

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 25/02/2024.

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 filamentoso *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 filamentoso *Neurospora crassa*"

AUTOR: JONATAS ERICK MAIMONI CAMPANELLA

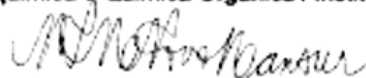
ORIENTADORA: MARIA CELIA BERTOLINI

COORDINADORA: FERNANDA ZANOLLI FREITAS

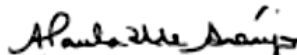
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



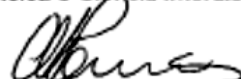
Profa. Dra. MARIA CELIA BERTOLINI (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



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^a. 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^a. 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^a. 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 co-imunoprecipitação.

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

INTRODUÇÃO	17
1. O fungo filamentoso <i>Neurospora crassa</i> como um modelo	17
2. Mecanismos moleculares envolvidos na resposta a estresse	20
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
3. Uma rede integrada: existe um núcleo comum para a resposta a estresse?	31
4. As proteínas RuvBL/Rvb e suas homólogas RVB-1 e RVB-2 de <i>N. crassa</i>	32
4.1 As proteínas RVBs na resposta a estresse.....	34
OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	37
Capítulo 1. Caracterização Bioquímica e Biofísica do complexo RVB-1/RVB-2	38
Biochemical and biophysical characterization of the RVB-1/RVB-2 protein complex, the RuvBL/RVB homologues in <i>Neurospora crassa</i>.....	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUCTION	41
2. MATERIALS AND METHODS.....	43
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
3. RESULTS	50
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 α (NclIMP α).	70
4. DISCUSSION	73
5. CONCLUSIONS	75
Funding	77
Author contributions	77
Acknowledgements	77
Conflicts of interest.....	77
Author agreement.....	77
REFERENCES	78
CAPÍTULO 2. Estudos do envolvimento do complexo RVB-1/RVB-2 na resposta a estresse em <i>Neurospora crassa</i>	84
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	85
INTRODUCTION	86
MATERIALS AND METHODS	88
<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
RESULTADOS	96
1. As proteínas RVB-1 e RVB-2 de <i>Neurospora crassa</i> desempenham uma função na resposta ao estresse	96
2. A expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2 e a localização celular são influenciadas pelo estresse	100
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

3. Experimentos de imunoprecipitação revelaram prováveis alvos de interação com a proteína RVB-1 durante estresse térmico e osmótico	107
3.1 Proteínas identificadas após estresse térmico.....	110
3.2 Proteínas identificadas após estresse osmótico	111
4. Componentes de complexos de remodelagem a cromatina podem estar envolvidos com a resposta a estresse em <i>N. crassa</i>	111
4.1. Caracterização das linhagens mutantes homocárias Δ arp-6 e Δ arp-8.....	111
4.2. Caracterização das linhagens mutantes heterocárias Δ arp-4, Δ arp-5 e Δ crc-1 (<i>swc-4</i>)	115
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>.....	117
5.1. A ORF NCU01842 de <i>N. crassa</i> codifica para uma proteína shugoshin	117
5.2. Análise fenotípica da linhagem mutante Δ 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
6. As proteínas RVB-1 e RVB-2 são componentes de grânulos de estresse em <i>N. crassa</i>	127
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.....	129
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>.....	131
DISCUSSÃO.....	137
REFERÊNCIAS.....	148
CAPÍTULO 3. Estudo do envolvimento da ciclina multifuncional PCL-1 na resposta a estresse em <i>Neurospora crassa</i>.....	161
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	162
ABSTRACT	163
IMPORTANCE	164
INTRODUCTION	165
RESULTS	168
Molecular cloning of the <i>Neurospora crassa</i> pcl-1 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
DISCUSSION	188

MATERIALS AND METHODS	193
<i>Neurospora crassa</i> strains and culture conditions.....	193
Construction of the Δ 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
ACKNOWLEDGMENTS.....	201
REFERENCES	202
REFERÊNCIAS FINAIS.....	211

INTRODUÇÃO

1. O fungo filamentoso *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 filamentoso 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.

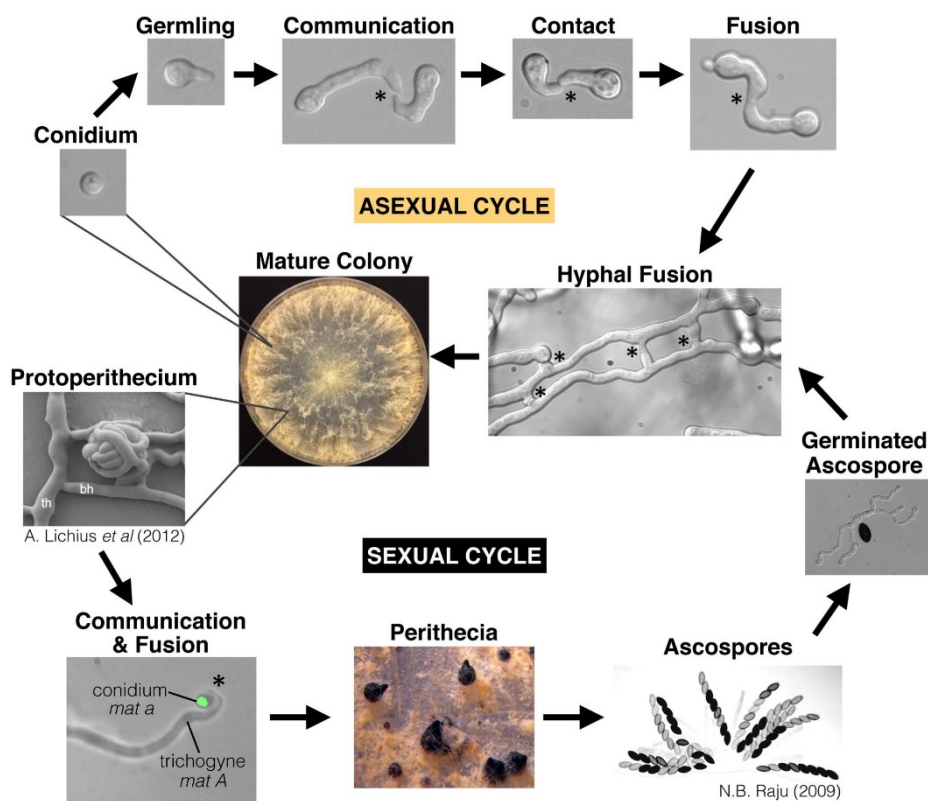


Fonte: Adaptado de <https://www.fgsc.net/Neurospora/sectionB4.htm>

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 heterotático, *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.

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)P₂ 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, Quirocho 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, Quirocho 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.semcdb.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, Freitas 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* 10.1128/MMBR.68.1.1-108.2004.
28. Hong CI, Zámboorszky J, Baek M, Labiscsak 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 Ca²⁺-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. Zámberszky 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 Co-Ordinates 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^{(-Delta Delta C(T))} 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, Grubmüller 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. 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. Lambregts, 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.
- [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 SlfA, 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/MBE08-07-0760>.
- [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/MBE02-08-0546>.
- [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. Kakiyama, 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>.