RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/05/2024. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências de Botucatu Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Camila Moreira Pinto

Estudo do fluxo de prótons em Saccharomyces cerevisiae sob estresse etanólico

Botucatu

2022

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências de Botucatu Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Camila Moreira Pinto

Estudo do fluxo de prótons em Saccharomyces cerevisiae sob estresse etanólico

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia do IBB-UNESP/Botucatu para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Guilherme Targino Valente

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

Pinto, Camila Moreira. Estudo do fluxo de prótons em Saccharomyces cerevisiae sob estresse etanólico / Camila Moreira Pinto. - 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. Eisossoma. 3. Prótons. 4. Etanol. 5. Leveduras (Fungos).

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae é amplamente utilizada na produção de bioetanol e as elevadas concentrações de etanol durante a fermentação representam um dos estressores mais comuns que afetam inicialmente a membrana citoplasmática. Entretanto, o conhecimento acerca da dinâmica dos compartimentos da membrana plasmática em S. cerevisiae sob estresse etanólico é incipiente. Aqui, objetivou-se buscar por características que contribuam para a melhor compreensão da dinâmica dos compartimentos eisossoma e MCP em resposta ao estresse etanólico em S. cerevisiae. Durante 240 min, células da linhagem BY4741 foram expostas a diferentes concentrações de etanol e analisou-se a acidificação do meio extracelular, taxa de crescimento, sublocalização celular de proteínas e análises da expressão gênica e proteica. Os resultados mostraram que o etanol tem influência na interação entre os compartimentos MCP e eisossoma, afetando diretamente o fluxo de prótons entre a célula e o meio externo e o nível de interferência é norteado pelo percentual de etanol. Adicionalmente, a redução da Pma1p (MCP) em células sob estresse por etanol corrobora a baixa atividade de fluxo de prótons. O aumento de eisossomas juntamente com o aumento de Can1p e Xrn1p sugerem um papel protetor e regulador do eisossoma durante o estresse por etanol. Por fim, demonstramos o aumento de grânulos de estresse vinculado ao aumento de eisossomas durante o estresse por etanol. Em suma, reportamos algumas características-chave para a compreensão da dinâmica dos compartimentos eisossoma e MCP em resposta estresse etanólico, evidenciamos a importância da interação entre os compartimentos de membrana plasmática com vias regulatórias responsáveis pelo homeostase iônica intracelular e degradação de mRNA e sugerimos que eisossomas podem representar uma importante resposta celular adaptativa ao estresse por etanol.

Palavras-chave: Estresse etanólico; Eisossoma; Fluxo de prótons; *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae is widely used in the bioethanol production and the high ethanol concentrations during fermentation represent one of the most common stressors that initially affect the cytoplasmic membrane. However, the knowledge about dynamics of plasma membrane compartments in S. cerevisiae under ethanolic stress is incipient. Here, the objective was to search for characteristics that contribute to a better understanding of the dynamics of eisosome and MCP compartments in response to ethanolic stress in S. cerevisiae. During 240 min, BY4741 cells were exposed to different ethanol concentrations and the acidification of extracellular environment, growth rate, cellular protein sublocalization and gene and protein expression analysis were analyzed. The results showed that ethanol has an influence on the interaction between MCP and eisosome compartments, directly affecting the proton flow between cell and external environment, and the interference level is guided by the ethanol percentage. Additionally, the Pma1p (MCP) reduction in cells under ethanol stress corroborates with the proton flux activity low. The increase in eisosomes together with the increase in Can1p and Xrn1p suggest a protective and regulatory role of the eisosome during ethanol stress. Finally, we demonstrate the increase in stress granules linked to the increase in eisosomes during ethanol stress. In summary, we report some key-features for understanding the dynamics of eisosome and MCP compartments in response to ethanolic stress, highlight the importance of interaction between plasma membrane compartments with regulatory pathways responsible for intracellular ionic homeostasis and mRNA degradation and suggest that eisosomes may represent an important adaptive cellular response to ethanol stress.

Key-words: Ethanolic stress; Eisosome; Proton flux; Saccharomyces cerevisiae.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maurício e Edina, e ao meu irmão, Julio César, pelo amor e apoio incondicional. Sempre presentes em todos os momentos da minha vida. Me ensinaram a ser forte e perseverante em meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Targino Valente, agradeço a confiança e ensinamentos passados. Nada disso seria possível sem a sua ajuda.

Ao pessoal do SBGL, Amanda, Luiz, Ivan, Lazari, Farinazzo e agregados, agradeço pela amizade dentro e fora do laboratório. Vocês foram a peça-chave para esse trabalho acontecer.

Agradeço ao Pedro pelo carinho, partilha, companheirismo e, claro, as temidas análises estatísticas rs.

A todos da BPI Biotecnologia, agradeço o incentivo e apoio durante os dois anos de mestrado. Esse trabalho também não teria acontecido sem o apoio de vocês.

Agradeço a UNESP/Botucatu, IBB e ao programa de pós-graduação em Biotecnologia.

Agradeço aos bons amigos (antigos ou novos) que a vida me trouxe, com certeza são companheiros que continuarão presentes.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha pós-graduação, minha eterna gratidão!

"Ideias podem ser roubadas, mas ninguém pode roubar execução ou paixão" - Timothy Ferriss

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
INTRODUÇÃO1	0
Biocombustíveis e a produção de bioetanol no Brasil1	0
Saccharomyces cerevisiae e a tolerância ao etanol1	1
Compartimentação da membrana plasmática de S. cerevisiae 1	13
A troca de prótons entre a célula e o meio externo em <i>S. cerevisiae</i> é dependente da interação entre eisossoma e MCP1	э 15
Eisossoma e a regulação de proteínas pertencentes ao loop de mRNA 1	6
OBJETIVO 1	8
MATERIAIS E MÉTODOS 1	9
Linhagem selecionada para o estudo1	9
Ativação e expansão das linhagens2	21
Teste acidificação do meio de crescimento e taxa de crescimento sob diferentes porcentagens de etanol	21
Microscopia de fluorescência: quantificação de GFP e avaliação da localização intracelular das proteínas Pil1p e Pma1p2	21
Extração de RNA total e expressão gênica relativa por qPCR2	22
Extração de proteínas e quantificação via <i>western blot</i>	<u>2</u> 4
Descrição das análises estatísticas2	25
RESULTADOS	27
Acidificação do meio extracelular e taxa de crescimento populacional em diferentes porcentagens de etanol2	27
Localização subcelular das proteínas Pma1p e Pil1p e quantificação GFP2	28
Expressão gênica relativa por PCR em tempo real (qPCR)	31
Avaliação da abundância das proteínas Dcp1a, elF4E e Pabp via western blot 3	31
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Aminoácido-poliamina-organocátion
ATP	do inglês, Adenosine triphosphate
cDNA	do inglês, <i>Complementary DNA</i>
EtOH	Etanol
F	do inglês, <i>Forward</i>
GFP	do inglês, Green fluorescent protein
GRAS	do inglês, Generally Regarded As Safe
MCC	do inglês, Membrane compartment of Pma1
MCP	do inglês, Membrane compartment of Can1
MCT	do inglês, Membrane compartment of TORC2
mRNA	do inglês, <i>messenger RNA</i>
OD ₆₂₀	Densidade óptica em 620 nm
RNA	do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
ORFs	do inglês, <i>Open Reading Frames</i>
pb	Pares de base
PBs	do inglês, <i>P-bodies</i>
PCR	do inglês Polymerase chain reaction
рН	Potencial hidrogeniônico
qPCR	do inglês Quantitative Polymerase chain reaction
R	do inglês, <i>Reverse</i>
SGs	do inglês, stress granules (grânulos de estresse)
TBS	do inglês, <i>Tris-buffered saline</i>
TORC2	Complexo de Rapamicina 2
YPD	do inglês Yeast extract, peptone and dextrose medium

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Compartimentos da membrana plasmática de S cerevisiae
Figura 2 - Estratégia utilizada para gerar a coleção de clones de GFP de S. cerevisiae
Figura 3 - Workflow das análises desenvolvidas no presente estudo 20
Figura 4 - Demonstração da identificação de objetos primários das células BY4741- Pma1p-GFP e BY4741-Pil1p-GFP no CellProfiler22
Figura 5 - Gráfico de linha de pH e OD ₆₂₀ para células submetidas a 0%, 6%, 12% e 18% de estresse etanólico ao longo de 240 min27
Figura 6 - Gráfico de dispersão entre pH e OD ₆₂₀ sob estresse etanólico de 6%, 12% e 18%
Figura 7 - Imagens de microscopia de fluorescência para a linhagem BY4741- Pma1p-GFP tratadas com 0% e 18% de estresse etanólico por 240 min
Figura 8 - Imagens de microscopia de fluorescência para a linhagem BY4741-Pil1p- GFP tratadas com 0% e 18% de estresse etanólico por 240 min
Figura 9 - Média e erro-padrão da intensidade de fluorescência de células BY4741- Pma1p-GFP e BY4741-Pil1p-GFP
Figura 10 - Expressão gênica relativa de PIL1, CAN1, XRN1 e PMA1 em 0 min e 240 min de exposição à 0% e 18% de etanol
Figura 11- Quantificação das proteínas Dcp1a, PABP e elF4E via western blot após 240 min tratamento com 0% e 18% de etanol

Além disso, encontramos um aumento da quantidade da proteína PABP em células sob alto nível de estresse por etanol, indicando um aumento de SGs durante esse estresse. Os eisossomas podem estimular diretamente a montagem de SGs através do recrutamento subcortical da Pkc1p ativa (AMEN; KAGANOVICH, 2020). A formação de SGs no contexto de estresse permite uma re-inicialização mais rápida da divisão celular após a finalização do estresse (AMEN; KAGANOVICH, 2020). Um estudo demonstrou uma menor abundância de SGs na ausência de eisossomas, resultando em uma recuperação tardia do estresse devido a Pkc1p estar desprotegida da degradação (AMEN; KAGANOVICH, 2020). O aumento de PABP e consequentemente dos SGs, pode ser parcialmente explicado pelo aumento dos compartimentos eisossomas durante o elevado estresse etanólico.

Por fim, aparentemente, o aumento do compartimento eisossoma representa uma possível resposta celular adaptativa no enfrentamento das altas concentrações de etanol, indicando uma possível função protetora dos eisossomas. Assim, nossas descobertas contribuem para uma melhor compreensão da dinâmica dos compartimentos da membrana plasmática eisossoma e MCP em células durante o estresse por etanol. Esses dados também reforçam a importância da interação entre os compartimentos da membrana plasmática com diferentes vias regulatórias, como a regulação de transportadores de prótons/nutrientes e a via de degradação de mRNAs. Portanto, as descobertas acerca dos compartimentos eisossoma e MCP no nosso estudo podem fornecer as bases para estudos futuros a fim de desenvolver linhagens mais tolerantes ao etanol, impactando positivamente a produção de biocombustíveis ao redor do mundo.

CONCLUSÃO

A utilização de dados da avaliação de acidificação de meio extracelular, taxa de crescimento populacional, a sublocalização celular e quantificação GFP de proteínas por microscopia de fluorescência, bem como análises de expressão gênica e proteica, possibilitou encontramos uma combinação de características chaves para a melhor compreensão da dinâmica dos compartimentos eisossoma e MCP em resposta ao estresse etanólico em linhagens BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*. Uma delas foi a redução da atividade de fluxo de prótons durante estresse etanólico,

o qual foi modulado pelo percentual de etanol imposto. Além disso, destacamos o aumento dos compartimentos eisossoma durante o estresse etanólico, assim como simportadores APC e proteínas de outros mecanismos intracelulares, confirmando o papel protetor e regulador desse compartimento também durante o estresse por etanol. Por fim, o aumento de SGs atrelado ao aumento dos eisossomas em células sob alto nível de estresse, pode ser entendido como um mecanismo benéfico de resposta ao estresse etanólico para a rápida retomada das funções celulares pósestresse.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L, F. Análise das linhagens de Saccharomyces cerevisiae expostas ao estresse por etanol. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Biociências (IBB) - UNESP. Botucatu, p. 58, 2017.

AMEN, T.; KAGANOVICH, D. Stress granules sense metabolic stress at the plasma membrane and potentiate recovery by storing active Pkc1. **Science Signaling**, v. 13, n. 623, eaaz6339, 2020.

AMBESI, A. et al. W. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H (+)-ATPase. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 1, p. 155-160, 2000.

AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 91, n. 5, p. 1267-75, 2011.

ANDERSON, P., KEDERSHA, N. RNA granules. **The Journal of cell biology**, v. 172, n. 6, p. 803-808, 2006.

BASTOS, V. D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v.1, n. 25, p. 5-38, 2007.

BERCHTOLD, D.; WALTHER, T.C. 2009. TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. **Mol. Biol. Cell**, v. 20, p. 1565–75, 2009.

BIANCHI, F. et al. Steric exclusion and protein conformation determine the localization of plasma membrane transporters. **Nat. Commun.**, v. 9, p. 501, 2018.

BIANCHI, F. et al. Regulation of Amino Acid Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and molecular biology reviews. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 83, n. 4: e00024-19, 2019.

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

BUSTO, J. V. et al. Lateral plasma membrane compartmentalization links protein function and turnover. **EMBO J**., v. 37, e99473, 2018.

BUSTO, J. V.; WEDLICH-SÖLDNER, R. Integration Through Separation – The Role of Lateral Membrane Segregation in Nutrient Uptake. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, p. 97, 2019.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHANDLER, M. et al. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 427– 454, 2004.

CHAKRABORTY, S. et al. Biomass to biofuel: a review on production technology. **AsiaPacific Journal of Chemical Engineering**, v. 7, n. SUPPL. 3, p. S254–S262, ago. 2012.

CHAVES, M.C.C.; GOMES, C.F.S. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. **Prod**., v. 24, n. 3, p. 495-507, 2014.

DEMEKE, M. M. et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 89, 2013.

37

DEMIRBAS, A. Tomorrow's biofuels: Goals and hopes. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 39, n. 7, p. 673–679, 2017.

DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 253-63, 2009.

DOUGLAS, L.M.; KONOPKA, J.B. Fungal membrane organization: the eisosome concept. **Annu Rev Microbiol**, v. 68, p. 377–393, 2014.

DOUGLAS, L.M.; KONOPKA, J.B.; Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. **J Microbiol**, v. 54, p. 178 –191, 2016.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: a promising microrganism for alcoholic fermentation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.

FORREST, L.R.; KRÅMER, R.; ZIEGLER, C. The structural basis of secondary active transport mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1807, n. 2, p. 167-88, 2011.

FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res, v. 8, p. 979-995, 2008.

GALDIERI, L. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. **OMICS**. v. 14, n. 6, p. 629-38, 2010.

GOFFEAU, A., et al. Life with 6000 genes. Science, v. 274, p. 546–567, 1996.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, jan. 2015.

GROUSL, T. et al. Evolutionarily Conserved 5'-3' Exoribonuclease Xrn1 Accumulates at Plasma Membrane-Associated Eisosomes in Post-Diauxic Yeast. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0122770, 2015.

GROSSMANN, G. et al. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. **EMBO J**., v. 26, p.1–8, 2007.

HUH, W. et al. Global Analysis of Protein Localization in Budding Yeast. **Nature**, v. 425, p. 686-691, 2003.

JACOBSON, K.; LIU, B. P; LAGERHOLM, C. The Lateral Organization and Mobility of Plasma Membrane Components. **Cell**, v. 177, n. 4, p. 806-819, 2019.

JIA, K.; ZHANG, Y.; LI, Y. Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance. Engineering in Life Sciences, v. 10, n. 5, p. 422–429, 2010.

JUNQUEIRA, T. L. et al. Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 1-12, 2017.

KANE, P. M. Proton Transport and pH Control in Fungi. In: RAMOS, J; SYCHROVÁ,
H.; KSCHISCHO, M. (eds). Yeast Membrane Transport. Advances in Experimental Medicine and Biology, **Springer**, v.892, p. 33 – 68, 2016. DOI: 10,1007 / 978-3-319-25304-6

KOCK, C. et al. Yeast cell wall integrity sensors form specific plasma membrane microdomains important for signalling. **Cell Microbiol**, v. 18, p. 1251–1267, 2016.

KURODA, K. et al. Critical roles of the pentose phosphate pathway and GLN3 in isobutanol-specific tolerance in yeast. **Cell Systems**, v. 9, n. 6, p. 534-547, 2019.

KURTZMAN, C.; ROBNETT, C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene. **Journal of clinical microbiology**. v. 35, p. 1216-23,1997.

LABNO, A.; TOMECKI, R.; DZIEMBOWSKI, A. Cytoplasmic RNA decay pathways enzymes and mechanisms. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1863, n. 12, p. 3125-3147, 2016.

LAMB, T.M. et al. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. **J Biol Chem**, v. 276, n. 3, p. 1850–1856, 2001.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 4, p. 402-8, 2001.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 829-45, 2010.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p.157-165, 2007.

MALINSKA, K. et al. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 14, p. 4427–36, 2003.

MALINSKA, K. et al. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. **J. Cell Sci**, v. 117, p. 6031–41, 2004.

MALPARTIDA, F.; SERRANO, R. Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. **FEBS letters**, v. 111, n. 1, p. 69-72, 1980.

MARTINS, A. L.; WANKE, P.; CHEN, Z.; ZHANG, N. Ethanol production in Brazil: An assessment of main drivers with MCMC generalized linear mixed models. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 132, p. 16-27, 2018.

MASCARAQUE, V. et al. Phosphoproteomic analysis of protein kinase c signaling in *Saccharomyces cerevisiae* reveals Slt2 mitogen-activated protein kinase (MAPK)dependent phosphorylation of eisosome core components. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 12, p. 557–574, 2013.

MENDOÇA, E.A.M. et al. Activation and biochemical identification of gras strains of *Saccharomyces cerevisiae* with biotechnological potential. **SAJEBTT**, v.6 n.2, p. 237-243, 2019.

MOHARIR, A., GAY, L., MARKUS, B. Mitochondrial energy metabolism regulates the nutrient import activity and endocytosis of APC transporters. **FEBS letters**, 2022.

MOHARIR, A. et al. Eisosomes are metabolically regulated storage compartments for APC-type nutrient transporters. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, n. 17, p. 2113–2127, 2018.

MONCADA, J. A et al. Exploring policy options to spur the expansion of ethanol production and consumption in Brazil: An agent-based modeling approach. **Energy Policy**, v.123, p. 619-641, 2018.

MOREIRA, K.E. et al. Pil1 controls eisosome biogenesis. **Mol Biol Cell**, v. 20, p. 809– 818, 2009.

MUELLER, L. P. et al. O potencial associado das fontes renováveis e *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol. **Educação Ambiental em Ação**, v. 18, n. 68, 2019.

MURLEY, A. et al. Sterol transporters at membrane contact sites regulate TORC1 and TORC2 signaling. **J Cell Biol**, v. 216, p. 2679–2689, 2017.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. **Biotechnol Adv**, v .28, n. 6, p. 817-830, 2010.

NAVARRO-TAPIA, E. et al. Ethanol Cellular Defense Induce Unfolded Protein Response in Yeast. Front Microbiol. v. 7, n.189, 2016.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011.

ORIJ, R. et al. Genome-wide analysis of intracellular pH reveals quantitative control of cell division rate by pHc in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome biology**, v. 13, n. 9, p. 1-15, 2012.

PARKER, R. RNA degradation in *Saccharomyces cerevisae*. **Genetics**, v. 191, n. 3, p. 671-702, 2012.

SÁ-CORREIA, I.; GODINHO, C. P. Exploring the biological function of efflux pumps for the development of superior industrial yeasts, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 74, p. 32-41, 2022.

SAIER, M. H., et al. The transporter classification database (TCDB): recent advances. **Nucleic Acids Res**., v. 44, p.372–379, 2016.

SCHUBERTH, C.; WEDLICH-SÖLDNER, R.; Building a patchwork - the yeast plasma membrane as model to study lateral domain formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1853, p. 767–774, 2015.

STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 1, p. 13–24, 2010.

STRADALOVA, V. et al. Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. J. Cell Sci. v. 122, p. 2887–94, 2009.

SWISHER, K. D.; PARKER, R. Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10006, 2010.

TIMMERS, H. T. M.; TORA, L. Transcript Buffering: A Balancing Act between mRNA Synthesis and mRNA Degradation. **Mol Cell**, v. 72, n. 1, p.10-17, 2018.

TSIEN, R.Y. The Green Fluorescent Protein. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 509-544, 1998.

VAN DER REST, M.E. et al. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. **Microbiol Rev**, v. 59, n. 2, p. 304-22, 1995.

VAUDANO, E. et al. Identification of reference genes suitable for normalization of RTqPCR expression data in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1593–1599, 2011.

VASKOVICOVA, K. et al. mRNA decay is regulated via sequestration of the conserved 5'-3' exoribonuclease Xrn1 at eisosome in yeast. **European Journal of Cell Biology**, v. 96, n. 6, p. 591-599, 2017.

WALTHER, T. C. et al. Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. **EMBO J.** v. 26, p. 4946–4955, 2007.

WALTHER, T.C. et al. Eisosomes mark static sites of endocytosis. **Nature**, v. 439, p. 998–1003, 2006.

WIEDERHOLD, E. et al. Proteomics of *Saccharomyces cerevisiae* Organelles. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 9, n. 3, p. 431–445, 2010.

WOLF, I. R. Identificação de assinaturas sistêmicas associadas à tolerância ao etanol em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) -Instituto de Biociências (IBB) - UNESP. Botucatu, p. 118, 2019.

WOLF, I. R. et al. The ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* under a phenomics perspective. **bioRxiv**, [s. l.], p. 1–41, 2021.

YANG, J.; TAVAZOIE, S. Regulatory and evolutionary adaptation of yeast to acute lethal ethanol stress. **PLoS One**. v. 15, n. 11, p. e0239528, 2020.

ZHANG, Y. et al. The importance of engineering physiological functionality into microbes. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 664–672, 2009.