

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/01/2024.

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Instituto de Biociências de Botucatu**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Amanda Piveta Schnepfer

Caracterização funcional dos *long non-coding* RNAs (lncRNAs) de  
*Saccharomyces cerevisiae* na tolerância ao etanol

Botucatu

2022

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Instituto de Biociências de Botucatu**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Mestranda: Amanda Piveta Schnepfer**

**Orientador: Guilherme Targino Valente**

**Caracterização funcional dos *long non-coding* RNAs (lncRNAs) de  
*Saccharomyces cerevisiae* na tolerância ao etanol**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Botucatu,  
para obtenção da qualificação de  
mestrado do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, na área  
de Biotecnologia

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Schnepper, Amanda Piveta.

Caracterização funcional dos *long non-coding* RNAs (lncRNAs) de *Saccharomyces cerevisiae* na tolerância ao etanol / Amanda Piveta Schnepper. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Guilherme Targino Valente

Capes: 90400003

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. lncRNAs. 3. Etanol.  
4. Leveduras. 5. Engenharia genética.

Palavras-chave: *Long non-coding* RNA; *Saccharomyces cerevisiae*; Tolerância ao etanol.

## Agradecimentos

Nas palavras de Agatha Christie:

*“A essência da vida é andar para a frente;  
sem possibilidade de fazer ou intentar marcha a trás.”*

Porém, andar para frente nem sempre é fácil, e nesses momentos de dúvidas e dificuldade, temos a sorte de ter pessoas boas ao nosso lado. Mudar de rotina, de casa, de cidade, só foi possível por ter o apoio e a compreensão da minha mãe e do meu pai. Graças a eles, sei que sempre vou ter um “lugar para voltar”, um lugar para descansar, e a certeza de que não estou sozinha. Aqui agradeço também ao meu irmão, minha vó, minhas tias, que mesmo que distantes se fizeram presentes nesta caminhada.

Durante o mestrado, tive a sorte de encontrar bons amigos, que fizeram parte deste trabalho dentro e fora do laboratório. Agradeço ao Luiz, Camila, Farinazzo, Lazari, Flávia, Fabi e Leo, porque sem vocês talvez isso não tivesse sido possível.

Agradeço também ao Prof Guilherme, que como meu orientador me fez superar os desafios, buscar soluções para os problemas (que foram muitos), e fazer este projeto acontecer. Sou grata por ter tido a oportunidade de trabalhar no SBGL, pois aqui encontrei uma realidade muito diferente daquela que eu conhecia, e que com certeza me fez uma pessoa e uma profissional melhor.

Agradeço ao Ivan, que esteve do meu lado nos momentos mais difíceis, que me ajudou e me apoiou mesmo quando o caminho era árduo. Você fez a jornada ser mais colorida.

Agradeço também à CAPES, UNESP e à toda equipe do IBB e do programa de pós-graduação em Biotecnologia.

Juntos passamos por dificuldades, por uma pandemia, mudanças de laboratório, e todos os problemas que são possíveis de imaginar, mas estes momentos difíceis só fazem com que valorizemos mais as boas amizades. Eu agradeço a todos vocês do fundo do meu coração, e dou a certeza de que os levarei comigo para sempre.

*“Respeito, educação e liberdade.  
As pessoas têm de ser livres para  
serem felizes como elas são.”*

*- Rita Lee*

## Resumo

*Saccharomyces cerevisiae* é a levedura responsável por grande parte dos processos fermentativos do cotidiano, principalmente a produção de etanol como combustível. Dado o aumento da demanda de uso do etanol, cada vez mais a engenharia genética tem sido usada para entender o metabolismo das leveduras, elucidar as regulações envolvidas nas vias de produção de etanol e melhorar o desempenho das leveduras na fermentação. Neste trabalho, iremos explorar os lncRNA responsivos ao estresse por etanol do ponto de vista funcional. LncRNAs são moléculas de RNA com mais de 200 nt e que normalmente não codificam proteínas. Estes RNAs atuam regulando o metabolismo das células por meio de regulações transcricionais ou traducionais, uma vez que possuem a capacidade de interagir com DNA, RNA e proteínas. Experimentos de modelagem em tripla-hélice mostraram um potencial dos lncRNAs em interagir com a região promotora de diversos genes de *S. cerevisiae*, atuando tanto na sobre-expressão quanto na sub-expressão destes genes. O KO do transcr\_9136 reduziu a tolerância ao etanol e alterou a expressão dos genes RRP1 e ILT1, vizinhos a este lncRNA. Na linhagem BY4742, o KO do transcr\_10027 resultou em alterações no crescimento, redução da tolerância ao etanol e diferenças significativas nos mecanismos de resposta ao estresse, como a formação de *P-bodies* e grânulos de estresse. Desta forma, reporta-se a importância das regulações mediadas por lncRNAs no metabolismo das leveduras, o que pode contribuir para estudos posteriores e orientar experimentos de engenharia genética.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, lncRNAs, tolerância ao etanol



## **Abstract**

*Saccharomyces cerevisiae* is a yeast responsible for the ordinary fermentation processes, mainly concerning the ethanol-fuel production. The increasing demand for ethanol prompts the use of genetic engineering to understand yeast metabolism, elucidate how regulations are involved in ethanol production, and to improve ethanol yield. Herein, we explore the ethanol stress responsive lncRNAs from a functional view. The lncRNAs are RNAs larger than 200 nt that usually do not code proteins. These RNAs work on regulating the cell metabolism by transcriptional or translational regulation. The ones are also able to interact with DNA, RNA and proteins. Triple-helix interaction experiments revealed that lncRNAs may interact with promoter region of many *S. cerevisiae* genes to either up or down regulate the genes. The transcript\_9136 KO albeit the ones had reduced ethanol tolerance and exhibited RRP1 and ILT1 expression changes: these genes are close to that lncRNA. In the BY4742 strain, the transcr\_10027 KO lead to growth changes, but reduced the ethanol tolerance and caused differences in stress response mechanisms such as P-bodies and stress granules formation. Thus, the importance of lncRNA-mediated regulations in yeast metabolism is here shown, which may contribute to further studies by guiding genetic engineering experiments.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, lncRNAs, ethanol tolerance

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
INTRODUÇÃO .....	10
Bioetanol como uma alternativa sustentável a matriz energética mundial .....	10
<i>S. cerevisiae</i> e a tolerância ao etanol .....	10
lncRNAs e o metabolismo: a chave para a resistência ao etanol pode estar em um RNA não codificante .....	12
CRISPR-Cas9, uma ferramenta importante na engenharia genética .....	13
HIPÓTESE .....	14
<b>Capítulo 1</b> .....	15
INTRODUÇÃO .....	15
Estocagem e degradação de moléculas: os lncRNAs como mediadores do ciclo das moléculas dentro da célula .....	15
Artigo científico a ser submetido .....	18
Introduction .....	18
MATERIAL AND METHODS .....	20
Prediction of lncRNAs-Protein Interaction Network .....	20
Generating the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutants .....	20
Gene expression in mutant strains SEY6210 <i>transcr_9136Δ</i> and BY4742 <i>transcr_10027Δ</i> .....	24
Protein extraction and western blot analysis for strains BY4742 WT, BY4742 <i>transcr_10027Δ</i> , SEY6210 WT and SEY6210 <i>transcr_9136Δ</i> .....	25
Analysis of ethanol tolerance of mutant yeasts .....	26
RESULTS .....	26
Analysis of the impact of lncRNAs deletion on metabolism .....	26
DISCUSSION .....	30
<i>Transcr_10027</i> as one of the stress response regulators through the formation of PBs and SGs .....	30
The <i>transcr_9136</i> lncRNA as a potential regulator of the translational apparatus .....	31
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	35
INTRODUÇÃO .....	35
lncRNAs como reguladores transcricionais, pós-transcricionais e traducionais .....	35
Bioinformática e o estudo de regulação transcricional pela formação de triplas hélices (RNA:DNA:DNA) .....	36
MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
Obtenção dos lncRNAs do transcriptoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
Análise da formação de triplas hélices das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
RESULTADOS .....	39
DISCUSSÃO .....	40

conhecida. O lncRNA transcr\_10944 é o único da linhagem S288C que possui interações pertencentes à classe 9, sendo alvos os genes: ANP1 (YEL036C), HYP2 (YEL034W), MTC7 (YEL033W), RPL2A (YFR031C-A), ERG11 (YHR007C), YNL089C, TOP2 (YNL088W) e AGA1 (YNR044W). Entre estas 8 interações, temos o gene HYP2, um importante fator de alongamento da tradução (SAINI et al., 2009), o RPL2A, uma proteína que faz parte da subunidade ribossomal 60S (MESKAUSKAS; RUSS; DINMAN, 2008) e TOP2, uma topoisomerase essencial para duplicação do DNA (GITTENS et al., 2019). Este caso reporta como um lncRNA pode interferir em diferentes vias dentro da célula, além de indicar que as interações em tripla hélice podem ter um papel essencial para determinadas etapas do metabolismo e do ciclo celular.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho apresentado tem como objeto contribuir para a compreensão função e o impacto dos lncRNAs no metabolismo de *S. cerevisiae*, determinar se os lncRNAs são determinantes para a tolerância ao etanol e para a recuperação da célula após o estresse.

No primeiro capítulo, reportamos que os lncRNAs possuem um papel importante para a tolerância ao etanol. A deleção dos lncRNAs transcr\_9136 e transcr\_10027 causou alterações no crescimento e recuperação das linhagens pós o estresse, mudanças nas vias de resposta ao estresse como PBs e SGs, e também modificações na expressão de genes próximos.

No segundo capítulo, por meio de análises de tripla hélice, foi possível compreender melhor um dos mecanismos de regulação que envolve os lncRNAs, os quais vários transcritos atuam diretamente na região promotora dos genes.

Dito isto, de diferentes formas, os lncRNAs mostram-se moléculas importantes dentro da célula, atuando direta e indiretamente nas vias de transcrição e tradução, o que os torna candidatos para estudos posteriores para o entendimento do metabolismo de leveduras.

## REFERÊNCIAS

ABULWERDI, F. A.; XU, W.; AGEELI, A. A.; YONKUNAS, M. J.; ARUN, G.; NAM, H.; SCHNEEKLOTH, J. S.; DAYIE, T. K.; SPECTOR, D.; BAIRD, N.; LE GRICE, S. F. J. Selective Small-Molecule Targeting of a Triple Helix Encoded by the Long Noncoding RNA, MALAT1. **ACS Chemical Biology**, [s. l.], 2019.

ALI, T.; GROTE, P. Beyond the RNA-dependent function of LncRNA genes. **eLife**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 1–14, 2020.

ANDERSON, D. M.; ANDERSON, K. M.; CHANG, C. L.; MAKAREWICH, C. A.; NELSON, B. R.; MCANALLY, J. R.; KASARAGOD, P.; SHELTON, J. M.; LIOU, J.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. **Cell**, [s. l.], v. 160, n. 4, p. 595–606, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009>>

BEREZIKOV, E.; GURYEV, V.; CUPPEN, E. CONREAL web server: Identification and visualization of conserved transcription factor binding sites. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 33, n. SUPPL. 2, p. 447–450, 2005.

BHAN, A.; MANDAL, S. S. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1856, n. 1, p. 151–164, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.07.001>>

BROWN, J. A.; BULKLEY, D.; WANG, J.; VALENSTEIN, M. L.; YARIO, T. A.; STEITZ, T. A.; STEITZ, J. A. Structural insights into the stabilization of MALAT1 noncoding RNA by a bipartite triple helix. **Nature Structural and Molecular Biology**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 633–640, 2014.

BUCHAN, J. R.; MUHLRAD, D.; PARKER, R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 183, n. 3, p. 441–455, 2008.

BUCHAN, J. R.; YOON, J. H.; PARKER, R. Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 228–239, 2011.

BUSKE, F. A.; BAUER, D. C.; MATTICK, J. S.; BAILEY, T. L. Triplexator: Detecting nucleic acid triple helices in genomic and transcriptomic data. **Genome Research**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1372–1381, 2012.

CHEKANOVA, J. A. Long non-coding RNAs and their functions in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 27, p. 207–216, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.003>>

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 3541–3549, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.04.031>>

D, □; INÉS FERNÁNDEZ-ULIBARRI, □ V; VILELLA, M.; LÁZARO-DIÉGUEZ, F.; SARRI, E.; MARTÍNEZ, S. E.; JIMÉNEZ, N.; CLARO, E.; MÉRIDA, I.; BURGER, K. N. J.; EGEA,

G. Diacylglycerol Is Required for the Formation of COPI Vesicles in the Golgi-to-ER Transport Pathway. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 18, n. June, p. 3250–3263, 2007.

DELLOMONACO, C.; FAVA, F.; GONZALEZ, R. *Path Of Next Generation Biofuels* fulltext.Pdf. [s. l.], p. 1–15, 2010.

DEMMELE, L.; BECK, M.; KLOSE, C.; SCHLAITZ, A.-L.; GLOOR, Y.; HSU, P. P.; HAVLIS, J.; SHEVCHENKO, A.; KRAUSE, E.; KALAIIDZIDIS, Y.; WALCH-SOLIMENA, C. Nucleocytoplasmic shuttling of the Golgi phosphatidylinositol 4-kinase Pik1 is regulated by 14-3-3 proteins and coordinates Golgi function with cell growth. **Molecular biology of the cell**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 1046–1061, 2008.

DEVENISH, R. J.; PRESCOTT, M.; ROUCOU, X.; NAGLEY, P. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1458, n. 2–3, p. 428–442, 2000.

ESCUDEÉ, C.; FRANÇOIS, J. christophe; SUN, J. sheng; OTT, G.; SPRINZL, M.; GARESTIER, T.; HEÉLENE, J. christophe. Stability of triple helices containing RNA and DNA strands: Experimental and molecular modeling studies. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 21, n. 24, p. 5547–5553, 1993.

FANG, Y.; FULLWOOD, M. J. **Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer**. [s.l.] : Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences and Genetics Society of China, 2016. v. 14 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.09.006>>

FERRÉ, F.; COLANTONI, A.; HELMER-CITTERICH, M. Revealing protein-lncRNA interaction. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 106–116, 2016.

GALIPON, J.; MIKI, A.; ODA, A.; INADA, T.; OHTA, K. Stress-induced lncRNAs evade nuclear degradation and enter the translational machinery. **Genes to Cells**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 353–368, 2013.

GITTENS, W. H.; JOHNSON, D. J.; ALLISON, R. M.; COOPER, T. J.; THOMAS, H.; NEALE, M. J. A nucleotide resolution map of Top2-linked DNA breaks in the yeast and human genome. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–16, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-12802-5>>

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 2086–2097, 2008.

GOMES, A. Q.; REAL, C.; ANTUNES, F.; MARINHO, H. S.; NOLASCO, S.; SOARES, H. **Noncoding RNAs as Critical Players in Regulatory Accuracy, Redox Signaling, and Immune Cell Functions**. [s.l.] : Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00010-3>>

HEO, J. B.; SUNG, S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. **Science**, [s. l.], v. 331, n. 6013, p. 76–79, 2011.

HUBSTENBERGER, A.; COUREL, M.; BÉNARD, M.; SOUQUERE, S.; ERNOULT-

LANGE, M.; CHOUAIB, R.; YI, Z.; MORLOT, J. B.; MUNIER, A.; FRADET, M.; DAUNESSE, M.; BERTRAND, E.; PIERRON, G.; MOZZICONACCI, J.; KRESS, M.; WEIL, D. P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 144- 157.e5, 2017.

IVANOV, P.; KEDERSHA, N.; ANDERSON, P. Stress granules and processing bodies in translational control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2019.

JAKOČINAS, T.; BONDE, I.; HERRGÅRD, M.; HARRISON, S. J.; KRISTENSEN, M.; PEDERSEN, L. E.; JENSEN, M. K.; KEASLING, J. D. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 28, p. 213–222, 2015.

JARROUX, J.; MORILLON, A.; PINSKAYA, M. **History, discovery, and classification of lncRNAs**. [s.l: s.n.]. v. 1008

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A Programmable Dual-RNA – Guided. [s. l.], v. 337, n. August, p. 816–822, 2012.

KEELING, K. M.; SALAS-MARCO, J.; OSHEROVICH, L. Z.; BEDWELL, D. M. Tpa1p Is Part of an mRNP Complex That Influences Translation Termination, mRNA Deadenylation, and mRNA Turnover in *Saccharomyces cerevisiae* . **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 26, n. 14, p. 5237–5248, 2006.

LÁZARI, L. C.; WOLF, I. R.; SCHNEPPER, A. P.; VALENTE, G. T. LncRNAs of *Saccharomyces cerevisiae* dodge the cell cycle arrest imposed by the ethanol stress. [s. l.], v. 6210, p. 1–29, 2021.

LEASE, R. A.; CUSICK, M. E.; BELFORT, M. Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 21, p. 12456–12461, 1998.

LEI, E. P.; STERN, C. A.; FAHRENKROG, B.; KREBBER, H.; MOY, T. I.; AEBI, U.; SILVER, P. A. Sac3 is an mRNA export factor that localizes to cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 836–847, 2003.

LIMA, N.; TEIXEIRA, A. Alcohol Production from Cheese Whey. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 507–514, 2001.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. de L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; DE AMORIM NETO, H. B.; DE AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 47, p. 64–76, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>>

LUCAS FARINAZZO, M.; IVAN RODRIGO, W.; LAZARI, L. C.; ALMEIDA, L. F. De; SCHNEPPER, A. P.; CARDOSO, L. H.; MORAES, L. N. De; GROTTTO, R. M. T.; SIMÕES, R. P.; RAMOS, É.; VALENTE, G. T. Long non-coding RNAs bind to proteins relevant to the ethanol tolerance in yeast: a systems biology view. [s. l.], p. 1–27, 2021.

MESKAUSKAS, A.; RUSS, J. R.; DINMAN, J. D. Structure/function analysis of yeast ribosomal protein L2. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1826–1835, 2008.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>>

QIAO, F.; CECH, T. R. Triple-helix structure in telomerase RNA contributes to catalysis. **Nature Structural and Molecular Biology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 634–640, 2008.

RINE, J.; GF, S.; HERSKOWITZ, I. rme1 Mutation of *Saccharomyces cerevisiae*: map position and bypass of mating type locus control of sporulation. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 1, n. 10, p. 958–960, 1981.

ROM, A.; MELAMED, L.; GIL, N.; GOLDRICH, M. J.; KADIR, R.; GOLAN, M.; BITON, I.; PERRY, R. B. T.; ULITSKY, I. Regulation of CHD2 expression by the Chaserr long noncoding RNA gene is essential for viability. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13075-8>>

RYAN, O. W.; PODDAR, S.; CATE, J. H. D. Crispr–cas9 genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2016, n. 6, p. 525–533, 2016.

SAINI, H. K.; ENRIGHT, A. J.; GRIFFITHS-JONES, S. Annotation of mammalian primary microRNAs. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 9, p. 1–19, 2008.

SAINI, P.; EYLER, D. E.; GREEN, R.; DEVER, T. E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, [s. l.], v. 459, n. 7243, p. 118–121, 2009.

SHAH, K. H.; ZHANG, B.; RAMACHANDRAN, V.; HERMAN, P. K. Processing body and stress granule assembly occur by independent and Differentially regulated pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 109–123, 2013.

SHIVANGE, G.; KODIPELLI, N.; MONISHA, M.; ANINDYA, R. A role for *Saccharomyces cerevisiae* Tpa1 protein in direct alkylation repair. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 289, n. 52, p. 35939–35952, 2014.

SNOEK, T.; VERSTREPEN, K. J.; VOORDECKERS, K. How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations? **Current Genetics**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 475–480, 2016.

SNOWDON, C.; SCHIERHOLTZ, R.; POLISZCZUK, P.; HUGHES, S.; VAN DER MERWE, G. ETP1/YHL010c is a novel gene needed for the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 372–380, 2009.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 13–24, 2010. a.

STANLEY, D.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A.; BORNEMAN, A.; FRASER, S.

Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 231–239, 2010. b.

STATELLO, L.; GUO, C. J.; CHEN, L. L.; HUARTE, M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 96–118, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>>

SUN, J. S.; GARESTIER, T.; HÉLÈNE, C. Oligonucleotide directed triple helix formation. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 327–333, 1996.

SZCZEŚNIAK, M. W.; MAKAŁOWSKA, I. LncRNA-RNA interactions across the human transcriptome. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–11, 2016.

TKACH, J. M.; YIMIT, A.; LEE, A. Y.; RIFFLE, M.; COSTANZO, M.; JASCHOB, D.; HENDRY, J. A.; OU, J.; MOFFAT, J.; BOONE, C.; DAVIS, T. N.; NISLOW, C.; BROWN, G. W. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 966–976, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncb2549>>

TZENG, Y. W.; HUANG, J. N.; SCHUYLER, S. C.; WU, C. H.; JUANG, Y. L. Functions of the mitotic B-type cyclins CLB1, CLB2, and CLB3 at mitotic exit antagonized by the CDC14 phosphatase. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 966–978, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2011.07.001>>

VAUDANO, E.; COSTANTINI, A.; NOTI, O.; GARCIA-MORUNO, E. An RT-qPCR approach to study the expression of genes responsible for sugar assimilation during rehydration of active dry yeast. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 802–808, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.010>>

WANG, C. Y.; WEN, W. L.; NILSSON, D.; SUNNERHAGEN, P.; CHANG, T. H.; WANG, S. W. Analysis of stress granule assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. **Rna**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 694–703, 2012.

WANG, G. Q.; WANG, Y.; XIONG, Y.; CHEN, X. C.; MA, M. L.; CAI, R.; GAO, Y.; SUN, Y. M.; YANG, G. S.; PANG, W. J. Sirt1 AS lncRNA interacts with its mRNA to inhibit muscle formation by attenuating function of miR-34a. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. October 2015, p. 1–13, 2016.

WANG, J.; TAN, J.; QI, Q.; YANG, L.; WANG, Y.; ZHANG, C.; HU, L.; CHEN, H.; FANG, X. MiR-487b-3p suppresses the proliferation and differentiation of myoblasts by targeting IRS1 in skeletal muscle myogenesis. **International Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 760–774, 2018.

WOLF, I. R.; MARQUES, L. F.; ALMEIDA, L. F. De; LÁZARI, L. C.; MORAES, L. N. De; CARDOSO, L. H.; OLIVEIRA, C. C. De; NAKAJIMA, R. T.; SCHNEPPER, A. P.; GOLIM, M. de A.; CATALDI, T. R.; NIJLAND, J. G.; PINTO, C. M.; FIORETTO, M. N.; ALMEIDA, R. O.; DRIESSEN, A. J. M.; SIMÕES, R. P.; LABATE, M. V.; TOMMASINI, REJANE M GROTTO, C. A. L.; JUNIOR, A. F.; JUSTULIN, L. A.; COAN, R. L. B.; RAMOS, É.; FURTADO, F. B.; MARTINS, C.; VALENTE, G. T. The ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* under a phenomics perspective. **bioRxiv**, [s. l.], p. 1–41, 2021.



YAMASHITA, A.; SHICHINO, Y.; YAMAMOTO, M. The long non-coding RNA world in yeasts. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, [s. l.], v. 1859, n. 1, p. 147–154, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.08.003>>

YIN, Y.; YAN, P.; LU, J.; SONG, G.; ZHU, Y.; LI, Z.; ZHAO, Y.; SHEN, B.; HUANG, X.; ZHU, H.; ORKIN, S. H.; SHEN, X. Opposing roles for the lncRNA haunt and its genomic locus in regulating HOXA gene activation during embryonic stem cell differentiation. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 504–516, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.03.007>>

YOU, K. M.; ROSENFELD, C. L.; KNIPPLE, D. C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 1499–1503, 2003.

ZHANG, M.; XIAO, Y.; ZHU, R.; ZHANG, Q.; WANG, S. L. Enhanced thermotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* mutated by high-energy pulse electron beam and protoplast fusion. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 1455–1465, 2012.

ZHOU, Z.; GILES, K. E.; FELSENFELD, G. DNA-RNA triple helix formation can function as a cis-acting regulatory mechanism at the human  $\beta$ -globin locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 116, n. 13, p. 6130–6139, 2019.