

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).

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

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 nortado 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
INTRODUÇÃO	10
Biocombustíveis e a produção de bioetanol no Brasil.....	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a tolerância ao etanol	11
Compartimentação da membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i>	13
A troca de prótons entre a célula e o meio externo em <i>S. cerevisiae</i> é dependente da interação entre eisossoma e MCP	15
Eisossoma e a regulação de proteínas pertencentes ao <i>loop</i> de mRNA.....	16
OBJETIVO	18
MATERIAIS E MÉTODOS	19
Linhagem selecionada para o estudo	19
Ativação e expansão das linhagens.....	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 Pma1p	21
Extração de RNA total e expressão gênica relativa por qPCR	22
Extração de proteínas e quantificação via <i>western blot</i>	24
Descrição das análises estatísticas	25
RESULTADOS	27
Acidificação do meio extracelular e taxa de crescimento populacional em diferentes porcentagens de etanol.....	27
Localização subcelular das proteínas Pma1p e Pil1p e quantificação GFP	28
Expressão gênica relativa por PCR em tempo real (qPCR)	31
Avaliação da abundância das proteínas Dcp1a, eIF4E e Pabp via <i>western blot</i> ..	31
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Aminoácido-poliamina-organocátion
ATP	do inglês, <i>Adenosine triphosphate</i>
cDNA	do inglês, <i>Complementary DNA</i>
EtOH	Etanol
F	do inglês, <i>Forward</i>
GFP	do inglês, <i>Green fluorescent protein</i>
GRAS	do inglês, <i>Generally Regarded As Safe</i>
MCC	do inglês, <i>Membrane compartment of Pma1</i>
MCP	do inglês, <i>Membrane compartment of Can1</i>
MCT	do inglês, <i>Membrane compartment of TORC2</i>
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 <i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	do inglês <i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
R	do inglês, <i>Reverse</i>
SGs	do inglês, <i>stress granules</i> (grânulos de estresse)
TBS	do inglês, <i>Tris-buffered saline</i>
TORC2	Complexo de Rapamicina 2
YPD	do inglês <i>Yeast extract, peptone and dextrose medium</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Compartimentos da membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i> ..	14
Figura 2 - Estratégia utilizada para gerar a coleção de clones de GFP de <i>S. cerevisiae</i> .	19
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 CellProfiler	22
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 min.	27
Figura 6 - Gráfico de dispersão entre pH e OD ₆₂₀ sob estresse etanólico de 6%, 12% e 18%.	28
Figura 7 - Imagens de microscopia de fluorescência para a linhagem BY4741-Pma1p-GFP tratadas com 0% e 18% de estresse etanólico por 240 min.	29
Figura 8 - Imagens de microscopia de fluorescência para a linhagem BY4741-Pil1p-GFP tratadas com 0% e 18% de estresse etanólico por 240 min.	30
Figura 9 - Média e erro-padrão da intensidade de fluorescência de células BY4741-Pma1p-GFP e BY4741-Pil1p-GFP.	30
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	31
Figura 11- Quantificação das proteínas Dcp1a, PABP e eIF4E via western blot após 240 min tratamento com 0% e 18% de etanol.	32

INTRODUÇÃO

Biocombustíveis e a produção de bioetanol no Brasil

O aumento das demandas energéticas acompanha o crescimento da população mundial e as fontes primárias de energia baseiam-se em combustíveis fósseis não renováveis (GUPTA; VERMA, 2015). O propósito de buscar por combustíveis de origem renovável tem movimentado organizações governamentais, pesquisadores e ambientalistas, devido a sua crescente demanda afetar diretamente a economia global. Ainda, os gases provindos da combustão dos compostos fósseis são considerados um dos principais responsáveis pelo aquecimento global e intensificação do efeito estufa (CHAKRABORTY et al., 2012; MUELLER et al., 2019).

Essas preocupações têm incentivado países a buscarem fontes renováveis para a sua matriz energética (tais como os biocombustíveis) objetivando amenizar os efeitos econômicos causados pelo aumento e oscilação dos preços do petróleo e também contribuir para a diminuição da emissão de gases tóxicos provenientes da reação de combustão (MARTINS et al., 2018).

Os biocombustíveis renováveis são fontes alternativas de energia que competem diretamente com os combustíveis fósseis e são menos impactantes ao meio ambiente (CHAVES; GOMES, 2014). Além disso, os biocombustíveis são mais facilmente obtidos, podendo ser produzidos a partir de fontes agrárias e biomassa de plantas, tais como a cana-de-açúcar, trigo e milho, resíduos como palha, madeira e alguns resíduos domésticos (DEMIRBAS, 2017). O bioetanol está entre os biocombustíveis mais importantes, sendo considerado um dos mais promissores substitutos da gasolina no mercado de combustíveis para transporte (CHAKRABORTY et al., 2012; GUPTA; VERMA, 2015).

Na década de 1970, foi criado no Brasil o Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL), o qual incentivou a implementação da bioenergia em larga escala através do investimento em tecnologia para reduzir a importação de petróleo e aumentar a produção de etanol no país (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009). Apesar dos gargalos e do declínio do PROÁLCOOL no final da década de 1980, o incentivo à produção bioenergética durante o auge do programa gerou muitos estudos e avanços na área da produção do bioetanol, que passou a constar de forma definitiva no mercado (BASTOS, 2007).

Indústrias brasileiras comumente produzem etanol a partir do processamento da cana-de-açúcar, que, dentre as várias opções de matérias-primas, possui o maior balanço energético (MACEDO, 2007). O etanol é utilizado como combustível para automóveis de duas maneiras: (i) o etanol hidratado é utilizado de forma direta nos tanques; e (ii) o etanol anidro é misturado com a gasolina em um percentual que varia de 18 a 27,5% (JUNQUEIRA et al., 2017). O Brasil desponta como um dos maiores produtores de cana-de-açúcar e produtor de etanol do mundo, a partir desta matéria-prima (MONCADA et al., 2018).

A maioria das destilarias optam por processos com microrganismos para a fermentação alcoólica, na qual os açúcares da cana-de-açúcar são convertidos em etanol por enzimas de leveduras. Esta preferência representa cerca de 20 a 30% das formas de produção disponíveis (MUSSATTO et al., 2010; NIGAM; SINGH, 2011). Existem diversas espécies de leveduras utilizadas no processo de produção do bioetanol. Entre as *Saccharomyces* sp., a espécie *S. cerevisiae* é o principal organismo fermentador utilizado para a produção de bioetanol, possuindo linhagens industriais bastante utilizadas, como por exemplo CAT e PEDRA.

As condições de crescimento das leveduras nas destilarias diferem bastante das condições de crescimento em ambientes laboratoriais. Os processos de fermentação industrial impõem várias condições estressantes na levedura, como por exemplo, alteração da temperatura, concentração de etanol, pressão osmótica e estresse iônico, afetando diretamente o desempenho e cinética de crescimento da levedura durante a fermentação alcoólica (FLEET, 2008). Portanto, é importante compreender os mecanismos de tolerância de tais microrganismos em estresse etanólico.

***Saccharomyces cerevisiae* e a tolerância ao etanol**

Saccharomyces cerevisiae pertence ao domínio Eukaryota, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces* (KURTZMAN; ROBNETT, 1997). É um fungo predominantemente unicelular, de rápido e fácil crescimento. As células possuem aproximadamente 3 µm de diâmetro e são capazes de dividir-se a cada 90 minutos em condições nutricionais adequadas. É considerado um organismo modelo por apresentar mecanismos celulares altamente conservados e é amplamente utilizada em diversas aplicações, pois possuem características interessantes para o

trabalho laboratorial por não serem patogênicas (GRAS - *generally regarded as safe*), serem passíveis de técnicas como transformação, replicação, isolamento de mutantes, entre outras (MENDOÇA et al., 2019).

S. cerevisiae destaca-se por apresentar alta capacidade fermentativa e de crescimento em condições anaeróbias. Possui alta tolerância às condições industriais, tais como alterações na temperatura e valores de pH, e também apresentam uma relativa alta tolerância ao etanol e a outros inibidores (MUSSATTO et al., 2010; DEMEKE et al., 2013). Foi o primeiro organismo eucarioto com genoma sequenciado (GOFFEAU et al. 1996), projeto que demonstrou a presença de mais de 6.608 Open Reading Frames (ORFs) das quais 5.797 codificam polipeptídeos, sendo que mais de um terço dessas ORFs não têm função conhecida (WIEDERHOLD et al., 2010).

Mediante as características supracitadas dessa levedura, durante o processo de fermentação industrial para a síntese de etanol, a *S. cerevisiae* enfrenta diversos tipos de estresses, sendo a alta concentração de etanol o estressor mais comum (STANLEY et al., 2010).

As altas concentrações de etanol afetam a integridade da membrana plasmática alterando sua fluidez e permeabilidade iônica, o que acarreta a perda do potencial eletroquímico transmembrana e, conseqüentemente, acidifica a célula e seus vacúolos, gerando incapacidade de controlar o pH citosólico (KANE, 2016). O pH citosólico está intimamente ligado ao estado metabólico da célula, podendo servir como sinalizador uma vez que o pH pode variar significativamente em diferentes condições de crescimento (ORIJ et al., 2012).

Ademais, o estresse etanólico pode ocasionar a disfunção e desnaturação de proteínas e interferir na absorção de nutrientes, provocando o escape de nucleotídeos, aminoácidos e potássio da célula. Esses fatores inibem a divisão celular e reduzem a vitalidade das células durante o processo fermentativo (CHANDLER et al., 2004; DING et al., 2009; MA; LIU, 2010; JIA; ZHANG; LI, 2010; STANLEY et al., 2010, NAVARRO-TAPIA et al., 2016). Portanto, a obtenção de linhagens mais tolerantes ao etanol é de extrema importância e interesse das indústrias produtoras de bioetanol (STANLEY et al., 2010; AMORIM et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Compartimentação da membrana plasmática de *S. cerevisiae*

A membrana plasmática exerce papel na endocitose, secreção, captação de nutrientes, homeostase de íons, transdução de sinal, morfogênese e síntese de parede celular ou matriz extracelular (DOUGLAS; KONOPKA, 2016; SCHUBERTH; WEDLICH-SÖLDNER, 2015). A composição da membrana plasmática de *S. cerevisiae* não é uma mistura homogênea e aleatória de lipídios e proteínas. Ao contrário, as membranas são caracterizadas pela compartimentação em domínios nos quais a composição local, organização e/ou dinâmica diferem entre si (JACOBSON; LIU; LAGERHOLM, 2019).

Desta forma, a compartimentação da membrana plasmática de *S. cerevisiae* é caracterizada pela existência de regiões distintas distribuídas por toda membrana plasmática que abrigam lipídios e proteínas com funções específicas (GROSSMANN et al., 2007). Diferentes compartimentos da membrana plasmática de *S. cerevisiae* já foram previamente definidos, sendo que os principais são os domínios MCP (*Membrane compartment of Pma1*), MCC (*Membrane compartment of Can1*) associado a um complexo proteico denominado eisossoma e MCT (*Membrane compartment of TORC2*) (DOUGLAS; KONOPKA, 2014). Foram propostos também domínios adicionais que contêm os transportadores de esterol Lct3/4 e o sensor de integridade da parede celular Wsc1 (BUSTO et al., 2018; MURLEY et al., 2017; KOCK et al., 2016).

O compartimento MCP é composto por uma H⁺-ATPase do tipo P (Pma1p) codificada pelo gene PMA1. Pma1p é responsável pelo efluxo de prótons e sua atividade é alimentada pela hidrólise de ATP. As principais funções de Pma1p resumem-se em manter o equilíbrio iônico, a homeostase intracelular do pH, regular a absorção de nutrientes e gerar o gradiente eletroquímico na membrana plasmática (BUSTO; WEDLICH-SÖLDNER, 2019). Ela foi caracterizada e identificada como sendo uma proteína integral de membrana com tamanho aproximado de 100 KDa, composta de dez domínios transmembranares, dois domínios hidrofílicos expostos ao meio externo e uma cauda C-terminal fosforilável (MALPARTIDA; SERRANO, 1980; AMBESI et al., 2000).

A proteína Pil1p foi identificada como essencial para a formação da eisossoma (WALTHER et al., 2006). O compartimento MCC/eisossoma é visualizado como manchas pontuais, imóveis, distintas dos locais de endocitose e associados a um complexo de proteínas citoplasmáticas denominado eisossoma (WALTHER et al.,

2006). Esse compartimento possui alto grau de estabilidade e está associado a invaginações de membranas, formando sulcos com cerca de 50 nm de profundidade e 300 nm de comprimento (STRADALOVA et al., 2009).

Em termos funcionais, o compartimento eisossoma é descrito como um compartimento que armazena, organiza e protege diversas moléculas, proteínas, simportadores de nutrientes/prótons (proteínas que fazem o transporte de dois ou mais solutos na mesma direção (VAN DER REST et al., 1995)) e componentes sensoriais. É um multipotente regulador que controla a sinalização de diversas vias e interage com diferentes maquinarias celulares, tais como resposta a diferentes tipos de estresse, homeostase lipídica e a via de degradação do mRNA (GROUSL et al. 2015; DOUGLAS; KONOPKA, 2014).

Outro compartimento significativo é denominado MCT, o qual contém o alvo do complexo de rapamicina 2 (TORC2). O MCT regula a polaridade celular, polimerização de actina, endocitose e síntese de esfingolipídeos (BERCHTOLD; WALTHER, 2009). A Figura 1 ilustra os principais compartimentos da membrana plasmática de *S. cerevisiae*.

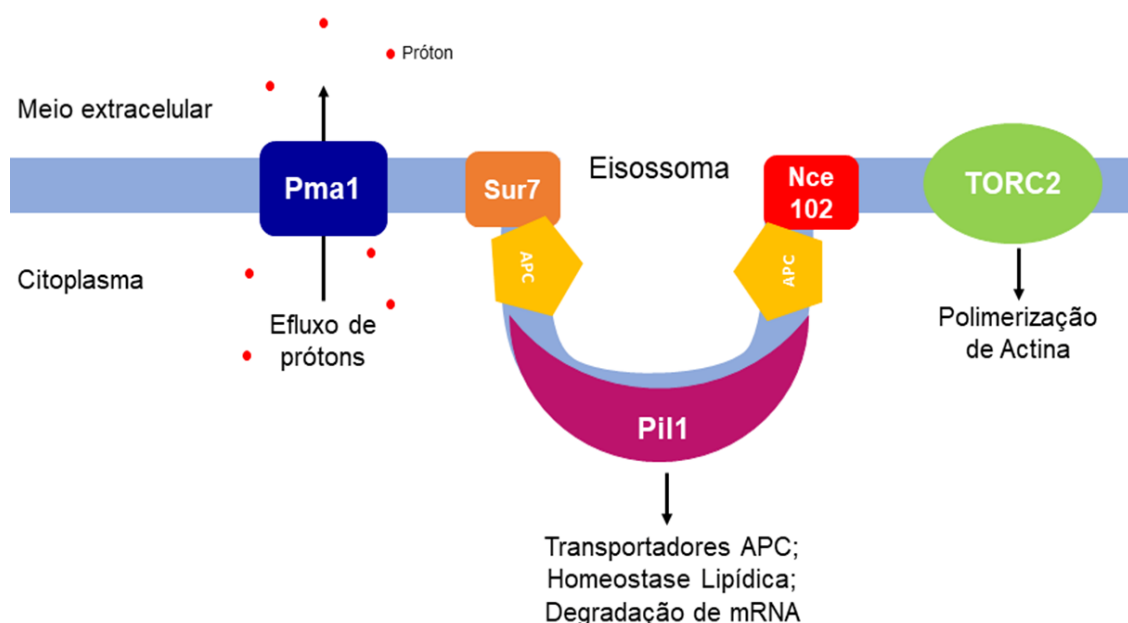


Figura 1- Compartimentos da membrana plasmática de *S. cerevisiae*. A imagem ilustra os principais compartimentos existentes da membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*.

A troca de prótons entre a célula e o meio externo em *S. cerevisiae* é dependente da interação entre eisossoma e MCP

As células sob estresse por etanol ativam mecanismos de resposta que modulam vários processos biológicos para evitar os efeitos colaterais causados pelo estresse (YANG; TAVAZOIE, 2020). A membrana plasmática é uma interface ativa entre o interior da célula e o meio circundante (SÁ-CORREIA; GODINHO, 2022). O potencial de membrana é considerado a principal força motriz que impulsiona a translocação de íons e nutrientes através da membrana plasmática (GROSSMANN et al., 2007).

Transportadores secundários de aminoácidos da superfamília APC (aminoácido-poliamina-organocátion) são transportadores do tipo simportador que usam o gradiente eletroquímico para transportar uma grande variedade de íons e nutrientes tais como açúcares, aminoácidos, vitaminas, nucleotídeos ou pequenas moléculas para dentro da célula (BIANCHI et al., 2019; SAIER et al., 2016). A levedura *S. cerevisiae* expressa ~26 transportadores APC diferentes (MOHARIR; GAY; MARKUS, 2022). Can1p (MALINSKA et al., 2003), Fur4p (MALINSKA et al., 2004), Tat2p (GROSSMANN et al., 2007), Lyp1p (BIANCHI et al., 2018) e Mup1p (BUSTO et al., 2018) são exemplos de APCs que transportam respectivamente arginina, uracila, triptofano e tirosina, lisina e metionina juntamente com prótons.

Tais transportadores podem localizar-se nos eisossomas em sua forma inativa, sugerindo a importância deste compartimento em organizar proteínas com atividades de fluxo de prótons e separar espacialmente o fluxo de prótons interno promovido pelos simportadores, do fluxo externo de prótons promovido pela Pma1p (GROSSMANN et al., 2007; MALINSKA et al., 2004; MALINSKA et al., 2003).

O movimento dos transportadores APC entre o eisossoma e os domínios lipídicos circundantes é altamente dinâmico e impulsionado pelo gradiente de prótons através da membrana plasmática, o qual é mantido Pma1p (MOHARIR et al., 2018). Transportadores APC representam os principais consumidores do gradiente de prótons. Portanto, é essencial manter o equilíbrio entre o influxo de prótons mediado

por transportadores APC e o efluxo de prótons pela Pma1p (MOHARIR; GAY; MARKUS, 2022).

A atividade da Pma1p exige alta demanda ATP. Então, níveis reduzidos de ATP diminuem a exportação de prótons pela Pma1p e, conseqüentemente, a célula reduz a importação de prótons por meio da regulação negativa dos transportadores APC (MOHARIR; GAY; MARKUS, 2022). Além disso, uma aproximação entre o pH extracelular e citosólico causa uma disruptura do gradiente da membrana plasmática e perda da capacidade dos transportadores APC em direcionar íons, permitindo que os substratos se movam através da membrana em ambas as direções causando secreção de nutrientes do citoplasma para o meio extracelular (LAMB et al., 2001; FORREST; KRAMER; ZIEGLER, 2011; KANE, 2016; MOHARIR et al., 2018).

As mudanças conformacionais que os transportadores APC sofrem durante a importação de nutrientes impedem que essas proteínas voltem para o eisossoma. Após saírem do eisossoma, os transportadores ficam susceptíveis a ubiquitinação pela Rsp5p, com uma subsequente entrega ao vacúolo para degradação dos transportadores (MOHARIR et al., 2018).

Ao agrupar os transportadores APC inativos no compartimento eisossoma, a célula ajusta o número de transportadores em sua forma ativa disponíveis na membrana plasmática circundante, enquanto fornecer proteção contra a ubiquitinação e endocitose aos transportadores armazenados no eisossoma (BUSTO; WEDLICH-SÖLDNER, 2019; MOHARIR et al., 2018). Desta forma, a levedura é capaz de equilibrar o número de transportadores APC e a atividade de bombeamento de prótons pela Pma1p, mantendo o gradiente de prótons da membrana plasmática (MOHARIR et al., 2018).

Eisossoma e a regulação de proteínas pertencentes ao *loop* de mRNA

O estresse por etanol proporciona um ambiente que induz vias de armazenamento e degradação de RNAs pelas organelas sem membranas (WOLF et al., 2021). A degradação citoplasmática de mRNAs de levedura ocorre por duas vias gerais, ambas iniciadas pela desadenilação da cauda poli-A (PARKER, 2012).

A proteína Elf4e liga-se ao cap 5' do mRNA enquanto que a proteína Pab1 liga-se a cauda poli-A na extremidade 3'. A interação entre Elf4e e Pab1 propicia um *loop* de mRNA. O encurtamento da cauda poli-A de um mRNA resulta na perda de ligação de Pab1p e a ativação do complexo Lsm1-7p/Pat1p, o qual estimula a hidrólise do cap 5' mediada por Dcp1p/ Dcp2p. A extremidade 5' desprotegida se torna substrato para a exoribonuclease Xrn1p, a qual atua na direção 5'–3' (TIMMERS; TORA, 2018). Quando o sistema de degradação 5'–3' está comprometido, a cauda poli-A encurtada é capturada pelo exossomo, o qual degrada a extremidade 3' do mRNA (LABNO; TOMECKI; DZIEMBOWSKI, 2016).

A localização subcelular de mRNAs é um aspecto chave da regulação da expressão gênica de células eucarióticas (BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008). A modulação da tradução e a degradação do mRNA citoplasmático permite mudanças importantes na população de mRNAs pré-existentes (SWISHER; PARKER, 2010). O acúmulo de mRNAs em grânulos citoplasmáticos conhecidos como *P-bodies* (PBs) e grânulos de estresse (SGs) é uma característica dessa via de modulação permitindo o armazenamento e o decaimento de mRNA (SWISHER; PARKER, 2010).

PBs são grânulos de proteína que contém mRNAs não traduzidos complexados com um conjunto de repressores de tradução, maquinaria de *decapping* de mRNA e a exoribonuclease 5'-3' Xrn1p (BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008). Os SGs são agregados de mRNAs não traduzidos, fatores de iniciação da tradução (como a família Elf4), subunidade ribossomal 40S e proteína Pab1. Porém, a composição exata dos SGs pode variar dependendo do tipo de estresse (SWISHER; PARKER, 2010; BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008; ANDERSON; KEDERSHA, 2006).

Mesmo com composições distintas, PBs e SGs funcionam em conjunto e um dado mRNA pode localizar-se em ambas estruturas (SWISHER; PARKER, 2010).

Enquanto os outros componentes da via de decaimento do mRNA permanecem acumulados em PBs, a Xrn1p é seletivamente liberada e sequestrada no córtex celular, associando-se ao eisossoma em células pós-diauxicas (células que trocaram o metabolismo energético anaeróbico provindo da glicólise para o metabolismo aeróbico provindo de fontes não fermentativas de carbono, como etanol

ou glicerol) (GROUSL et al. 2015; GALDIERI et al., 2010). Xrn1p é espacialmente separada da maquinaria de degradação de mRNA e seu substrato (mRNAs sem cap 5') de forma dependente de Pil1p (principal constituinte do eisossoma), para evitar a degradação desnecessária de mRNAs potencialmente necessários em condições favoráveis, representando uma maneira rápida e eficiente de modular a atividade da enzima em resposta às condições ambientais e/ou vias de sinalização (VASKOVICOVA et al 2017).

Curiosamente, os eisossomas podem estimular diretamente a montagem de SGs através do recrutamento subcortical da Pkc1p ativa (AMEN; KAGANOVICH, 2020). Pil1p é fosforilada por Pkc1p e essa fosforilação induz rearranjos dos eisossomas (MASCARAQUE et al., 2013; WALTHER et al., 2007).

O recrutamento subcortical da Pkc1p em sua forma ativa para o eisossoma também protege Pkc1p da rotatividade e a mantém armazenada até que a possibilidade de crescimento celular seja restaurada. Um dos principais benefícios da formação de SGs em contexto de estresse, é permitir uma reinicialização mais rápida da divisão celular após a finalização do estresse (AMEN; KAGANOVICH, 2020).

Em suma, os compartimentos da membrana plasmática MCP e eisossoma são multipotentes reguladores, controlando o pH citosólico, a sinalização de diversas vias, a interação com diferentes maquinarias celulares e atuando em resposta ao estresse. Dessa forma, é importante o aprofundamento dos estudos direcionados a esses compartimentos em *Saccharomyces cerevisiae* bem como procurar esclarecer os papéis reguladores desses compartimentos em células durante o estresse por etanol.

OBJETIVO

Avaliar o papel dos eisossomas e MCP em resposta a um alto nível de estresse por etanol na levedura *S. cerevisiae* BY4741.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem selecionada para o estudo

A linhagem de *S. cerevisiae* BY4741 (EUROSCARF genótipo: MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) foi selecionada como modelo de estudo devido a existência de uma biblioteca dessa linhagem com genes acoplados a GFP (*Green Fluorescent Protein*). Além disso, o grupo já vinha pesquisando o perfil de crescimento dessa linhagem em condições de estresse por etanol, tendo obtido também dados de transcriptoma, proteoma e metaboloma nesse contexto (ALMEIDA, 2017; WOLF, 2019).

As linhagens BY4741 (Invitrogen) utilizadas nesse estudo pertencem a uma coleção de linhagens de *S. cerevisiae* que expressa ORFs contendo um *tag Aequorea victoria* GFP (S65T) (TSIEN, 1998) na extremidade C-terminal. Nessa biblioteca, cassetes específicos de cada gene contendo um marcador GFP posicionado na extremidade C-terminal foram gerados por PCR usando um modelo pFA6a–GFP(S65T)–His3MX. As proteínas de fusão GFP são integradas ao cromossomo da levedura por meio de recombinação homóloga e são expressas usando promotores endógenos (HUH et al., 2003). A Figura 2 reporta a estratégia utilizada para gerar a coleção de clones de GFP de *S. cerevisiae*.

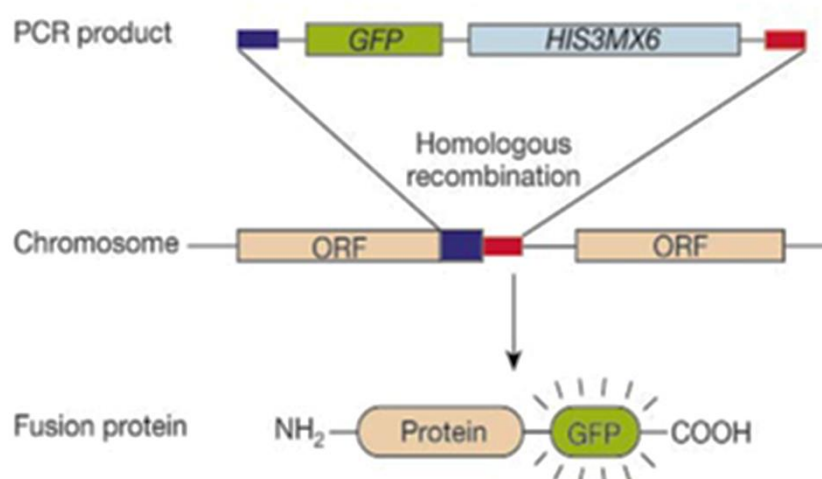


Figura 2 - Estratégia utilizada para gerar a coleção de clones de GFP de *S. cerevisiae*. FONTE: HUH et al., 2003.

Dessa forma, aqui refere-se a linhagem BY4741 não portadora de GFP como BY4741 Euroscarf, enquanto àquelas portadoras de GFP são aqui referidas como

BY4741 Invitrogen. A Figura 3 apresenta um workflow resumindo as análises realizadas neste trabalho.

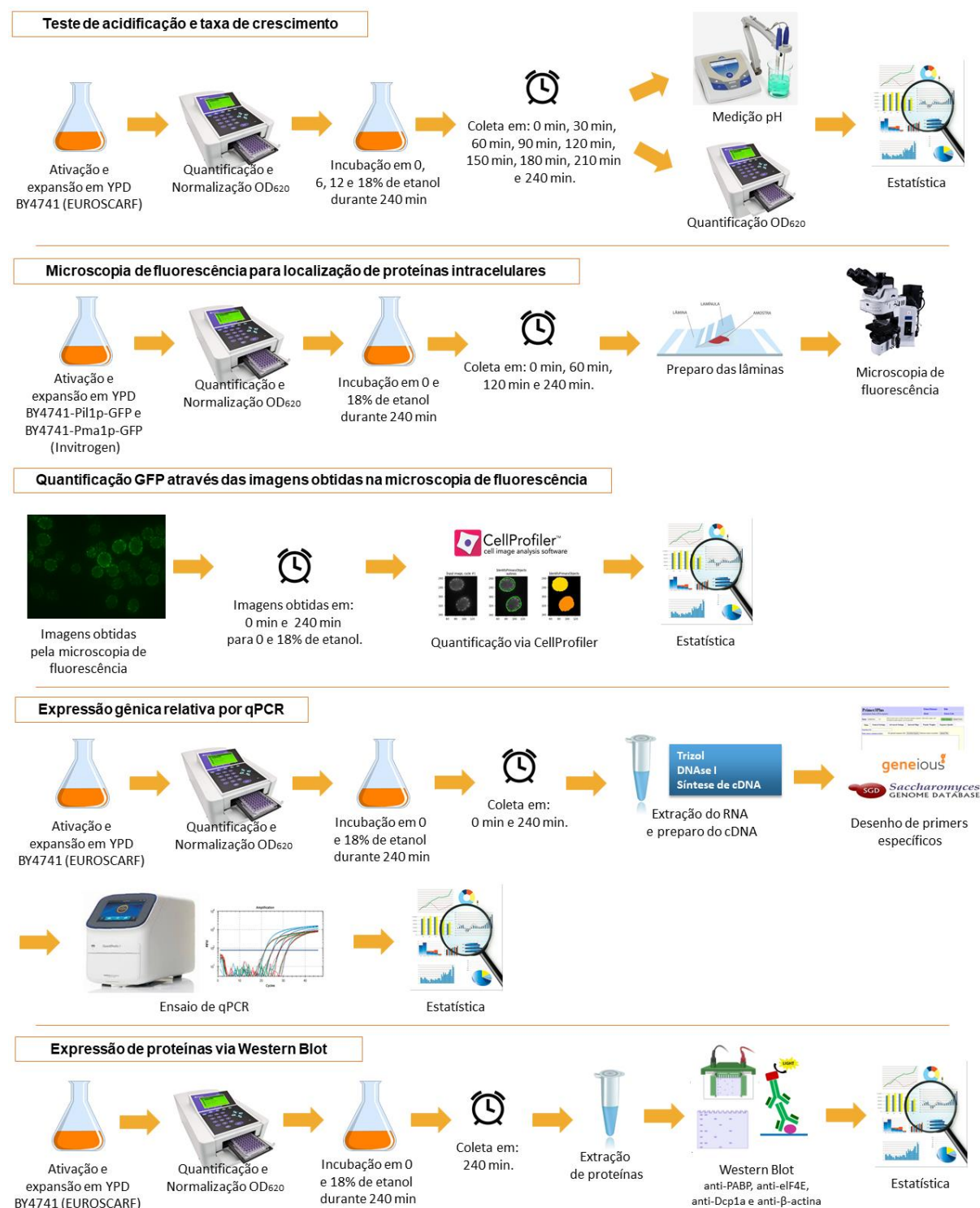


Figura 3 - Workflow das análises desenvolvidas no presente estudo. Workflow apresenta de forma resumida as etapas desenvolvidas em cada experimento realizado no presente trabalho.

Ativação e expansão das linhagens

Antes de cada experimento, as linhagens BY4741 Euroscarf e Invitrogen foram submetidas a um crescimento e reativação em meio de cultura YPD (2% peptona, 1% extrato de levedura e 2% glicose). As células foram incubadas no agitador rotativo a 30°C sob agitação de 200 RPM ao longo de 12-16 horas. Após o período de reativação e crescimento, a quantidade de células foi mensurada pelo equipamento Asys Expert Plus Microplate Reader (Biochrom) sob filtro de absorbância de 620nm e a concentração de células foi ajustada para uma OD620 de 0,4. A partir das etapas de ativação, expansão e normalização da OD620 foram realizados os diferentes experimentos descritos a seguir.

Teste acidificação do meio de crescimento e taxa de crescimento sob diferentes porcentagens de etanol

O efluxo de prótons de células em diferentes porcentagens de estresse etanólico foi avaliado utilizando a linhagem BY4741 (EUROSCARF). As células foram incubadas em 70 mL de meio YPD contendo 0, 6, 12 e 18% de etanol (v/v) para simular respectivamente a condição controle, ~1/4, ~1/2 e ~3/4 (v/v) de etanol em relação ao nível máximo suportado por essa linhagem (22% de etanol previamente determinada (ALMEIDA, 2017)). A incubação foi realizada a 30°C com agitação de 200 RPM e as amostras foram coletadas a 0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, e 240 min. Foi mensurada a taxa de crescimento via OD620 em cada amostra usando o Asys Expert Plus Microplate Reader (Biochrom) com o filtro de absorbância de 620nm e o pH do meio de crescimento utilizando um pHmetro PG2000 (Gehaka). O teste foi realizado em triplicata biológica e os dados coletados foram analisados estatisticamente.

Microscopia de fluorescência: quantificação de GFP e avaliação da localização intracelular das proteínas Pil1p e Pma1p

Foram escolhidas linhagens da biblioteca BY4741 Invitrogen com acoplamento de GFP para as ORFs dos genes PIL1 e PMA1. Foi iniciada a incubação das linhagens BY4741-Pil1p-GFP e BY4741-Pma1p-GFP em 20 mL de meio YPD contendo 0% e 18% de etanol (v/v) para simular respectivamente a condição controle e ~3/4 (v/v) de etanol, como já citado acima. A incubação foi realizada a 30°C com agitação de 200 RPM e as amostras foram coletadas a 0 min, 60 min, 120 min e 240

min. 200 μ L de cada amostra foi centrifugada a 2.000 RPM por 2 min, seguido por 2 lavagens com 100 μ L de PBS. Após a segunda lavagem, o *pellet* foi eluído em 50 μ L de PBS e 20 μ L da eluição foi disposta sobre lâminas de microscopia. As células foram avaliadas no microscópio de fluorescência Olympus BX61 utilizando objetiva de 100X, filtro FITC e escala de 5 μ m. O teste foi realizado em duplicata biológica.

O padrão de localização intracelular de Pil1p e Pma1p foi avaliado com base nas imagens de microscopia obtidas para cada tratamento e momento supracitado. A quantificação de GFP foi feita através da análise das médias de fluorescência obtidas utilizando o software CellProfiler 4.2.1 analisando-se 101 células para cada tratamento (0% e 18% de etanol) em 0 min e 240 min. O software foi ajustado para identificar e quantificar como objeto primário as células inteiras no qual internamente alocam-se as proteínas marcadas com GFP. Para cada tratamento/momento foi utilizado a média de fluorescência de 101 objetos primários identificados pelo software. Posteriormente, os valores foram analisados estatisticamente. A Figura 4A-B exemplificam a forma como o software faz a identificação supracitada.

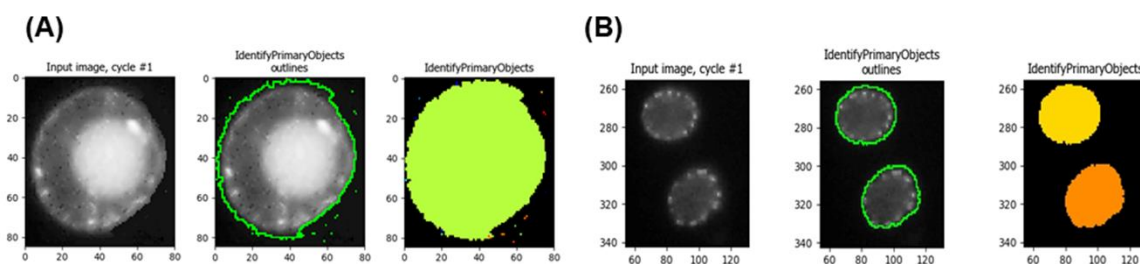


Figura 4 - Demonstração da identificação de objetos primários das células BY4741-Pma1p-GFP e BY4741-Pil1p-GFP no CellProfiler. (A): visualização da célula com as proteínas Pma1p localizadas na periferia da membrana plasmática assim como a presença de vacúolos. (B): visualização da célula com as proteínas Pil1p localizadas na periferia da membrana plasmática. Para (A) e (B): os pontos acinzentados na figura à esquerda reportam as proteínas marcadas com GFP estão localizadas; O traço de cor verde circundando a célula nas figuras centrais representam o objeto primário selecionado pelo software; Circunferências verde, amarela ou laranja na figura da direita reportam a área do objeto primário identificado que teve sua média de fluorescência quantificada.

Extração de RNA total e expressão gênica relativa por qPCR

Para avaliarmos a expressão relativa dos genes pertencentes aos compartimentos da membrana plasmática ou vias de regulação ligadas à esses compartimentos (Tabela 1), utilizamos 2 mL das amostras BY4741 Euroscarf cultivadas em YPD com 0% e 18% de etanol (v/v), a 30°C com agitação de 200 RPM ao longo de 0 min e 240 min, como reportado acima. As amostras foram centrifugadas

por 2 min. à 2.000 RPM, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram armazenados à -80°C até o uso.

As amostras foram submetidas ao tratamento de 250 µL de Lyticase (Sigma-Aldrich) com 0,1 µL de β-mercaptoetanol por 30 min à 30°C, seguido pelo protocolo de extração de RNA total com Trizol® (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. As concentrações de RNA total foram mensuradas por fluorometria utilizando o equipamento Qubit 3.0 Fluorometer e kit Qubit™ RNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific). A integridade do RNA total extraído foi avaliada em gel de agarose 2% corado com GelRed 10.000x (Biotium Inc.).

1µg de RNA total de cada amostra foi submetido ao tratamento com DNase I – Amplification Grade (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram submetidas imediatamente à reação de transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystem), conforme especificação do fabricante.

Os oligonucleotídeos específicos para os genes PIL1, CAN1, PMA1 e XRN1 foram construídos baseando-se nas sequências disponíveis nos bancos de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e SGD (www.yeastgenome.org/). O gene TDH2 foi utilizado como gene endógeno (VAUDANO et al. 2011) (Tabela 1).

Tabela 1 – Lista de oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão gênica. F: forward; R: reverse.

Gene	ID		Sequencia (5'-3')
TDH2 (90 pb)	YJR009C	F	AGACTGTTGACGGTCCATCC
		R	CCTTAGCAGCACCGGTAGAG
PIL1 (118 pb)	YGR086C	F	AGAAGTGCTGCTGGAGCTTT
		R	CAGCGTCACGTCTTTCGTTG
CAN1 (99 pb)	YEL063C	F	AGACGCCGACATAGAGGAGA
		R	ATTGACCCACGTCTGTGGTG
PMA1 (108 pb)	YGL008C	F	GGTCAAAGCGTCCTTAGCCT
		R	TTGACTGCTTGTTTGGCTGC
XRN1 (127 pb)	YGL173C	F	TGGTTGGGGTCCTATTCCT
		R	GGGTAAGGCATCTGGTGAGG

A expressão relativa dos genes alvo (PIL1, CAN1, PMA1 e XRN1) foi investigada por ensaio de qPCR utilizando o sistema SYBR Green de amplificação no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). As reações de qPCR foram montadas com 7,5 µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 1 µL do primer F (5 µM), 1 µL do primer R (5 µM), 2 µL de cDNA (diluição 1:5) e 3,5 µL de água ultrapura, com volume final de 15 µL por reação. O programa de quantificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 min., seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3 seg., anelamento e extensão a 60°C por 30 seg. A curva de melting foi feita como sugerido pelo protocolo do kit GoTaq qPCR MasterMix (Promega) e foi analisada para verificar se houve formação de um único produto de amplificação. A expressão do gene endógeno TDH2 foi utilizada para a normalização dos dados, sob as mesmas condições dos genes alvos. Cada amostra foi analisada em triplicata biológica e duplicata técnica e toda análise acompanhou um controle negativo composto por todos os reagentes exceto uma amostra de cDNA. A expressão relativa de cada gene alvo foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e os dados de expressão relativa foram analisados estatisticamente.

Extração de proteínas e quantificação via *western blot*

Para o ensaio de *western blot* de proteínas importantes para a via de degradação de mRNAs, PBs e SGs, utilizamos 20 mL da linhagem BY4741 Euroscarf cultivadas ao longo de 240 min em YPD com 0% e 18% de etanol (v/v) a 30°C com agitação de 200 RPM ao longo de 0 min e 240 min. Foram utilizadas 6 replicatas biológicas.

As amostras foram centrifugadas a 2.000 RPM por 3 min, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 600 µL de acetato de lítio à 2,0 M e 200 µL de hidróxido de sódio a 0,4 M. O conteúdo foi incubado por 5 min em gelo e novamente centrifugado a 2.000 RPM por 1 min. O sobrenadante foi descartado e as proteínas extraídas foram armazenadas à -80°C até o uso.

A concentração de proteína foi mensurada usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). 70 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese em condições redutoras em gel de poliacrilamida 10%. As proteínas foram então

transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). As membranas foram bloqueadas por 1h com 5% de leite desnatado diluído em TBS (*Tris-buffered saline*) e então incubadas com anticorpo primário por 16 h a 4°C. Os anticorpos utilizados foram o anti-PABP (sc-166027, Santa Cruz, 1:1000), anti-eIF4E (sc-9976, Santa Cruz, 1:1000), anti-Dcp1a (sc-100706; Santa Cruz, 1:1000). O anticorpo primário utilizado para normalização foi o anti- β -actina (Abcam-8226, 1:1000).

Após uma nova lavagem em TBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário Rabbit anti-mouse, (Abcam-ab6709, 1:5000) específico para os anticorpos primários por 2 horas e novamente lavadas em TBS. O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular marcado por cor, Kaleidoscope (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), que foi alocado no momento da eletroforese. A reação foi desenvolvida em kit ECL e as imagens das bandas foram adquiridas em equipamento Image Quant 350 (GE - Healthcare). Posteriormente, foram realizadas análises semiquantitativas por densitometria das bandas e os valores foram analisados estatisticamente.

Descrição das análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R com o ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (Version 4.1.0 (2020-06-22), RStudio, Inc.). As funções e os pacotes foram aqui apresentados no formato 'função{pacote}' e considerou-se significância de 5% em todos os testes estatísticos.

Comparações intragrupo são comparações estatísticas das amostras dentro de uma mesma condição (0%, 6%, 12% ou 18% de etanol) ao longo do tempo (0 min *versus* 30 min, 0 min *versus* 60 min, etc.). Comparações intergrupo são comparações estatísticas das amostras de diferentes condições (0% de etanol *versus* 6%, 0% *versus* 12%, etc.) para cada tempo coletado (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min).

Com propósito de avaliar as variações de pH e OD₆₂₀, foram utilizados modelos lineares misto estimado por mínimos quadrados ('lmer{lme4}'). Os modelos adotados levaram em consideração a interação entre porcentagem de etanol e os momentos de coleta como efeito fixo e as replicatas biológicas como efeito aleatório. O erro residual do modelo ('residuals{stats}') mostrou distribuição com aderência à Gaussiana pelo teste de Cramer-Von Mises ('cvm.test{nortest}'). Comparações

múltiplas foram realizadas no pós-teste com o teste de Tukey ('lsmeans{lme4}' e 'cld{lme4}') o coeficiente de correlação de Pearson entre pH e OD620 em todos os tempos agrupados também foi estimado.

Para avaliar a intensidade de fluorescência GFP de Pil1p e Pma1p, os valores de média de fluorescência GFP gerados pelo software CellProfiler 4.2.1 passaram por comparações intragrupo e intergrupo, utilizando um modelo linear simples estimado por mínimos quadrados ('lm{stats}') cuja interação de momentos e tratamentos foi aplicada como efeito fixo. Foi executado um procedimento de retirada de valores extremos (*outliers*) considerando $\pm$ três vezes o desvio-padrão a partir da média em cada momento de um mesmo tratamento. O erro residual do modelo Pma1p ('residuals{stats}') mostrou distribuição assumida como Gaussiana pelo teste de Cramer-Von Mises ('cvm.test{nortest}'), sendo que para o modelo Pil1p, tal condição foi alcançada após transformação de Box-Cox ($\lambda = 0.2133248$; 'powerTransform{car}'). Comparações múltiplas foram realizadas no pós-teste com o teste de Tukey ('lsmeans{lme4}' e 'cld{lme4}').

Para analisar as diferenças de expressão gênica de PIL1, CAN1, PMA1 e XRN1 a expressão do gene endógeno TDH2 foi utilizada para normalização dos dados e a expressão relativa dos alvos foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores de expressão gênica relativa foram comparados utilizando um modelo linear simples estimado por mínimos quadrados ('lm{stats}'), cuja interação de momentos e tratamentos foi usada como efeito fixo. O erro residual do modelo ('residuals{stats}') mostrou distribuição com aderência à Gaussiana pelo teste de Cramer-Von Mises ('cvm.test{nortest}'). Comparações múltiplas foram realizadas no pós-teste com o teste de Tukey ('lsmeans{lme4}' e 'cld{lme4}').

A expressão proteica de Pabp, Elf4e e Dcp1a via western blot foram normalizadas em comparação com a expressão da proteína endógena β -actina. A média dos valores de expressão obtidos no tratamento com 18% de etanol foram divididos pela média dos valores do grupo controle (0% de etanol). Os dados mostraram aderência à distribuição Gaussiana pelo teste de Cramer-Von Mises ('cvm.test{nortest}') e foi conduzido teste *t* pareado bicaudal ('t.test{stats}').

RESULTADOS

Acidificação do meio extracelular e taxa de crescimento populacional em diferentes porcentagens de etanol

A avaliação da taxa de crescimento celular (via densidade óptica, OD₆₂₀) mostra um significativo aumento populacional a partir de 60 min e 90 min em meios com 0% e 6% de etanol, respectivamente. O aumento populacional só foi observado em 180 min e 240 min nas células cultivadas em meio com 12% de etanol. Não houve crescimento em células cultivadas em meio com 18% de etanol (Figura 5A). O pH extracelular diminuiu significativamente a partir de 30 min em amostras com 0% e 6% de etanol, enquanto o meio com 12% e 18% de etanol foram acidificados somente a partir de 60 min e 150 min de cultivo, respectivamente (Figura 5B). De fato, o teste de correlação de Pearson suportou uma correlação negativa entre o pH extracelular e crescimento celular sob estresse etanólico a 6% ($r^2 = -0,94$), 12% ($r^2 = -0,83$) e 18% ($r^2 = -0,45$) (Figura 6).

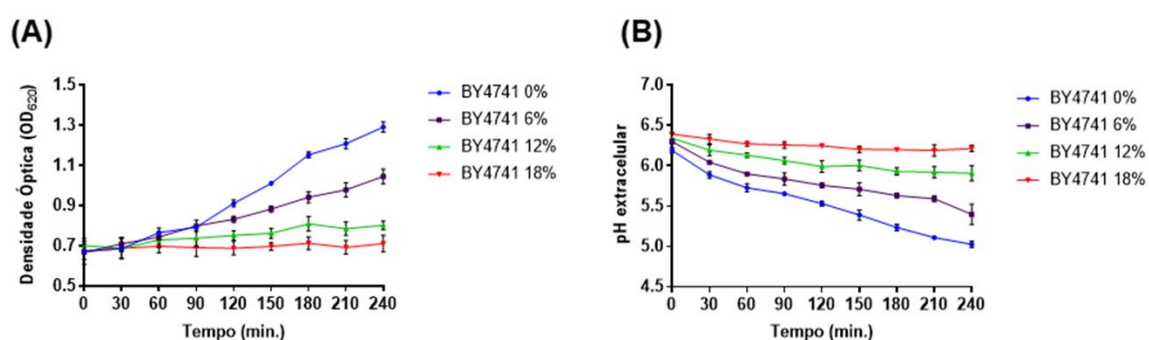


Figura 5 - Gráfico de linha de pH e OD₆₂₀ para células submetidas a 0%, 6%, 12% e 18% de estresse etanólico ao longo de 240 min. (A) apresenta média e erro padrão dos valores de OD₆₂₀ e (B) média e erro padrão dos valores de pH extracelular.

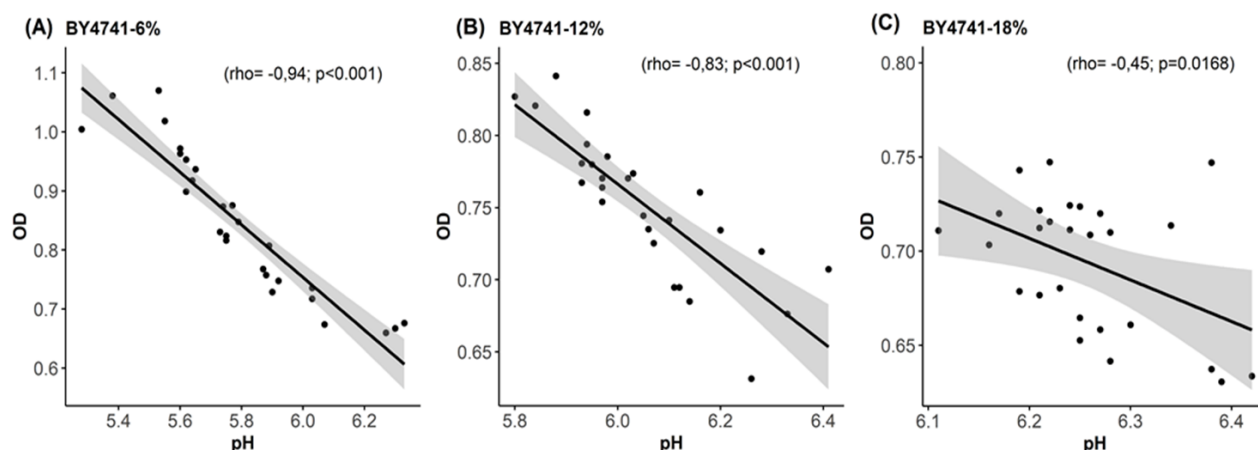


Figura 6 - Gráfico de dispersão entre pH e OD₆₂₀ sob estresse etanólico de 6%, 12% e 18%. Cada ponto representa uma observação e a área cinza indica o intervalo de confiança. (A): Coeficiente de correlação de Pearson em 6% de etanol. (B): Coeficiente de correlação de Pearson em 12% de etanol. (C): Coeficiente de correlação de Pearson em 18% de etanol.

Localização subcelular das proteínas Pma1p e Pil1p e quantificação GFP

As proteínas Pma1p são identificadas como pequenos pontos verdes no interior celular e na membrana das células de BY4741-Pma1p-GFP com 0% e 18% de etanol. Ainda, observa-se nessas amostras a presença de vacúolos. Observamos que as células não tratadas com etanol possuem uma maior quantidade de Pma1p, sugerindo uma maior movimentação intracelular desta proteína durante os 240 min de tratamento (Figura 7A-D). Não houve mudanças no padrão de distribuição de Pma1p das células tratadas durante 240 min com 18% de etanol (Figura 7E-H).

A quantificação GFP mostrou que a intensidade da fluorescência da Pma1p é semelhante entre as células com 0% e 18% de etanol à 0 min. A intensidade de fluorescência aumentou significativamente em ambas as condições após 240 min de exposição, embora essa intensidade seja ligeiramente maior nas células cultivadas com 0% de etanol (Figura 9A).

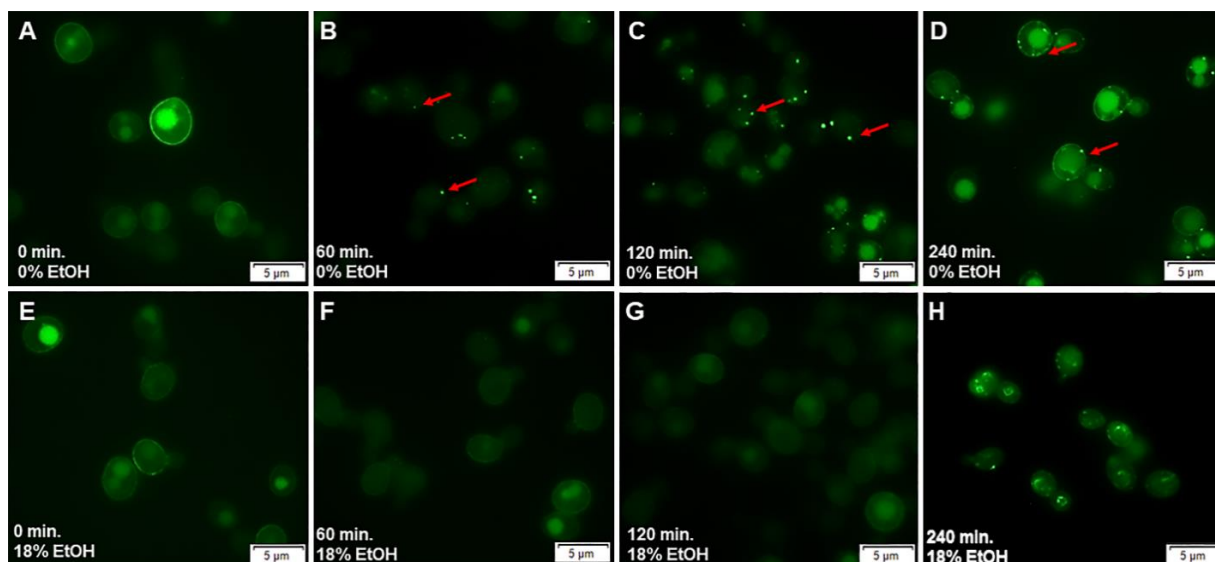


Figura 7 - Imagens de microscopia de fluorescência para a linhagem BY4741-Pma1p-GFP tratadas com 0% e 18% de estresse etanólico por 240 min. As setas vermelhas apontam regiões de presença da Pma1p. (A): BY4741-Pma1p-GFP em 0% de etanol e 0 min. (B): BY4741-Pma1p-GFP em 0% de etanol e 60min. (C): BY4741-Pma1p-GFP em 0% de etanol e 120 min. (D): BY4741-Pma1p-GFP em 0% de etanol e 240 min. (E): BY4741-Pma1p-GFP em 18% de etanol e 0 min. (F): BY4741-Pma1p-GFP em 18% de etanol e 60 min. (G): BY4741-Pma1p-GFP em 18% de etanol e 120 min. (H): BY4741-Pma1p-GFP em 18% de etanol e 240 min.

Comparando as células com a Pil1p-GFP com 0% (Figura 8A-D) e 18% (Figura 8E-H) de etanol, ambos apresentam as proteínas Pil1p como pontos verdes homogeneamente distribuídos em toda periferia da membrana plasmática.

A quantificação GFP mostrou que a intensidade de fluorescência da Pil1p é semelhante entre as células com 0% e 18% de etanol à 0 min. A intensidade de fluorescência aumentou significativamente em ambas as condições após 240 min de tratamento, embora essa intensidade seja significativamente maior nas células tratadas com 18% de etanol (Figura 9B).

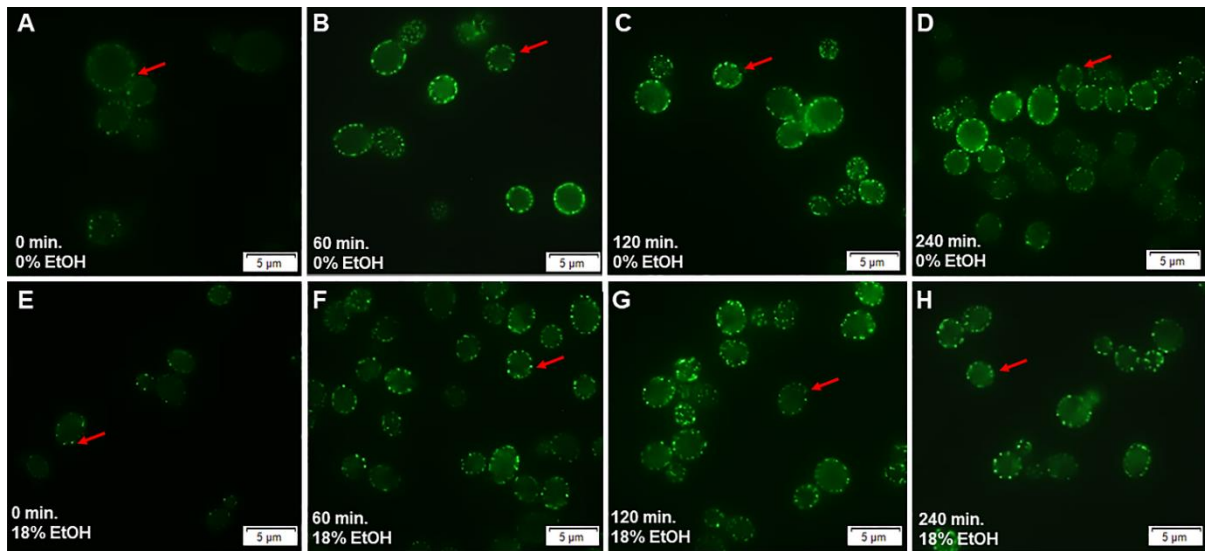


Figura 8 - Imagens de microscopia de fluorescência para a linhagem BY4741-Pil1p-GFP tratadas com 0% e 18% de estresse etanólico por 240 min. As setas vermelhas exemplificam regiões de localização da Pil1p. (A): BY4741-Pil1p-GFP em 0% de etanol e 0 min. (B): BY4741-Pil1p-GFP em 0% de etanol e 60 min. (C): BY4741-Pil1p-GFP em 0% de etanol e 120 min. (D): BY4741-Pil1p-GFP em 0% de etanol e 240 min. (E): BY4741-Pil1p-GFP em 18% de etanol e 0 min. (F): BY4741-Pil1p-GFP em 18% de etanol e 60 min. (G): BY4741-Pil1p-GFP em 18% de etanol e 120 min. (H): BY4741-Pil1p-GFP em 18% de etanol e 240 min.

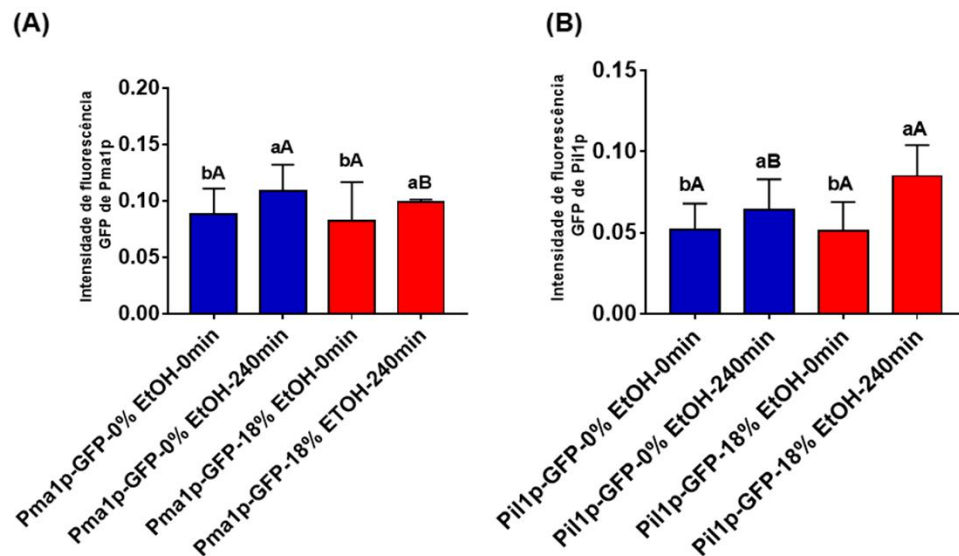


Figura 9 - Média e erro-padrão da intensidade de fluorescência de células BY4741-Pma1p-GFP e BY4741-Pil1p-GFP. (A) Quantificação GFP de Pma1p. (B) Quantificação GFP de Pil1p. Barras azuis e vermelhas evidenciam os valores de média de intensidade de fluorescência GFP para 0% e 18% de etanol, respectivamente. As letras minúsculas em cima das barras indicam mudança significativa ao longo do tempo em um mesmo grupo (onde a>b) enquanto que as letras maiúsculas em cima das barras indicam mudança significativa entre os grupos em cada momento (onde A>B).

Expressão gênica relativa por PCR em tempo real (qPCR)

A expressão relativa dos genes PIL1, CAN1 e XRN1 é significativamente aumentada nas células expostas a 18% de etanol após 240 min de tratamento (Figura 10A-C). Ao contrário, a expressão relativa de PMA1 é significativamente menor nas células após 240 min de tratamento com 18% de etanol (Figura 10D).

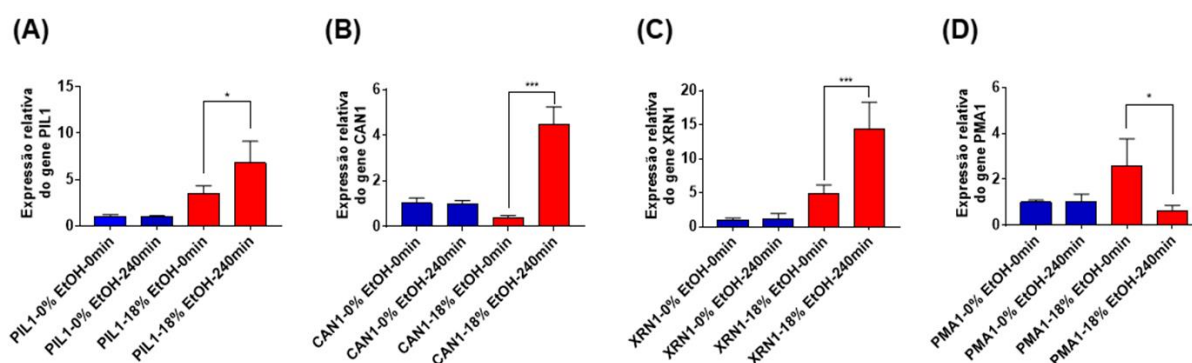


Figura 10 - Expressão gênica relativa de PIL1, CAN1, XRN1 e PMA1 em 0 min e 240 min de exposição à 0% e 18% de etanol. Barras azuis e vermelhas evidenciam os valores de expressão para 0% e 18% de etanol, respectivamente. * simbolizam alterações estatísticas significativas. (A): Expressão relativa do gene PIL1. (B): Expressão relativa do gene CAN1. (C): Expressão relativa do gene XRN1. (D): Expressão relativa do gene PMA1.

Avaliação da abundância das proteínas Dcp1a, eIF4E e PABP via *western blot*

A quantificação via *western blot* das proteínas importantes para a via de degradação de mRNA, *P-bodies* e SGs (Dcp1a, eIF4E e PABP), mostrou que após 240 min de tratamento com 18% de etanol houve uma redução significativa da abundância da proteína Dcp1a (Figura 11A), enquanto a proteína PABP apresentou um aumento significativo na sua abundância na mesma condição (Figura 11B). Por fim, a proteína eIF4E não apresentou alteração significativa em sua expressão (Figura 11C).

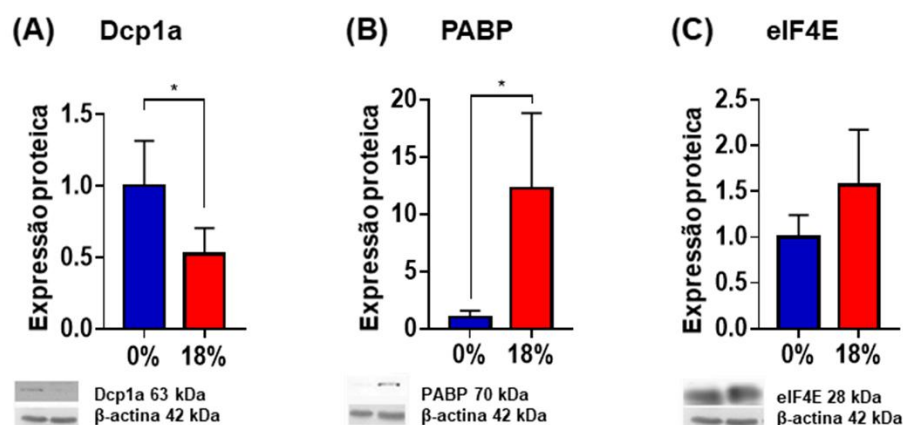


Figura 11- Quantificação das proteínas Dcp1a, PABP e eIF4E via western blot após 240 min tratamento com 0% e 18% de etanol. Barras azuis e vermelhas evidenciam os valores de *fold change* (comparadas com a B-actina) para 0% e 18% de etanol, respectivamente. * simbolizam alterações estatísticas significativas. (A): quantificação proteica da Dcp1a. (B): quantificação proteica da PABP. (C): quantificação proteica da eIF4E.

DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a investigar a dinâmica dos compartimentos de membrana plasmática eisossoma e MCP em células de *S. cerevisiae* durante o estresse etanólico.

Células de *S. cerevisiae* submetidas à baixo nível de estresse etanólico mostram taxa de crescimento celular e atividade de fluxo de prótons pouco afetadas pelo etanol. Porém, à medida que os níveis de estresse aumentam, o crescimento celular torna-se mais lento e a atividade de fluxo de prótons diminui, sugerindo que o ciclo celular é prolongado e a célula permanece em estado estacionário em níveis elevados de estresse por etanol. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo prévio conduzido por nosso time com as linhagens BMA64-1A e S288C de *S. cerevisiae* (WOLF et al., 2021).

Foi observado que células cultivadas em glicose acidificam rapidamente o meio extracelular (KURODA et al., 2019). Porém, o citosol é acidificado à medida que as células atingem a fase estacionária ou sob condições de restrição de glicose (KANE, 2016). Além disso, há uma relação entre pH citosólico e a taxa de crescimento populacional, na qual a acidificação do citosol está associada a um crescimento mais lento enquanto que pH citosólico mais alcalino relaciona-se a um crescimento mais rápido (KANE, 2016). Dessa forma, os nossos dados de taxa de crescimento populacional e análise de acidificação do meio extracelular corroboram com os relatos

descritos acima, indicando que o estresse etanólico conduz a célula rapidamente a um estado estacionário.

Os resultados de expressão gênica, sublocalização celular e quantificação via GFP da Pma1p, evidenciam a diminuição Pma1p/PMA1 (MCP) em células sob alto estresse etanólico. Essa proteína é responsável pelo efluxo de prótons (BUSTO; WEDLICH-SÖLDNER, 2019), sugerindo que níveis médio e alto de etanol diminuem a atividade da Pma1p (MCP) e, conseqüentemente, reduz o efluxo e gradiente de prótons na membrana plasmática, corroborado com nossas análises de pH extracelular.

Apesar do gradiente de prótons da membrana plasmática e a manutenção do pH intracelular serem conservados principalmente pela atividade de Pma1p (MCP) (MOHARIR et al., 2018), transportadores APC também influenciam na manutenção do pH citosólico e representam os principais consumidores do gradiente de prótons (MOHARIR; GAY; MARKUS, 2022). Dessa forma, a levedura tem a capacidade de regular o número de transportadores APC disponíveis na membrana em sua forma ativa com a atividade de fluxo de prótons mantido pela Pma1p (MCP), agrupando-os no eisossoma em sua forma inativa, protegendo-os da ubiquitinação e subsequente entrega ao vacúolo para degradação (MOHARIR et al., 2018).

O aumento da expressão do gene CAN1 (gene responsável por codificar transcricionalmente o simportador APC de arginina, Can1p) em células sob alto estresse etanólico indica o aumento no número desses simportadores nas células. Com o aumento de transportadores APCs em sua forma ativa (transportando prótons/nutrientes para dentro da célula) seria esperado encontrar alterações nos valores de pH extracelular. Interessantemente, nossos achados mostraram que o pH extracelular manteve-se constante durante os 240 min de exposição ao alto nível de etanol. Dessa forma, sugerimos que os simportadores APC estão armazenados no compartimento eisossoma em sua forma inativa durante o estresse por etanol, protegidos da degradação.

A principal proteína do eisossoma (Pil1p) estava aumentada em nossa quantificação via GFP e expressão gênica sob alto estresse por etanol. É proposto que níveis reduzidos de PIL1 induzem uma redução na quantidade de eisossomas de

tamanho normal, enquanto o aumento de PIL1 conduz a um número normal de eisossomas com tamanhos maiores (MOREIRA et al., 2009). Por isso, sugerimos que os compartimentos eisossoma devem estar aumentados em tamanho durante o estresse por etanol.

Ademais, regiões onde os compartimentos eisossoma estão localizados, são ricas em ergosterol e tem a rigidez da membrana aumentada (DOUGLAS; KONOPKA, 2014). O aumento na rigidez da membrana plástica antagoniza o aumento da fluidez induzido por altas concentrações de etanol (DING et al., 2009). Assim, o aumento do tamanho dos eisossoma preexistentes durante o estresse etanólico, implica no aumento de regiões contendo ergosterol e, conseqüentemente, aumento da rigidez da membrana plasmática, o que proporcionaria uma maior proteção para a célula.

Uma outra forma para melhor entender o aumento do eisossoma sob elevado estresse etanólico, pode ser a associação deste compartimento com proteínas da via de degradação de mRNA. O compartimento eisossoma já foi implicado na regulação das vias de degradação de mRNAs (GROUSL et al. 2015; AMEN; KAGANOVICH, 2020). O estresse por etanol também proporciona um ambiente que induz vias de armazenamento e degradação de RNAs através de organelas sem membranas, como, por exemplo, *P-bodies* e SGs (WOLF et al., 2021).

Nossa análise de abundância proteica demonstra uma redução da proteína Dcp1a (mRNA *decapping*) em células sob alto estresse etanólico, indicando uma menor taxa de degradação de mRNA via cap 5', menor número de *P-bodies* e de mRNA sem cap 5' (subproduto da exoribonuclease 5'-3' Xrn1p). Em contrapartida, o gene XRN1, o qual codifica transcricionalmente a exoribonuclease 5'-3' Xrn1p, estava aumentado em células sob a mesma condição. Um estudo reportou que enquanto outros componentes da via de decaimento do mRNA permanecem acumulados em *P-bodies*, a Xrn1p é seletivamente liberada e associa-se ao eisossoma em células pós-diauxicas (GROUSL et al. 2015). Desta forma, propomos que sob alto estresse etanólico, a Xrn1p também pode estar armazenada em eisossomas, reforçando o possível papel protetor e regulador do eisossoma em células sob alto estresse etanólico.

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 pós-estresse.

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.

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 microorganism for alcoholic fermentation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.

FORREST, L.R.; KRÄMER, 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 real-time 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 bio-ethanol 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 pH_i in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome biology**, v. 13, n. 9, p. 1-15, 2012.

PARKER, R. RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. **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 RT-qPCR 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.