	hypothetical protein GE21DRAFT_1645, partial	26	18 (1)	10 (1)
NCU05132	hypothetical protein NCU05132	25	33 (1)	21 (1)
NCU08515	V-type proton ATPase subunit B	25	10 (2)	8 (2)

NCU09109	60S ribosomal protein L33	25	6 (1)	5 (1)
NCU09123	Ca/CaM-dependent kinase-1	25	13 (1)	10 (1)
NCU00258	ribosomal protein	24	3 (1)	3 (1)
NCU07367	proteasome 26S subunit	24	8 (1)	8 (1)
NCU05075	mitochondrial tricarboxylate transporter	24	7 (1)	6 (1)
NCU08620	40S ribosomal protein S16	23	7 (1)	5 (1)
NCU05833	hypothetical protein NCU05833	23	26 (1)	14 (1)
NCU10344	cytochrome P450 98A3	23	30 (1)	16 (1)
NCU01398	thiol methyltransferase	23	7 (1)	5 (1)
NCU03407	rho1, variant	23	19 (1)	11 (1)
NCU02075	unnamed protein product	23	24 (2)	16 (2)
NCU00444	related to transcription initiation factor IIF 30K chain	22	10 (1)	6 (1)
NCU02623	mitochondrial hypoxia responsive domain- containing protein	22	11 (1)	8 (1)
NCU09119	ATP synthase subunit gamma	22	7 (2)	6 (1)
NCU01452	probable ribosomal protein 10, cytosolic	22	3 (1)	3 (1)
NCU07414	DnaJ family protein	92	14 (3)	9 (3)
NCU00489	cytoplasmic ribosomal protein 10	21	10 (1)	9 (1)
NCU07232	heat shock protein 30	21	24 (1)	11 (1)
NCU01577	hypothetical protein	21	17 (1)	3 (1)
NCU02123	Mitochondrial GTPase	21	25 (1)	15 (1)
NCU07556	TBP associated factor	21	55 (1)	34 (1)
NCU07072	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	20	9 (1)	8 (1)
NCU08307	hypothetical protein, variant	20	20 (1)	12 (1)
NCU16511	ADP-ribose 1"-phosphate phosphatase	20	28 (1)	16 (1)
NCU08772	Cyclin-dependent protein kinase complex component	20	9 (1)	3 (1)
NCU00962	hypothetical protein	19	37 (1)	24 (1)
NCU06037	hypothetical protein NCU06037	19	4 (1)	4 (1)
NCU06110	Thiamine thiazole synthase	19	8 (1)	8 (1)
NCU06511	hypothetical protein NCU06511	19	15 (1)	12 (1)
-	Uncharacterized protein	19	5 (1)	4 (1)
NCU00405	glycyl-tRNA synthetase 1	19	23 (1)	18 (1)
NCU03592	Phospholipid-transporting ATPase	19	35 (1)	25 (1)
NCU07806	hypothetical protein NCU07806	19	7 (1)	4 (1)
NCU10806	putative protein	18	15 (1)	4 (1)
NCU02405	hypothetical protein NCU02405	18	16 (1)	5 (1)
NCU08718	related to integral membrane protein pth11	18	7 (1)	5 (1)
NCU01981	Translation machinery-associated protein 22	17	2 (1)	2 (1)
NCU06438	DNA repair helicase RAD25	17	17 (1)	11 (1)
NCU09468	alpha-tubulin B	17	9 (1)	6 (1)
NCU04088	hypothetical protein NCU04088	17	29 (1)	21 (1)
NCU07050	hypothetical protein NCU07050	17	6 (1)	4 (1)
NCU05151	Phosphoketolase	17	19 (1)	12 (1)
NCU00634	ribosomal protein L14	16	5 (1)	4 (1)
NCU09132	alpha-tubulin A	16	10 (1)	6 (1)

NCU05363	probable 26S protease subunit RPT6	16	15 (1)	11 (1)
NCU09367	phosphatidylinositol 3-kinase 3	16	61 (1)	33 (1)
NCU09072	hypothetical protein NCU09072	15	16 (1)	2 (1)
NCU08885	hypothetical protein NCU08885	15	8 (1)	7 (1)
NCU02609	conserved hypothetical protein	15	21 (1)	13 (1)
NCU07516	RING finger membrane protein	14	24 (1)	12 (1)
NCU09898	hypothetical protein NCU09898	14	20 (1)	8 (1)

## DISCUSSÃO

A resposta ao estresse é uma propriedade fundamental para os microrganismos e garante a sobrevivência quando ocorre mudanças no meio ambiente. Para alcançar tal habilidade, mecanismos evoluíram para sentir e responder às diferentes condições de estresse. Em geral, as redes de resposta ao estresse incluem reguladores que são altamente conservados em eucariotos e aqueles que são específicos de um organismo em particular. Vários estudos têm demonstrando que as proteínas AAA+ ATPases RVBs aparentemente estão envolvidas em distintos eventos biológicos, com foco no contexto do câncer; no entanto, seus papéis funcionais precisos em cada um destes processos ainda não são completamente compreendidos. Recentemente, sua associação com a resposta ao estresse começou a ser discutida na literatura [107–110]. Entretanto, os dados preliminares não confirmaram a conexão funcional entre as proteínas RVBs e a resposta ao estresse, exceto sua importância como desagregases proteicas componentes do agressomo em mamíferos [109]. Neste trabalho, uma nova funcionalidade das proteínas RVB-1 e RVB-2 é discutida no contexto da resposta induzida por estresse em *N. crassa*.

Em um trabalho anterior, a proteína RVB-1 foi identificada em extratos nucleares do fungo *Neurospora crassa* submetidos a estresse térmico, como uma proteína que liga à região promotora do gene *gsn* de maneira STRE-dependente [120]. Estes resultados levaram nosso grupo de pesquisa a investigar as propriedades estruturais e funcionais dessa família de proteínas [19] e seu envolvimento na resposta ao estresse neste fungo filamentosos. [19], mostraram que as proteínas RVB-1 e RVB-2 de *N. crassa* são proteínas nucleares essenciais para o fungo, influenciando em diversas fases do seu desenvolvimento. Além disso, foi

demonstrado que ambas interagem formando múltiplos estados oligoméricos dependentes de nucleotídeos, sendo hexâmeros os majoritariamente identificados. Elas são ATPases ativas que ligam a DNA dupla fita estimulando consideravelmente sua atividade ATPase [19].

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína Rvb1 foi identificada em agregados celulares sob estresse térmico [107] e em condensados perinucleares em células da levedura sob certas condições de crescimento [108], no entanto, a expressão e a localização da proteína não foram alteradas sob diferentes condições de estresse [108]. Em células de mamíferos, as proteínas RuvBLs exercem uma função importante na proteostase proteica, interagindo com componentes do agressomo sob estresse proteotóxico e desempenhando papéis como desagregases proteicas, sendo sua atividade ATPase influenciada pela presença de proteínas desagregadas [109]. Neste trabalho, nós demonstramos por meio de ensaios de expressão proteica e de localização subcelular que as proteínas RVB-1 e RVB-2 permanecem nucleares após estresse induzido por sal e temperatura e também observamos suas presenças em condensados na região perinuclear sob estresse, um fenômeno previamente descrito em células de levedura e humanos estressadas, como mencionado anteriormente [108,109]. Porém, a expressão das proteínas de levedura não é regulada sob estresse, diferentemente do que é descrito aqui para as proteínas de *N. crassa*.

Os promotores dos genes *rvb-1* e *rvb-2* mostraram serem ricos em *motifs* de ligação para fatores de transcrição de *N. crassa* descritos ativar genes de resposta a estresse, como a presença do *motif* HSE, reconhecido e ligado pelo fator de transcrição HSF-1 [35,133,134], STRE [39] reconhecido por SEB-1 [16] e *motif* para PAC-3, [14,66,135] o que sugere que diferentes fatores de transcrição podem agir regulando a expressão gênica destas proteínas sob diferentes estresses, de tal forma a aumentar seu conteúdo proteico nestas condições, principalmente como demonstrado sob estresse térmico e osmótico causado por NaCl.

De fato, a região promotora dos genes codificadores destas proteínas parecem ser essencial para a célula, uma vez que durante o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas tentativas de trocar a região promotora de ambos genes por um promotor induzido por cobre (*Ptcu*), uma metodologia descrita em *N. crassa* e que permite regular o nível da expressão gênica por controlando a concentração

de cobre [136]. Essa metodologia permite estudar fenótipos em linhagens cujos genes são essenciais, tais como as linhagens mutantes  $\Delta rvb-1$  e  $\Delta rvb-2$ , porém as linhagens transformadas *Prvbs::Ptcu* cresceram apenas na forma heterocária e apresentaram fenótipos muito doentes que inviabilizavam suas caracterizações (resultados não mostrados nesta Tese). Outra técnica que utilizamos foi o cruzamento das linhagens mutantes  $\Delta rvb-1$  e  $\Delta rvb-2$  com uma linhagem  $\Delta sad-1$ . O *locus sad-1* codifica uma RNA polimerase dependente de RNA essencial para silenciamento meiótico por DNA não pareado, sendo que a ausência do alelo supressor *sad-1* impede o emparelhamento adequado ao seu homólogo selvagem durante a meiose induzindo o silenciamento do gene na célula e permitindo que alguns genes essenciais por métodos convencionais (como substituição homóloga do gene pela sequência *hph*) sejam viáveis sob o fenótipo  $\Delta sad-1$  [137]. Entretanto, também não obtivemos sucesso utilizando essa técnica (resultado não mostrado), sendo os genes *rvb-1* e *rvb-2* essenciais como descrito [19].

No contexto de estresse, a via MAPK HOG-1 de transdução do sinal na presença de variações osmóticas, é conhecida por ativar genes de resposta a estresse térmico em *N. crassa* levando à indução da expressão das chaperonas HSP70-1 e HSP90-1 [54]. Isso sugere que esta via também pode ser importante para a ativação das RVBs no estresse térmico e osmótico e que o complexo RVB-1/RVB-2 pode atuar na estabilização destas vias. Em células humanas, as proteínas RuvBLs estabilizam proteínas da família fosfatidilinositol-3-kinases [97,100], bem como modulam a atividade dos reguladores transcricionais c-Myc e  $\beta$ -catenina, desempenhando papéis no desenvolvimento e progressão do câncer [102,138]. A presença de proteínas sinalizadoras imunoprecipitadas com RVB-1 após estresse osmótico, neste trabalho, como Ca/CaM-dependente quinase-1, fosfatidilinositol 3-quinase 3, CDC-25, PCL-1 e da GTPase RHO-1 contribuem para esta hipótese, mostrando conservação de funções e novas interações das RVBs em condições específicas. Embora não investigado neste trabalho, a presença das proteínas PCL-1 e RHO-1 como proteínas que interagem com RVB-1 sob estresse osmótico trás luz para estudos promissores no futuro. PCL-1 é um ciclina multifuncional ortóloga às Pcls (Pho85 cyclins) de *S. cerevisiae* e o trabalho recente (capítulo III) mostrou o papel multifuncional desta proteína, incluindo metabolismo de glicogênio, desenvolvimento e resposta ao estresse causado por NaCl e cálcio. Já RHO-1 é

uma GTPase de membrana importante na resposta ao estresse de parede celular [139], o que corrobora com os resultados de sensibilidade das mutantes  $\Delta rvb-1$  e  $\Delta rvb-2$  frente à presença de Congo Red, um agente indutor de estresse de parede. A presença nos resultados de imunoprecipitação de um regulador da síntese de quitina sob estresse térmico (NCU02351) reforça esta hipótese.

Neste trabalho, as proteínas RVBs foram identificadas como componentes de grânulos de estresse (SGs). A literatura é muito rica em informação sobre as funções e constituintes destas estruturas [140–144] e outros. Utilizando ensaios de imunoprecipitação com um componente de SG de *S. cerevisiae* e de mamífero, [110] identificaram as proteínas RVBs como componentes de um grande proteoma sugerindo que suas atividades ATPase seriam importantes em diferentes etapas na montagem e desmontagem destes grânulos. No entanto, suas presenças não foram comprovadas por experimentos adicionais. A composição dos SGs para estes organismos foi definida, mostrando ser constituída 50% por proteínas ligantes a mRNA e rRNA (RNPs) [110,142], assim como também estão presentes fatores de alongamento da tradução, subunidades AAA+ do proteassomo, chaperonas da família das 30 e 70-kDa, DEAD box helicases e as proteínas Rvbs, além de uma variedade transcriptômica muito grande [110]. Curiosamente, a proteína glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GA3PDH) foi identificada como componente de SG de células de mamífero, mas não na levedura [109].

A presença de fatores de alongamento da tradução, muitas RNPs e da proteína GA3PDH imunoprecipitados com RVB-1 após estresse, neste trabalho, nos levou a investigar se as RVBs de *N. crassa* mantinham esta função conservada. Nós comprovamos que, assim como na levedura e células de mamíferos, *N. crassa* apresenta grânulos de estresse assim como mostramos a presença das proteínas RVB-1 e RVB-2 como componentes destes grânulos por microscopia de fluorescência. Além disso, mostramos que a proteína glicolítica GA3PDH está presente em extratos enriquecidos com estes grânulos em *N. crassa*. A presença desta enzima nos experimentos de estresse sugere que GA3PDH e RVB-1 podem interagir através desses grânulos e que os mecanismos de montagem e desmontagem de SGs, assim como seus componentes no fungo filamentosos, podem estar mais relacionados às células de mamíferos do que à levedura *S. cerevisiae*.

Um resultado interessante foi a modulação da expressão de maneira oposta em resposta à luz das proteínas RVB-1 e RVB-2. Enquanto RVB-1 é regulada positivamente nos primeiros tempos de exposição a luz (expressão máxima em 30 min) a expressão de RVB-2 é reprimida sob luz nesta mesma condição. A identificação de elementos de resposta à luz (LRE [130]) nos promotores *rvb-1* e *rvb-2* reforça que os genes podem ser regulados pela luz. A resposta à luz em *N. crassa* está sob o controle dos fatores de transcrição WC-1 e WC-2 do tipo GATA, os quais formam o complexo heterodimérico WCC-1/2 e regula a expressão transcricional de genes relacionados ao relógio circadiano [145,146]. A resposta à luz também envolve a remodelação da cromatina e a regulação de RVB-1 e RVB-2 pela luz é esperada, pois são ATPases ativas e são componentes de vários complexos remodeladores da cromatina, evidenciados pelos nossos ensaios de imunoprecipitação. Um estudo recente [147] relaciona os transcritos e as proteínas regulados pelo relógio na linhagem selvagem de *N. crassa* e no mutante  $\Delta csp-1$ , um fator de transcrição regulado por WCC que atua como repressor de genes envolvidos com o relógio [130]. Enquanto apenas o gene *rvb-2*, mas não a proteína RVB-2, é rítmico na linhagem selvagem, ambas as proteínas são rítmicas de uma maneira dependente de CSP-1 [147], revelando uma discordância entre a expressão do mRNA *rvb-2* e a tradução proteica e, mais importante, uma conexão de ambas as proteínas ao relógio circadiano através de CSP-1.

Sugerimos que a regulação pós-transcricional possa explicar a regulação oposta de RVB-1 e RVB-2 sob a luz descrita neste trabalho, um tipo de regulação de expressão que merece ser investigado futuramente. Além disso, resultados recentes de uma aluna de Iniciação científica do laboratório, demonstrou que diferente do relatado por [147], as proteínas RVB-1 e RVB-2 apresentam expressão circadiana, com períodos variando ao redor de 24 h, de maneira independente de CSP-1, embora o fator de transcrição regule consideravelmente a expressão de ambas proteínas na célula. Curiosamente, foi recentemente descrito que tanto em células humanas quanto em camundongos, RUVBL2 interage com outras proteínas do relógio na cromatina para regular a fase circadiana. Além disso, ambos os transcritos *RUVBL1* e *RUVBL2* são rítmicos [148]. Estes resultados mostram uma conservação de funções específicas das proteínas RVBs em *N. crassa* e revelam que as proteínas RVB-1 e RVB-2 são ATPases reguladas por luz e pelo relógio

biológico do fungo, podendo representar um papel importante na regulação gênica mediada pelo relógio, via complexos de remodelagem de cromatina, interação com seus componentes em momentos específicos e outras funções ainda desconhecidas.

As proteínas RVB-1 e RVB-2 são componentes essenciais de complexos de remodelagem da cromatina, como os da família INO80, Swr1/SRCAP e o complexo TIP60/ NuA4 histona acetiltransferase (HAT) [132,149]. Entretanto, seus papéis e estados oligoméricos nesses complexos permanecem ainda controversos [132,150,151] Sabe-se que as proteínas Rvbs regulam a expressão gênica de componentes do INO80 [152], que a atividade ATPásica de ambas é importante para a maturação desse complexo e que a proteína Rvb2 recruta Arp5 na subunidade Ino80 em *S. cerevisiae* [153]. Recentemente, estruturas crio-EM de INO80 de *Chetomium thermophilum* e de humano [154–156] e Swr1/SRCAP de levedura e humano [157,158] revelaram que RUVBL1 e RUVBL2 são âncoras para outras proteínas destes complexos, contribuindo de forma motora por meio de sua atividade ATPase. O complexo INO80 realiza deslizamento de nucleossomos e troca de histonas H2A/H2B, enquanto Swr1/SRCAP troca exclusivamente variantes de histonas. Apesar de apresentarem diferentes mecanismos de ação, esses complexos compartilham uma arquitetura semelhante, conservada de leveduras a humano [149]. O dodecâmero RUVBL1–RUVBL2 compõe o núcleo desses complexos utilizando seu domínio DII exposto de cada anel hexamérico para interagir com as proteínas motoras INO80 ou Swr1/SRCAP, de um lado, e com as subunidades reguladoras ARP5/IES6 (INO80) ou ARP6 (Swr1 /SRCAP) do outro lado. A interação com esses componentes é dirigida pela flexibilidade dos domínios DII das proteínas RUVBL1 e RUVBL2 cuja conformação muda significativamente para se adaptar aos parceiros. No complexo Swr1, o hexâmero RUVBL1/RUVBL2 também interage com as subunidades reguladoras ligadas ao nucleossomo Swc2/4/6 (Willhoft e Wigley, 2020; Dauden, López-Perrote e Llorca, 2020). ARP4, por outro lado, interage com actina e parece desempenhar papéis compartilhados em diferentes complexos, alternando a composição de nucleossomos de maneira ATP-dependente (INO80 e SWR1) ou modificando histonas pós-tradução (TIP60/NuA4) [159].

Neste trabalho, mostramos nos experimentos de imunoprecipitação a conservação de muitos componentes destes complexos em *N. crassa*, como as unidades motoras INO80 e SWR-1, bem como suas proteínas acessórias IESs, ARP-6, ARP8, ARP5, ARP4, SWC-4 e outros. Além disso, muitos destes componentes são ligeiramente mais conservados com seus homólogos em humano (porcentagens de identidade ao nível proteico), do que em leveduras, destacando *N. crassa* como um bom modelo de estudos futuros de aspectos estruturais destes complexos. Neste trabalho, com foco na regulação mediada por estresse, estes componentes foram identificados co-imunoprecitando com RVB-1 tanto em condições vegetativas de crescimento quanto após estresse térmico e osmótico, em alto *score*, sugerindo um papel importante destes complexos durante estresse. De fato, nós mostramos que linhagens mutantes para os componentes do complexo INO80 (ARP4, ARP5 e ARP8) bem como do complexo SWR-1 (ARP4, ARP-6 e SWC-4) são sensíveis a diferentes tipos de estresse, assim como as mutantes RVBs. Isso sugere que estes complexos são requeridos durante estresse na cromatina, de forma a regular a expressão gênica garantindo uma resposta rápida frente às mudanças ambientais. Além disso, as linhagens mutantes nestas proteínas apresentaram em sua totalidade fenótipos semelhantes ao das linhagens mutantes RVBs em relação ao desenvolvimento do fungo. É importante enfatizar que as linhagens mutantes nas proteínas ARP-4, ARP-5 e SWC-4 são heterocarios, portanto indicando que tais proteínas são essenciais. Em *S. cerevisiae*, *SWC4* e *ARP4* são genes essenciais [160,161], mas *ARP5* não, apesar de estar descrito que a linhagem *ARP5Δ* é sensível ao aumento da temperatura [162], o que corrobora com nosso resultado.

Outro resultado importante deste trabalho foi a identificação da proteína shugoshin nos experimentos de imunoprecipitação da proteína RVB-1 durante estresse térmico. As proteínas shugoshin são conservadas e ubíquas entre os eucariotos, variando de maneira espécie-específica em número de parálogos, isoformas por *splicing* alternativo, função e localização celular, embora estejam amplamente relacionadas com processos de divisão celular [163–165]. Elas apresentam majoritariamente localização nuclear e são capazes de ligar a histonas [164,166,167], mas também são descritas como presentes em múltiplos locais na célula, agindo como adaptadoras, mediando interações proteína-proteína de

maneira espaço-temporal [168]. Recentemente, a proteína SGO2 de camundongo foi identificada como essencial para resposta ao choque térmico, via interação com HSF-1 em elementos HSE localizados no gene *HSP70* [114]. Esta proteína mostrou regular a resposta ao estresse servindo como moduladora na cromatina na montagem do complexo da transcrição, interagindo com muitos alvos, entre eles as proteínas RuvBL1/2 [114]. Expressão diminuída ou inexistente de proteínas shugoshin está relacionada a diversos tipos de câncer como o de cabeça e pescoço, de nasofaringe, neuroblastoma, de próstata e de pulmão [169]. Além disso, recentemente, a diminuição na expressão de SGO1 em células cerebrais de camundongos causou o acúmulo de proteínas beta amiloides provocando um desenvolvimento espontâneo da doença de Alzheimer [170]. Embora as proteínas RuvBL1 e RuvBL-2 estejam presentes no trabalho de [114] nos ensaios de imunoprecipitação com a proteína SGO2 durante estresse térmico, não foi comprovado experimentalmente que a proteína SGO2 interage com o complexo RuvBL.

Neste trabalho, a identificação da proteína nos levou a investigar se a mesma pode exercer uma função conservada com a proteína de *Mus musculus* na resposta ao estresse. A proteína de *N. crassa* apresentou semelhanças estruturais com a proteína SGO2 de camundongo, preditas por *AlphaFold*, como a presença de um grande domínio  $\alpha$ -hélice N-terminal e regiões desprovidas de estrutura. Vale ressaltar que apenas um trabalho na literatura realizou um estudo estrutural da proteína SGO1 humana, mas devido a sua instabilidade na forma recombinante, apenas o domínio  $\alpha$ -hélice foi caracterizado [171]. A linhagem de *N. crassa* mutante  $\Delta$ *sgo-1* apresentou poucos fenótipos relacionados ao desenvolvimento, com aspecto semelhante à linhagem selvagem. No entanto, seu crescimento foi afetado por diferentes tipos de estresse, principalmente térmico, osmótico e oxidativo. Ensaios preliminares *in vitro* revelaram que a proteína SGO-1 interage diretamente com a proteína RVB-1, mas não com RVB-2, sugerindo que possa existir um mecanismo de interação *in vivo* no qual SGO-1 interage com o complexo RVB-1/RVB-2 no estresse via RVB-1, permitindo que RVB-2 interaja com outros alvos. Além disso, a proteína SGO-1 apresentou localização predominantemente nuclear, mas pode estar localizada em diferentes regiões celulares após estresse térmico e osmótico. Também, a presença de NLSs na estrutura primária da proteína SGO-1, sugere que

assim como descrito para as proteínas RVBs, seu tráfego núcleo/citoplasma pode ser por meio da via clássica envolvendo importinas- $\alpha/\beta$  [19,172].

A identificação da proteína SGO-1 no choque térmico, abre portas para diversos estudos funcionais e estruturais dessa proteína. A proteína SGO-1 de *N. crassa* é solúvel na forma recombinante, diferente do que foi relatado para as proteínas de humano [171] tornando um excelente modelo para compreender aspectos estruturais ainda pouco conhecidos. O seu papel transcricional, bem como a importância da proteína SGO-1 na promoção da homeostase celular também precisa ser mais bem elucidado. Sua função na literatura em prevenir agregados celulares [114] é promissora, porém mais estudos são necessários para entender as funções dessas proteínas, incluindo as RVBs, nestes processos celulares.

Outro resultado interessante deste trabalho foi o envolvimento das proteínas RVBs no metabolismo de carboidratos. Várias proteínas envolvidas no processo de síntese de glicogênio foram identificadas nos ensaios de IP, como GNN, GSN e GBE, assim como a interação com GNN *in vivo* parece ocorrer. A proteína RVB-1, como já foi descrito, foi identificada em nosso laboratório possivelmente ligando de maneira STRE-dependente ao promotor *gsn* durante choque térmico [120], o qual é reconhecido pelo fator de transcrição SEB-1 [16].

Curiosamente, trabalhos vem relatando a presença das proteínas envolvidas na síntese de glicogênio em diferentes regiões da célula, incluindo o núcleo. O glicogênio nuclear foi documentado pela primeira vez no início década de 1940 [173], mas seu papel na fisiologia celular ainda não é totalmente compreendido [174]. Glicogênio nuclear foi relatado em hepatócitos humanos localizados em grânulos discretos na região perinuclear interna [175]. A localização intracelular da proteína glicogênio sintase muscular humana, expressa em hepatócitos de camundongos, está localizada no núcleo na ausência de glicose [176], mas transloca-se para o citoplasma na presença do açúcar de maneira independente de insulina, resultado contrário ao que foi relatado para a glicogênio sintase hepática [177]. Em *S. cerevisiae*, a Gsy2p (glicogênio sintase 2) localiza-se dispersa no citoplasma em resposta à presença de glicogênio [178], porém em condições nas quais o conteúdo de glicogênio é baixo Gsy2 encontra-se localizada em grânulos discretos no citoplasma, possivelmente ligada aos estoques intracelulares do carboidrato. No entanto, sob condições de ausência de glicogênio, Gsy2p localiza-se

principalmente no núcleo celular [178]. Recentemente, em células de câncer de pulmão, foi documentado que glicogênio pode ser sintetizado *de novo* no núcleo e serve como substrato para a acetilação de histonas, o que desempenha um papel importante na tumorigênese [174]. Estes resultados sugerem que as enzimas regulatórias da síntese de glicogênio podem interagir com proteínas de funções regulatórias associadas a complexos proteicos no núcleo, incluindo as RVBs, como os nossos resultados mostram. Pouco se sabe sobre o papel das RVBs nestes processos, no entanto glicogênio diminuído foi observado em células de fígado de camundongos expressando baixos níveis de RUVBL1 [179].

Neste sentido, a presença de enzimas do metabolismo de glicogênio nos experimentos de imunoprecipitação da proteína RVB-1 após estresse, sugere um papel ainda desconhecido destas proteínas. Nós mostramos que RVB-1 interage *in vivo* com GNN de maneira independente de estresse e GNN é uma enzima altamente regulada por estresse térmico e osmótico, mostrando estar super expressa nessas condições (resultados deste trabalho). Além disso, níveis menores de glicogênio foram encontrados nas linhagens mutantes heterocárias para ambas as proteínas RVB-1 e RVB-2. Considerando o papel importante do glicogênio e das proteínas RVBs no câncer, nosso trabalho trás luz para uma nova função que merece uma investigação futura, pressupondo um papel central destas proteínas no metabolismo.

Finalmente, a ausência de Hsp90 nos nossos resultados de imunoprecipitação nos levaram a investigar a presença dos componentes do complexo R2TP em *N. crassa*, os quais mostraram estar ausentes nesta classe de fungos. Ortólogos para estas proteínas não apareceram nos bancos de dados de *Neurospora* ou outros fungos filamentosos [19]. O complexo R2TP foi identificado pela primeira vez em levedura, formado pelas proteínas Rvbs, Tah1 e Pih1, as quais interagem com a chaperona Hsp90 [180,181]. Juntas, estas proteínas formam diferentes complexos multiméricos, nas quais Pih1 e Tah1 agem como proteínas adaptadores (Kakihara e Houry, 2012). Estes complexos levam as proteínas RVBs a estarem envolvidas em vários processos celulares, interagindo com muitas proteínas clientes distintas, como na biogênese de snRNPs (proteínas ribonucleolares pequenas) e estabilização de PIKKs [181]. Além disso, recentemente foi mostrado que o complexo de humano pode envolver a participação dessas proteínas em

subcomplexos R2P e R2T, agindo em substratos diferentes com função chaperona-like [182]. Porém, as Rvbs de levedura também foram descritas como capazes de interagir diretamente com Hsp90 na ausência de Pih1 e Tah1, indicando que os processos celulares podem ser mantidos mesmo na ausência dessas proteínas [106].

Nossos resultados, no entanto, não identificaram HSP90 em nenhum dos experimentos de imunoprecipitação realizado, mas a proteína HSP90 mostrou ser uma chaperona expressa dependente de choque térmico em *N. crassa*, assim como previamente relatado para seus transcritos [183]. Embora a interação não tenha sido mostrada, neste trabalho, proteínas envolvidas na biogênese de snRNAs e uma PIKK foram encontradas nos experimentos de imunoprecipitação, sugerindo que funções associadas às RVBs via R2TP podem estar mantidas mesmo na ausência do complexo. Podemos sugerir que os mecanismos de interação entre HSP90 e RVB-1/RVB-2, se existirem, devem envolver proteínas diferentes em momentos específicos.

Concluindo, este é o primeiro trabalho de caracterização funcional das proteínas RVB-1 e RVB-2 no contexto da resposta ao estresse em fungos filamentosos, acrescentando novas funções para estas proteínas. Este trabalho demonstrou por meio de seus experimentos que as proteínas RVBs são reguladas por estresse, principalmente térmico, osmótico e luz e que além das RVBs, alguns complexos associados (INO80 e SWR-1) podem estar envolvidos na resposta ao estresse, possivelmente facilitando o acesso da cromatina nestas condições. Além disso, o grande número de interações identificadas, mostram que estas proteínas agem de maneira geral e específica, sendo importantes para uma correta resposta celular frente ao estresse.

## REFERÊNCIAS

- [1] D.D. Perkins, R.H. Davis, *Neurospora at the Millennium*, *Fungal Genetics and Biology*. 31 (2000) 153–167. <https://doi.org/10.1006/FGBI.2000.1248>.
- [2] H.J. Vogel, A Convenient Growth Medium for *Neurospora crassa*., *Microbial Genetics Bulletin*. 13 (1956) 42–47.
- [3] U. Schulte, I. Becker, H.W. Mewes, G. Mannhaupt, Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*, *Journal of Biotechnology*. 94 (2002) 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00415-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00415-1).
- [4] J.R.S. Fincham, P.R. Day, A.E. Radford, *Fungal genetics*, University of California Press, 1979. <https://www.ucpress.edu/book/9780520038189/fungal-genetics> (accessed August 1, 2022).
- [5] D.D. Perkins, B.C. Turner, E.G. Barry, STRAINS OF NEUROSPORA COLLECTED FROM NATURE, *Evolution*. 30 (1976) 281–313. <https://doi.org/10.1111/J.1558-5646.1976.TB00910.X>.
- [6] M.S. Fischer, N.L. Glass, Communicate and Fuse: How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network, *Front Microbiol*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00619>.
- [7] J.E. Galagan, S.E. Calvo, K.A. Borkovich, E.U. Selker, N.O. Read, D. Jaffe, W. FitzHugh, L.J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. Wang, C.B. Nielsen, J. Butler, M. Endrizzi, D. Qui, P. Ianakiev, D. Bell-Pedersen, M.A. Nelson, M. Werner-Washburne, C.P. Selitrennikoff, J.A. Kinsey, E.L. Braun, A. Zelter, U. Schulte, G.O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, C. Staben, E. Marcotte, D. Greenberg, A. Roy, K. Foley, J. Naylor, N. Stange-Thomann, R. Barrett, S. Gnerre, M. Kamal, M. Kamvysselis, E. Mauceli, C. Bielke, S. Rudd, D. Frishman, S. Krystofova, C. Rasmussen, R.L. Metzenberg, D.D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Macino, D. Catcheside, W. Li, R.J. Pratt, S.A. Osmani, C.P.C. DeSouza, L. Glass, M.J. Orbach, J.A. Berglund, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamann, S. Seiler, J. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D.O. Natvig, L.A. Alex, G. Mannhaupt, D.J. Ebbole, M. Freitag, I. Paulsen, M.S. Sachs, E.S. Lander, C. Nusbaum, B. Birren, The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*, *Nature*. 422 (2003) 859–868. <https://doi.org/10.1038/NATURE01554>.
- [8] J.C. Dunlap, K.A. Borkovich, M.R. Henn, G.E. Turner, M.S. Sachs, N.L. Glass, K. McCluskey, M. Plamann, J.E. Galagan, B.W. Birren, R.L. Weiss, J.P. Townsend, J.J. Loros, M.A. Nelson, R. Lambreghts, H. v. Colot, G. Park, P. Collopy, C. Ringelberg, C. Crew, L. Litvinkova, D. DeCaprio, H.M. Hood, S. Curilla, M. Shi, M. Crawford, M. Koerhsen, P. Montgomery, L. Larson, M. Pearson, T. Kasuga, C. Tian, M. Baştürkmen, L. Altamirano, J. Xu, Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project, *Adv Genet*. 57 (2007) 49–96. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(06\)57002-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(06)57002-6).
- [9] Y. Ninomiya, K. Suzuki, C. Ishii, H. Inoue, Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (2004) 12248–12253. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0402780101>.
- [10] H. v. Colot, G. Park, G.E. Turner, C. Ringelberg, C.M. Crew, L. Litvinkova, R.L. Weiss, K.A. Borkovich, J.C. Dunlap, A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103 (2006) 10352–10357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0601456103>.
- [11] R.D. Gonçalves, F.B. Cupertino, F.Z. Freitas, A.D. Luchessi, M.C. Bertolini, A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism, *Mol Cell Proteomics*. 10 (2011). <https://doi.org/10.1074/MCP.M111.007963>.

- [12] T. de Souza Candido, R.D. Gonçalves, A.P. Felício, F.Z. Freitas, F.B. Cupertino, A.C.G.V. de Carvalho, M.C. Bertolini, A protein kinase screen of *Neurospora crassa* mutant strains reveals that the SNF1 protein kinase promotes glycogen synthase phosphorylation, *Biochem J.* 464 (2014) 323–334. <https://doi.org/10.1042/BJ20140942>.
- [13] S. Virgilio, F.B. Cupertino, D.L. Ambrosio, M.C. Bertolini, Regulation of the reserve carbohydrate metabolism by alkaline pH and calcium in *Neurospora crassa* reveals a possible cross-regulation of both signaling pathways, *BMC Genomics.* 18 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3832-1>.
- [14] F.B. Cupertino, F.Z. Freitas, R.M. de Paula, M.C. Bertolini, Ambient pH controls glycogen levels by regulating glycogen synthase gene expression in *Neurospora crassa*. New insights into the pH signaling pathway, *PLoS One.* 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0044258>.
- [15] F.B. Cupertino, S. Virgilio, F.Z. Freitas, T. de S. Candido, M.C. Bertolini, Regulation of glycogen metabolism by the CRE-1, RCO-1 and RCM-1 proteins in *Neurospora crassa*. The role of CRE-1 as the central transcriptional regulator, *Fungal Genetics and Biology.* 77 (2015) 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.03.011>.
- [16] F.Z. Freitas, S. Virgilio, F.B. Cupertino, D.J. Kowbel, M. Fioramonte, F.C. Gozzo, N.L. Glass, M.C. Bertolini, The SEB-1 Transcription Factor Binds to the STRE Motif in *Neurospora crassa* and Regulates a Variety of Cellular Processes Including the Stress Response and Reserve Carbohydrate Metabolism, *G3 (Bethesda).* 6 (2016) 1327–1343. <https://doi.org/10.1534/G3.116.028506>.
- [17] M. Baek, S. Virgilio, T.M. Lamb, O. Ibarra, J.M. Andrade, R.D. Gonçalves, A. Dovzhenok, S. Lim, D. Bell-Pedersen, M.C. Bertolini, C.I. Hong, Circadian clock regulation of the glycogen synthase (*gsn*) gene by WCC is critical for rhythmic glycogen metabolism in *Neurospora crassa*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116 (2019) 10435–10440. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1815360116/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- [18] A.C. Boni, D.L. Ambrósio, F.B. Cupertino, A. Montenegro-Montero, S. Virgilio, F.Z. Freitas, F.A. Corrocher, R.D. Gonçalves, A. Yang, M.T. Weirauch, T.R. Hughes, L.F. Larrondo, M.C. Bertolini, *Neurospora crassa* developmental control mediated by the FLB-3 transcription factor, *Fungal Biol.* 122 (2018) 570–582. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2018.01.004>.
- [19] J.E. Maimoni Campanella, S.L. Ramos Junior, V.T. Rodrigues Kiraly, A.A. Severo Gomes, A.C. de Barros, P.A. Mateos, F.Z. Freitas, M.R. de Mattos Fontes, J.C. Borges, M.C. Bertolini, Biochemical and biophysical characterization of the RVB-1/RVB-2 protein complex, the RuvBL/RVB homologues in *Neurospora crassa*, *Biochimie.* 191 (2021) 11–26. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2021.08.002>.
- [20] A.J.P. Brown, L.E. Cowen, A. di Pietro, J. Quinn, Stress Adaptation, *Microbiol Spectr.* 5 (2017). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0048-2016>.
- [21] S. Fulda, Cell death and survival signaling in oncogenesis, *Klinische Padiatrie.* 222 (2010) 340–344. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1265169>.
- [22] C.R. Weston, R.J. Davis, The JNK signal transduction pathway, *Curr Opin Cell Biol.* 19 (2007) 142–149. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2007.02.001>.
- [23] M. Ashburner, J.J. Bonner, The induction of gene activity in drosophila by heat shock, *Cell.* 17 (1979) 241–254. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90150-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90150-8).
- [24] A.P. Gasch, P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M.B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, P.O. Brown, Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Molecular Biology of the Cell.* 11 (2000) 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/MBC.11.12.4241>.

- [25] S. Nicholls, M.D. Leach, C.L. Priest, A.J.P. Brown, Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals, *Molecular Microbiology*. 74 (2009) 844–861. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2009.06883.X>.
- [26] S.W. Kmiecik, M.P. Mayer, Molecular mechanisms of heat shock factor 1 regulation, *Trends Biochem Sci*. 47 (2022) 218–234. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2021.10.004>.
- [27] J. Joutsen, L. Sistonen, Tailoring of Proteostasis Networks with Heat Shock Factors, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 11 (2019). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A034066>.
- [28] S. Tiwari, R. Thakur, J. Shankar, Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi, *Biotechnology Research International*. 2015 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/132635>.
- [29] E. V. LeBlanc, E.J. Polvi, A.O. Veri, G.G. Privé, L.E. Cowen, Structure-guided approaches to targeting stress responses in human fungal pathogens, *J Biol Chem*. 295 (2020) 14458–14472. <https://doi.org/10.1074/JBC.REV120.013731>.
- [30] J.H.T.M. Fabri, M.C. Rocha, C.M. Fernandes, G.F. Persinoti, L.N.A. Ries, A.F. da Cunha, G.H. Goldman, M. del Poeta, I. Malavazi, The Heat Shock Transcription Factor HsfA Is Essential for Thermotolerance and Regulates Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*, *Frontiers in Microbiology*. 12 (2021) 735. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.656548/BIBTEX>.
- [31] C. Wu, Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation, <Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Cb.11.110195.002301>. 11 (2003) 441–469. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CB.11.110195.002301>.
- [32] D. Pincus, Regulation of Hsf1 and the Heat Shock Response, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1243 (2020) 41–50. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40204-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40204-4_3).
- [33] M. Fernandes, H. Xiao, J.T. Lis, Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor–heat shock element interactions, *Nucleic Acids Res*. 22 (1994) 167–173. <https://doi.org/10.1093/NAR/22.2.167>.
- [34] H. Xiao, O. Perisic, J.T. Lis, Cooperative binding of *drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit, *Cell*. 64 (1991) 585–593. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90242-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90242-Q).
- [35] F. Zanolli Freitas, M.C. Bertolini, Genomic organization of the *Neurospora crassa* gsn gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock, *Mol Genet Genomics*. 272 (2004) 550–561. <https://doi.org/10.1007/S00438-004-1086-5>.
- [36] M.T. Martínez-Pastor, G. Marchler, C. Schüller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, F. Estruch, The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE), *EMBO Journal*. 15 (1996) 2227–2235. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1996.TB00576.X>.
- [37] T.M. Dinamarco, R.S. Almeida, P.A. de Castro, N.A. Brown, T.F. dos Reis, L.N.Z. Ramalho, M. Savoldi, M.H.S. Goldman, G.H. Goldman, Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in *Aspergillus fumigatus*, *Eukaryot Cell*. 11 (2012) 518–531. <https://doi.org/10.1128/EC.00016-12>.
- [38] C.K. Peterbauer, D. Litscher, C.P. Kubicek, The *Trichoderma atroviride* seb1 (stress response element binding) gene encodes an AGGGG-binding protein which is involved in the response to high osmolarity stress, *Molecular Genetics and Genomics* 2002 268:2. 268 (2002) 223–231. <https://doi.org/10.1007/S00438-002-0732-Z>.
- [39] N. Kobayashit, K. Mcentee, Identification of cis and trans Components of a Novel Heat Shock Stress Regulatory Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. 13 (1993) 248–256.

- [40] J. Ellis, Proteins as molecular chaperones, *Nature* 1987 328:6129. 328 (1987) 378–379. <https://doi.org/10.1038/328378a0>.
- [41] S. Tiwari, R. Thakur, J. Shankar, Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi, *Biotechnol Res Int.* 2015 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/132635>.
- [42] J. Borges, C. Ramos, Protein folding assisted by chaperones, *Protein Pept Lett.* 12 (2005) 257–261. <https://doi.org/10.2174/0929866053587165>.
- [43] M.R. Fernández-Fernández, J.M. Valpuesta, Hsp70 chaperone: A master player in protein homeostasis [version 1; peer review: 3 approved], *F1000Res.* 7 (2018). <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15528.1/DOI>.
- [44] M. Daugaard, M. Rohde, M. Jäättelä, The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions, *FEBS Lett.* 581 (2007) 3702–3710. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.05.039>.
- [45] F.H. Schopf, M.M. Biebl, J. Buchner, The HSP90 chaperone machinery, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18 (2017) 345–360. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.20>.
- [46] M. Taipale, I. Krykbaeva, M. Koeva, C. Kayatekin, K.D. Westover, G.I. Karras, S. Lindquist, Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition, *Cell.* 150 (2012) 987–1001. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.06.047>.
- [47] M. Criado-Marrero, T. Rein, E.B. Binder, J.T. Porter, J. Koren, L.J. Blair, Hsp90 and FKBP51: complex regulators of psychiatric diseases, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 373 (2018). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2016.0532>.
- [48] S. Hohmann, Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts, *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66 (2002) 300–372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002>.
- [49] S. Hohmann, M. Krantz, B. Nordlander, Yeast Osmoregulation, *Methods in Enzymology.* 428 (2007) 29–45. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28002-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28002-4).
- [50] M. Rep, M. Krantz, J.M. Thevelein, S. Hohmann, The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock, *Journal of Biological Chemistry.* 275 (2000) 8290–8300. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8290>.
- [51] M. Rep, M. Krantz, J.M. Thevelein, S. Hohmann, The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes, *Journal of Biological Chemistry.* 275 (2000) 8290–8300. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.12.8290>.
- [52] J. Lee, W. Reiter, I. Dohnal, C. Gregori, S. Beese-Sims, K. Kuchler, G. Ammerer, D.E. Levin, MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators, *Genes and Development.* 27 (2013) 2590–2601. <https://doi.org/10.1101/GAD.229310.113>.
- [53] A.J.P. Brown, L.E. Cowen, A. di Pietro, J. Quinn, Stress Adaptation, *Microbiology Spectrum.* 5 (2017). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0048-2016>.
- [54] R. Noguchi, S. Banno, R. Ichikawa, F. Fukumori, A. Ichiishi, M. Kimura, I. Yamaguchi, M. Fujimura, Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*, *Fungal Genetics and Biology.* 44 (2007) 208–218. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2006.08.003>.
- [55] T. Maeda, M. Takekawa, H. Saito, Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor, *Science* (1979). 269 (1995) 554–558. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7624781>.

- [56] Y. Zhang, R. Lamm, C. Pillonel, S. Lam, J.-R. Xu, Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa os-2* Gene Encodes a *HOG1* Mitogen-Activated Protein Kinase Homologue, *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (2002) 532–538. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.532-538.2002>.
- [57] T.M. Lamb, K.E. Finch, D. Bell-Pedersen, The *Neurospora crassa* OS MAPK pathway-activated transcription factor *ASL-1* contributes to circadian rhythms in pathway responsive clock-controlled genes, *Fungal Genetics and Biology*. 49 (2012) 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.12.006>.
- [58] M.S. Cyert, C.C. Philpott, Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 193 (2013) 677–713. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.112.147207>.
- [59] M.A. Peñalva, D. Lucena-Agell, H.N. Arst, Liaison alcaline: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling, *Current Opinion in Microbiology*. 22 (2014) 49–59. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2014.09.005>.
- [60] D.A. Davis, How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence, *Current Opinion in Microbiology*. 12 (2009) 365–370. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2009.05.006>.
- [61] J. Tilburn, S. Sarkar, D.A. Widdick, A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M.A. Penalva, H.N. Arst, The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH., *The EMBO Journal*. 14 (1995) 779–790. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1995.TB07056.X>.
- [62] E. Díez, J. Álvaro, E.A. Espeso, L. Rainbow, T. Suárez, J. Tilburn, H.N. Arst, M.Á. Peñalva, Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps, *The EMBO Journal*. 21 (2002) 1350–1359. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/21.6.1350>.
- [63] M.A. Peñalva, J. Tilburn, E. Bignell, H.N. Arst, Ambient pH gene regulation in fungi: making connections, *Trends in Microbiology*. 16 (2008) 291–300. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.03.006>.
- [64] H.N. Arst, M.A. Peñalva, pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems, *Trends in Genetics*. 19 (2003) 224–231. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00052-0).
- [65] W. Li, A.P. Mitchell, Proteolytic Activation of Rim1p, a Positive Regulator of Yeast Sporulation and Invasive Growth, *Genetics*. 145 (1997) 63–73. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/145.1.63>.
- [66] S. Virgilio, F.B. Cupertino, N.E. Bernardes, F.Z. Freitas, A.A.S. Takeda, M.R. de Mattos Fontes, M.C. Bertolini, Molecular Components of the *Neurospora crassa* pH Signaling Pathway and Their Regulation by pH and the PAC-3 Transcription Factor, *PLOS ONE*. 11 (2016) e0161659. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0161659>.
- [67] M.P. Martins, N.M. Martinez-Rossi, P.R. Sanches, A. Rossi, The PAC-3 transcription factor critically regulates phenotype-associated genes in *Neurospora crassa*., *Genet Mol Biol*. 43 (2020) e20190374. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0374>.
- [68] M.P. Martins, N.M. Martinez-Rossi, P.R. Sanches, E.V. Gomes, M.C. Bertolini, W.R. Pedersoli, R.N. Silva, A. Rossi, The pH Signaling Transcription Factor PAC-3 Regulates Metabolic and Developmental Processes in Pathogenic Fungi., *Front Microbiol*. 10 (2019) 2076. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02076>.
- [69] B. Halliwell, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology*. 141 (2006) 312–322. <https://doi.org/10.1104/PP.106.077073>.
- [70] M. Ralser, M.M. Wamelink, A. Kowald, B. Gerisch, G. Heeren, E.A. Struys, E. Klipp, C. Jakobs, M. Breitenbach, H. Lehrach, S. Krobitsch, Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress, *Journal of Biology*. 6 (2007). <https://doi.org/10.1186/JBIOL61>.

- [71] A. Roetzer, N. Gratz, P. Kovarik, C. Schüller, Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis, *Cellular Microbiology*. 12 (2010) 199–216. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2009.01391.X>.
- [72] D. Chen, C.R.M. Wilkinson, S. Watt, C.J. Penkett, W.M. Toone, N. Jones, J. Bähler, Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast, *Molecular Biology of the Cell*. 19 (2008) 308–317. <https://doi.org/10.1091/MBC.E07-08-0735>.
- [73] T.A. Missall, J.K. Lodge, Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators, *Molecular Microbiology*. 57 (2005) 847–858. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04735.X>.
- [74] M. Guo, Y. Chen, Y. Du, Y. Dong, W. Guo, S. Zhai, H. Zhang, S. Dong, Z. Zhang, Y. Wang, P. Wang, X. Zheng, The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *magnaporthe oryzae*, *PLoS Pathogens*. 7 (2011). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1001302>.
- [75] D. Hagiwara, S. Suzuki, K. Kamei, T. Gonoï, S. Kawamoto, The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genetics and Biology*. 73 (2014) 138–149. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2014.10.011>.
- [76] F. Lara-Rojas, O. Sánchez, L. Kawasaki, J. Aguirre, *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions, *Molecular Microbiology*. 80 (2011) 436–454. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07581.X>.
- [77] S.-K. Hong, M.-K. Cha, Y.-S. Choi, W.-C. Kim, I.-H. Kim, Msn2p/Msn4p Act as a Key Transcriptional Activator of Yeast Cytoplasmic Thiol Peroxidase II, *Journal of Biological Chemistry*. 277 (2002) 12109–12117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111341200>.
- [78] D.E. Levin, Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69 (2005) 262–291. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005/ASSET/7EAC9A4F-A772-4F67-8765-08376DDC4A6E/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0020520840006.JPEG>.
- [79] J.E. Adamo, G. Rossi, P. Brennwald, The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity, *Molecular Biology of the Cell*. 10 (1999) 4121–4133. <https://doi.org/10.1091/MBC.10.12.4121>.
- [80] R.S. Shapiro, L.E. Cowen, Thermal control of microbial development and virulence: Molecular mechanisms of microbial temperature sensing, *MBio*. 3 (2012). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00238-12>.
- [81] C.A. Munro, Chitin and Glucan, the Yin and Yang of the Fungal Cell Wall, Implications for Antifungal Drug Discovery and Therapy, *Advances in Applied Microbiology*. 83 (2013) 145–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407678-5.00004-0>.
- [82] M.C. Rocha, K. Minari, J.H.T.M. Fabri, J.D. Kerkaert, L.M. Gava, A.F. da Cunha, R.A. Cramer, J.C. Borges, I. Malavazi, *Aspergillus fumigatus* Hsp90 interacts with the main components of the cell wall integrity pathway and cooperates in heat shock and cell wall stress adaptation, *Cellular Microbiology*. 23 (2021) e13273. <https://doi.org/10.1111/CMI.13273>.
- [83] M.D. Leach, E. Klipp, L.E. Cowen, A.J.P. Brown, Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs, *Nature Reviews Microbiology* 2012 10:10. 10 (2012) 693–704. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2875>.
- [84] M.S. Cyert, Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 311 (2003) 1143–1150. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01552-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01552-3).

- [85] A.M. Stathopoulos, M.S. Cyert, Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast, *Genes & Development*. 11 (1997) 3432–3444. <https://doi.org/10.1101/GAD.11.24.3432>.
- [86] A. Spielvogel, H. Findon, H.N. Arst, L. Araújo-Bazán, P. Hernández-Ortiz, U. Stahl, V. Meyer, E.A. Espeso, Two zinc finger transcription factors, CrzA and SitA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*, *Biochemical Journal*. 414 (2008) 419–429. <https://doi.org/10.1042/BJ20080344>.
- [87] A. Pitoniak, B. Birkaya, H.M. Dionne, N. Vadaie, P.J. Cullen, The signaling mucins Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response, *Molecular Biology of the Cell*. 20 (2009) 3101–3114. <https://doi.org/10.1091/MBC.E08-07-0760>.
- [88] A. Roetzer, C. Gregori, A.M. Jennings, J. Quintin, D. Ferrandon, G. Butler, K. Kuchler, G. Ammerer, C. Schüller, *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors, *Molecular Microbiology*. 69 (2008) 603–620. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2008.06301.X>.
- [89] B. Enjalbert, A. Nantel, M. Whiteway, Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: Absence of a general stress response, *Molecular Biology of the Cell*. 14 (2003) 1460–1467. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-08-0546>.
- [90] P. Dunayevich, R. Baltanás, J.A. Clemente, A. Couto, D. Sapochnik, G. Vasen, A. Colman-Lerner, Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway, *Scientific Reports*. 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33203-6>.
- [91] D.R. Amici, D.J. Ansel, K.A. Metz, R.S. Smith, C.M. Phoumyvong, S. Gayatri, T. Chamera, S.L. Edwards, B.P. O'Hara, S. Srivastava, S. Brockway, S.R. Takagishi, B.-K. Cho, Y.A. Goo, N.L. Kelleher, I. Ben-Sahra, D.R. Foltz, J. Li, M.L. Mendillo, C16orf72/HAPSTR1 is a molecular rheostat in an integrated network of stress response pathways., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 119 (2022) e2111262119. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2111262119/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- [92] F.Z. Freitas, A. Chapeaurouge, J. Perales, M.C. Bertolini, A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*, *PROTEOMICS*. 8 (2008) 2052–2061. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200700921>.
- [93] H. -T Ni, D.C. LaPorte, Response of a yeast glycogen synthase gene to stress, *Mol Microbiol*. 16 (1995) 1197–1205. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1995.TB02342.X>.
- [94] N. Nano, W.A. Houry, Chaperone-like activity of the AAA proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 368 (2013) 1–12. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2011.0399>.
- [95] A. Jeganathan, V. Leong, L. Zhao, J. Huen, N. Nano, W.A. Houry, J. Ortega, Yeast Rvb1 and Rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency, *Journal of Molecular Biology*. 427 (2015) 1875–1886. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.01.010>.
- [96] J. Rosenbaum, S.H. Baek, A. Dutta, W.A. Houry, O. Huber, T.R. Hupp, P.M. Matias, The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape, *Sci Signal*. 6 (2013). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2003906>.
- [97] N. Izumi, A. Yamashita, S. Ohno, Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2, *Nucleus*. 3 (2012) 29–43. <https://doi.org/10.4161/NUCL.18926>.
- [98] Z.O. Jónsson, S. Jha, J.A. Wohlschlegel, A. Dutta, Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex, *Mol Cell*. 16 (2004) 465–477. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.09.033>.

- [99] I.A. Olave, S.L. Reck-Peterson, G.R. Crabtree, Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling, *Annu Rev Biochem.* 71 (2002) 755–781. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.71.110601.135507>.
- [100] N. Izumi, A. Yamashita, A. Iwamatsu, R. Kurata, H. Nakamura, B. Saari, H. Hirano, P. Anderson, S. Ohno, AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay, *Sci Signal.* 3 (2010). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2000468>.
- [101] X.B. Qiu, Y.L. Lin, K.C. Thome, P. Pian, B.P. Schlegel, S. Weremowicz, J.D. Parvin, A. Dutta, An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth, *J Biol Chem.* 273 (1998) 27786–27793. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.43.27786>.
- [102] B. A, C. S, H. O, U. F, R. U, A. D, K. R, P. J, Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity, *EMBO J.* 19 (2000) 6121–6130. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.22.6121>.
- [103] Y.Q. Mao, W.A. Houry, The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology, *Front Mol Biosci.* 4 (2017). <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2017.00058>.
- [104] A. Grigoletto, V. Neaud, N. Allain-Courtois, P. Lestienne, J. Rosenbaum, The ATPase activity of reptin is required for its effects on tumor cell growth and viability in hepatocellular carcinoma, *Mol Cancer Res.* 11 (2013) 133–139. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0455>.
- [105] W.A. Houry, E. Bertrand, B. Coulombe, The PAQosome, an R2TP-Based Chaperone for Quaternary Structure Formation, *Trends Biochem Sci.* 43 (2018) 4–9. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2017.11.001>.
- [106] M. Lakshminarasimhan, G. Boanca, C.A.S. Banks, G.L. Hattem, A.E. Gabriel, B.D. Groppe, C. Smoyer, K.E. Malanowski, A. Peak, L. Florens, M.P. Washburn, Proteomic and Genomic Analyses of the Rvb1 and Rvb2 Interaction Network upon Deletion of R2TP Complex Components, *Mol Cell Proteomics.* 15 (2016) 960–974. <https://doi.org/10.1074/MCP.M115.053165>.
- [107] E.W.J. Wallace, J.L. Kear-Scott, E. v. Pilipenko, M.H. Schwartz, P.R. Laskowski, A.E. Rojek, C.D. Katanski, J.A. Riback, M.F. Dion, A.M. Franks, E.M. Airoidi, T. Pan, B.A. Budnik, D.A. Drummond, Reversible, Specific, Active Aggregates of Endogenous Proteins Assemble upon Heat Stress, *Cell.* 162 (2015) 1286–1298. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.08.041>.
- [108] K. Rizzolo, J. Huen, A. Kumar, S. Phanse, J. Vlasblom, Y. Kakihara, H.A. Zeineddine, Z. Minic, J. Snider, W. Wang, C. Pons, T. v. Seraphim, E.E. Boczek, S. Alberti, M. Costanzo, C.L. Myers, I. Stagljjar, C. Boone, M. Babu, W.A. Houry, Features of the Chaperone Cellular Network Revealed through Systematic Interaction Mapping, *Cell Reports.* 20 (2017) 2735–2748. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.08.074>.
- [109] N. Zaarur, X. Xu, P. Lestienne, A.B. Meriin, M. McComb, C.E. Costello, G.P. Newnam, R. Ganti, N. v Romanova, M. Shanmugasundaram, S.T. Silva, T.M. Bandejas, P.M. Matias, K.S. Lobachev, I.K. Lednev, Y.O. Chernoff, M.Y. Sherman, RuvbL1 and RuvbL2 enhance aggresome formation and disaggregate amyloid fibrils, *The EMBO Journal.* 34 (2015) 2363–2382. <https://doi.org/10.15252/emj.201591245>.
- [110] S. Jain, J.R. Wheeler, R.W. Walters, A. Agrawal, A. Barsic, R. Parker, ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure, *Cell.* 164 (2016) 487–498. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.12.038>.
- [111] H. Glauninger, C.J. Wong Hickernell, J.A.M. Bard, D.A. Drummond, Stressful steps: Progress and challenges in understanding stress-induced mRNA condensation and accumulation in stress granules, *Mol Cell.* 82 (2022). <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2022.05.014>.

- [112] P. Anderson, N. Kedersha, Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation, *Cell Stress Chaperones*. 7 (2002) 213–221. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2002\)007<0213:vstroe>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2002)007<0213:vstroe>2.0.co;2).
- [113] N. Kedersha, P. Anderson, Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability, *Biochem Soc Trans*. 30 (2002) 963–969. <https://doi.org/10.1042/BST0300963>.
- [114] R. Takii, M. Fujimoto, M. Matsumoto, P. Srivastava, A. Katiyar, K.I. Nakayama, A. Nakai, The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment, *EMBO J*. 38 (2019). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019102566>.
- [115] A.S. Kainth, R. Meduri, V. Pandit, L.S. Rubio, D.S. Gross, Shugoshin 2—a new guardian for heat shock transcription, *EMBO J*. 39 (2020). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019104077>.
- [116] R.K. Hackley, A.K. Schmid, Global Transcriptional Programs in Archaea Share Features with the Eukaryotic Environmental Stress Response, *Journal of Molecular Biology*. 431 (2019) 4147–4166. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.07.029>.
- [117] E. Nikolaou, I. Agrafioti, M. Stumpf, J. Quinn, I. Stansfield, A.J. Brown, Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi, *BMC Evolutionary Biology*. 9 (2009). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-44>.
- [118] J. Huen, Y. Kakihara, F. Ugwu, K.L.Y. Cheung, J. Ortega, W.A. Houry, Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes, *Biochem Cell Biol*. 88 (2010) 29–40. <https://doi.org/10.1139/O09-122>.
- [119] M. Kanemaki, Y. Kurokawa, T. Matsu-Ura, Y. Makino, A. Masani, K.I. Okazaki, T. Morishita, T.A. Tamura, TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuVB-like DNA helicase, TIP49a, *Journal of Biological Chemistry*. 274 (1999) 22437–22444. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22437>.
- [120] F.Z. Freitas, A. Chapeaurouge, J. Perales, M.C. Bertolini, A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*, *Proteomics*. 8 (2008) 2052–2061. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200700921>.
- [121] T.S. Kitajima, S.A. Kawashima, Y. Watanabe, The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis, *Nature* 2004 427:6974. 427 (2004) 510–517. <https://doi.org/10.1038/nature02312>.
- [122] K. McCluskey, A. Wiest, M. Plamann, The Fungal Genetics Stock Center: a repository for 50 years of fungal genetics research, *J Biosci*. 35 (2010) 119–126. <https://doi.org/10.1007/S12038-010-0014-6>.
- [123] E.L. Tatum, R.W. Barratt, V.M. Cutter, Chemical Induction of Colonial Paramorphs in *Neurospora* and *Syncephalastrum*, *Science*. 109 (1949) 509–511. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.109.2838.509>.
- [124] D. EBBOLE, M.S. SACHS, A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia, *Fungal Genetics Reports*. 37 (1990) 7. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1472>.
- [125] J. Adler, I. Parmryd, Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient, *Cytometry A*. 77 (2010) 733–742. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.20896>.
- [126] E.F. Hartree, Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal Biochem*. 48 (1972) 422–427. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2).

- [127] C. Olivares-Yañez, J. Emerson, A. Kettenbach, J.J. Loros, J.C. Dunlap, L.F. Larrondo, Modulation of Circadian Gene Expression and Metabolic Compensation by the RCO-1 Corepressor of *Neurospora crassa*, *Genetics*. 204 (2016) 163–176. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.116.191064>.
- [128] J.R. Wheeler, S. Jain, A. Khong, R. Parker, Isolation of yeast and mammalian stress granule cores, *Methods*. 126 (2017) 12–17. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2017.04.020>.
- [129] F.Z. Freitas, R.M. de Paula, L.C.B. Barbosa, H.F. Terenzi, M.C. Bertolini, cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation, *Fungal Genetics and Biology*. 47 (2010) 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.10.011>.
- [130] K.M. Smith, G. Sancar, R. Dekhang, C.M. Sullivan, S. Li, A.G. Tag, C. Sancar, E.L. Bredeweg, H.D. Priest, R.F. McCormick, T.L. Thomas, J.C. Carrington, J.E. Stajich, D. Bell-Pedersen, M. Brunner, M. Freitag, Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for neurospora white collar complex, *Eukaryot Cell*. 9 (2010) 1549–1556. <https://doi.org/10.1128/EC.00154-10>.
- [131] C.H. Chen, C.S. Ringelberg, R.H. Gross, J.C. Dunlap, J.J. Loros, Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*, *EMBO J*. 28 (2009) 1029–1042. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.54>.
- [132] M.I. Dauden, A. López-Perrote, O. Llorca, RUVBL1-RUVBL2 AAA-ATPase: a versatile scaffold for multiple complexes and functions, *Curr Opin Struct Biol*. 67 (2021) 78–85. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2020.08.010>.
- [133] B.K. Jakobsen, H.R.B. Pelham, Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo, *Molecular and Cellular Biology*. 8 (1988) 5040–5042. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.11.5040-5042.1988>.
- [134] U. Meyer, C. Monnerjahn, D. Techel, L. Rensing, Interaction of the *Neurospora crassa* heat shock factor with the heat shock element during heat shock and different developmental stages, *FEMS Microbiology Letters*. 185 (2000) 255–261. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2000.TB09071.X>.
- [135] M.T. Weirauch, A. Yang, M. Albu, A.G. Cote, A. Montenegro-Montero, P. Drewe, H.S. Najafabadi, S.A. Lambert, I. Mann, K. Cook, H. Zheng, A. Goity, H. van Bakel, J.C. Lozano, M. Galli, M.G. Lewsey, E. Huang, T. Mukherjee, X. Chen, J.S. Reece-Hoyes, S. Govindarajan, G. Shaulsky, A.J.M. Walhout, F.Y. Bouget, G. Ratsch, L.F. Larrondo, J.R. Ecker, T.R. Hughes, Determination and Inference of Eukaryotic Transcription Factor Sequence Specificity, *Cell*. 158 (2014) 1431–1443. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.08.009>.
- [136] T.M. Lamb, J. Vickery, D. Bell-Pedersen, Regulation of gene expression in *neurospora crassa* with a copper responsive promoter, *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 3 (2013) 2273–2280. <https://doi.org/10.1534/G3.113.008821/-/DC1>.
- [137] P.K.T. Shiu, N.B. Raju, D. Zickler, R.L. Metzberg, Meiotic Silencing by Unpaired DNA, *Cell*. 107 (2001) 905–916. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00609-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00609-2).
- [138] O. Huber, L. Ménard, V. Haurie, A. Nicou, D. Taras, J. Rosenbaum, Pontin and Reptin, Two Related ATPases with Multiple Roles in Cancer, *Cancer Research*. 68 (2008) 6873–6876. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0547>.
- [139] G.-J. Day, R.D. Mosteller, D. Broek, Distinct Subclasses of Small GTPases Interact with Guanine Nucleotide Exchange Factors in a Similar Manner, *Molecular and Cellular Biology*. 18 (1998) 7444. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7444>.

- [140] H. Glauninger, C.J. Wong Hickernell, J.A.M. Bard, D.A. Drummond, Stressful steps: Progress and challenges in understanding stress-induced mRNA condensation and accumulation in stress granules, *Mol Cell*. 82 (2022). <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2022.05.014>.
- [141] D. Mateju, J.A. Chao, Stress granules: regulators or by-products?, *FEBS J*. 289 (2022) 363–373. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15821>.
- [142] D.S.W. Protter, R. Parker, Principles and Properties of Stress Granules, *Trends Cell Biol*. 26 (2016) 668–679. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2016.05.004>.
- [143] J. Ross Buchan, T. Nissan, R. Parker, Analyzing P-bodies and stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Enzymol*. 470 (2010) 619–640. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70025-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70025-2).
- [144] S. Souquere, S. Mollet, M. Kress, F. Dautry, G. Pierron, D. Weil, Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells, *J Cell Sci*. 122 (2009) 3619–3626. <https://doi.org/10.1242/JCS.054437>.
- [145] C. Talora, L. Franchi, H. Linden, P. Ballario, G. Macino, Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction, *EMBO Journal*. 18 (1999) 4961–4968. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.4961>.
- [146] H. Linden, G. Macino, White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*, *EMBO Journal*. 16 (1997) 98–109. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.1.98>.
- [147] J.M. Hurley, M.S. Jankowski, H. de los Santos, A.M. Crowell, S.B. Fordyce, J.D. Zucker, N. Kumar, S.O. Purvine, E.W. Robinson, A. Shukla, E. Zink, W.R. Cannon, S.E. Baker, J.J. Loros, J.C. Dunlap, Circadian Proteomic Analysis Uncovers Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation in Metabolic Pathways, *Cell Syst*. 7 (2018) 613–626.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELS.2018.10.014>.
- [148] D. Ju, W. Zhang, J. Yan, H. Zhao, W. Li, J. Wang, M. Liao, Z. Xu, Z. Wang, G. Zhou, L. Mei, N. Hou, S. Ying, T. Cai, S. Chen, X. Xie, L. Lai, C. Tang, N. Park, J.S. Takahashi, N. Huang, X. Qi, E.E. Zhang, Chemical perturbations reveal that RUVBL2 regulates the circadian phase in mammals, *Sci Transl Med*. 12 (2020). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABA0769>.
- [149] O. Willhoft, D.B. Wigley, INO80 and SWR1 complexes: the non-identical twins of chromatin remodelling, *Current Opinion in Structural Biology*. 61 (2020) 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.09.002>.
- [150] A. Tosi, C. Haas, F. Herzog, A. Gilmozzi, O. Berninghausen, C. Ungewickell, C.B. Gerhold, K. Lakomek, R. Aebersold, R. Beckmann, K.P. Hopfner, Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex, *Cell*. 154 (2013) 1207. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.08.016>.
- [151] V.Q. Nguyen, A. Ranjan, F. Stengel, D. Wei, R. Aebersold, C. Wu, A.E. Leschziner, Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1, *Cell*. 154 (2013). <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.08.018>.
- [152] O. Willhoft, R. Bythell-Douglas, E.A. McCormack, D.B. Wigley, Synergy and antagonism in regulation of recombinant human INO80 chromatin remodeling complex, *Nucleic Acids Res*. 44 (2016) 8179–8188. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW509>.
- [153] Z.O. Jónsson, S. Jha, J.A. Wohlschlegel, A. Dutta, Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex, *Mol Cell*. 16 (2004) 465–477. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.09.033>.
- [154] R.J. Aramayo, O. Willhoft, R. Ayala, R. Bythell-Douglas, D.B. Wigley, X. Zhang, Cryo-EM structures of the human INO80 chromatin-remodeling complex, *Nature Structural and Molecular Biology*. 25 (2018) 37–44. <https://doi.org/10.1038/S41594-017-0003-7>.

- [155] R. Ayala, O. Willhoft, R.J. Aramayo, M. Wilkinson, E.A. McCormack, L. Ocloo, D.B. Wigley, X. Zhang, Structure and regulation of the human INO80-nucleosome complex, *Nature*. 556 (2018) 391–395. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0021-6>.
- [156] S. Eustermann, K. Schall, Di. Kostrewa, K. Lakomek, M. Strauss, M. Moldt, K.P. Hopfner, Structural basis for ATP-dependent chromatin remodelling by the INO80 complex, *Nature*. 556 (2018) 386–390. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0029-Y>.
- [157] Y. Feng, Y. Tian, Z. Wu, Y. Xu, Cryo-EM structure of human SRCAP complex, *Cell Research*. 28 (2018) 1121–1123. <https://doi.org/10.1038/S41422-018-0102-Y>.
- [158] O. Willhoft, M. Ghoneim, C.L. Lin, E.Y.D. Chua, M. Wilkinson, Y. Chaban, R. Ayala, E.A. McCormack, L. Ocloo, D.S. Rueda, D.B. Wigley, Structure and dynamics of the yeast SWR1-nucleosome complex, *Science*. 362 (2018). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT7716>.
- [159] S. Yamazaki, C. Gerhold, K. Yamamoto, Y. Ueno, R. Grosse, K. Miyamoto, M. Harata, The Actin-Family Protein Arp4 Is a Novel Suppressor for the Formation and Functions of Nuclear F-Actin, *Cells*. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/CELLS9030758>.
- [160] A. Miciałkiewicz, A. Chelstowska, The essential function of Swc4p-a protein shared by two chromatin-modifying complexes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*-resides within its N-terminal part, (2008).
- [161] S. Ohnuki, Y. Ohya, High-dimensional single-cell phenotyping reveals extensive haploinsufficiency, *PLOS Biology*. 16 (2018) e2005130. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2005130>.
- [162] S.H. Chen, C.P. Albuquerque, J. Liang, R.T. Suhandynata, H. Zhou, A proteome-wide analysis of kinase-substrate network in the DNA damage response, *Journal of Biological Chemistry*. 285 (2010) 12803–12812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106989>.
- [163] Y. Watanabe, Shugoshin: guardian spirit at the centromere, *Curr Opin Cell Biol*. 17 (2005) 590–595. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2005.10.003>.
- [164] Q. Zhang, H. Liu, Functioning mechanisms of Shugoshin-1 in centromeric cohesion during mitosis, *Essays Biochem*. 64 (2020) 289–297. <https://doi.org/10.1042/EBC20190077>.
- [165] X. Wang, W. Dai, Shugoshin, a guardian for sister chromatid segregation, *Exp Cell Res*. 310 (2005) 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2005.07.018>.
- [166] S.A. Kawashima, Y. Yamagishi, T. Honda, K.I. Lshiguro, Y. Watanabe, Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin, *Science*. 327 (2010) 172–177. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1180189>.
- [167] H. Liu, Q. Qu, R. Warrington, A. Rice, N. Cheng, H. Yu, Mitotic Transcription Installs Sgo1 at Centromeres to Coordinate Chromosome Segregation, *Mol Cell*. 59 (2015) 426–436. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.06.018>.
- [168] A. Sane, S. Sridhar, K. Sanyal, S.K. Ghosh, Shugoshin ensures maintenance of the spindle assembly checkpoint response and efficient spindle disassembly, *Mol Microbiol*. 116 (2021) 1079–1098. <https://doi.org/10.1111/MMI.14796>.
- [169] R. Kumar, M. Agarwal, Shugoshin: From the Perspective of Clinical Disorders, *BioChem 2021*, Vol. 1, Pages 51-59. 1 (2021) 51–59. <https://doi.org/10.3390/BIOCHEM1020006>.
- [170] C. v. Rao, M. Farooqui, Y. Zhang, A.S. Asch, H.Y. Yamada, Spontaneous development of Alzheimer’s disease-associated brain pathology in a Shugoshin-1 mouse cohesinopathy model, *Aging Cell*. 17 (2018). <https://doi.org/10.1111/ACEL.12797>.

- [171] Z. Xu, B. Cetin, M. Anger, U.S. Cho, W. Helmhart, K. Nasmyth, W. Xu, Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction, *Mol Cell*. 35 (2009) 426. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.06.031>.
- [172] N.E. Bernardes, C.A. Fukuda, T.D. da Silva, H.C. de Oliveira, A.C. de Barros, T.R. Dreyer, M.C. Bertolini, M.R.M. Fontes, Comparative study of the interactions between fungal transcription factor nuclear localization sequences with mammalian and fungal importin-alpha, *Sci Rep*. 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-58316-9>.
- [173] H.D. Chipps, G.L. Duff, Glycogen Infiltration of the Liver Cell Nuclei, *The American Journal of Pathology*. 18 (1942) 645. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2033050/> (accessed August 2, 2022).
- [174] R.C. Sun, V. v. Dukhande, Z. Zhou, L.E.A. Young, S. Emanuelle, C.F. Brainson, M.S. Gentry, Nuclear Glycogenolysis Modulates Histone Acetylation in Human Non-Small Cell Lung Cancers, *Cell Metabolism*. 30 (2019) 903-916.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2019.08.014>.
- [175] F. Caramia, G.F. Ghergo, G. Menghini, A glycogen body in liver nuclei, *Journal of Ultrastructure Research*. 19 (1967) 573–585. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80083-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80083-2).
- [176] J.C. Ferrer, S. Baqué, J.J. Guinovart, Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose, *FEBS Lett*. 415 (1997) 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01136-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01136-8).
- [177] J.M. Fernández-Novell, D. Bellido, S. Vilaró, J.J. Guinovart, Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes, *Biochem J*. 321 ( Pt 1) (1997) 227–231. <https://doi.org/10.1042/BJ3210227>.
- [178] W.A. Wilson, M.P. Boyer, K.D. Davis, M. Burke, P.J. Roach, The subcellular localization of yeast glycogen synthase is dependent upon glycogen content, *Canadian Journal of Microbiology*. 56 (2010) 408–420. <https://doi.org/10.1139/W10-027/ASSET/IMAGES/LARGE/W10-027F10.JPEG>.
- [179] T. Mello, M. Materozzi, F. Zanieri, I. Simeone, E. Ceni, O. Bereshchenko, S. Polvani, M. Tarocchi, G. Marroncini, C. Nerlov, D. Guasti, D. Bani, M. Pinzani, A. Galli, Liver haploinsufficiency of RuvBL1 causes hepatic insulin resistance and enhances hepatocellular carcinoma progression, *International Journal of Cancer*. 146 (2020) 3410–3422. <https://doi.org/10.1002/ijc.32787>.
- [180] R. Zhao, M. Davey, Y.C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili, W.A. Houry, Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone, *Cell*. 120 (2005) 715–727. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.12.024>.
- [181] Y. Kakiyama, W.A. Houry, The R2TP complex: Discovery and functions, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1823 (2012) 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.016>.
- [182] T. v. Seraphim, N. Nano, Y.W.S. Cheung, S. Aluksanasuwan, C. Colleti, Y.Q. Mao, V. Bhandari, G. Young, L. Höll, S. Phanse, Y. Gordiyenko, D.R. Southworth, C. v. Robinson, V. Thongboonkerd, L.M. Gava, J.C. Borges, M. Babu, L.R.S. Barbosa, C.H.I. Ramos, P. Kukura, W.A. Houry, Assembly principles of the human R2TP chaperone complex reveal the presence of R2T and R2P complexes, *Structure*. 30 (2022) 156-171.e12. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2021.08.002>.
- [183] H.S. Roychowdhury, D. Wong, M. Kapoor, hsp80 of *Neurospora crassa*: cDNA cloning, gene mapping, and studies of mRNA accumulation under stress, *Biochem Cell Biol*. 70 (1992) 1356–1367. <https://doi.org/10.1139/O92-184>.

### **CAPÍTULO 3. Estudo do envolvimento da ciclina multifuncional PCL-1 na resposta a estresse em *Neurospora crassa*.**

Neste capítulo, serão apresentados os resultados de caracterização da ciclina multifuncional PCL-1 em *Neurospora crassa*. Parte dos resultados compilados neste capítulo foram realizados por outros alunos do laboratório e colaboradores, como seu envolvimento no metabolismo de glicogênio, divisão celular e resultados relacionados a modelagem e dinâmica molecular. Porém, durante as atividades de pesquisa que compõe esta Tese, o aluno caracterizou funcionalmente a linhagem mutante, bem como uma linhagem complementada, em funções relacionadas a germinação, localização subcelular e envolvimento em estresse, principalmente relacionados à resposta a cálcio. Com este conjunto de resultados, redigimos um extenso manuscrito, que busca apresentar para a comunidade científica as múltiplas funções da ciclina PCL-1, produto da ORF NCU08772.

*Manuscrito submetido à Microbiology Spectrum.*

Segundo INSTRUÇÃO NORMATIVA No 01, de 29 de abril de 2022, que dispõe sobre as normas para apresentação de dissertações e teses do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, despacho nº 083/2022 – CoPGB/IQ-CAr, aprovada pelo Conselho do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Reunião de 13/04/2022, esta tese será apresentada na forma de capítulos contendo os manuscritos gerados a partir dos resultados obtidos durante as atividades de doutorado.

**The *Neurospora crassa* PCL-1 protein is a cyclin with multifunctional activities and together with PHO85-1 (PGOV) protein kinase directs the complex to glycogen metabolism**

Jonatas Erick Maimoni Campanella<sup>1†</sup>, Thiago de Souza Candido<sup>1†</sup>, Luiz Carlos Bertucci Barbosa<sup>1‡</sup>, Antoniel Augusto Severo Gomes<sup>2</sup>, Carla Andréa Leite<sup>1</sup>, Erika Silva Higashi<sup>1</sup>, Paula Aboud Barbugli<sup>3</sup>, Marcos Roberto de Matos Fontes<sup>2</sup>, Maria Célia Bertolini<sup>1\*</sup>

<sup>†</sup>both authors contributed equally to this work

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 14.800-060, Araraquara, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica e Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 18.618-689, Botucatu, SP, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 14801-903, Araraquara, SP, Brazil

<sup>‡</sup>Present address: Instituto de Recursos Naturais, Universidade Federal de Itajubá, 37.500-903, Itajubá, Minas Gerais, Brazil

Running title: PCL-1 protein is a multifunctional cyclin

\*Corresponding author: Maria Célia Bertolini

Phone: +55-16-3301-9675

E-mail: mc.bertolini@unesp.br

## ABSTRACT

Cyclins are a family of proteins characterized by possessing a cyclin box domain that mediates binding to cyclin dependent kinases (CDKs) partners. In this study, the search for a partner cyclin of the PHO85-1 CDK retrieved PCL-1 an ortholog of yeast Pcls (for Pho85 cyclins) that performs functions common to Pcls belonging to different cyclin families. We show here, that PCL-1, as a typical cyclin, is involved in cell cycle control and cell progression. In addition, PCL-1 regulates glycogen metabolism;  $\Delta pcl-1$  cells accumulate higher glycogen levels than wild-type cells and the glycogen synthase (GSN) enzyme is less phosphorylated and, therefore, more active in the mutant cells. Together with PHO85-1, PCL-1 phosphorylates *in vitro* GSN at the Ser636 amino acid residue. Modeling studies identified PHO85-1 and PCL-1 as a CDK/cyclin complex, with a conserved intermolecular region stabilized by hydrophobic and polar interactions. PCL-1 is also involved in calcium and NaCl stress response.  $\Delta pcl-1$  cells are sensitive to high NaCl concentration; on the contrary, they grow better and overexpress calcium responsive genes under high calcium chloride concentration compared to the wild-type strain. The expression of the calcium-responsive CRZ-1 transcription factor is modulated by PCL-1, and this transcription factor seems to be less phosphorylated in  $\Delta pcl-1$  cells since exhibits nuclear location in these cells in the absence of calcium. Our results show that PCL-1 locates at different cell regions suggesting that it may determine its activity by controlling its intracellular location and reveal an interesting functional divergence between yeast and filamentous fungus cyclins.

## **IMPORTANCE**

Proteins belonging to the cyclin family share a common structural motif, the cyclin box domain (CBD), which mediates binding to their cyclin-dependent kinase (CDK) partner controlling their activity. In addition to their role in cell cycle regulation, CDK/cyclin complexes have been implicated in a wide functional diversity. *Neurospora crassa* synthesizes a few cyclins compared to *Saccharomyces cerevisiae*, and little is known concerning the functional roles of cyclins in this filamentous fungus. This study reveals the functionality of a protein identified as a cyclin, and named as PCL-1, based on the existence of a CBD predicted by AlphaFold. The results provide new insights into the functional role of cyclins in *Neurospora* and reveal an interesting divergence between yeast and filamentous fungus concerning the functionality of this protein family.

**KEYWORDS** CDK/cyclin complex, protein phosphorylation, stress response, CRZ-1 transcription factor, *Neurospora crassa*

## INTRODUCTION

Cyclins are a family of structurally related and highly conserved proteins that regulate cell cycle, transcription, and other cellular processes. Numerous cyclins have been described in the genomes of higher eukaryotes associated with various stages of the cell cycle. They can associate with proteins called cyclin dependent kinases (CDKs), a family of serine/threonine kinases, regulating their activity and determining the substrate specificity of the kinase complex. The association with CDKs and the additional regulation of CDKs by phosphorylation result in a highly intricate regulatory complex that drives the cellular events (1-3). In addition to their important role in controlling of cell cycle progression, CDKs also modulate transcription in response to signals being considered attractive targets for drug development (4).

The Pho85p is a CDK from *Saccharomyces cerevisiae* that is activated by different cyclins, resulting in gene expression regulation, which affects many cellular processes depending on the cyclin partner (5, 6). Unlike CDKs involved in the cell cycle that require phosphorylation of a specific serine or threonine residue for maximal activation, phosphorylation of Pho85 is not required for activity (7). In yeast, ten Pho85 cyclins, referred to as Pcls (for Pho85 cyclins), have been identified, which have been grouped in two subfamilies, the Pho80 subfamily consisting of Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8, and Pcl10, and the Pcl1,2 subfamily comprising the Pcl1, Pcl2, Pcl5, Pcl9, and Clg1 (6). The association to a particular cyclin directs Pho85 to various cellular processes, such as metabolic pathways (phosphate, carbohydrate, and lipid metabolism) and cell cycle functions (8-11). One of the best characterized substrates for the Pcl-Pho85 complex is the yeast glycogen synthase (Gsy2p), the predominant and nutritionally regulated enzyme that catalyzes the rate limiting step in the synthesis of the storage carbohydrate glycogen. The glycogen synthase enzyme family is known to be negatively regulated by phosphorylation in multiple sites, both at the N- and C- termini, which are substrates for different kinase proteins that inactivate the enzyme preventing high glycogen accumulation (12). The Gsy2 enzyme possesses three C-terminus phosphorylation sites, and the Pho85 protein has been described as a kinase that negatively regulates glycogen accumulation by Gsy2 phosphorylation. The Pcl8 and Pcl10 cyclins were the first to be implicated in the enzyme phosphorylation, and the Pcl10-Pho85 complex was demonstrated to

directly phosphorylate the enzyme (13-15). Additionally, the Pcl6 and Pcl7 cyclins have also been reported to be involved in the control of glycogen accumulation by the Pho85 protein kinase (16).

An important issue is understanding the structural basis of how Pcls target Pho85 to different substrates and the regulatory mechanisms involved in identifying the activating signals for each Pcl-Pho85 complex. The crystal structures of the Pho85-Pho80 (17) and Pho85-Pcl10 (18) complexes were reported, and revealed important information for understanding substrate recognition and how the complex makes unnecessary the phosphorylation of the Pho85 activation loop, which is required for full activation of CDK-cyclin complex acting in cell cycle (7).

The fungus *Neurospora crassa* has been widely used as a model organism for fundamental aspects of eukaryotic biology, and we have been studying the main regulatory molecular mechanisms that work together to maintain proper glycogen levels in this fungus. Using a collection of *N. crassa* protein kinase mutant strains, we searched for protein kinases that regulate glycogen metabolism, and the ORF NCU07580 was identified as a putative kinase involved in glycogen metabolism control. The heterokaryon knockout strain exhibits higher glycogen levels and less phosphorylated glycogen synthase enzyme; therefore, an enzyme more active than the one from wild-type strain (19). This protein is annotated in the fungus database as a cyclin-dependent protein kinase, and was formerly named as PGOV (20). Based on its high identity to the *S. cerevisiae* Pho85 protein, we renamed here as PHO85-1, according to *N. crassa* nomenclature (21). As previously mentioned, Pho85 CDK requires different cyclins for activation, and, in yeast, the Pcl6, 7, 8, and 10 cyclins are described as partners proteins that target the kinase to glycogen substrate. To identify the *N. crassa* partner cyclin that directs PHO85-1 to glycogen substrate, the four yeast cyclins were used as queries and only the ORF NCU08772 was retrieved. The encoded protein is annotated as nuclear division-60, and is named here as PCL-1, as it is the first, and probably only, PHO85-1 CDK cyclin characterized in *N. crassa*.

We demonstrated here that the *N. crassa* PCL-1 is a real cyclin based on its structural features and that directs PHO85-1 kinase to glycogen metabolism. The  $\Delta pcl-1$  strain accumulates higher glycogen levels than the wild-type strain and the glycogen synthase (GSN) enzyme is less phosphorylated and, therefore, more active

in the mutant strain. PCL-1, together with PHO85-1, phosphorylates *in vitro* GSN, and the Ser636 residue was identified as the PHO85-1/PCL-1 complex phosphorylation site. In addition, we demonstrate that the cyclin is involved in cellular functions not only related to carbohydrate metabolism regulation. The  $\Delta pcl-1$  cells exhibit defects in germination, the protein influences the progressing of cell division, and is involved in calcium metabolism regulation. A complemented strain was constructed, and the wild-type phenotypes were restored indicating that the defects observed are due to the protein lacking. The *N. crassa* PCL-1 multifunctional cyclin characterized in this work reveals functions common to cyclins belonging to different classes in *S. cerevisiae*, an organism that synthesizes various cyclins targeting the Pho85 kinase to different cellular functions.

## RESULTS

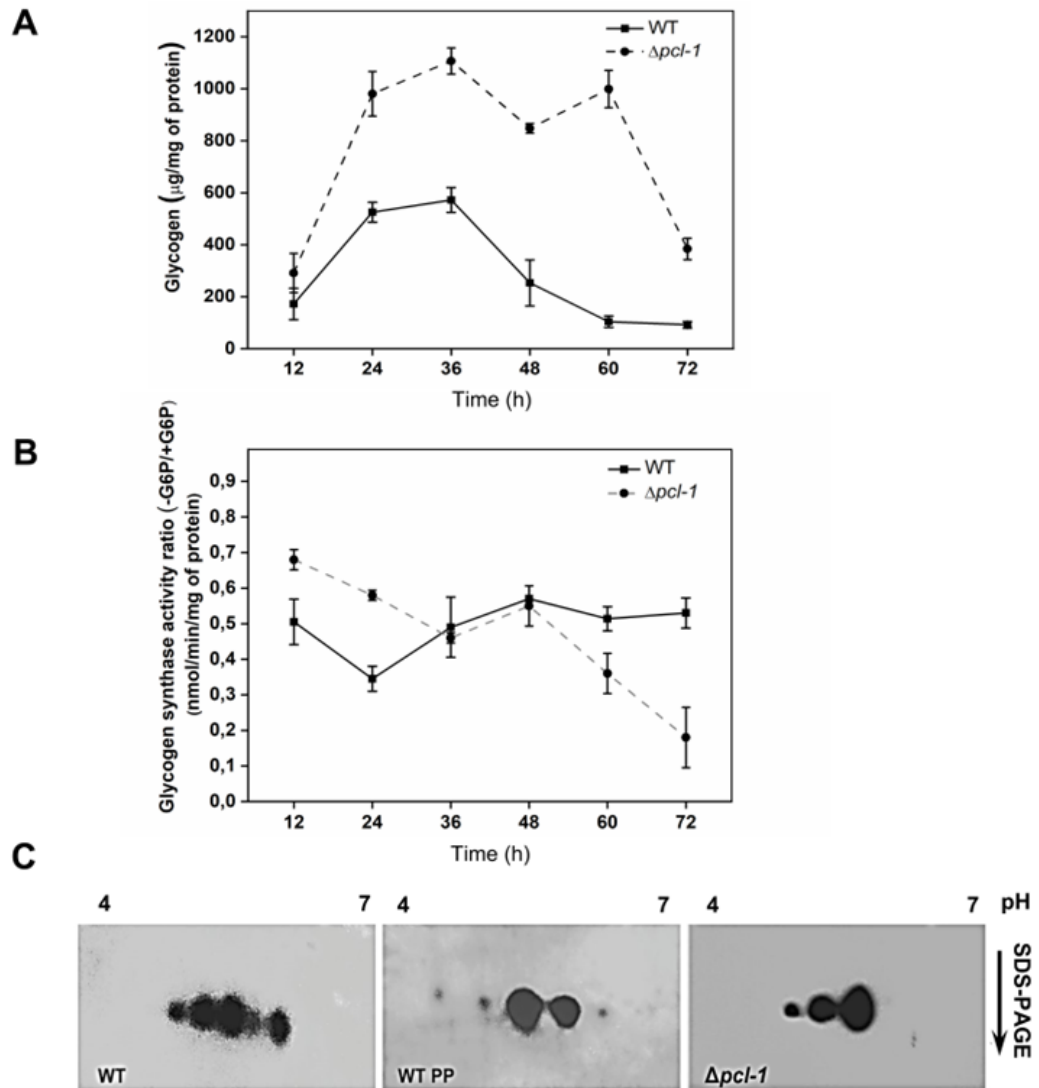
**Molecular cloning of the *Neurospora crassa* *pcl-1* and molecular modeling of the PCL-1.** In a previous study, we identified the ortholog of the *S. cerevisiae* Pho85p cyclin-dependent protein kinase, the ORF NCU07580 product, as a regulatory protein of the glycogen metabolism (19). In *S. cerevisiae*, the Pho85p protein kinase together with Pcl6p, Pcl7p, Pcl8p, and Pcl10p (for Pho85p cyclins) cyclins has been described as a protein that controls glycogen metabolism by controlling glycogen synthase (Gsy2p) phosphorylation (15, 22). To identify the partner cyclin of PHO85-1 involved in the glycogen metabolism control in *N. crassa*, a BLASTp search in the *N. crassa* genome database (<http://fungidb.org/fungidb>) using as queries the *S. cerevisiae* cyclins, retrieved a homolog protein encoded by the ORF NCU08772, which shares an average of 24% identity to the yeast cyclins mainly in the cyclin domain (Fig. 1A). The predicted protein is annotated in the fungus database as nuclear division-60 in the fungus database, and is named here as PCL-1 consistent with the *N. crassa* nomenclature (21) and considering that it is the first PCL described in *N. crassa*. PCL-1 is a nonessential protein, and the  $\Delta pcl-1$  mutant strain exhibits wild-type phenotypes suggesting that it is not involved in processes related to growth and development (results not shown).

PCL-1 is composed of 369 amino acid residues and contains a characteristic cyclin domain encompassing the amino acid region from 156 to 340 (Fig. 1A) (23). Sequence alignment of PCL-1 with the orthologous Pcls from yeast (Fig. 1B) showed that they share a C-terminus conserved region only in the amino acid sequence corresponding to the cyclin box domain (CBD, 24% identity and e-value  $3.10^{-14}$  compared with Pcl10). This region shows high divergence regarding the conserved amino acid residues, there are large insertions and only a few residues are identical in all proteins.

The PCL-1 sequence was submitted to AlphaFold to predict its folding. As shown in Fig. 1C, PLC-1 model presents a globular region formed by the arrangement of different  $\alpha$ -helices predicted with high confidence. Such a region corresponds to a classical cyclin domain (24), which is composed of two N-terminal helices ( $\alpha$ NT1 and  $\alpha$ NT2) followed by five helices ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 5) and one C-terminal helix ( $\alpha$ CT1). Furthermore, PCL-1 was superposed to Pcl10 (18) to corroborate the



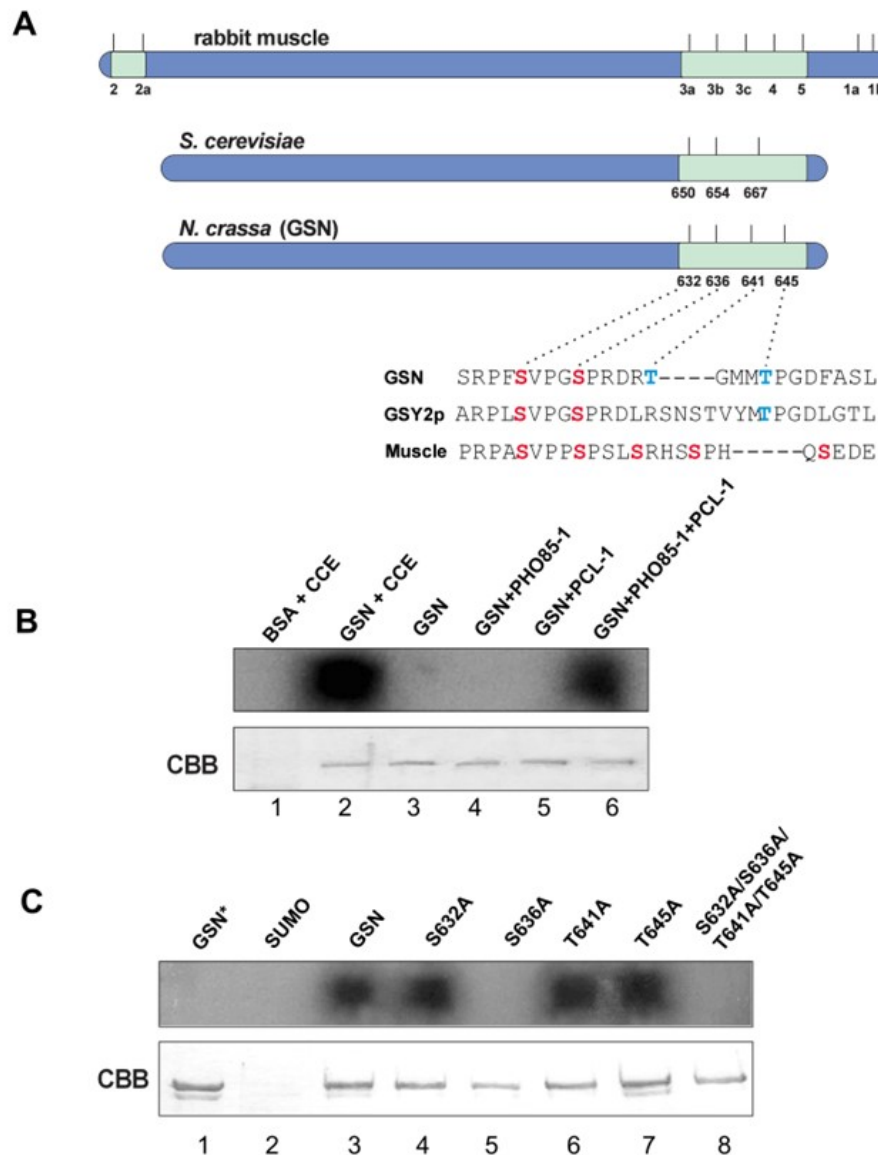
**PCL-1 controls glycogen levels by affecting the glycogen synthase phosphorylation status.** We investigated if PCL-1 is involved in the *N. crassa* glycogen metabolism control similar to the *S. cerevisiae* Pcl6p, Pcl7p, Pcl8p, and Pcl10p counterparts. Glycogen quantification in the  $\Delta pcl-1$  strain at different times of vegetative growth revealed that the mutant strain accumulates higher levels of glycogen, approximately twice more as much as the wild-type strain (Fig. 2A). We further quantified the glycogen synthase (GSN) phosphorylation status as an attempt to correlate the enzyme phosphorylation with the glycogen stored by the mutant strain. Phosphorylation inhibits glycogen synthase activity (25). Enzymatic activity was quantified in the same mycelial pads used for glycogen quantification in the presence and in the absence of glucose-6-phosphate (G6P), the glycogen synthase allosteric modulator. The  $-/+$  G6P activity ratio is considered as an index of phosphorylation, with higher levels being correlated with lower phosphorylation and thus, higher activity. The activity ratio in the  $\Delta pcl-1$  strain was higher than that in the wild-type strain at the initial growth times, suggesting that GSN is less phosphorylated in the mutant strain (Fig. 2B). This result may explain the higher glycogen levels observed in the mutant strain under the same growth condition. As the  $-/+$  G6P activity ratio correlates with different isoforms of phosphorylated GSN, we decided to investigate the phosphorylated forms of GSN. For that, 24 h mycelial pads from the wild-type and mutant strain were analyzed by 2D-gels followed by Western blot using anti GSN antibody (Fig. 2C). Five GSN differentially phosphorylated isoforms were observed in the wild-type strain, which were reduced to two isoforms after treatment with protein phosphatase. Only three GSN phosphorylated isoforms were visualized in the  $\Delta pcl-1$  strain, suggesting that GSN is less phosphorylated in this strain and that PCL-1 influences the phosphorylation status of GSN.



**FIG 2** The  $\Delta pcl-1$  strain shows increased glycogen levels and GSN activity during growth and GSN is less phosphorylated in  $\Delta pcl-1$  strain. Conidia from wild-type and mutant strains were inoculated into liquid VM, and samples were harvested every 12 h. (A) Glycogen accumulation was assayed by digestion with amyloglucosidase and  $\alpha$ -amylase after ethanol precipitation. Free glucose was quantified using the glucose PAP kit (Labtest). (B) Quantification of GSN activity was performed in the same extracts used for glycogen quantification. Activity was quantified in the presence and absence of G6P (glucose-6-phosphate). The  $-/+$  G6P activity ratio is considered an index of GSN phosphorylation status, with a higher ratio indicating less phosphorylation and thus a more active enzyme. Error bars represent the standard deviations derived from three independent experiments. (C) GSN phosphorylation was analyzed in the wild-type and  $\Delta pcl-1$  strains using 2D-PAGE gels followed by Western blot with anti-GSN antibody raised in rabbits. GSN is an 80 kDa protein with a theoretical isoelectric pH of 6.0. To detect specific phosphate signals, samples were treated with 100 U of  $\lambda$ -Protein Phosphatase ( $\lambda$ -PP).

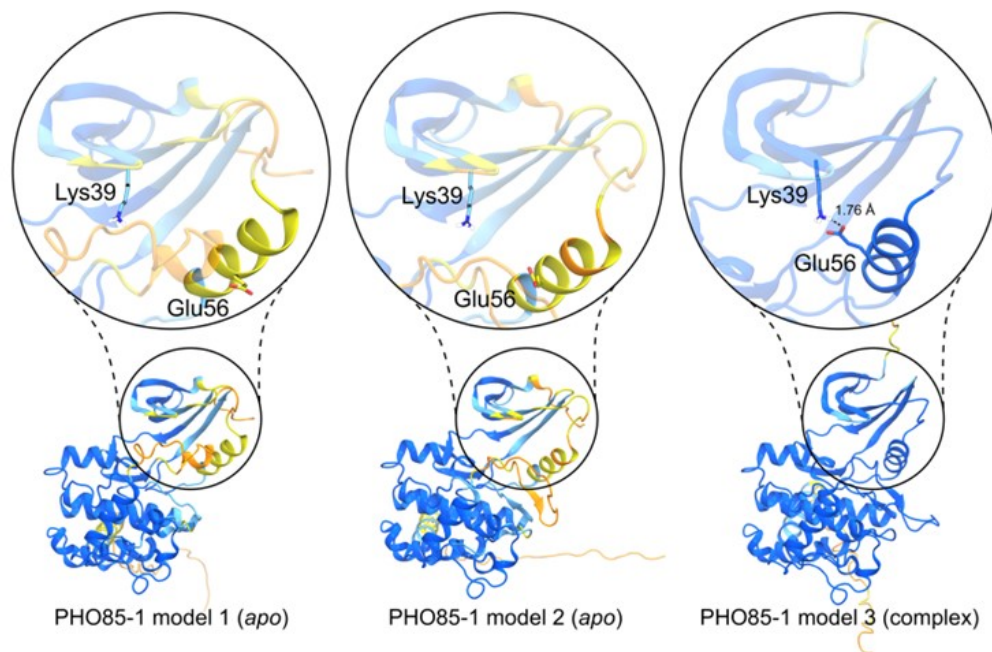


Based on an amino acid sequence alignment with the rabbit muscle (Gys1) and the *S. cerevisiae* (Gsy2p) glycogen synthases, we identified four C-terminus putative phosphorylation sites in GSN, the Ser632, Ser636, Thr641, and Thr645 amino acid residues (Fig. 3A). Like the yeast enzyme, the *N. crassa* enzyme lacks the N-terminus phosphorylation sites. We next investigate whether PCL-1 could be a partner cyclin of the PHO85-1 protein kinase in the *in vitro* GSN phosphorylation, and to identify the amino acid residue target of phosphorylation by the PHO85-1/ PCL-1 complex. Site-directed mutagenesis was used to introduce point mutations in the His-SUMO-GSN by replacing the putative serine and threonine phosphorylation residues with alanine, generating the single S632A, S636A, T641A, and T645A and the quadruple S632A/S636A/T641A/T645A mutant proteins. We first analyzed the wild-type His-SUMO-GSN phosphorylation using as source of protein kinases the crude cellular extract from a knockout strain that does not synthesize GSN (FGSC#18932, *gsn::hyg*). BSA was used as a negative control in the assay. We observed that GSN was phosphorylated *in vitro* by the kinases present in the cellular extract (Fig. 3B, lane 2). In addition, GSN was phosphorylated only when the PHO85-1 protein kinase and the PCL-1 cyclin were combined in the reaction mixture (Fig. 3B, lane 6). This result confirms that PHO85-1 is the *N. crassa* ortholog of the yeast Pho85p protein, and that PCL-1 acts as a partner cyclin of the PHO85-1 protein kinase in the GSN phosphorylation. No phosphorylation was observed in the absence of either the cyclin (Fig. 3B, lane 4) or the protein kinase (Fig. 3B, lane 5). We further assayed the phosphorylation of the GSN mutants by the PHO85-1/PCL-1 complex. The GSN wild-type protein incubated in absence of the complex (Fig. 3C, lane 1) and the recombinant SUMO protein (Fig. 3C, lane 2) were used as negative controls. We observed that only the GSNS636A mutant was not phosphorylated *in vitro*, indicating that the Ser636 amino acid residue is the amino acid residue target of phosphorylation by the kinase/cyclin protein complex (Fig. 3C, lane 5). No phosphorylation was observed when the quadruple mutant GSN (S632A/S636A/T641A/T645A) was used as substrate, indicating that no additional phosphorylation site is present in GSN (Fig. 3C, lane 8).



**FIG 3** The recombinant PHO85-1/PCL-1 complex phosphorylates GSN *in vitro* at Ser636. (A) Characteristics of the glycogen synthase phosphorylation sites. General architecture of the rabbit muscle GS compared to the *S. cerevisiae* Gsy2p and the *N. crassa* GSN. The Ser and Thr amino acid residues are shown in red and blue, respectively. (B and C) Commercial BSA and the recombinant protein His<sub>6</sub>-SUMO, His<sub>6</sub>-PCL-1, His<sub>6</sub>-PHO85-1, and His<sub>6</sub>-SUMO-GSN wild-type and mutant proteins at different phosphorylation sites (S632A, S636A, T641A, T645A, and S632A/S636A/T641A/T645A) were expressed in *E. coli*, purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography and assayed for *in vitro* phosphorylation in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP and MgCl<sub>2</sub>. (B) Phosphorylation reaction using either the His<sub>6</sub>-PHO85-1/His<sub>6</sub>-PCL-1 complex or crude cellular extract (CCE) from the  $\Delta$ *gsn* strain as source of protein kinase. Lanes 1 and 2, phosphorylation of BSA and His<sub>6</sub>-SUMO-GSN, respectively, using CCE. Lanes 3–6, His<sub>6</sub>-SUMO-GSN without protein kinase (lane 3), and in the presence of His<sub>6</sub>-PHO85-1 protein kinase (lane 4), His<sub>6</sub>-PCL-1 cyclin (lane 5), and His<sub>6</sub>-PHO85-1/His<sub>6</sub>-PCL-1 complex (lane 6). (C) Phosphorylation reaction using the His<sub>6</sub>-PHO85-1/His<sub>6</sub>-PCL-1 complex. Lane 1, His<sub>6</sub>-SUMO-GSN without protein kinase. Lane 2-8, His<sub>6</sub>-SUMO (lane 2, negative control), lanes 3-8, His<sub>6</sub>-SUMO-GSN wild-type and mutant proteins in the presence of His<sub>6</sub>-PHO85-1/His<sub>6</sub>-PCL-1 complex.

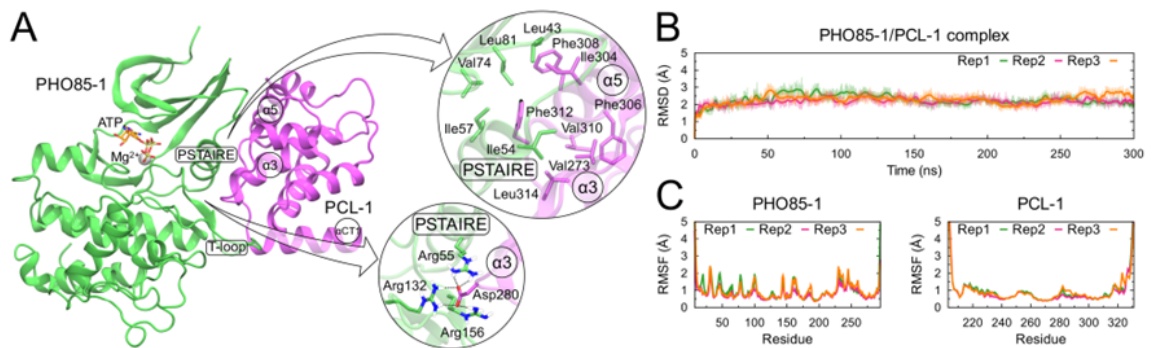
**The PHO85-1 structure is predicted with high confidence only when in complex to PCL-1.** As shown in Fig. 3, the PHO85-1 kinase activity depends on the presence of PCL-1, suggesting that these proteins interact to result in a functional CDK/cyclin complex. Therefore, the structure of PHO85-1 was predicted using AlphaFold as previously applied to PCL-1. Five models of PHO85-1 were generated, which converged to only two conformations (Fig. S2, models 1 and 2). In general, the predicted PHO85-1 structures presented high confidence, with the exception of the PSTAIRE helix and the T-loop. Interestingly, these regions were predicted with high confidence using AlphaFold Multimer (Fig. S2, model 3) only when PCL-1 was present, suggesting that these regions may assume stable conformations only when in complex with their partner, resulting in a salt-bridge between the Lys39 and Glu56 residues of PHO85-1.



**FIG S2** PHO85-1 model prediction by AlphaFold. Two *apo* conformations (model 1 and model 2) diverged according to PSTAIRE and T-loop orientation, which presented low (yellow) or very low (orange) model confidence. On the other hand, when PHO85-1 was predicted in complex to PCL-1 (not shown) such regions presented considerable model confidence, shown in blue or cyan. When bound to PCL-1, PHO85-1 presents a salt-bridge formation between Lys39 and Glu56 residues (zoom-in-view).

Fig. 4A shows the predicted PHO85-1/PCL-1 complex, considering the presence of ATP and Mg<sup>2+</sup> molecules (see Materials and Methods), which was further submitted to MD simulations to verify its structural stability and to determine the main contacts between them. Some important regions at the interface of the complex are shown, such as the PSTAIRE helix and the T-loop of PHO85-1 and the helices  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5, and  $\alpha$ CT1 of PCL-1. When analyzing these regions in detail, a salt-bridge is observed between the residue Asp280, located in the  $\alpha$ 3 helix of PCL-1, and three Arginine residues of PHO85-1, named Arg55 (PSTAIRE helix) and Arg132 and Arg156 (T-loop). Another important region found to stabilize the complex was determined by hydrophobic interactions between the PSTAIRE helix residues, such as Ile54, and the PCL-1 residues placed in the  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 5 helices, such as Phe312 and Val273 (Fig. 4A, zoom-in-view panels).

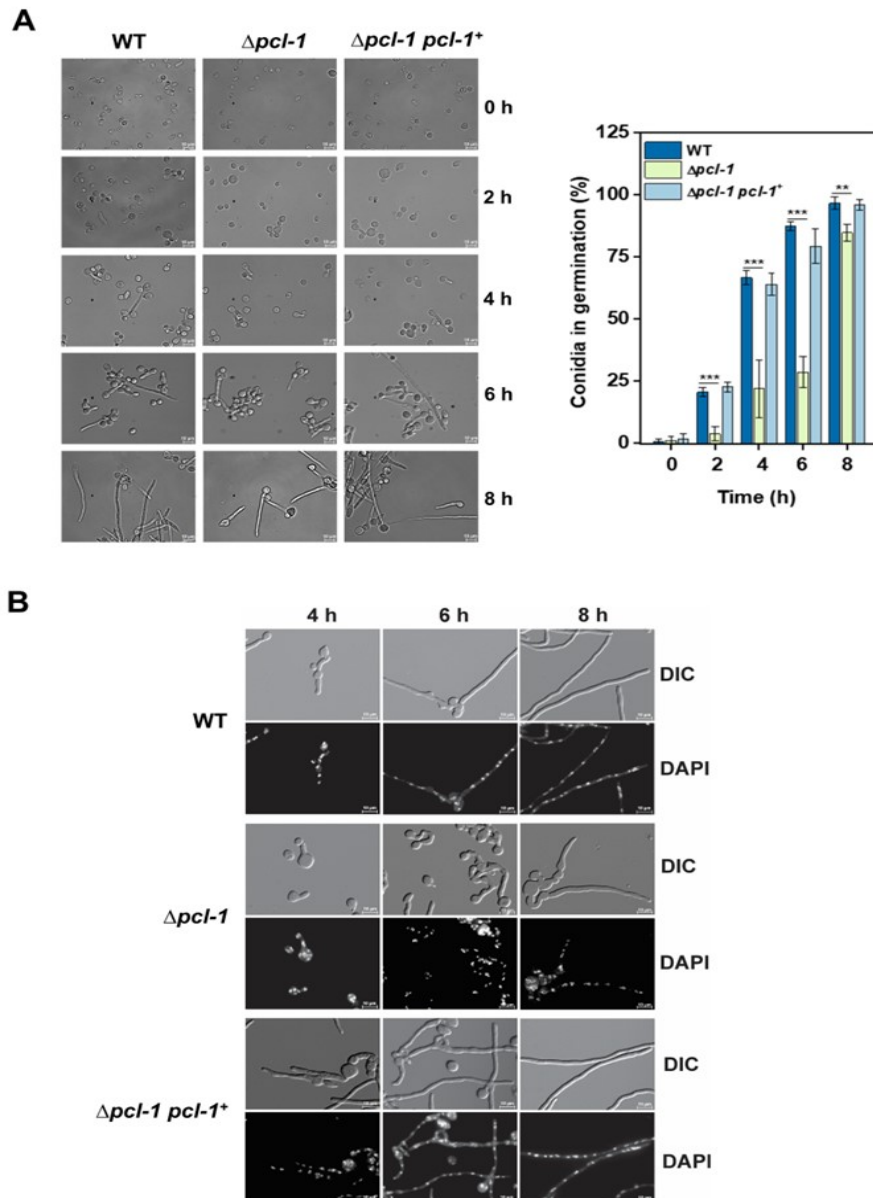
Molecular dynamics (MD) simulations of the PHO85-1/PCL-1 complex predicted by AlphaFold showed considerable stability and reproducibility in all three replicas, presenting a root-mean-square deviation (RMSD) average value of  $2.2 \pm 0.49$  Å (Fig. 4B) and root mean-square fluctuation (RMSF) values for each protein below 3 Å in every replica, except for the first N- and last C-terminal residues. Considering the whole amount of data, it was possible to determine the prevalence of contacts of the PHO85-1/PCL-1 interface. The salt-bridge led by Asp280 residue of PCL-1 is strongly stable, presenting contacts to Arg55, Arg132, and Arg156 during 74.83, 99.70 and 75.02% of the time. Asp280 is surrounded by these three Arginine residues, allowing an environment with high complementarity of charges. Moreover, a hydrophobic-rich region formed by the complex was also considered important for stabilizing the PHO85-1/PCL-1 complex (Fig. 4A, zoom-in-view panels). Being part of this region, it is important to highlight the contacts of Phe312 (PCL-1) to Ile57 (PHO85-1) during 99.77%, and Phe314 (PCL-1) to Ile54 (PHO85-1) during 81.72% of time.



**FIG 4** MD simulation of the PHO85-1/PCL-1 complex predicted by AlphaFold Multimer. (A) Initial conformation of the complex with PHO85-1 and PCL-1 shown as green and purple, respectively, highlighting important regions such as PSTAIRE and T-loop of PHO85-1, and  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , and  $\alpha CT1$  of PCL-1. ATP and  $Mg^{2+}$  are considered presented as orange sticks and silver sphere, respectively. Salt-bridge and hydrophobic interactions between the complex are shown in detail in zoom-in-view panels. (B) RMSD of backbone atoms of the PHO85-1/PCL-1 complex and (C) RMSF of backbone atoms of PHO85-1 and PCL-1 are shown in the left and right panels, respectively. Values are shown for each replica separately.

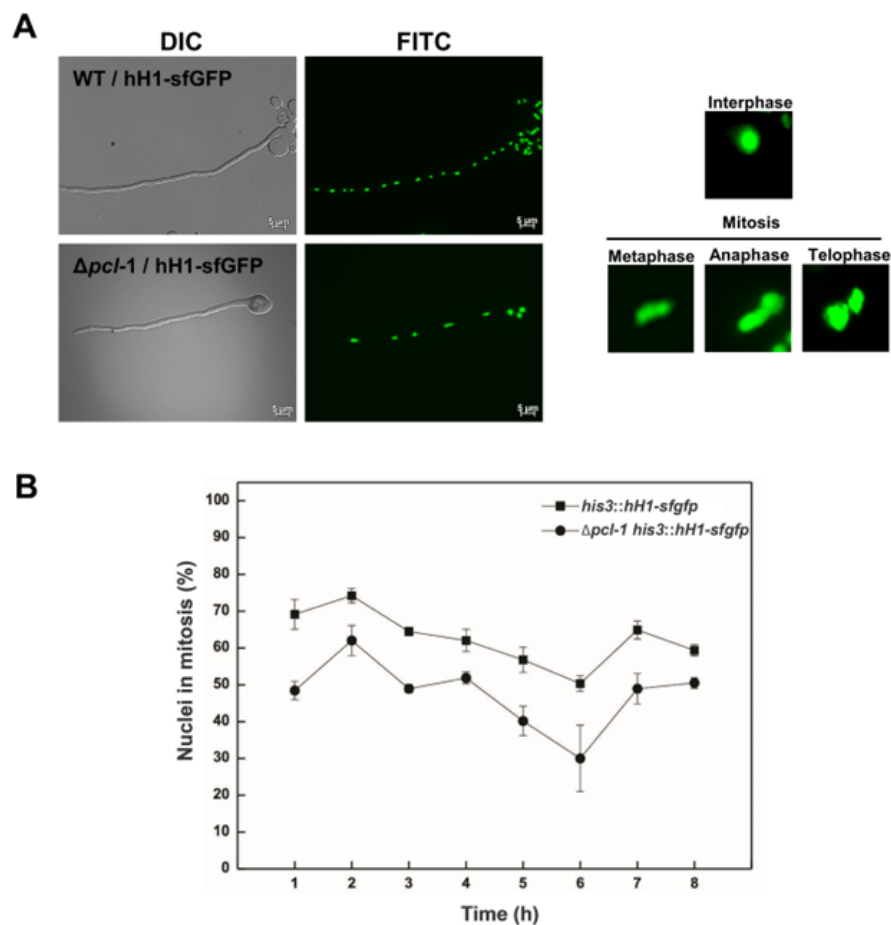
**PCL-1 influences the germination rate and cell cycle progression and localizes in different cellular compartments.** As *N. crassa* synthesizes a limited number of cyclins (27, 28), and that in yeast cyclins from different families direct the Pho85p kinase to different functions, we decided to investigate whether PCL-1 is involved in additional cellular functions. To verify whether PCL-1 influenced growth, we first analyzed conidia germination of the WT and  $\Delta pcl$  strains and the  $\Delta pcl-1 pcl-1^+$  complemented strain in samples collected from liquid cultures under agitation. The amount of conidia in germination was quantified at different times and we observed a delay in the germination rate of the  $\Delta pcl$  strain at the initial times of culture, mainly up to 6 h of growth. However, normal growth rate was achieved at later times of culture (8 h) (Fig. 5A, left and right panels). Conidia germination was also analyzed in conidia inoculated onto coverslips and covered with liquid medium (Fig. 5B). In this assay, the delay in germination is more evident because the mutant strain shows shorter hypha, mainly at the time of 6 h, when compared to the wild-type strain. The germination delay was not observed in the complemented strain indicating that the phenotype was due to the PCL-1 lacking. It is important to mention that no changes

in the hypha morphology was observed, and that the complemented strain expresses the protein under the control of the native promoter.



**FIG 5**  $\Delta pcl-1$  strain shows defective timing in germination. For germination analysis, conidia from wild-type,  $\Delta pcl-1$  mutant and  $\Delta pcl-1 pcl-1^+$  complemented strains were inoculated into VM medium containing 2% sucrose, pH 5.8 at 30°C, and aliquots were taken at the indicated time points for microscopic assay. (A) Conidia germination in submerged cultures at 150 rpm at different time points. Images were captured using an AXIO Imager.A2 Zeiss microscope, at a magnification of 630 X. The results were expressed as percentage of conidia in germination (right panel) and represent the standard deviations from three independent experiments. (B) Conidia germinated on coverslip were fixed with formaldehyde in PBS, the nuclei were stained with DAPI, and the fluorescence was analyzed using the microscope AXIO Imager.A2 (Zeiss) coupled to AxioCam camera at a magnification of 1000 X. *t* test was used for the P values. \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.0001.

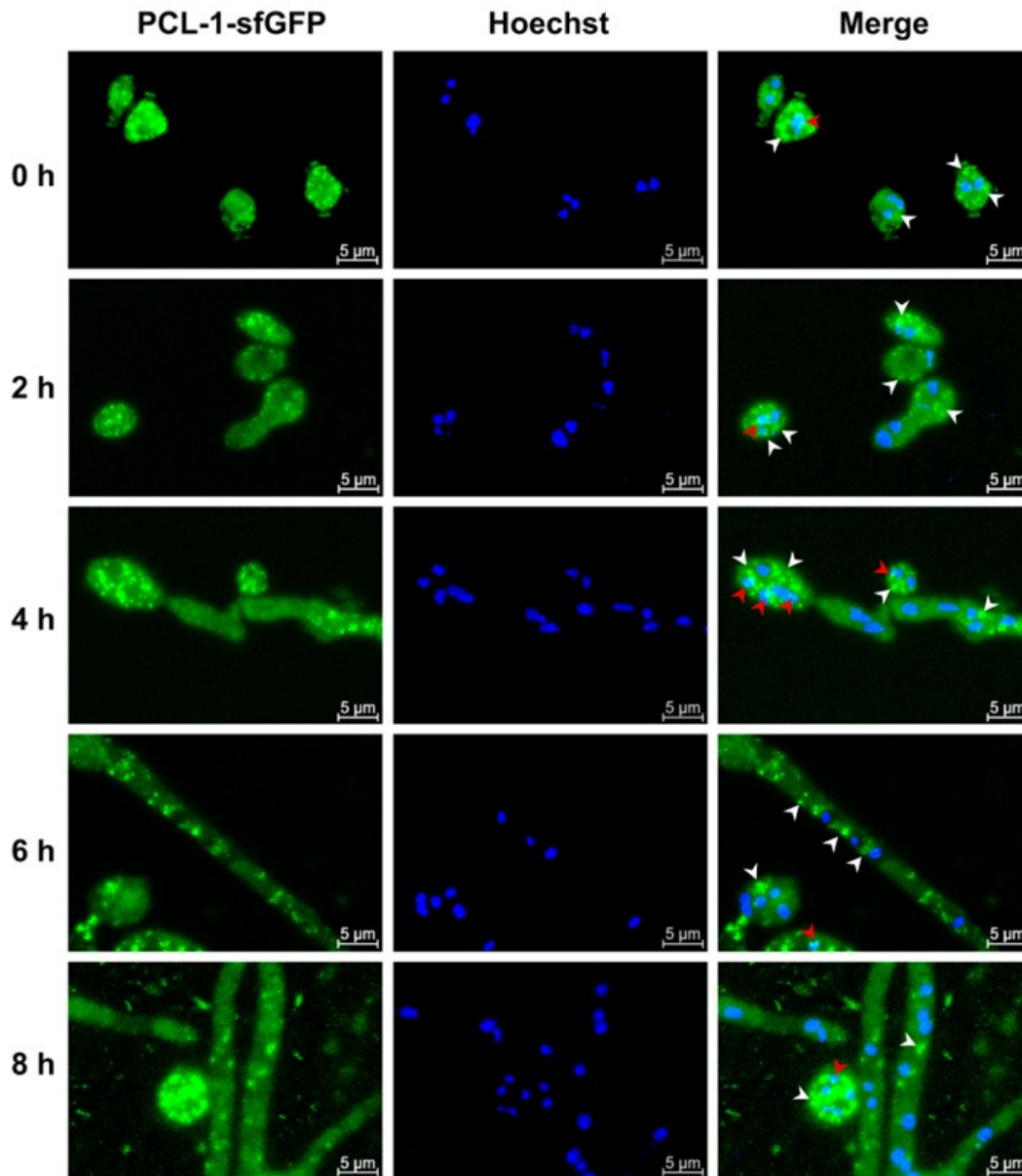
To investigate the PCL-1 involvement in cell cycle progression, we constructed the  $\Delta pcl-1$  *hH1-sfgfp* strain, a  $\Delta pcl-1$  mutant strain that synthesizes the sfGFP-fused H1 histone (Fig. 6A) and allows quantification of the nuclei in different mitotic phases (Fig. 6A, right panel). Fewer nuclei under division were counted in the mutant strain compared to the nonmutant strain (*hH1-sfGFP*) indicating that PCL-1 may also control cell cycle progression (Fig. 6B). We have not observed accumulation of cells in any specific mitotic phase, suggesting that PCL-1 is continuously synthesized during the cell cycle. The germination and cell progression data suggested that PCL-1 may play a role in fundamental cellular processes.



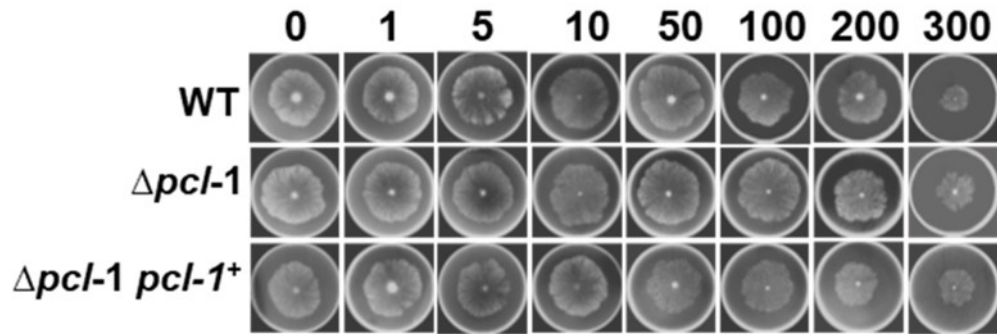
**FIG 6**  $\Delta pcl-1$  strain shows lower number of mitotic nuclei compared to the wild-type strain. For cell division analysis, conidia from  $\Delta pcl-1$  *hH1-sfgfp* and *hH1-sfgfp* strains were germinated in liquid VM medium containing 2% sucrose, pH 5.8 at 30°C, at the indicated time points. (A) General view of a hypha from each strain (left panel) and the nuclei in the different mitosis phases used for quantification (right panel). (B) Aliquots were removed during germination, and the fluorescence was analyzed in the AXIO Imager.A2 Zeiss coupled to AxioCam camera at a magnification of 1000 X. Six images were taken from each time point and the nuclei undergoing mitosis were counted. The result is representative of three independent experiments.

Since PCL-1 is involved in different cellular processes, we next investigated the cellular distribution of PCL-1 at different times of conidia germination using the  $\Delta pcl-1 pcl-1^+$  complemented strain, which express sfGFP-fused PCL-1. The conidia of the strain showed a strong fluorescent signal throughout the cytoplasm (Fig. 7, 0 h). Interestingly, during germination, cells displayed a noticeably subcellular accumulation of the protein in the cytosol of hyphae (Fig. 7, later times, white arrowheads) indicating that PCL-1 may accumulate in certain cell regions during germination as granular clusters. In addition, accumulation in nuclei was also observed (Fig. 7, red arrowheads), suggesting that the protein may also translocate into nucleus, although classical nuclear localization signals (NLS) were not identified in the protein primary sequence.

**PCL-1 plays a role in the regulation of calcium metabolism and influences the expression and localization of the CRZ-1 transcription factor.** In *S. cerevisiae*, the Pho85 protein kinase, together with Pho80 partner cyclin, is a kinase that phosphorylates the zinc finger Crz1 transcription factor, which is involved in the regulation of calcium metabolism and activated by dephosphorylation by the calcineurin phosphatase (29, 6). The fact that *N. crassa* synthesizes low number of cyclins (27), prompted us to investigate if PCL-1 could be a cyclin involved in calcium metabolism regulation. Hyphal growth in Petri dishes of the  $\Delta pcl-1$  strain was strongly increased under high calcium chloride concentration (200-300 mM) suggesting that PCL-1 participates in the calcium stress response (Fig. 8A, Fig. S3). The  $\Delta pcl-1 pcl-1^+$  complemented strain exhibited comparable growth to the wild-type strain (Fig. 8A, Fig. S3), confirming that the growth defect in the mutant strain was indeed due to the *pcl-1* deletion.

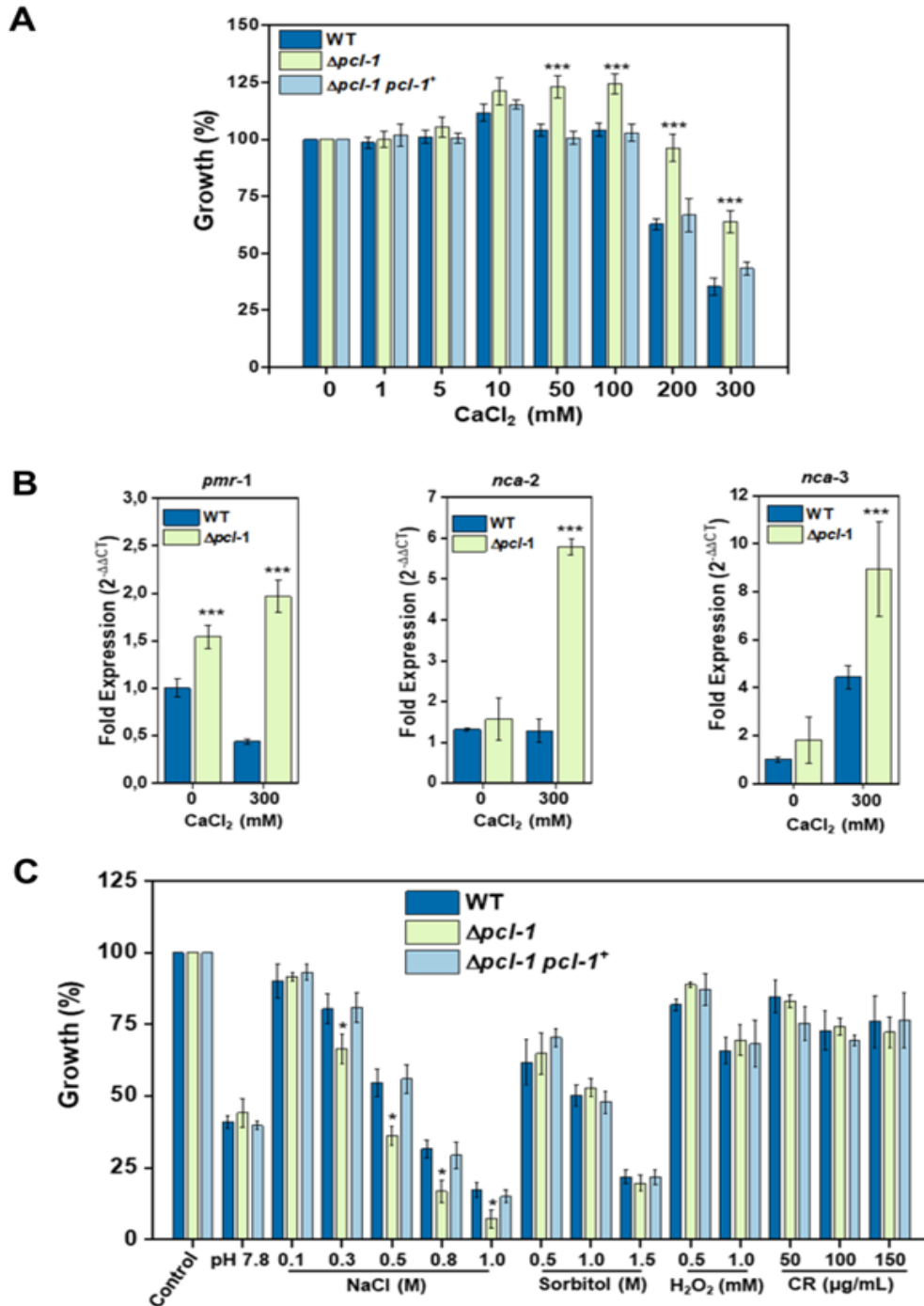


**FIG 7** PCL-1-sfGFP cyclin locates in the cytoplasm and nucleus. Conidia from the  $\Delta pcl-1$   $pcl-1^+$  complemented strain were grown on coverslips in liquid VM medium containing 2% sucrose at 30°C, and the fluorescence was evaluated at the indicated time points. Cells were fixed in PBS with formaldehyde, the nuclei were stained with Hoechst (10 μg per ml), and the fluorescence was evaluated using the CARLS ZEISS LSM 800 Confocal Laser Scanning Microscopy with Airyscan with a Plan Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 objective. The images are representative of at least three independent experiments. Protein showing cytoplasm (white arrow) and nuclei (red arrow) location.



**FIG S3**  $\Delta pcl-1$  cells exhibit tolerance to high calcium chloride concentration in plates. Conidia from the wild-type,  $\Delta pcl-1$ , and  $\Delta pcl-1 pcl-1^+$  strains were inoculated into plates containing solid VM with 2% sucrose and increased amounts of calcium chloride (0 to 300 mM). Cells were grown for 24 h at 30°C. Images of the plates were acquired using the ChemiDoc Image System (BioRad).

The expression of three genes encoding  $Ca^{2+}$ -ATPases, *pmr-1* (NCU03292), *nca-2* (NCU04736), and *nca-3* (NCU05154) (30, 31) was analyzed after growing the wild-type and mutant strain under 300 mM calcium chloride for 24 h. Gene expression of all three genes was increased in the mutant strain compared to the wild-type strain indicating a role for PCL-1 in the expression regulation of these genes and, therefore, in the control of the calcium stress response in *N. crassa* (Fig. 8B). To investigate if PCL-1 influences the cellular response to other stressors, we analyzed growth of the wild-type, mutant, and complemented strains in VM pH 7.8 (alkaline pH stress) and in VM containing NaCl and sorbitol (osmotic stress),  $H_2O_2$  (oxidative stress), and Congo Red (plasma membrane/cell wall stress). The mutant strain showed sensitivity only to osmotic stress induced by NaCl (Fig. 8C).



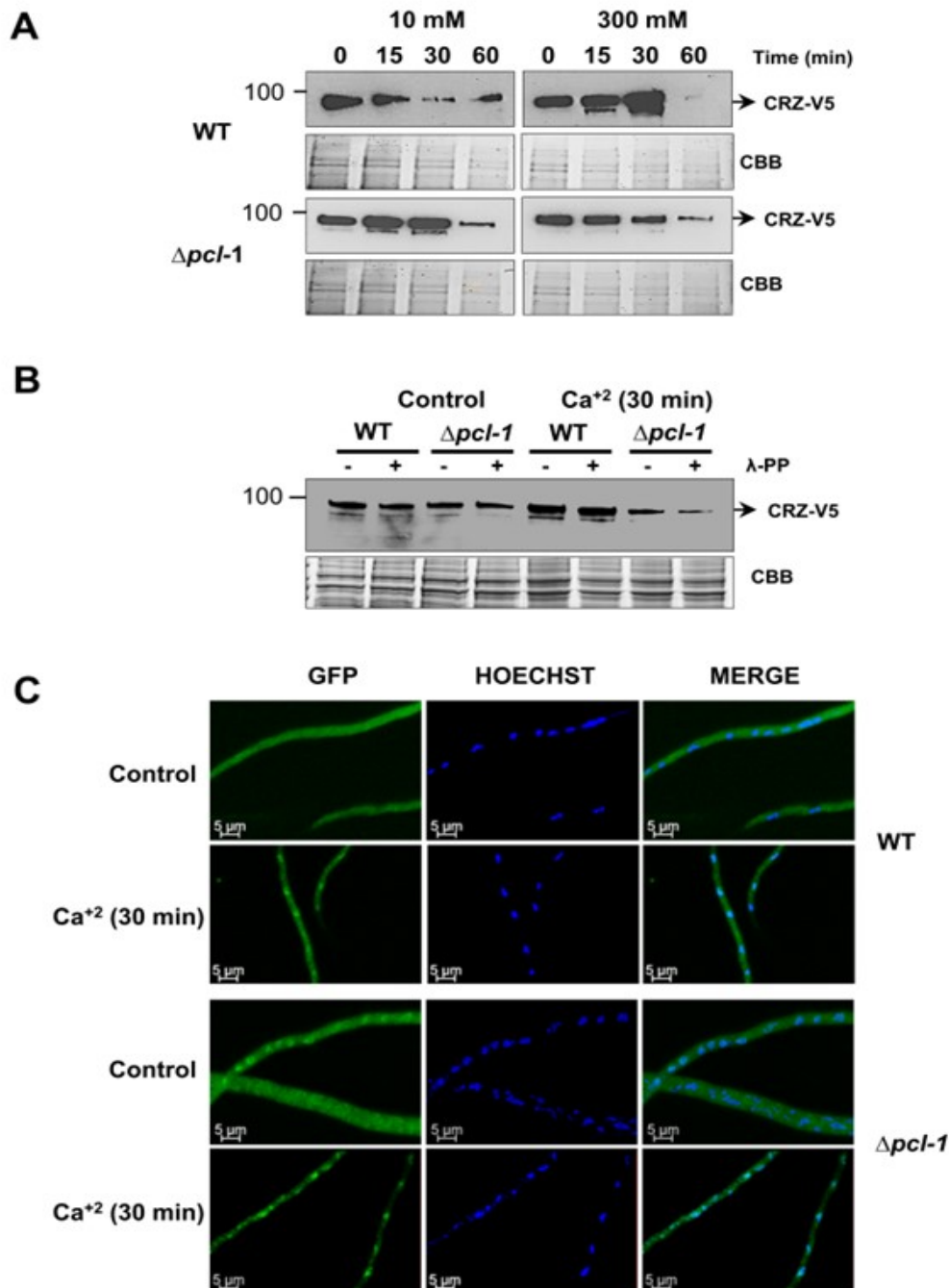
**FIG 8** PCL-1 is involved in calcium stress response. Growth of the wild-type,  $\Delta pcl-1$  and  $\Delta pcl-1 pcl-1^+$  complemented strains under different stressing conditions. (A) Growth in the presence of calcium. Strains were grown in solid VM media containing 2% sucrose, pH 5.8, and increased calcium chloride concentration. Growth was evaluated after 24 h and is expressed as percentage of growth in the absence of calcium. (B) Expression of calcium responsive genes. Strains were grown in the presence and absence of 300 mM calcium for 24 h and total RNA was extracted. Expression of *pmr-1*, *nca-2* and *nca-3* genes was assayed by qPCR using the *tub-2* gene as reference gene.  $C_i$  values were used to estimate the  $\log_2 -\Delta\Delta C_t$  fold difference between control (without calcium) and growth in the presence of 300 mM calcium. (C) Strains growth in the presence of different stressors agents. Strains were grown in solid VM media supplemented with 2% sucrose and increased concentration of the stress agents. Growth was evaluated after 24 h and is expressed as percentage of growth in the absence of stress. Error bars represent the standard deviations from three independent experiments. *t* test was used for the P values. \* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ .

As the mutant strain exhibited increased growth and upregulation of calcium responsive genes under high calcium chloride concentration, we decided to extend the investigation on the calcium-responsive CRZ-1 transcription factor. We first analyzed the protein expression in the wild-type and  $\Delta pcl-1$  strains both endogenously expressing C-terminus V5-tagged CRZ-1 at different times of growth under low (10 mM) and high (300 mM) calcium chloride concentrations. In this experiment, the protein samples were treated with phosphatase due to the high number of putative phosphorylation sites that might exist in the *N. crassa* protein. CRZ-1-V5 migrates as an apparent molecular mass between 90-100 kDa. Interestingly, we observed variation in the CRZ-1 expression both in a strain- and calcium chloride concentration-dependent manner (Fig. 9A). While the protein expression in the wild-type strain was increased over time under high calcium chloride concentration, the expression in the  $\Delta pcl-1$  strain decreased over time. In addition, protein expression in the wild-type strain was increased over time under high calcium chloride concentration compared with low concentration, whereas in the mutant strain high calcium represses protein expression compared with low calcium concentration. In summary, CRZ-1 expression is modulated by calcium concentration and, in an opposite manner, by PCL-1. We previously reported the regulation of *crz-1* expression by calcium chloride; while low concentration negatively regulates gene expression, high concentration induces gene expression (32), supporting the results of protein expression reported here.

It was previously mentioned here that the *S. cerevisiae* Pho85 kinase, together with Pho80 cyclin, is a kinase that phosphorylates and inactivates the Crz1p transcription factor (29). Phosphorylated Crz1p localizes in the cytosol (33). Based on the multiple functionalities of PCL-1, we hypothesized that CRZ-1 would be less phosphorylated in the  $\Delta pcl-1$  strain than in the wild-type strain, and therefore, being able to be translocated to the nucleus. The *A. fumigatus* CrzA orthologous transcription factor has been reported as a highly phosphorylated protein *in vivo*, and a total of twenty phosphorylation sites were identified in the CrzA by mass spectroscopy; some of them predicted as potential target motifs for CDKs by bioinformatic tool (34). Comparison between the *A. fumigatus* CrzA and the *N. crassa* CRZ-1 proteins by sequence alignment (Fig. S4) showed that many putative phosphorylation sites are conserved in the *N. crassa* protein (highlighted in red),

including two potential CDK targets. We decided to analyze the phosphorylation status of CRZ-1-V5 in the wild-type and  $\Delta pcl-1$  strains under high (300 mM) calcium chloride concentration (Fig. 9B). Again, we observed lower CRZ-1 expression in the mutant strain and higher expression in the wild-type strain in the presence of calcium when compared to lacking calcium (control). However, we did not observe any differences in the phosphorylation levels of CRZ-1, even after protein phosphatase treatment. Using PhosTag gel as a different experimental approach to find out whether phosphorylation of CRZ-1 is affected by PCL-1 we are not able to obtain a conclusive result, most likely due to the many putative phosphorylation sites in CRZ-1 (results not shown).

We decided to analyze the CRZ-1-GFP cellular localization in the wild-type and  $\Delta pcl-1$  background strains, both expressing the protein under the control of the native promoter, in the presence of calcium chloride (300 mM) (Fig. 9C). In the wild-type strain, strong fluorescence was visualized throughout the cytoplasm in the absence of calcium, as expected (Fig. 9C, control). However, upon calcium stress, the protein translocates into nucleus, as described for the *A. fumigatus* and *A. nidulans* CrzA orthologs (35, 36). Interestingly, in the  $\Delta pcl-1$  strain, in the absence of calcium we observed protein localization both in the nuclei and cytoplasm, depending on the hyphae analyzed. On the other hand, upon calcium stress, the protein mainly localized in the nuclei (Fig. 9C). These results strongly support our hypothesis, in which CRZ-1 is less phosphorylated in the  $\Delta pcl-1$  background strain compared to the wild-type background strain, being able to translocate into nucleus and to regulate the expression of calcium responsive genes.



**FIG 9** CRZ-1 expression and cellular localization are modulated by PCL-1. (A) CRZ-1-V5 expression was analyzed in cellular extracts from wild-type and  $\Delta pcl-1$  strains expressing V5-tagged CRZ-1 under stress induced by either 10 mM or 300 mM calcium chloride up to 1 hour. 30  $\mu$ g of total protein treated with 400 U  $\lambda$ -phosphatase was assayed in 10% SDS-PAGE. (B). CRZ-1-V5 phosphorylation assay in 4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels using 30  $\mu$ g total protein from crude cell extracts incubated or not with 300 mM calcium chloride for 30 min and dissolved with  $\lambda$ -protein phosphatase and were dissolved in 4-15% mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels. Proteins were electrotransferred to a nitrocellulose membrane and probed with the anti-V5 monoclonal antibody (Invitrogen). CBB, 10% SDS-PAGE gel stained with Coomassie brilliant blue used as loading control. The numbers on the left side represent the MW in kDa. (C) Cellular localization of CRZ-1-GFP is modulated by PCL-1. Wild type and  $\Delta pcl-1$  strains expressing CRZ-1-GFP were grown in coverslips in VM medium containing 2% sucrose for 24 h and subjected to calcium stress for 30 min by replacing the growth medium by VM containing 0.5% sucrose and 300 mM calcium chloride for 30 min. A control sample without calcium was used as a control. Cells were fixed in PBS with formaldehyde, the nuclei were stained with Hoechst (10  $\mu$ g per ml), and the fluorescence was evaluated using the CARLS ZEISS LSM 800 Confocal Laser Scanning Microscopy with a Plan Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 objective. The images are representative of at least three independent experiments.

```

CrzA_A.fumigatus/1-754 1 MASQEMFPELGGSPAPGVKSRGVSRSRPHHQDQQQQQ---HQQHQGFVTGTVGLDLDSSIAASSF 64
CRZ-1_N.crassa/1-710 1 -MDQQYTDARGRSLSAA--STG---GGQVHDDQQQSHIRNHSPSPPTFPNSNDGVNNGLGLGLIDPS 61

CrzA_A.fumigatus/1-754 65 ANSSFDPNNSNVSPSAESYGYTAAGYLSGTPASQTDQNYANS LQIPQSYGTGLVPOFNESRGLPIQQ 131
CRZ-1_N.crassa/1-710 62 ASQHFOREF-----SYGGPN-PFQQHSFSSQ-----PGLDFNQGYNQLENQDNISFGGL----- 109

CrzA_A.fumigatus/1-754 132 QSQQQHQQPSLDDNFSDLLNSNATEYDFNTVYQTHSPSSNTAPEYDSSLLLDPQ-VHQQSHPTQIP 197
CRZ-1_N.crassa/1-710 110 -----SQPAYS---PNLMASNFGDADYG-----IFPTTTAAGQFNGSLFITDNQSIINNPDPNMMA 161

CrzA_A.fumigatus/1-754 198 -SSHSSTSPQISPLEQQHSSPGFMSTDGSTTVAYYTPQHSRHASLDPATAAFLLTSNTHPDWQAVMG 263
CRZ-1_N.crassa/1-710 162 QGSHSPEPPHLLS---PEI--NSPFAFAQG--RFPMATGRHSRNASLGEAALL---PGQDWS--- 213

CrzA_A.fumigatus/1-754 264 NSAAFQGHRRAPSEVSEISSAAPSPYLSQHESFDGVDNNSPPLLAPQNDPSLYDSALGIENFTLSEQ 330
CRZ-1_N.crassa/1-710 214 HMPQFQGHRRSASELSDVSSVAHSNPLGGLDSFDP IENNSPLQGPQAD-ALYSQLNGISNFSLSDD 279

CrzA_A.fumigatus/1-754 331 HQQHGFSPAHSPI SPRLMFQQGQEMM-PNVFYLSGPAPNTQYPTPPNDMYGNGAEGMMNMSQGTG 396
CRZ-1_N.crassa/1-710 280 ---HIGRSPSHSPAVSPRIHPQQSPDEIDPNQPN-----HFMLHTPANSFGPPATY-MQPQDEAF 335

CrzA_A.fumigatus/1-754 397 PS-----VDIGQASQMAPPSTINVEFAPPSRIPIPSFGPSKPAENLDSLSPPPSSSTRSRGRSKSDPYA 456
CRZ-1_N.crassa/1-710 336 PQLSLDDPSGMAQQNMPAPPAINIDFAPAPAKSGLDQPTNLDNNSLALPNRARGMRPRAVITDPFN 402

CrzA_A.fumigatus/1-754 457 HPSTSLRSLSSSTST-----SLDPLAPTTPRSLSPFDSFGRQQSNPSSRRDPSRSNRRLSTSSIDS 518
CRZ-1_N.crassa/1-710 403 NSG---YRSPSPSGSLSPSAAADLRPSSARSLSPMDRSGAGS-----INSRRRQSTSSVFN 455

CrzA_A.fumigatus/1-754 519 RNYILGLADPQRPGA--SPNDSKRVQKHPATFQCNLCPKRFTRAYNLRSHLRTHTDERPFVCTVCGK 583
CRZ-1_N.crassa/1-710 456 NVIALRLADPNYNGSGENGGGPRRAQKHPATFQCKVCPKRFTRAYNLRSHLRTHTDERPFKCTVCGK 522

CrzA_A.fumigatus/1-754 584 AFARQHDRKRHEGLHSGEKKFVQGELSR-GGQWGCRRRFARADALGRHFRSEAGRICIKPLLEDEFS 649
CRZ-1_N.crassa/1-710 523 AFARQHDRKRHEGLHSGEKKFICKGELPVAGQWGCRRRFARADALGRHFRSEAGRICIRPLLEAEN 589

CrzA_A.fumigatus/1-754 650 QERERSLMDQQQHHLQPLPQQ-----VMVPVDNPHAGNFVLP AALLAQYPALQTLQWDQIAASA 708
CRZ-1_N.crassa/1-710 590 RERQRQYAEAMQNAAGMMQQQGGMMSPGMDPNGEFQMDPFVLPQALLAQYPALALLPAGPAA--- 653

CrzA_A.fumigatus/1-754 709 DDPSDIGRRSFDASSGNEFGFEDDS--GLSSVSGIN-----AGYSAAGNFY----- 754
CRZ-1_N.crassa/1-710 654 ----MQDGAGLEEDLGSNYEASDYDVEEGGYVSGPGTGFPGSMQEGYGELEGYASDYGGR 710

```

**FIG S4** Sequence alignment between the *N. crassa* CRZ-1 and *A. fumigatus* Crz-1 protein. Alignment was performed with ClustalW2 and the identical (dark blue) and conservative (light blue) amino acid residues were identified with Jalview Version 2 (71). The putative phosphorylating sites identified in the Crz-1 protein are shown in green (34) and the conservative putative phosphorylation sites in CRZ-1 are shown in red.

## DISCUSSION

Cyclins are defined as proteins that are periodically synthesized and degraded in every mitosis, and although characterized as regulatory partners for CDKs they also play CDK-independent cellular functions. The multinucleated fungi *Neurospora crassa* is described as having a few cyclins likely involved in cell cycle control (27), some of them showing circadian oscillations indicating a connection between cell cycle and circadian rhythms (37, 28). Because of the repeat-induced point mutation (RIP) mechanism (38), it is expected the existence of non-redundant and, therefore, less specialized cyclins in *Neurospora* compared to yeasts and higher eukaryotes. In this work, a new *N. crassa* cyclin was identified in a search for a PHO85-1 partner cyclin, a protein kinase orthologous to the *Saccharomyces cerevisiae* Pho85 kinase that together with Pcls from the Pho80 subfamily regulates glycogen metabolism by phosphorylating glycogen synthase, the rate limiting enzyme in glycogen synthesis (13, 14). The protein was named as PCL-1, and the presence of a typical cyclin box domain (CBD) (24) predicted by AlphaFold confirms that PCL-1 is a real cyclin that performs functions encompassing both *S. cerevisiae* Pcl subfamilies, the Pho80 and the Pcl1,2 subfamilies.

Mammalian cells possess a complex network of cyclins and CDKs to ensure an accurate progression of cell cycle, having different cyclin/CDK complexes specific for each phase of the cell cycle. On the other hand, in yeast cells, only one CDK, Cdc28 in *S. cerevisiae* and Cdc2 in *Schizosaccharomyces pombe*, controls the entire cell cycle (39, 40), and in *N. crassa*, like yeasts, only one CDK (CDC-2) participates in the cell cycle progression. Regarding to cyclins, only three cyclins likely involved in cell cycle progression are described in *N. crassa* (27, 41) suggesting that the CDK/cyclin complexes are more simplified compared to the yeast models. In this work, we identified a multifunctional cyclin that together with PHO85-1 CDK regulates glycogen metabolism by phosphorylating glycogen synthase (GSN).

PCL-1 plays a role in cell cycle progression and in germination indicating that, complexed with a CDK, the heterodimer translocates into nucleus and phosphorylates several target proteins inducing cell-cycle regulation. Although we have not identified a classical nuclear localization signal (NLS), a common characteristic described in CDK/cyclins complexes (42, 43), we observed PCL-1 localization both in nucleus and cytoplasm during germination indicating that it

requires a protein partner to be translocated into nucleus. Little is known concerning cell cycle regulators and their nucleocytoplasmic trafficking in filamentous fungi. While yeasts are mononucleated cells, *Neurospora* is a multinucleate organism having in the cytoplasm nuclei in different phases of the cell cycle. Therefore, the nuclei divide asynchronously, and their cell cycles must be regulated independently (44), which may explain our results regarding the protein localization both in nucleus and cytoplasm. A recent study demonstrated that each nucleus selects a special cyclin only when necessary, maintaining nuclei in different cell cycle phases in the same cytoplasm (41).

Beyond cell cycle control, CDKs and cyclin members have been described to influence various cellular processes, including metabolism, independently of their partners (39). In *S. cerevisiae* cells, the accumulation of glycogen and trehalose depends on the Cdc28 activity (45). We demonstrated here that PCL-1 participates in the regulation of glycogen metabolism. The  $\Delta pcl-1$  strain accumulates higher glycogen levels and exhibits higher glycogen synthase activity ratio (-/+ G6P, Fig. 2B) than the wild-type strain, features that imply PCL-1 as a cyclin involved in the control of the glycogen metabolism in *N. crassa*. In addition, the existence of less phosphorylated glycogen synthase isoforms in the mutant strain supports its role in the glycogen synthase phosphorylation and, therefore, in the maintenance of proper glycogen levels. By producing recombinant PCL-1 cyclin and PHO85-1 CDK in *E. coli*, we were able to reconstitute the functional PHO85-1/PCL-1 complex and to demonstrate that the Ser636 is the amino acid residue *in vitro* phosphorylated by the complex, demonstrating that PCL-1 is required for phosphorylation of GSN by the PHO85-1 kinase. By sequence alignment this residue may correspond to Ser654 in the *S. cerevisiae* Gsy2p (Fig. 3A), which together Thr667, are both *in vitro* and *in vivo* phosphorylated by the Pho85p/Pcl10p complex (15, 13). Therefore, two from the three yeast Gsy2p phosphorylation sites are phosphorylated by this protein complex. Surprisingly, the *N. crassa* PHO85-1/PCL-1 complex is not able to phosphorylate the Thr641 residue in GSN, which may resemble to the yeast Thr667 residue, and does not phosphorylate none of the additional putative sites. Our results regarding GSN phosphorylation are very interesting and differ from the more extensively characterized Gsy2p phosphorylation. Only one amino acid residue is phosphorylated by the PHO85-1/PCL-1 complex, which implies that additional

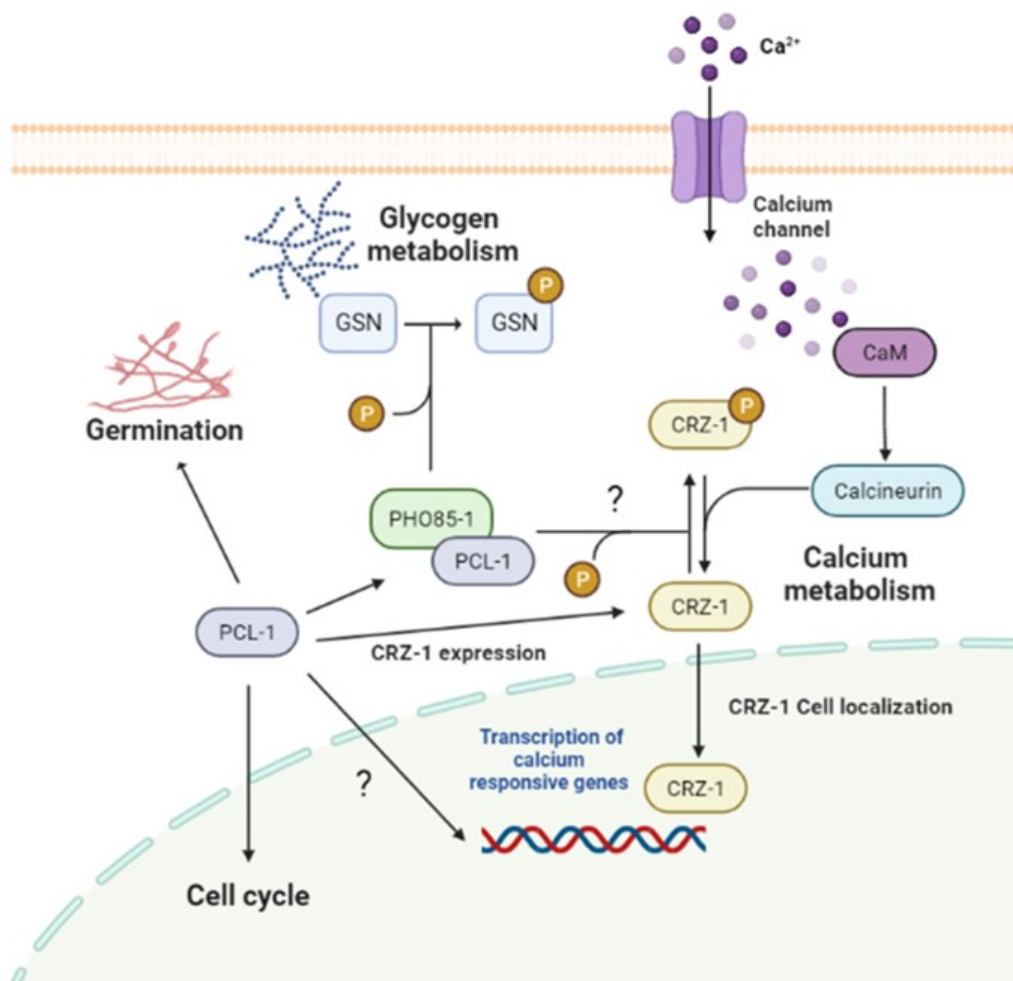
kinases, different from CDKs, may be required for phosphorylation of the other three putative sites. It is important to mention that various protein kinases are described to phosphorylate the nine sites existent in the muscle glycogen synthase (12). Like the yeast Pho85p kinase, PHO85-1 does not appear to require phosphorylation for activation, as required for others CDKs, since it is a *E. coli* recombinant protein.

The structural prediction of PHO85-1 by AlphaFold revealed regions such as PSTAIRE and T-loop with low confidence, however a high-confidence model was obtained when PHO85-1 was predicted in complex to its partner PCL-1 (Fig. S2). PHO85-1 models predicted by AlphaFold suggests intermediate conformations that can highlight the activation process of CDKs, observed by structural modifications mainly caused by the PSTAIRE helix rotation and further salt-bridge formation between Lys39 and Glu56 residues when bound to cyclins. Such movements are well known in CDKs, which are required for cyclin binding (46). The interface of the complex represents a common CDK/cyclin dimer (18, 47, 24) with PSTAIRE playing a central role in dimer stabilization. MD simulations of the complex showed that PSTAIRE and T-loop residues are essential for PCL-1 recognition and stabilization, described mainly by a salt-bridge between an arginine-rich region of PHO85-1 and Asp280 of PCL-1. This region constitutes the so-called Substrate Recognition Segment (SRS) with such interactions being observed by Arg132 and Asp376 interactions in PHO85/Pcl10 (18). In other complexes, the arginines of the SRS are interacting with mainchain oxygens of cyclin residues, such as Phe267, Glu269, and Ile270, as observed in the CDK2/Cyclin A complex (48). In summary, the modeling study of the *N. crassa* PHO85-1/PCL-1 complex revealed these proteins as a classical CDK/cyclin complex. The importance of the PSTAIRE helix of PHO85-1 in complex stabilization is shown, as well as the structural particularities of the SRS in comparison to other CDK/cyclin complexes.

We also describe here that PCL-1 regulates calcium metabolism in *N. crassa*;  $\Delta pcl-1$  cells grow better than the wild-type strain and calcium responsive genes are overexpressed in this strain under high calcium concentration. The Calcineurin-Responsive-Zinc-fingers (CRZ) in the fungal kingdom is the main regulator in the calcium stress response. It is described as a highly phosphorylated protein in *A. fumigatus* (34), and several proteins kinase were identified to phosphorylate Crz1p in yeast, among them the Pho85p/Pho80p CDK/cyclin complex (29, 49). Upon calcium

stress, calcineurin dephosphorylates CRZ causing its translocation from cytosol into nucleus triggering expression of calcium responsive genes (50). We asked whether PCL-1 could regulate the CRZ-1 phosphorylation status and, therefore, to influence its cellular location. Although we were not able to observe changes in the CRZ-1 phosphorylation in  $\Delta pcl-1$  cells expressing V5-tagged CRZ-1, we did observe nuclei fluorescence in certain hypha synthesizing GFP-tagged CRZ-1, suggesting the presence of less phosphorylated CRZ-1-GFP in  $\Delta pcl-1$  cells in the absence of calcium. We conclude that CRZ-1 nuclear localization induces expression of calcium responsive genes allowing better growth of  $\Delta pcl-1$  cells under calcium stress, as we demonstrate here. An intriguing result reported here concerns the regulation of CRZ-1 expression dependent on calcium concentration, and the control by PCL-1 may represent additional information regarding a new manner of CRZ-1 activity modulation. In *S. cerevisiae*, the abundance of Crz1-GFP was described to remain constant over a few hours in the presence of calcium (51).

In this work, we have characterized a new cyclin in *N. crassa* that participates in multicellular events besides being a cyclin involved in cell cycle control and progression (Fig. 10). PCL-1 is an activator of the PHO85-1 CDK in the glycogen metabolism regulation leading to higher GSN phosphorylation (Fig. 10). In addition, PCL-1 influences the CRZ-1 expression and its phosphorylation, which modulates its cellular location. Although we have not identified the protein kinase acting in the CRZ-1 modulation, we suppose that PHO85-1 may act as the PCL-1 partner based on what is described for *S. cerevisiae*. These observations extend our understanding concerning cyclins' role and how cyclins may mediate their functions in a multinucleated cell such as a filamentous fungus.



**FIG 10** Proposed model for the multifunctional role of the PCL-1 cyclin in *N. crassa*. PCL-1 is involved in conidial germination since  $\Delta pcl-1$  cells shows reduced germination at the initial germination times and in cell cycle progression since  $\Delta pcl-1$  cells presents less nuclei in mitotic phases. PCL-1 together PHO85-1 protein kinase regulates glycogen metabolism by directly *in vitro* phosphorylating glycogen synthase (GSN) at the Ser636 amino acid residue. As consequence, in  $\Delta pcl-1$  cells GSN is more active and the levels of glycogen are higher compared to the wild-type cells. Moreover, PCL-1 is involved in calcium stress response.  $\Delta pcl-1$  cells exhibit higher growth than the wild-type cells in the presence of high calcium chloride concentration by overexpressing calcium regulated genes. In addition, the CRZ-1 transcription factor also locates in nuclei in these cells supporting our hypothesis that CRZ-1 is less phosphorylated in the  $\Delta pcl-1$  strain being able to translocate into nucleus. Created by BioRender.com.

## MATERIALS AND METHODS

**Neurospora crassa strains and culture conditions.** The *N. crassa* FGSC#2489 wild-type strain and the FGSC#9718 (*mat a mus-51::bar*), FGSC#9568 (*mat a mus-52::hph*), FGSC#18393 (*a NCU08772::hyg*), FGSC#18394 (*A NCU08772::hyg*), FGSC#6103 (*A his-3*), FGSC#18932 (*NCU06687::hyg*), and FGSC#9518 (*A, his-3<sup>+</sup>::Pccg-1-hH1<sup>+</sup>-sfGFP<sup>+</sup>*) mutant strains were purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC, University of Missouri, Kansas City, MO, USA, <http://www.fgsc.net>) (52). The strain  $\Delta pcl-1$  *hH1-sfGFP* was generated by crossing the FGSC#18393 and #9518 strains in 0.1 x SC Westergard medium (53) containing 0.5% sucrose. Gene knockout in all mutant strains was confirmed by PCR using specific oligonucleotides (Table S1) by comparing to the amplification in the genomic DNA of the wild-type strain. The strains were maintained on solid Vogel's minimal (VM) medium, pH 5.8 (54) containing 2% sucrose at 30°C. Conidia from 10-day old cultures were suspended in sterile water, counted, and used in the experiments.

For stress analyses in plates, 5  $\mu$ l of a  $2 \times 10^7$  conidia per mL suspension from wild-type,  $\Delta pcl$  and  $\Delta pcl-1$  *pcl-1<sup>+</sup>* (complemented) strains were inoculated on Petri dishes in solid VM medium containing 2% sucrose and either NaCl or sorbitol for osmotic stress assays, or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for oxidative stress assays, or Congo Red (CR) for plasma membrane/cell wall stress assay, or calcium chloride for calcium sensitivity assay, or at pH 7.8 for alkaline stress assay. Cultures were incubated at 30°C, and the colony diameter was measured after 24 h.

**Construction of the  $\Delta pcl-1$  *pcl-1<sup>+</sup>* complemented strain.** For complementation, the FGSC#18393 strain ( $\Delta pcl-1::hyg$ ) was crossed with the FGSC#6103 strain (*his-3*) to generate the  $\Delta pcl-1$  *his-3* double mutant strain. A DNA fragment of 1,156 bp was amplified by PCR with the primers 8772sfGFP-F and 8772sfGFP-R (Table S1) using genomic DNA from the wild-type strain as template. The 8772sfGFP-R oligonucleotide contains the sequence that codifies for 6-Gly between the nucleotide sequences encoding sfGFP and the PCL-1 proteins. PCR was performed using a Phusion High-Fidelity PCR kit (Finnzymes), and the DNA fragment was purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CA) according to the manufacturer's instructions. The purified DNA fragment was cloned into the *Pacl*

and *Xba*I sites of the pTSL91-A plasmid (a donation from N. L. Glass, University of California at Berkeley, Berkeley, CA, USA), generating the pTSL91A-*pcl-1* plasmid. This plasmid allows the constitutive expression of the C-terminus PCL-1-sfGFP fusion protein, as the *ccg-1* promoter drives the *pcl-1* gene expression. To express the protein under the control of native promoter, the *ccg-1* promoter was removed with the *Not*I and *Xba*I enzymes and replaced by the *pcl-1* promoter (1,500 bp) amplified by PCR using the np8772-F and np8772-R oligonucleotides (Table S1), generating the construction pTSL91A-P*pcl-1-pcl1-sfgfp*. Plasmid constructions were used to transform by electroporation competent conidia from the recipient  $\Delta$ *pcl-1 his-3* double mutant strain. The transformants were selected on VM media containing hygromycin (200  $\mu$ g per mL) without histidine and confirmed by PCR using the primers np8772-F and 8772sfGFP-R (Table S1). The progeny was analyzed by fluorescence microscopy, and the complemented strain ( $\Delta$ *pcl-1 pcl-1*<sup>+</sup>) was evaluated in different experiments.

**Germination and cell cycle progression assays.** The analyses were performed in submerged cultures, and  $2 \times 10^7$  conidia per mL (final concentration) from WT,  $\Delta$ *pcl* and  $\Delta$ *pcl-1 pcl-1*<sup>+</sup> strains were inoculated into flasks containing 30 mL of liquid VM medium plus 2% sucrose, pH 5.8, 30°C, 150 rpm. Aliquots were removed every 2 h, and the conidia in germination were counted. Germination was also analyzed in conidia inoculated onto coverslips covered with liquid VM plus 2% sucrose, pH 5.8 and incubated at 30°C for different times. For nuclei analysis, cells were fixed [1% phosphate buffered saline (PBS), 3.7% formaldehyde, 0.1% Triton X-100], washed twice with PBS and stained with 100  $\mu$ l DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 0.5 mg per mL in DMSO) for 5 min. DAPI fluorescence was visualized using a fluorescence microscope with excitation and emission wavelengths of 358 nm and 463 nm, respectively. Images of conidia germination were captured using an AXIO Imager.A2 Zeiss microscope, at a magnification of 1000 X, coupled to an AxioCam MRm camera and processed with the using the AxioVision software.

The cell cycle progression of the  $\Delta$ *pcl-1 hH1-sfgfp* strain was analyzed by inoculating  $2 \times 10^7$  conidia per mL (final concentration) into flasks containing 30 mL of liquid VM medium plus 2% sucrose, pH 5.8, 30°C, 150 rpm. The FGSC#9518 (A, *his-3*<sup>+</sup>::*Pccg-1-hH1*<sup>+</sup>-*sfgfp*<sup>+</sup>) strain was used as control. Aliquots were removed every 2 h,

and the GFP fluorescence was analyzed in the AXIO Imager.A2 Zeiss fluorescence microscope coupled to an AxioCam MRm camera and processed using the AxioVision 4.8.2 software with excitation and emission wavelengths of 490 nm and 525 nm, respectively. Images were captured at different times, and six images from each strain were used for quantification of the nuclei in the different phases of mitosis (approximately 200) (28).

**Quantification of glycogen and glycogen synthase activity.** Glycogen and glycogen synthase activity were quantified in mycelia pads grown by inoculating  $10^7$  conidia per mL into 500 mL of liquid VM, 250 rpm at 30°C. Mycelia samples were collected every 12 h and frozen in liquid nitrogen. Mycelia pads were extracted in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.1 mM TCLK, 25 mM benzamidine, and 1  $\mu$ g per mL of each pepstatin and aprotinin). Cellular extracts were clarified by centrifugation at 3,000 X *g*, 10 min, 4°C, and the supernatants were used for glycogen, glycogen synthase activity and protein quantification. Glycogen quantification was performed after precipitation with cold ethanol and digestion with  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase (55). Free glucose was quantified with a glucose oxidase kit (Labtest), and glycogen concentration was normalized to the total protein concentration. Glycogen synthase activity was measured in the presence and in the absence of G6P (glucose-6-phosphate, 7.2 mM final concentration) and normalized to the total protein concentration (56). Total protein was quantified using BSA as standard (57).

**GSN phosphorylation analysis by 2-DE.** Glycogen synthase phosphorylation was analyzed by two-dimensional electrophoresis in mycelial pads from the wild-type and  $\Delta$ *pcl-1* strains (19). Briefly, total protein was fractionated by IEF using the pH 4-7 gradient Immobiline™ DryStrip (13 cm, linear, GE Healthcare) in an Ettan IPGphor 3 system (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. IEF was carried out at 50  $\mu$ A per strip at 20°C, using the following steps: 100 V (10 h), 500 V (500 Vh), 1,000 V (750 Vh), 8,000 V (11,325 Vh), and 8,000 V (5,067 Vh). After electrofocusing, the strips were equilibrated and subjected to a 9% SDS-PAGE, using a Hoefer™ SE600 system (GE Healthcare). To analyze the GSN phosphorylation status, proteins were transferred to nitrocellulose membrane after 2-

DE and blotted with anti-GSN antibody raised in rabbit. Blots were subsequently probed with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed with luminol reagent. As a control of phosphorylation, total protein from the wild-type strain was treated with  $\lambda$ -protein phosphatase according to the suppliers' protocol (#P0753S, New England Biolabs).

**Production and purification of recombinant proteins.** The *pcl-1* cDNA (ORF NCU08772, 1,110 bp) was amplified by RT-PCR with the oligonucleotides Nc8772-F/Nc8772-R (Table S1) using cDNA synthesized from total RNA and the SuperScript III reverse transcriptase kit (Invitrogen). The DNA fragment was cloned into *NdeI* and *BamHI* sites of pET28a expression vector leading to the pET-*pcl-1* construction for the expression of a 369 amino acids protein fused to His-tag at N-terminus. The *pho85-1* cDNA (ORF NCU07580, 1,014 bp) was amplified by RT-PCR with the oligonucleotides Nc7580-F/Nc7580-R (Table S1) and cloned into *NdeI* and *BamHI* sites of pET28a expression vector leading to the pET-*pho85-1* construction for the expression of a 337 amino acids protein fused to His-tag at N-terminus. The full *gsn* cDNA was amplified from the pET28a-*gsn* plasmid (55) with the GSN-*BamHI*-F and GSN-*EcoRI*-R oligonucleotides and subcloned into *BamHI* and *EcoRI* sites of a modified pET28a expression vector, leading to a His-tagged SUMO fusion protein at N-terminus. Site-directed mutagenesis at serine/threonine amino acids in SUMO-GSN was performed using the QuickChange mutagenesis kit (Stratagene). The S632A, S636A, T641A, and T645A single mutations were introduced with the S632A-F/R, S636A-F/R, T641A-F/R, and T645A-F/R oligonucleotides pairs, respectively. The quadruple mutant protein S632A/S636A/T641A/T645A was constructed by previously constructing the double mutant S632/636A using the S636ADM-F/R oligonucleotides and the S632A mutant cDNA as model. The double mutant cDNA was used to construct the triple mutant S632/636AT641A using the T641A-F/R oligonucleotides, which was used to construct the quadruple mutant using the T645ADM-F/R oligonucleotides. All plasmid constructions were confirmed by DNA sequencing. Recombinant proteins were produced according to Campanella et al. (58) with slight modifications. The His-SUMO protein was also produced under the same induction conditions and used as control in the *in vitro* protein phosphorylation experiments.

**In vitro phosphorylation assay.** For the phosphorylation assays, 25 µg of the wild-type and mutants His-SUMO-GSN proteins were incubated with 10 µg of His-PHO85-1 and 10 µg of His-PCL-1 proteins in reacting buffer (1 mM ATP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, [γ-<sup>32</sup>P]-ATP, activity 330 mCi/mmol, ~1200 cpm/mmol) in 25 µl of reaction volume for 30 min at 30°C. Crude cellular extract of a *N. crassa* mutant strain ( $\Delta$ *gsn*), which does not synthesize glycogen synthase, was used as source of protein kinases. After incubation, His-SUMO-GSN proteins were immobilized on Ni-NTA agarose beads (Qiagen) under low agitation. The beads were collected by centrifugation, washed three times in washing buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 30 mM imidazole, 500 mM NaCl) and suspended in elution buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM imidazole, 500 mM NaCl). After protein elution, Laemmli buffer (59) was added, the protein samples were boiled for 5 min and separated on a 12% SDS-PAGE gel. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB), dried and exposed to X-ray film.

**Construction of V5- and GFP-tagged proteins.** For protein expression and cellular localization, strains expressing at C-terminus either V5- or GFP-tagged CRZ-1 proteins were constructed using the Honda and Selker (60) methodology, as previously described (58). The pZERO-*hph-V5* and pZERO-*hph-gfp* plasmids (a donation from M. Freitag, Oregon State University, Corvallis, OR, USA) were used as templates and the splitmarkers were amplified by PCR using the CrzGly-F/R, and CrzLox-F/R oligonucleotide pairs, listed in Table S1. The *hph-V5* and *hph-gfp* nucleotide sequences were amplified from pZERO plasmids using the 10xGly-F/LoxP-R pair (Table S1). The PCR fragments were fused to the *hph-V5* or *hph-gfp* fragments by PCR using the CrzGly-F/Hph-R, Hph-F/CrzLox-R oligonucleotide pairs. (Table S1). Fusion DNA fragments were individually transformed into #9718 strain, and transformants were selected in the presence of hygromycin. Homokaryons were isolated by crossing with either the FGSC#2489 or FGSC#18394 strains in 0.5% Westergaard's medium leading to the *crz-1::crz-1-V5* and *crz-1::crz-1-gfp* in the wild type and in the  $\Delta$ *pcl-1* background strains. The segregants from each strain were confirmed by PCR using the Nc8772-F/R, CrzGly-F, V5-R, and GFP-R primers

(Table S1). *N. crassa* transformation and other molecular techniques were performed using the protocols available at the Neurospora homepage (<http://www.fgsc.net/Neurospora/NeurosporaProtocolGuide.htm>).

**Gene and protein expression.** For gene expression analysis, conidia from the WT and  $\Delta pcl-1$  strains were grown in VM media containing 2% sucrose for 24 h with and without 300 mM CaCl<sub>2</sub>. The mycelia were harvested by filtration, washed with sterile water, and submitted to total RNA extraction (61). Total RNA (10  $\mu$ g) samples were first treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) and subjected to cDNA synthesis by using SuperScript III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen) and an oligo (dT) primer, according to manufacturer's instructions. The cDNA libraries were subjected to RT-qPCR on a StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers for each gene amplicon (Table S1) as previously described (32). Data analysis was performed by the StepOne Software (Applied Biosystems), the comparative CT ( $\Delta\Delta$ CT) method (62) was used to estimate the Log<sub>2</sub> fold expression. At least three biological replicates, with three experimental replicates each were performed, and reactions with no template were used as negative control. The PCR products were subjected to melting curves analysis to verify the presence of a single amplicon. All reaction efficiencies varied from 94 to 100% and the results were expressed relative to the expression of the beta-tubulin reference gene ( $\beta$ -*tub-2* gene, NCU04054).

For protein expression, conidia from *crz-1::crz-1-V5* and  $\Delta pcl-1$  *crz-1::crz-1-V5* strains were grown for 24 h in VM containing 2% sucrose at 30°C and 180 rpm. After 24 h, the mycelia were harvested by filtration and divided in samples. One sample was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use (control sample). The remaining samples were individually transferred into 150 ml of fresh VM liquid medium containing either 0.5% sucrose and 10 or 300 mM CaCl<sub>2</sub> for up to 60 min at 30°C and 180 rpm. The stressed mycelia were harvested, washed with sterile water and frozen in liquid nitrogen. Protein extraction was performed according to Campanella et al. (58). For analysis of phosphorylated proteins 1mM NaF, 1mM sodium orthovanadate, and 1x EDTA-Free Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma) was added to the lysis buffer. For protein phosphatase treatment, samples prepared in lysis buffer without phosphatase inhibitor were added of 2 mM MnCl<sub>2</sub> and treated

with 400 U of  $\lambda$ -protein phosphatase ((#P0753S, New England Biolabs) for 40 min at 30°C followed by boiling for 5 min in 1 X Laemmli sample buffer (59). Separation of CRZ-1-V5 was accomplished in 4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels using 30  $\mu$ g of total protein (57). The proteins were electro-transferred to nitrocellulose blotting membrane (BioRad) and probed with a monoclonal anti-V5 antibody (Invitrogen). Blots were subsequently probed with HRP-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) and developed with ECL reagent (BioRad). Images were acquired using the ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

**Cellular localization.** To determine the cellular localization of the CRZ-1-GFP protein under calcium stress, 200  $\mu$ l of a conidial suspension ( $2 \times 10^6$  conidia per mL) from the *crz-1::crz-1-gfp* and  $\Delta$ *pcl-1 crz-1::crz-1-gfp* strains were inoculated onto coverslips, covered with VM media plus 2% sucrose and incubated at 30°C for 8 h (control sample). After incubation, the coverslips were transferred to fresh VM media containing 0.5% sucrose and 300 mM CaCl<sub>2</sub>, and incubated for 30 min. The PCL-1 localization during germination was performed by inoculating  $2 \times 10^7$  conidia per mL (final concentration) of  $\Delta$ *pcl-1 pcl-1*<sup>+</sup> complemented strain, which express the sfGFP-tagged PCL-1 under the native promoter. Coverslips were removed and protein location was analyzed every 2 h. For nuclei analysis, all samples were immediately fixed in 3.7% formaldehyde, 1% phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0, 0.2% (v/v) Tween 80, washed twice with PBS and stained with Hoechst (10  $\mu$ g per ml) for 15 min, followed by washing with PBS. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) was performed using a CARLS ZEISS LSM 800 Confocal Microscopy with a Plan Aplanachromat 63x/1.40 Oil DIC M27 objective. The detection parameters for all experiments were fixed at (i) nuclei analysis - hoechst – laser 405 nm: 35% 2.21 AU/79  $\mu$ m, detection wavelength 400 – 450 nm, detection gain 894V; (ii) CRZ-1-GFP - laser 488 nm: 35% 1.89 AU/84  $\mu$ m detection wavelength 488 - 574nm, detection gain 850V. The z-stack increments were 0.3  $\mu$ m. The images were analyzed using the ZEN Blue 2.3.

**Molecular modeling study of PCL-1 and PHO85-1.** PCL-1 and PHO-85-1 sequences were submitted to AlphaFold (<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>) to obtain their respective predicted models separately and also in complex, using

AlphaFold Multimer (<https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>). The atomic coordinates of ATP and  $Mg^{2+}$  were retrieved from the crystallographic structure of the *S. cerevisiae* Pcl10/PHO85 complex available in Protein Data Bank (PDB ID: 4KRC) (<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.502773>) after superposition of the complexes. Then, the PCL-1/PHO85-1 complex was submitted to molecular dynamics (MD) simulations using GROMACS v.2020.4 (63) under the CHARMM36m force field (64). The protonation state of the complex was determined according to the PROPKA3 web server (65), setting the residue His290 of PCL-1 as positively charged. The complex was placed in a rhombic dodecahedral box of 12 Å distant from the farthest atom in XYZ directions. The system was then solvated and equilibrated with 0.15 M of NaCl, adding two Cl<sup>-</sup> to obtain the net charge of zero. Following, the system was minimized using the Steepest Descent algorithm until reaching an energy gradient below 100 kJ/mol/nm<sup>2</sup>. An NVT ensemble was applied generating the initial velocities randomly following a Maxwell-Boltzmann distribution at 300 K during 1 ns, using the V-Rescale thermostat (66) with a time constant of 0.1 ps. An NPT ensemble of 1 ns was then applied, defining 1 bar as reference pressure, using the Berendsen barostat (67) with a time constant of 1.0 ps. These steps were performed restraining the backbone atoms of both proteins, ATP heavy atoms and  $Mg^{2+}$  under a force constant 1.000 kJ/mol/nm<sup>2</sup>. An unconstrained MD of 300 ns was applied using the Nose-Hoover thermostat (68) and Parrinello-Rahman barostat (69), using a time constant of 0.5 and 5.0 ps, respectively. Nonbonded interactions were calculated considering atoms within 10 Å using the PME method, with a switching force function between 10 and 12 Å. Three independent replicas were performed collecting frames every 20 ps. After processing the PBC conditions of all frames, RMSD and RMSF calculations were performed for backbone atoms of the complex, using GROMACS built-in tools. Further, the prevalence of contacts for each residue of PCL-1 or PHO85-1 was measured considering heavy atoms of pairs of residues within a 3.5 Å cutoff, using a homemade tcl script implemented in VMD (70).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. Juliana Sposto Avaca, Dr. Renato Magalhães de Paula and Dr. Fernanda Zanolli Freitas for *pho85-1* cloning and expression and Dr. Iran Malavazi and Dr. Marina Campos Rocha, from Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP for helping in the qPCR assays. We also thank the Fungal Genetics Stock Center, Manhattan, KS, USA for providing the *N. crassa* strains. We would like to thank the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, grant number 2013/24705 to M.C.B.), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) for providing fellowships to J.E.M.C. (CAPES), T.S.C. (FAPESP), L.C.B.B. (CNPq), A.A.S.G. (CAPES), C.A.L. (FAPESP), E.S.H. (FAPESP), M.R.M.F. (CNPq), and M.C.B. (CNPq).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

J.E.M.C., T.S.C., L.C.B.B., C.A.L., and E.S.H. performed the experiments; A.A.S.G. carried out the protein modeling experiments under supervision of M.R.M.F.; P.A.B. helped in the confocal microscopy; M.C.B. designed the work and wrote the manuscript with contribution of J.E.M.C. and A.A.S.G.

## REFERENCES

1. Noble ME, Endicott JA, Brown NR, Johnson LN. 1997. The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem Sci* 22:482–487. doi: 10.1016/s0968-0004(97)01144-4.
2. Andrews B, Measday V. 1988. The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* 14:66-72. doi: 10.1016/s0168-9525(97)01322-x.
3. Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Van Zeebroeck G, Rubio-Teixeira M, Thevelein JM. 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 38:254–299. doi: 10.1111/1574-6976.12065.
4. Gutierrez-Chamorro L, Felip E, Ezeonwumelu IJ, Margelí M, Ballana E. 2021 Cyclin-dependent Kinases as Emerging Targets for Developing Novel Antiviral Therapeutics. *Trends Microbiol* 29:836-848. doi: 10.1016/j.tim.2021.01.014.
5. Carroll AS, O'Shea EK. 2002. Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends Biochem Sci* 27:87–93. doi.org/10.1016/s0968-0004(01)02040-0.
6. Huang D, Friesen H, Andrews B. 2007a. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol* 66:303–314. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05914.x.
7. Nishizawa M, Suzuki K, Fujino M, Oguchi T, Toh-e A. 1999. The Pho85 kinase, a member of the yeast cyclin-dependent kinase (Cdk) family, has a regulation mechanism different from Cdks functioning throughout the cell cycle. *Genes Cells* 4:627-642. doi:10.1046/j.1365-2443.1999.00290.x.
8. Measday V, Moore L, Retnakara R., Lee J, Donoviel, , Neiman, AM, Andrews B. 1997. A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* 17:1212–1223. doi: 10.1128/MCB.17.3.1212.
9. Smets B, Ghillebert R, De Snijder P, Binda M, Swinnen E, De Virgilio C, Winderickx J. 2010. Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 56:1-32. doi:10.1007/s00294-009-0287-1.
10. Choi HS, Su WM, Han GS, Plote D, Xu Z, Carman GM. 2012. Pho85p-Pho80p phosphorylation of yeast Pah1p phosphatidate phosphatase regulates its activity, location, abundance, and function in lipid metabolism. *J Biol Chem* 287:11290-11301. doi:10.1074/jbc.M112.346023.

11. Prieto JA, Estruch F, Córcoles-Sáez I, Del poeta M, Rieger R, Stenzel I, Randez-Gil F. 2020. Pho85 and PI(4,5)P<sub>2</sub> regulate different lipid metabolic pathways in response to cold. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1865:158557. doi:10.1016/j.bbalip.2019.158557.
12. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. 2012. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* 441:763-787. doi:10.1042/BJ20111416.
13. Huang D, Farkas I, Roach PJ. 1996. Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and the Snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16:4357-4365. doi:10.1128/MCB.16.8.4357.
14. Huang D, Moffat J, Wilson WA, Moore L, Cheng C, Roach PJ, Andrews B. 1998. Cyclin partners determine Pho85 protein kinase substrate specificity in vitro and in vivo: control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10. *Mol Cell Biol* 18:3289-3299. doi:10.1128/MCB.18.6.3289.
15. Wilson WA, Mahrenholz AM, Roach PJ. 1999. Substrate targeting of the yeast cyclin-dependent kinase Pho85p by the cyclin Pcl10p. *Mol Cell Biol* 19:7020-7030. doi:10.1128/MCB.19.10.7020.
16. Wang Z, Wilson WA, Fujino MA, Roach PJ. 2001a. The yeast cyclins Pcl6p and Pcl7p are involved in the control of glycogen storage by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. *FEBS Lett* 506:277-280. doi:10.1016/s0014-5793(01)02914-3.
17. Huang K, Ferrin-O'Connell I, Zhang W, Leonard GA, O'Shea EK, Quioco FA. 2007b. Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. *Mol Cell* 28:614-623. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.013.
18. Zheng F, Quioco FA. 2013. New structural insights into phosphorylation-free mechanism for full cyclin-dependent kinase (CDK)-cyclin activity and substrate recognition. *J Biol Chem* 288:30682-30692. doi:10.1074/jbc.M113.50277
19. Candido TS, Gonçalves RD, Felício AP, Freitas FZ, Cupertino FB, De Carvalho AC, Bertolini MC. 2014. A protein kinase screen of *Neurospora crassa* mutant strains reveals that the SNF1 protein kinase promotes glycogen synthase phosphorylation. *Biochem J* 464:323-334. doi: 10.1042/BJ20140942.

20. Peleg Y, Addison R, Aramayo R, Metzenberg RL. 1996. Translocation of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1 into the nucleus is induced by phosphorus limitation. *Fungal Genet Biol* 20:185-191. doi:10.1006/fgbi.1996.0034.
21. Perkins DD, Radford A, Newmeyer D, Björkman M. 1982. Chromosomal loci of *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev* 46:426-570. doi: 10.1128/mr.46.4.426-570.1982.
22. Wang Z, Wilson WA, Fujino MA, Roach PJ. 2001b. Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol Cell Biol* 21:5742-5752. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02914-3.
23. Gibson TJ, Thompson JD, Blocker A, Kouzarides T. 1994. Evidence for a protein domain superfamily shared by the cyclins, TFIIB and RB/p107. *Nucleic Acids Res* 22:946-952. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
24. Tatum NJ, Endicott JA. 2020. Chatterboxes: the structural and functional diversity of cyclins. *Semin Cell Dev Biol* 107:4-20. doi:10.1016/j.semcd.2020.04.021.
25. Téllez-Iñón MT, Terenzi H, Torres HN. 1969. Interconvertible forms of glycogen synthetase in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* 191:765-8. doi: 10.1016/0005-2744(69)90383-0.
26. Pines J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308:697-711. doi: 10.1042/bj3080697.
27. Borkovich KA, Alex LA, Yarden O, Freita M., Turner G, Read, ND, Seiler S, Bell-Pedersen D, Paietta, J, Plesofsky N, Plamann M, Goodrich-Tanrikulu M, Schulte U, Mannhaupt G, Nargang FE, Radford A, Selitrennikoff C, Galagan JE, Dunlap JC, Loros JJ, Catcheside D, Inoue H, Aramayo R, Polymenis M, Selker EU, Sachs MS, Marzluf GA, Paulsen I, Davis R, Ebbole DJ, Zelter A, Kalkman ER, O'Rourke R, Bowring F, Yeadon J, Ishii C, Suzuki K, Sakai W, Pratt R. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev* 68.1.1-108.2004.
28. Hong CI, Zámberszky J, Baek M, Labicsak L, Ju K, Lee H, Larrondo LF, Goity A, Chong HS, Belden WJ, Csikász-Nagy A. 2014. Circadian rhythms synchronize

- mitosis in *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci USA 111:1397-1402. doi:10.1073/pnas.1319399111.
29. Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B, Kafadar K, Snyder M, Oliver SG, Cyert M, Hughes TR, Boone C, Andrews B. 2006. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. Mol Cell 21:319-30. doi: 10.1016/j.molcel.2005.12.011.
  30. Bowman BJ, Abreu S, Margolles-Clark E, Draskovic M, Bowman EJ. 2011. Role of four calcium transport proteins, encoded by *nca-1*, *nca-2*, *nca-3*, and *cax*, in maintaining intracellular calcium levels in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell 10:654-661. doi:10.1128/EC.00239-10.
  31. Bowman BJ, Abreu S, Johl JK, Bowman EJ. 2012. The *pmr* gene, encoding a Ca<sup>2+</sup>-ATPase, is required for calcium and manganese homeostasis and normal development of hyphae and conidia in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell 11:1362-1370. doi:10.1128/EC.00105-12.
  32. Virgilio S, Cupertino FB, Ambrosio DL, Bertolini MC. 2017. Regulation of the reserve carbohydrate metabolism by alkaline pH and calcium in *Neurospora crassa* reveals a possible cross-regulation of both signaling pathways. BMC Genomics 18:457. doi:10.1186/s12864-017-3832-1.
  33. Cyert MS. 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. Biochem Biophys Res Commun 311:1143-1150. doi:10.1016/s0006-291x(03)01552-3
  34. Shwab EK, Juvvadi PR, Waitt G, Soderblom EJ, Barrington BC, Asfaw YG, Moseley MA, Steinbach WJ. 2019. Calcineurin-dependent dephosphorylation of the transcription factor CrzA at specific sites controls conidiation, stress tolerance, and virulence of *Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol 112:62-80. doi:10.1111/mmi.14254
  35. Soriani FM, Malavazi I, da Silva Ferreira ME, Savoldi M, Von Zeska Kress MR, de Souza Goldman MH, Loss O, Bignell E, Goldman GH. 2008. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. Mol Microbiol 67:1274-1291. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06122.x.
  36. Hernández-Ortiz P, Espeso EA. 2013. Phospho-regulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH

- stress in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol 89:532-551. doi: 10.1111/mmi.12294.
37. Zámorszky J, Csikász-Nagy A, Hong CI. 2014. *Neurospora crassa* as a model organism to explore the interconnected network of the cell cycle and the circadian clock. Fungal Genet Biol 71:52-57. doi:10.1016/j.fgb.2014.08.014.
38. Selker EU. 2002. Repeat-induced gene silencing in fungi. Adv Genet 46:439-450. doi:10.1016/s0065-2660(02)46016-6.
39. Lim S, Kaldis P. 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. Development 140:3079-3093. doi:10.1242/dev.091744.
40. Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A. 2013. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. Trends Cell Biol 23:345-356. doi:10.1016/j.tcb.2013.03.002
41. Kuwabara K, Yoshihara R, Hatakeyama S, Tanaka S. 2020. Analysis of localization of cell-cycle regulators in *Neurospora crassa*. Fungal Biol 124:613-618. doi:10.1016/j.funbio.2020.02.017.
42. Moore JD, Yang J, Truant R, Kornbluth S. 1999. Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. J Cell Biol 144:213-224. doi:10.1083/jcb.144.2.213.
43. Porter LA, Donoghue DJ. 2003. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. Prog Cell Cycle Res 5:335-347.
44. Serna L, Stadler D. 1978. Nuclear division cycle in germinating conidia of *Neurospora crassa*. J Bacteriol 136:341e351. doi: 10.1128/jb.136.1.341-351.1978.
45. Zhao G, Chen Y, Carey L, Fletcher B. 2016. Cyclin-Dependent Kinase Coordinates Carbohydrate Metabolism and Cell Cycle in *S. cerevisiae*. Mol Cell 62:546-557. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.026.
46. De Vivo M, Bottegoni G, Berteotti A, Recanatini M, Gervasio FL, Cavalli A. 2011. Cyclin-dependent kinases: bridging their structure and function through computations. Future Med Chem 3:1551-1559. doi:10.4155/fmc.11.113.
47. Wood DJ, Endicott JA. 2018. Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family. Open Biol 8:180112. doi:10.1098/rsob.180112.
48. Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletic NP. 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. Nature 376:313-320. doi:10.1038/376313a0.

49. Hernández-Ortiz P, Espeso EA. 2017. Spatiotemporal dynamics of the calcineurin target CrzA. *Cell Signal* 29:168-180. doi:10.1016/j.cellsig.2016.11.005.
50. Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. 1999. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev* 13:798–803. doi: 10.1101/gad.13.7.798.
51. Cai L, Dalal CK, Elowitz MB. 2008. Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature* 455:485-490. doi:10.1038/nature07292.
52. McCluskey K. 2003. The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol* 52:245-262. doi: 10.1016/s0065-2164(03)01010-4.
53. Westergaard M, Mitchell HK. 1947. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Am J Botany* 34:573-577. doi: 10.1002/j.1537-2197.1947.tb13032.x
54. Vogel HJ. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiol Genet Bull* 13:42-43.
55. Freitas FZ, de Paula RM, Barbosa LCB, Terenzi HF, Bertolini MC. 2010. cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation. *Fungal Genet Biol* 47:43-52. doi: 10.1016/j.fgb.2009.10.011.
56. Thomas JA, Schlender KK, Larne J. 1968. A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including as improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. *Anal. Biochem* 25:486-499. doi: 10.1016/0003-2697(68)90127-9.
57. Hartree EF. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427. doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2.
58. Campanella JEM, Ramos J SL, Kiraly VTR, Gomes AAS, de Barros AC, Mateos PA, Freitas FZ, Fontes MRM, Borges J, Bertolini MC. 2021. Biochemical and biophysical characterization of the RVB-1/RVB-2 protein complex, the RuvBL/RVB homologues in *Neurospora crassa*. *Biochimie* 191:11-26. doi:10.1016/j.biochi.2021.08.002.

59. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. doi: 10.1038/227680a0.
60. Honda S, Selker EU 2009. Tools for fungal proteomics: multifunctional *Neurospora* vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics* 182:11-23. doi: 10.1534/genetics.108.098707
61. Sokolovsky V, Kaldenhoff R, Ricci M, Russo VEA. 1990. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Newsl* 37.
62. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods* 25:402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
63. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1-2:19-25. doi: 10.1021/acs.jctc.5b00726.
64. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot B, Grubmuller H, MacKerell Jr A. 2017. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods* 14:71-73. doi:10.1038/nmeth.4067
65. Olsson MH, Søndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH. 2011. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J Chem Theory Comput* 7:525-537. doi:10.1021/ct100578z.
66. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126:014101. doi: 10.1063/1.2408420.
67. Eslami H, Mojahedi F, Moghadasi J. 2010. Molecular dynamics simulation with weak coupling to heat and material baths. *J Chem Phys* 133:084105. doi:10.1063/1.3474951.
68. Hoover WG. 1985. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys Rev A Gen Phys* 31:1695-1697. doi:10.1103/physreva.31.1695.
69. Parrinello M, Rahman A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys* 52:7182-7190. doi: [10.1063/1.328693](https://doi.org/10.1063/1.328693).
70. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14:33-38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.

71. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033.



## REFERÊNCIAS FINAIS

- [1] D.D. Perkins, R.H. Davis, *Neurospora at the Millennium*, *Fungal Genetics and Biology*. 31 (2000) 153–167. <https://doi.org/10.1006/FGBI.2000.1248>.
- [2] H.J. Vogel, A Convenient Growth Medium for *Neurospora crassa*., *Microbial Genetics Bulletin*. 13 (1956) 42–47.
- [3] U. Schulte, I. Becker, H.W. Mewes, G. Mannhaupt, Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*, *Journal of Biotechnology*. 94 (2002) 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00415-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00415-1).
- [4] J.R.S. Fincham, P.R. Day, A.E. Radford, *Fungal genetics*, University of California Press, 1979. <https://www.ucpress.edu/book/9780520038189/fungal-genetics> (accessed August 1, 2022).
- [5] D.D. Perkins, B.C. Turner, E.G. Barry, STRAINS OF NEUROSPORA COLLECTED FROM NATURE, *Evolution*. 30 (1976) 281–313. <https://doi.org/10.1111/J.1558-5646.1976.TB00910.X>.
- [6] M.S. Fischer, N.L. Glass, Communicate and Fuse: How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network, *Front Microbiol*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00619>.
- [7] J.E. Galagan, S.E. Calvo, K.A. Borkovich, E.U. Selker, N.O. Read, D. Jaffe, W. FitzHugh, L.J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. Wang, C.B. Nielsen, J. Butler, M. Endrizzi, D. Qui, P. Ianakiev, D. Bell-Pedersen, M.A. Nelson, M. Werner-Washburne, C.P. Selitrennikoff, J.A. Kinsey, E.L. Braun, A. Zelter, U. Schulte, G.O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, C. Staben, E. Marcotte, D. Greenberg, A. Roy, K. Foley, J. Naylor, N. Stange-Thomann, R. Barrett, S. Gnerre, M. Kamal, M. Kamvysselis, E. Mauceli, C. Bielke, S. Rudd, D. Frishman, S. Krystofova, C. Rasmussen, R.L. Metzenberg, D.D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Macino, D. Catcheside, W. Li, R.J. Pratt, S.A. Osmani, C.P.C. DeSouza, L. Glass, M.J. Orbach, J.A. Berglund, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamann, S. Seiler, J. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D.O. Natvig, L.A. Alex, G. Mannhaupt, D.J. Ebole, M. Freitag, I. Paulsen, M.S. Sachs, E.S. Lander, C. Nusbaum, B. Birren, The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*, *Nature*. 422 (2003) 859–868. <https://doi.org/10.1038/NATURE01554>.
- [8] J.C. Dunlap, K.A. Borkovich, M.R. Henn, G.E. Turner, M.S. Sachs, N.L. Glass, K. McCluskey, M. Plamann, J.E. Galagan, B.W. Birren, R.L. Weiss, J.P. Townsend, J.J. Loros, M.A. Nelson, R. Lambreghts, H. v. Colot, G. Park, P. Collopy, C. Ringelberg, C. Crew, L. Litvinkova, D. DeCaprio, H.M. Hood, S. Curilla, M. Shi, M. Crawford, M. Koerhsen, P. Montgomery, L. Larson, M. Pearson, T. Kasuga, C. Tian, M. Baştürkmen, L. Altamirano, J. Xu, Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional

- genomics project, *Adv Genet.* 57 (2007) 49–96. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(06\)57002-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(06)57002-6).
- [9] Y. Ninomiya, K. Suzuki, C. Ishii, H. Inoue, Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (2004) 12248–12253. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0402780101>.
- [10] H. v. Colot, G. Park, G.E. Turner, C. Ringelberg, C.M. Crew, L. Litvinkova, R.L. Weiss, K.A. Borkovich, J.C. Dunlap, A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 10352–10357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0601456103>.
- [11] R.D. Gonçalves, F.B. Cupertino, F.Z. Freitas, A.D. Luchessi, M.C. Bertolini, A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism, *Mol Cell Proteomics.* 10 (2011). <https://doi.org/10.1074/MCP.M111.007963>.
- [12] T. de Souza Candido, R.D. Gonçalves, A.P. Felício, F.Z. Freitas, F.B. Cupertino, A.C.G.V. de Carvalho, M.C. Bertolini, A protein kinase screen of *Neurospora crassa* mutant strains reveals that the SNF1 protein kinase promotes glycogen synthase phosphorylation, *Biochem J.* 464 (2014) 323–334. <https://doi.org/10.1042/BJ20140942>.
- [13] S. Virgilio, F.B. Cupertino, D.L. Ambrosio, M.C. Bertolini, Regulation of the reserve carbohydrate metabolism by alkaline pH and calcium in *Neurospora crassa* reveals a possible cross-regulation of both signaling pathways, *BMC Genomics.* 18 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3832-1>.
- [14] F.B. Cupertino, F.Z. Freitas, R.M. de Paula, M.C. Bertolini, Ambient pH controls glycogen levels by regulating glycogen synthase gene expression in *Neurospora crassa*. New insights into the pH signaling pathway, *PLoS One.* 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0044258>.
- [15] F.B. Cupertino, S. Virgilio, F.Z. Freitas, T. de S. Candido, M.C. Bertolini, Regulation of glycogen metabolism by the CRE-1, RCO-1 and RCM-1 proteins in *Neurospora crassa*. The role of CRE-1 as the central transcriptional regulator, *Fungal Genetics and Biology.* 77 (2015) 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.03.011>.
- [16] F.Z. Freitas, S. Virgilio, F.B. Cupertino, D.J. Kowbel, M. Fioramonte, F.C. Gozzo, N.L. Glass, M.C. Bertolini, The SEB-1 Transcription Factor Binds to the STRE Motif in *Neurospora crassa* and Regulates a Variety of Cellular Processes Including the Stress Response and Reserve Carbohydrate Metabolism, *G3 (Bethesda).* 6 (2016) 1327–1343. <https://doi.org/10.1534/G3.116.028506>.
- [17] M. Baek, S. Virgilio, T.M. Lamb, O. Ibarra, J.M. Andrade, R.D. Gonçalves, A. Dovzhenok, S. Lim, D. Bell-Pedersen, M.C. Bertolini, C.I. Hong, Circadian

- clock regulation of the glycogen synthase (*gsn*) gene by WCC is critical for rhythmic glycogen metabolism in *Neurospora crassa*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116 (2019) 10435–10440. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1815360116/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- [18] A.C. Boni, D.L. Ambrósio, F.B. Cupertino, A. Montenegro-Montero, S. Virgilio, F.Z. Freitas, F.A. Corrocher, R.D. Gonçalves, A. Yang, M.T. Weirauch, T.R. Hughes, L.F. Larrondo, M.C. Bertolini, *Neurospora crassa* developmental control mediated by the FLB-3 transcription factor, *Fungal Biol.* 122 (2018) 570–582. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2018.01.004>.
- [19] J.E. Maimoni Campanella, S.L. Ramos Junior, V.T. Rodrigues Kiraly, A.A. Severo Gomes, A.C. de Barros, P.A. Mateos, F.Z. Freitas, M.R. de Mattos Fontes, J.C. Borges, M.C. Bertolini, Biochemical and biophysical characterization of the RVB-1/RVB-2 protein complex, the RuvBL/RVB homologues in *Neurospora crassa*, *Biochimie*. 191 (2021) 11–26. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2021.08.002>.
- [20] A.J.P. Brown, L.E. Cowen, A. di Pietro, J. Quinn, Stress Adaptation, *Microbiol Spectr.* 5 (2017). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0048-2016>.
- [21] S. Fulda, Cell death and survival signaling in oncogenesis, *Klinische Padiatrie*. 222 (2010) 340–344. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1265169>.
- [22] C.R. Weston, R.J. Davis, The JNK signal transduction pathway, *Curr Opin Cell Biol.* 19 (2007) 142–149. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2007.02.001>.
- [23] M. Ashburner, J.J. Bonner, The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock, *Cell*. 17 (1979) 241–254. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90150-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90150-8).
- [24] A.P. Gasch, P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M.B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, P.O. Brown, Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Molecular Biology of the Cell*. 11 (2000) 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/MBC.11.12.4241>.
- [25] S. Nicholls, M.D. Leach, C.L. Priest, A.J.P. Brown, Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals, *Molecular Microbiology*. 74 (2009) 844–861. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2009.06883.X>.
- [26] S.W. Kmiecik, M.P. Mayer, Molecular mechanisms of heat shock factor 1 regulation, *Trends Biochem Sci*. 47 (2022) 218–234. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2021.10.004>.
- [27] J. Joutsen, L. Sistonen, Tailoring of Proteostasis Networks with Heat Shock Factors, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 11 (2019). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A034066>.

- [28] S. Tiwari, R. Thakur, J. Shankar, Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi, *Biotechnology Research International*. 2015 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/132635>.
- [29] E. v. LeBlanc, E.J. Polvi, A.O. Veri, G.G. Privé, L.E. Cowen, Structure-guided approaches to targeting stress responses in human fungal pathogens, *J Biol Chem*. 295 (2020) 14458–14472. <https://doi.org/10.1074/JBC.REV120.013731>.
- [30] J.H.T.M. Fabri, M.C. Rocha, C.M. Fernandes, G.F. Persinoti, L.N.A. Ries, A.F. da Cunha, G.H. Goldman, M. del Poeta, I. Malavazi, The Heat Shock Transcription Factor HsfA Is Essential for Thermotolerance and Regulates Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*, *Frontiers in Microbiology*. 12 (2021) 735. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.656548/BIBTEX>.
- [31] C. Wu, Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation, <Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Cb.11.110195.002301>. 11 (2003) 441–469. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CB.11.110195.002301>.
- [32] D. Pincus, Regulation of Hsf1 and the Heat Shock Response, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1243 (2020) 41–50. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40204-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40204-4_3).
- [33] M. Fernandes, H. Xiao, J.T. Lis, Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor--heat shock element interactions, *Nucleic Acids Res*. 22 (1994) 167–173. <https://doi.org/10.1093/NAR/22.2.167>.
- [34] H. Xiao, O. Perisic, J.T. Lis, Cooperative binding of *drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit, *Cell*. 64 (1991) 585–593. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90242-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90242-Q).
- [35] F. Zanolli Freitas, M.C. Bertolini, Genomic organization of the *Neurospora crassa* gsn gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock, *Mol Genet Genomics*. 272 (2004) 550–561. <https://doi.org/10.1007/S00438-004-1086-5>.
- [36] M.T. Martínez-Pastor, G. Marchler, C. Schüller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, F. Estruch, The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE), *EMBO Journal*. 15 (1996) 2227–2235. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1996.TB00576.X>.
- [37] T.M. Dinamarco, R.S. Almeida, P.A. de Castro, N.A. Brown, T.F. dos Reis, L.N.Z. Ramalho, M. Savoldi, M.H.S. Goldman, G.H. Goldman, Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in *Aspergillus fumigatus*, *Eukaryot Cell*. 11 (2012) 518–531. <https://doi.org/10.1128/EC.00016-12>.
- [38] C.K. Peterbauer, D. Litscher, C.P. Kubicek, The *Trichoderma atroviride* seb1 (stress response element binding) gene encodes an AGGGG-binding protein which is involved in the response to high osmolarity stress, *Molecular Genetics*

- and Genomics 2002 268:2. 268 (2002) 223–231.  
<https://doi.org/10.1007/S00438-002-0732-Z>.
- [39] N. Kobayashit, K. Mcentee, Identification of cis and trans Components of a Novel Heat Shock Stress Regulatory Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. 13 (1993) 248–256.
- [40] J. Ellis, Proteins as molecular chaperones, *Nature* 1987 328:6129. 328 (1987) 378–379. <https://doi.org/10.1038/328378a0>.
- [41] S. Tiwari, R. Thakur, J. Shankar, Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi, *Biotechnol Res Int*. 2015 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/132635>.
- [42] J. Borges, C. Ramos, Protein folding assisted by chaperones, *Protein Pept Lett*. 12 (2005) 257–261. <https://doi.org/10.2174/0929866053587165>.
- [43] M.R. Fernández-Fernández, J.M. Valpuesta, Hsp70 chaperone: A master player in protein homeostasis [version 1; peer review: 3 approved], *F1000Res*. 7 (2018). <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15528.1/DOI>.
- [44] M. Daugaard, M. Rohde, M. Jäättelä, The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions, *FEBS Lett*. 581 (2007) 3702–3710. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.05.039>.
- [45] F.H. Schopf, M.M. Biebl, J. Buchner, The HSP90 chaperone machinery, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18 (2017) 345–360. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.20>.
- [46] M. Taipale, I. Krykbaeva, M. Koeva, C. Kayatekin, K.D. Westover, G.I. Karras, S. Lindquist, Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition, *Cell*. 150 (2012) 987–1001. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.06.047>.
- [47] M. Criado-Marrero, T. Rein, E.B. Binder, J.T. Porter, J. Koren, L.J. Blair, Hsp90 and FKBP51: complex regulators of psychiatric diseases, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 373 (2018). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2016.0532>.
- [48] S. Hohmann, Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66 (2002) 300–372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002>.
- [49] S. Hohmann, M. Krantz, B. Nordlander, Yeast Osmoregulation, *Methods in Enzymology*. 428 (2007) 29–45. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28002-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28002-4).
- [50] M. Rep, M. Krantz, J.M. Thevelein, S. Hohmann, The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock, *Journal of Biological Chemistry*. 275 (2000) 8290–8300. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8290>.
- [51] M. Rep, M. Krantz, J.M. Thevelein, S. Hohmann, The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-

- dependent genes, *Journal of Biological Chemistry*. 275 (2000) 8290–8300. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.12.8290>.
- [52] J. Lee, W. Reiter, I. Dohnal, C. Gregori, S. Beese-Sims, K. Kuchler, G. Ammerer, D.E. Levin, MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators, *Genes and Development*. 27 (2013) 2590–2601. <https://doi.org/10.1101/GAD.229310.113>.
- [53] A.J.P. Brown, L.E. Cowen, A. di Pietro, J. Quinn, *Stress Adaptation, Microbiology Spectrum*. 5 (2017). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0048-2016>.
- [54] R. Noguchi, S. Banno, R. Ichikawa, F. Fukumori, A. Ichiishi, M. Kimura, I. Yamaguchi, M. Fujimura, Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*, *Fungal Genetics and Biology*. 44 (2007) 208–218. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2006.08.003>.
- [55] T. Maeda, M. Takekawa, H. Saito, Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor, *Science* (1979). 269 (1995) 554–558. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7624781>.
- [56] Y. Zhang, R. Lamm, C. Pillonel, S. Lam, J.-R. Xu, Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa os-2* Gene Encodes a *HOG1* Mitogen-Activated Protein Kinase Homologue, *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (2002) 532–538. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.532-538.2002>.
- [57] T.M. Lamb, K.E. Finch, D. Bell-Pedersen, The *Neurospora crassa* OS MAPK pathway-activated transcription factor ASL-1 contributes to circadian rhythms in pathway responsive clock-controlled genes, *Fungal Genetics and Biology*. 49 (2012) 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.12.006>.
- [58] M.S. Cyert, C.C. Philpott, Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 193 (2013) 677–713. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.112.147207>.
- [59] M.A. Peñalva, D. Lucena-Agell, H.N. Arst, Liaison alcaline: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling, *Current Opinion in Microbiology*. 22 (2014) 49–59. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2014.09.005>.
- [60] D.A. Davis, How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence, *Current Opinion in Microbiology*. 12 (2009) 365–370. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2009.05.006>.
- [61] J. Tilburn, S. Sarkar, D.A. Widdick, A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M.A. Penalva, H.N. Arst, The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH., *The EMBO Journal*. 14 (1995) 779–790. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1995.TB07056.X>.

- [62] E. Díez, J. Álvaro, E.A. Espeso, L. Rainbow, T. Suárez, J. Tilburn, H.N. Arst, M.Á. Peñalva, Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps, *The EMBO Journal*. 21 (2002) 1350–1359. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/21.6.1350>.
- [63] M.A. Peñalva, J. Tilburn, E. Bignell, H.N. Arst, Ambient pH gene regulation in fungi: making connections, *Trends in Microbiology*. 16 (2008) 291–300. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.03.006>.
- [64] H.N. Arst, M.A. Peñalva, pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems, *Trends in Genetics*. 19 (2003) 224–231. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00052-0).
- [65] W. Li, A.P. Mitchell, Proteolytic Activation of Rim1p, a Positive Regulator of Yeast Sporulation and Invasive Growth, *Genetics*. 145 (1997) 63–73. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/145.1.63>.
- [66] S. Virgilio, F.B. Cupertino, N.E. Bernardes, F.Z. Freitas, A.A.S. Takeda, M.R. de Mattos Fontes, M.C. Bertolini, Molecular Components of the *Neurospora crassa* pH Signaling Pathway and Their Regulation by pH and the PAC-3 Transcription Factor, *PLOS ONE*. 11 (2016) e0161659. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0161659>.
- [67] M.P. Martins, N.M. Martinez-Rossi, P.R. Sanches, A. Rossi, The PAC-3 transcription factor critically regulates phenotype-associated genes in *Neurospora crassa*., *Genet Mol Biol*. 43 (2020) e20190374. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0374>.
- [68] M.P. Martins, N.M. Martinez-Rossi, P.R. Sanches, E.V. Gomes, M.C. Bertolini, W.R. Pedersoli, R.N. Silva, A. Rossi, The pH Signaling Transcription Factor PAC-3 Regulates Metabolic and Developmental Processes in Pathogenic Fungi., *Front Microbiol*. 10 (2019) 2076. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02076>.
- [69] B. Halliwell, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology*. 141 (2006) 312–322. <https://doi.org/10.1104/PP.106.077073>.
- [70] M. Ralser, M.M. Wamelink, A. Kowald, B. Gerisch, G. Heeren, E.A. Struys, E. Klipp, C. Jakobs, M. Breitenbach, H. Lehrach, S. Krobitsch, Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress, *Journal of Biology*. 6 (2007). <https://doi.org/10.1186/JBIOL61>.
- [71] A. Roetzer, N. Gratz, P. Kovarik, C. Schüller, Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis, *Cellular Microbiology*. 12 (2010) 199–216. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2009.01391.X>.
- [72] D. Chen, C.R.M. Wilkinson, S. Watt, C.J. Penkett, W.M. Toone, N. Jones, J. Bähler, Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast, *Molecular Biology of the Cell*. 19 (2008) 308–317. <https://doi.org/10.1091/MBE.E07-08-0735>.

- [73] T.A. Missall, J.K. Lodge, Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators, *Molecular Microbiology*. 57 (2005) 847–858. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04735.X>.
- [74] M. Guo, Y. Chen, Y. Du, Y. Dong, W. Guo, S. Zhai, H. Zhang, S. Dong, Z. Zhang, Y. Wang, P. Wang, X. Zheng, The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *magnaporthe oryzae*, *PLoS Pathogens*. 7 (2011). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1001302>.
- [75] D. Hagiwara, S. Suzuki, K. Kamei, T. Gono, S. Kawamoto, The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genetics and Biology*. 73 (2014) 138–149. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2014.10.011>.
- [76] F. Lara-Rojas, O. Sánchez, L. Kawasaki, J. Aguirre, *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions, *Molecular Microbiology*. 80 (2011) 436–454. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07581.X>.
- [77] S.-K. Hong, M.-K. Cha, Y.-S. Choi, W.-C. Kim, I.-H. Kim, Msn2p/Msn4p Act as a Key Transcriptional Activator of Yeast Cytoplasmic Thiol Peroxidase II, *Journal of Biological Chemistry*. 277 (2002) 12109–12117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111341200>.
- [78] D.E. Levin, Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69 (2005) 262–291. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005/ASSET/7EAC9A4F-A772-4F67-8765-08376DDC4A6E/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0020520840006.JPEG>.
- [79] J.E. Adamo, G. Rossi, P. Brennwald, The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity, *Molecular Biology of the Cell*. 10 (1999) 4121–4133. <https://doi.org/10.1091/MBC.10.12.4121>.
- [80] R.S. Shapiro, L.E. Cowen, Thermal control of microbial development and virulence: Molecular mechanisms of microbial temperature sensing, *MBio*. 3 (2012). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00238-12>.
- [81] C.A. Munro, Chitin and Glucan, the Yin and Yang of the Fungal Cell Wall, Implications for Antifungal Drug Discovery and Therapy, *Advances in Applied Microbiology*. 83 (2013) 145–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407678-5.00004-0>.
- [82] M.C. Rocha, K. Minari, J.H.T.M. Fabri, J.D. Kerkaert, L.M. Gava, A.F. da Cunha, R.A. Cramer, J.C. Borges, I. Malavazi, *Aspergillus fumigatus* Hsp90 interacts with the main components of the cell wall integrity pathway and cooperates in heat shock and cell wall stress adaptation, *Cellular Microbiology*. 23 (2021) e13273. <https://doi.org/10.1111/CMI.13273>.

- [83] M.D. Leach, E. Klipp, L.E. Cowen, A.J.P. Brown, Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs, *Nature Reviews Microbiology* 2012 10:10. 10 (2012) 693–704. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2875>.
- [84] M.S. Cyert, Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 311 (2003) 1143–1150. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01552-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01552-3).
- [85] A.M. Stathopoulos, M.S. Cyert, Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast, *Genes & Development*. 11 (1997) 3432–3444. <https://doi.org/10.1101/GAD.11.24.3432>.
- [86] A. Spielvogel, H. Findon, H.N. Arst, L. Araújo-Bazán, P. Hernández-Ortíz, U. Stahl, V. Meyer, E.A. Espeso, Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*, *Biochemical Journal*. 414 (2008) 419–429. <https://doi.org/10.1042/BJ20080344>.
- [87] A. Pitoniak, B. Birkaya, H.M. Dionne, N. Vadaie, P.J. Cullen, The signaling mucins Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response, *Molecular Biology of the Cell*. 20 (2009) 3101–3114. <https://doi.org/10.1091/MBC.E08-07-0760>.
- [88] A. Roetzer, C. Gregori, A.M. Jennings, J. Quintin, D. Ferrandon, G. Butler, K. Kuchler, G. Ammerer, C. Schüller, *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors, *Molecular Microbiology*. 69 (2008) 603–620. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2008.06301.X>.
- [89] B. Enjalbert, A. Nantel, M. Whiteway, Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: Absence of a general stress response, *Molecular Biology of the Cell*. 14 (2003) 1460–1467. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-08-0546>.
- [90] P. Dunayevich, R. Baltanás, J.A. Clemente, A. Couto, D. Sapochnik, G. Vasen, A. Colman-Lerner, Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway, *Scientific Reports*. 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33203-6>.
- [91] D.R. Amici, D.J. Ansel, K.A. Metz, R.S. Smith, C.M. Phoumyvong, S. Gayatri, T. Chamera, S.L. Edwards, B.P. O'Hara, S. Srivastava, S. Brockway, S.R. Takagishi, B.-K. Cho, Y.A. Goo, N.L. Kelleher, I. Ben-Sahra, D.R. Foltz, J. Li, M.L. Mendillo, C16orf72/HAPSTR1 is a molecular rheostat in an integrated network of stress response pathways., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 119 (2022) e2111262119. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2111262119/-/DCSUPPLEMENTAL>.

- [92] F.Z. Freitas, A. Chapeaurouge, J. Perales, M.C. Bertolini, A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*, *PROTEOMICS*. 8 (2008) 2052–2061. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200700921>.
- [93] H. -T Ni, D.C. LaPorte, Response of a yeast glycogen synthase gene to stress, *Mol Microbiol*. 16 (1995) 1197–1205. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1995.TB02342.X>.
- [94] N. Nano, W.A. Houry, Chaperone-like activity of the AAAproteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 368 (2013) 1–12. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2011.0399>.
- [95] A. Jeganathan, V. Leong, L. Zhao, J. Huen, N. Nano, W.A. Houry, J. Ortega, Yeast Rvb1 and Rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency, *Journal of Molecular Biology*. 427 (2015) 1875–1886. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.01.010>.
- [96] J. Rosenbaum, S.H. Baek, A. Dutta, W.A. Houry, O. Huber, T.R. Hupp, P.M. Matias, The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape, *Sci Signal*. 6 (2013). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2003906>.
- [97] N. Izumi, A. Yamashita, S. Ohno, Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2, *Nucleus*. 3 (2012) 29–43. <https://doi.org/10.4161/NUCL.18926>.
- [98] Z.O. Jónsson, S. Jha, J.A. Wohlschlegel, A. Dutta, Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex, *Mol Cell*. 16 (2004) 465–477. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.09.033>.
- [99] I.A. Olave, S.L. Reck-Peterson, G.R. Crabtree, Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling, *Annu Rev Biochem*. 71 (2002) 755–781. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.71.110601.135507>.
- [100] N. Izumi, A. Yamashita, A. Iwamatsu, R. Kurata, H. Nakamura, B. Saari, H. Hirano, P. Anderson, S. Ohno, AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay, *Sci Signal*. 3 (2010). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2000468>.
- [101] X.B. Qiu, Y.L. Lin, K.C. Thome, P. Pian, B.P. Schlegel, S. Weremowicz, J.D. Parvin, A. Dutta, An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth, *J Biol Chem*. 273 (1998) 27786–27793. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.43.27786>.
- [102] B. A, C. S, H. O, U. F, R. U, A. D, K. R, P. J, Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity, *EMBO J*. 19 (2000) 6121–6130. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.22.6121>.

- [103] Y.Q. Mao, W.A. Houry, The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology, *Front Mol Biosci.* 4 (2017). <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2017.00058>.
- [104] A. Grigoletto, V. Neaud, N. Allain-Courtois, P. Lestienne, J. Rosenbaum, The ATPase activity of reptin is required for its effects on tumor cell growth and viability in hepatocellular carcinoma, *Mol Cancer Res.* 11 (2013) 133–139. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0455>.
- [105] W.A. Houry, E. Bertrand, B. Coulombe, The PAQosome, an R2TP-Based Chaperone for Quaternary Structure Formation, *Trends Biochem Sci.* 43 (2018) 4–9. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2017.11.001>.
- [106] M. Lakshminarasimhan, G. Boanca, C.A.S. Banks, G.L. Hattem, A.E. Gabriel, B.D. Groppe, C. Smoyer, K.E. Malanowski, A. Peak, L. Florens, M.P. Washburn, Proteomic and Genomic Analyses of the Rvb1 and Rvb2 Interaction Network upon Deletion of R2TP Complex Components, *Mol Cell Proteomics.* 15 (2016) 960–974. <https://doi.org/10.1074/MCP.M115.053165>.
- [107] E.W.J. Wallace, J.L. Kear-Scott, E. v. Pilipenko, M.H. Schwartz, P.R. Laskowski, A.E. Rojek, C.D. Katanski, J.A. Riback, M.F. Dion, A.M. Franks, E.M. Airoidi, T. Pan, B.A. Budnik, D.A. Drummond, Reversible, Specific, Active Aggregates of Endogenous Proteins Assemble upon Heat Stress, *Cell.* 162 (2015) 1286–1298. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.08.041>.
- [108] K. Rizzolo, J. Huen, A. Kumar, S. Phanse, J. Vlasblom, Y. Kakihara, H.A. Zeineddine, Z. Minic, J. Snider, W. Wang, C. Pons, T. v. Seraphim, E.E. Boczek, S. Alberti, M. Costanzo, C.L. Myers, I. Stagljar, C. Boone, M. Babu, W.A. Houry, Features of the Chaperone Cellular Network Revealed through Systematic Interaction Mapping, *Cell Reports.* 20 (2017) 2735–2748. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.08.074>.
- [109] N. Zaarur, X. Xu, P. Lestienne, A.B. Meriin, M. McComb, C.E. Costello, G.P. Newnam, R. Ganti, N. v Romanova, M. Shanmugasundaram, S.T. Silva, T.M. Bandejas, P.M. Matias, K.S. Lobachev, I.K. Lednev, Y.O. Chernoff, M.Y. Sherman, RuvbL1 and RuvbL2 enhance aggresome formation and disaggregate amyloid fibrils, *The EMBO Journal.* 34 (2015) 2363–2382. <https://doi.org/10.15252/embj.201591245>.
- [110] S. Jain, J.R. Wheeler, R.W. Walters, A. Agrawal, A. Barsic, R. Parker, ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure, *Cell.* 164 (2016) 487–498. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.12.038>.
- [111] H. Glauninger, C.J. Wong Hickernell, J.A.M. Bard, D.A. Drummond, Stressful steps: Progress and challenges in understanding stress-induced mRNA condensation and accumulation in stress granules, *Mol Cell.* 82 (2022). <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2022.05.014>.

- [112] P. Anderson, N. Kedersha, Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation, *Cell Stress Chaperones*. 7 (2002) 213–221. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2002\)007<0213:vstroe>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2002)007<0213:vstroe>2.0.co;2).
- [113] N. Kedersha, P. Anderson, Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability, *Biochem Soc Trans*. 30 (2002) 963–969. <https://doi.org/10.1042/BST0300963>.
- [114] R. Takii, M. Fujimoto, M. Matsumoto, P. Srivastava, A. Katiyar, K.I. Nakayama, A. Nakai, The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment, *EMBO J*. 38 (2019). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019102566>.
- [115] A.S. Kainth, R. Meduri, V. Pandit, L.S. Rubio, D.S. Gross, Shugoshin 2-a new guardian for heat shock transcription, *EMBO J*. 39 (2020). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019104077>.
- [116] R.K. Hackley, A.K. Schmid, Global Transcriptional Programs in Archaea Share Features with the Eukaryotic Environmental Stress Response, *Journal of Molecular Biology*. 431 (2019) 4147–4166. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.07.029>.
- [117] E. Nikolaou, I. Agrafioti, M. Stumpf, J. Quinn, I. Stansfield, A.J. Brown, Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi, *BMC Evolutionary Biology*. 9 (2009). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-44>.
- [118] J. Huen, Y. Kakihara, F. Ugwu, K.L.Y. Cheung, J. Ortega, W.A. Houry, Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes, *Biochem Cell Biol*. 88 (2010) 29–40. <https://doi.org/10.1139/O09-122>.
- [119] M. Kanemaki, Y. Kurokawa, T. Matsu-Ura, Y. Makino, A. Masani, K.I. Okazaki, T. Morishita, T.A. Tamura, TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuVB-like DNA helicase, TIP49a, *Journal of Biological Chemistry*. 274 (1999) 22437–22444. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22437>.
- [120] F.Z. Freitas, A. Chapeaurouge, J. Perales, M.C. Bertolini, A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the gsn glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*, *Proteomics*. 8 (2008) 2052–2061. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200700921>.
- [121] T.S. Kitajima, S.A. Kawashima, Y. Watanabe, The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis, *Nature* 2004 427:6974. 427 (2004) 510–517. <https://doi.org/10.1038/nature02312>.
- [122] K. McCluskey, A. Wiest, M. Plamann, The Fungal Genetics Stock Center: a repository for 50 years of fungal genetics research, *J Biosci*. 35 (2010) 119–126. <https://doi.org/10.1007/S12038-010-0014-6>.

- [123] E.L. Tatum, R.W. Barratt, V.M. Cutter, Chemical Induction of Colonial Paramorphs in *Neurospora* and *Syncephalastrum*, *Science*. 109 (1949) 509–511. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.109.2838.509>.
- [124] D. EBBOLE, M.S. SACHS, A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia, *Fungal Genetics Reports*. 37 (1990) 7. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1472>.
- [125] J. Adler, I. Parmryd, Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient, *Cytometry A*. 77 (2010) 733–742. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.20896>.
- [126] E.F. Hartree, Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal Biochem*. 48 (1972) 422–427. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2).
- [127] C. Olivares-Yañez, J. Emerson, A. Kettenbach, J.J. Loros, J.C. Dunlap, L.F. Larrondo, Modulation of Circadian Gene Expression and Metabolic Compensation by the RCO-1 Corepressor of *Neurospora crassa*, *Genetics*. 204 (2016) 163–176. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.116.191064>.
- [128] J.R. Wheeler, S. Jain, A. Khong, R. Parker, Isolation of yeast and mammalian stress granule cores, *Methods*. 126 (2017) 12–17. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2017.04.020>.
- [129] F.Z. Freitas, R.M. de Paula, L.C.B. Barbosa, H.F. Terenzi, M.C. Bertolini, cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation, *Fungal Genetics and Biology*. 47 (2010) 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.10.011>.
- [130] K.M. Smith, G. Sancar, R. Dekhang, C.M. Sullivan, S. Li, A.G. Tag, C. Sancar, E.L. Bredeweg, H.D. Priest, R.F. McCormick, T.L. Thomas, J.C. Carrington, J.E. Stajich, D. Bell-Pedersen, M. Brunner, M. Freitag, Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for *neurospora* white collar complex, *Eukaryot Cell*. 9 (2010) 1549–1556. <https://doi.org/10.1128/EC.00154-10>.
- [131] C.H. Chen, C.S. Ringelberg, R.H. Gross, J.C. Dunlap, J.J. Loros, Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*, *EMBO J*. 28 (2009) 1029–1042. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.54>.
- [132] M.I. Dauden, A. López-Perrote, O. Llorca, RUVBL1-RUVBL2 AAA-ATPase: a versatile scaffold for multiple complexes and functions, *Curr Opin Struct Biol*. 67 (2021) 78–85. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2020.08.010>.
- [133] B.K. Jakobsen, H.R.B. Pelham, Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo, *Molecular and Cellular Biology*. 8 (1988) 5040–5042. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.11.5040-5042.1988>.

- [134] U. Meyer, C. Monnerjahn, D. Techel, L. Rensing, Interaction of the *Neurospora crassa* heat shock factor with the heat shock element during heat shock and different developmental stages, *FEMS Microbiology Letters*. 185 (2000) 255–261. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2000.TB09071.X>.
- [135] M.T. Weirauch, A. Yang, M. Albu, A.G. Cote, A. Montenegro-Montero, P. Drewe, H.S. Najafabadi, S.A. Lambert, I. Mann, K. Cook, H. Zheng, A. Goity, H. van Bakel, J.C. Lozano, M. Galli, M.G. Lewsey, E. Huang, T. Mukherjee, X. Chen, J.S. Reece-Hoyes, S. Govindarajan, G. Shaulsky, A.J.M. Walhout, F.Y. Bouget, G. Ratsch, L.F. Larrondo, J.R. Ecker, T.R. Hughes, Determination and Inference of Eukaryotic Transcription Factor Sequence Specificity, *Cell*. 158 (2014) 1431–1443. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.08.009>.
- [136] T.M. Lamb, J. Vickery, D. Bell-Pedersen, Regulation of gene expression in *neurospora crassa* with a copper responsive promoter, *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 3 (2013) 2273–2280. <https://doi.org/10.1534/G3.113.008821/-/DC1>.
- [137] P.K.T. Shiu, N.B. Raju, D. Zickler, R.L. Metzenberg, Meiotic Silencing by Unpaired DNA, *Cell*. 107 (2001) 905–916. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00609-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00609-2).
- [138] O. Huber, L. Ménard, V. Haurie, A. Nicou, D. Taras, J. Rosenbaum, Pontin and Reptin, Two Related ATPases with Multiple Roles in Cancer, *Cancer Research*. 68 (2008) 6873–6876. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0547>.
- [139] G.-J. Day, R.D. Mosteller, D. Broek, Distinct Subclasses of Small GTPases Interact with Guanine Nucleotide Exchange Factors in a Similar Manner, *Molecular and Cellular Biology*. 18 (1998) 7444. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7444>.
- [140] H. Glauninger, C.J. Wong Hickernell, J.A.M. Bard, D.A. Drummond, Stressful steps: Progress and challenges in understanding stress-induced mRNA condensation and accumulation in stress granules, *Mol Cell*. 82 (2022). <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2022.05.014>.
- [141] D. Mateju, J.A. Chao, Stress granules: regulators or by-products?, *FEBS J*. 289 (2022) 363–373. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15821>.
- [142] D.S.W. Protter, R. Parker, Principles and Properties of Stress Granules, *Trends Cell Biol*. 26 (2016) 668–679. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2016.05.004>.
- [143] J. Ross Buchan, T. Nissan, R. Parker, Analyzing P-bodies and stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Enzymol*. 470 (2010) 619–640. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70025-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70025-2).
- [144] S. Souquere, S. Mollet, M. Kress, F. Dautry, G. Pierron, D. Weil, Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells, *J Cell Sci*. 122 (2009) 3619–3626. <https://doi.org/10.1242/JCS.054437>.

- [145] C. Talora, L. Franchi, H. Linden, P. Ballario, G. Macino, Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction, *EMBO Journal*. 18 (1999) 4961–4968. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.4961>.
- [146] H. Linden, G. Macino, White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*, *EMBO Journal*. 16 (1997) 98–109. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.1.98>.
- [147] J.M. Hurley, M.S. Jankowski, H. de los Santos, A.M. Crowell, S.B. Fordyce, J.D. Zucker, N. Kumar, S.O. Purvine, E.W. Robinson, A. Shukla, E. Zink, W.R. Cannon, S.E. Baker, J.J. Loros, J.C. Dunlap, Circadian Proteomic Analysis Uncovers Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation in Metabolic Pathways, *Cell Syst*. 7 (2018) 613-626.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELS.2018.10.014>.
- [148] D. Ju, W. Zhang, J. Yan, H. Zhao, W. Li, J. Wang, M. Liao, Z. Xu, Z. Wang, G. Zhou, L. Mei, N. Hou, S. Ying, T. Cai, S. Chen, X. Xie, L. Lai, C. Tang, N. Park, J.S. Takahashi, N. Huang, X. Qi, E.E. Zhang, Chemical perturbations reveal that RUVBL2 regulates the circadian phase in mammals, *Sci Transl Med*. 12 (2020). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABA0769>.
- [149] O. Willhoft, D.B. Wigley, INO80 and SWR1 complexes: the non-identical twins of chromatin remodelling, *Current Opinion in Structural Biology*. 61 (2020) 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.09.002>.
- [150] A. Tosi, C. Haas, F. Herzog, A. Gilmozzi, O. Berninghausen, C. Ungewickell, C.B. Gerhold, K. Lakomek, R. Aebersold, R. Beckmann, K.P. Hopfner, Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex, *Cell*. 154 (2013) 1207. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.08.016>.
- [151] V.Q. Nguyen, A. Ranjan, F. Stengel, D. Wei, R. Aebersold, C. Wu, A.E. Leschziner, Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1, *Cell*. 154 (2013). <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.08.018>.
- [152] O. Willhoft, R. Bythell-Douglas, E.A. McCormack, D.B. Wigley, Synergy and antagonism in regulation of recombinant human INO80 chromatin remodeling complex, *Nucleic Acids Res*. 44 (2016) 8179–8188. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW509>.
- [153] Z.O. Jónsson, S. Jha, J.A. Wohlschlegel, A. Dutta, Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex, *Mol Cell*. 16 (2004) 465–477. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.09.033>.
- [154] R.J. Aramayo, O. Willhoft, R. Ayala, R. Bythell-Douglas, D.B. Wigley, X. Zhang, Cryo-EM structures of the human INO80 chromatin-remodeling complex, *Nature Structural and Molecular Biology*. 25 (2018) 37–44. <https://doi.org/10.1038/S41594-017-0003-7>.

- [155] R. Ayala, O. Willhoft, R.J. Aramayo, M. Wilkinson, E.A. McCormack, L. Ocloo, D.B. Wigley, X. Zhang, Structure and regulation of the human INO80-nucleosome complex, *Nature*. 556 (2018) 391–395. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0021-6>.
- [156] S. Eustermann, K. Schall, Di. Kostrewa, K. Lakomek, M. Strauss, M. Moldt, K.P. Hopfner, Structural basis for ATP-dependent chromatin remodelling by the INO80 complex, *Nature*. 556 (2018) 386–390. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0029-Y>.
- [157] Y. Feng, Y. Tian, Z. Wu, Y. Xu, Cryo-EM structure of human SRCAP complex, *Cell Research*. 28 (2018) 1121–1123. <https://doi.org/10.1038/S41422-018-0102-Y>.
- [158] O. Willhoft, M. Ghoneim, C.L. Lin, E.Y.D. Chua, M. Wilkinson, Y. Chaban, R. Ayala, E.A. McCormack, L. Ocloo, D.S. Rueda, D.B. Wigley, Structure and dynamics of the yeast SWR1-nucleosome complex, *Science*. 362 (2018). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT7716>.
- [159] S. Yamazaki, C. Gerhold, K. Yamamoto, Y. Ueno, R. Grosse, K. Miyamoto, M. Harata, The Actin-Family Protein Arp4 Is a Novel Suppressor for the Formation and Functions of Nuclear F-Actin, *Cells*. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/CELLS9030758>.
- [160] A. Miciałkiewicz, A. Chelstowska, The essential function of Swc4p-a protein shared by two chromatin-modifying complexes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*-resides within its N-terminal part, (2008).
- [161] S. Ohnuki, Y. Ohya, High-dimensional single-cell phenotyping reveals extensive haploinsufficiency, *PLOS Biology*. 16 (2018) e2005130. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2005130>.
- [162] S.H. Chen, C.P. Albuquerque, J. Liang, R.T. Suhandynata, H. Zhou, A proteome-wide analysis of kinase-substrate network in the DNA damage response, *Journal of Biological Chemistry*. 285 (2010) 12803–12812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106989>.
- [163] Y. Watanabe, Shugoshin: guardian spirit at the centromere, *Curr Opin Cell Biol*. 17 (2005) 590–595. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2005.10.003>.
- [164] Q. Zhang, H. Liu, Functioning mechanisms of Shugoshin-1 in centromeric cohesion during mitosis, *Essays Biochem*. 64 (2020) 289–297. <https://doi.org/10.1042/EBC20190077>.
- [165] X. Wang, W. Dai, Shugoshin, a guardian for sister chromatid segregation, *Exp Cell Res*. 310 (2005) 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2005.07.018>.
- [166] S.A. Kawashima, Y. Yamagishi, T. Honda, K.I. Lshiguro, Y. Watanabe, Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin, *Science*. 327 (2010) 172–177. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1180189>.

- [167] H. Liu, Q. Qu, R. Warrington, A. Rice, N. Cheng, H. Yu, Mitotic Transcription Installs Sgo1 at Centromeres to Coordinate Chromosome Segregation, *Mol Cell*. 59 (2015) 426–436. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.06.018>.
- [168] A. Sane, S. Sridhar, K. Sanyal, S.K. Ghosh, Shugoshin ensures maintenance of the spindle assembly checkpoint response and efficient spindle disassembly, *Mol Microbiol*. 116 (2021) 1079–1098. <https://doi.org/10.1111/MMI.14796>.
- [169] R. Kumar, M. Agarwal, Shugoshin: From the Perspective of Clinical Disorders, *BioChem* 2021, Vol. 1, Pages 51-59. 1 (2021) 51–59. <https://doi.org/10.3390/BIOCHEM1020006>.
- [170] C. v. Rao, M. Farooqui, Y. Zhang, A.S. Asch, H.Y. Yamada, Spontaneous development of Alzheimer’s disease-associated brain pathology in a Shugoshin-1 mouse cohesinopathy model, *Aging Cell*. 17 (2018). <https://doi.org/10.1111/ACEL.12797>.
- [171] Z. Xu, B. Cetin, M. Anger, U.S. Cho, W. Helmhart, K. Nasmyth, W. Xu, Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction, *Mol Cell*. 35 (2009) 426. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.06.031>.
- [172] N.E. Bernardes, C.A. Fukuda, T.D. da Silva, H.C. de Oliveira, A.C. de Barros, T.R. Dreyer, M.C. Bertolini, M.R.M. Fontes, Comparative study of the interactions between fungal transcription factor nuclear localization sequences with mammalian and fungal importin-alpha, *Sci Rep*. 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-58316-9>.
- [173] H.D. Chipps, G.L. Duff, Glycogen Infiltration of the Liver Cell Nuclei, *The American Journal of Pathology*. 18 (1942) 645. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2033050/> (accessed August 2, 2022).
- [174] R.C. Sun, V. v. Dukhande, Z. Zhou, L.E.A. Young, S. Emanuelle, C.F. Brainson, M.S. Gentry, Nuclear Glycogenolysis Modulates Histone Acetylation in Human Non-Small Cell Lung Cancers, *Cell Metabolism*. 30 (2019) 903-916.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2019.08.014>.
- [175] F. Caramia, G.F. Ghergo, G. Menghini, A glycogen body in liver nuclei, *Journal of Ultrastructure Research*. 19 (1967) 573–585. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80083-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80083-2).
- [176] J.C. Ferrer, S. Baqué, J.J. Guinovart, Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose, *FEBS Lett*. 415 (1997) 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01136-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01136-8).
- [177] J.M. Fernández-Novell, D. Bellido, S. Vilaró, J.J. Guinovart, Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes, *Biochem J*. 321 ( Pt 1) (1997) 227–231. <https://doi.org/10.1042/BJ3210227>.
- [178] W.A. Wilson, M.P. Boyer, K.D. Davis, M. Burke, P.J. Roach, The subcellular localization of yeast glycogen synthase is dependent upon glycogen content,

Canadian Journal of Microbiology. 56 (2010) 408–420.  
<https://doi.org/10.1139/W10-027/ASSET/IMAGES/LARGE/W10-027F10.JPEG>.

- [179] T. Mello, M. Materozzi, F. Zanieri, I. Simeone, E. Ceni, O. Bereshchenko, S. Polvani, M. Tarocchi, G. Marroncini, C. Nerlov, D. Guasti, D. Bani, M. Pinzani, A. Galli, Liver haploinsufficiency of RuvBL1 causes hepatic insulin resistance and enhances hepatocellular carcinoma progression, *International Journal of Cancer*. 146 (2020) 3410–3422. <https://doi.org/10.1002/ijc.32787>.
- [180] R. Zhao, M. Davey, Y.C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili, W.A. Houry, Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone, *Cell*. 120 (2005) 715–727. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.12.024>.
- [181] Y. Kakihara, W.A. Houry, The R2TP complex: Discovery and functions, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1823 (2012) 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.016>.
- [182] T. v. Seraphim, N. Nano, Y.W.S. Cheung, S. Aluksanasuwan, C. Colleti, Y.Q. Mao, V. Bhandari, G. Young, L. Höll, S. Phanse, Y. Gordiyenko, D.R. Southworth, C. v. Robinson, V. Thongboonkerd, L.M. Gava, J.C. Borges, M. Babu, L.R.S. Barbosa, C.H.I. Ramos, P. Kukura, W.A. Houry, Assembly principles of the human R2TP chaperone complex reveal the presence of R2T and R2P complexes, *Structure*. 30 (2022) 156-171.e12. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2021.08.002>.
- [183] H.S. Roychowdhury, D. Wong, M. Kapoor, hsp80 of *Neurospora crassa*: cDNA cloning, gene mapping, and studies of mRNA accumulation under stress, *Biochem Cell Biol*. 70 (1992) 1356–1367. <https://doi.org/10.1139/O92-184>.