



Análisis de expresión diferencial en el cromosoma I de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentación y quimiostato

Nasim Salim*, Nikola Tesla†, Rosalind Elsie Franklin*, Charles Robert Darwin†, Margaret Oakley Dayhoff†, Carl Edward Sagan*

*Department of Computer Science and Artificial Intelligence Massachusetts Institute of Technology 32 Vassar Street, Cambridge, MA 02139, USA

†Department of Genetics and Genomic Sciences Icahn School of Medicine at Mount Sinai New York, NY 10029, USA

Autor de correspondencia: Carl Edward Sagan cesagan@ingenieria.uner.edu.ar

Resumen

En este trabajo se planteó analizar cambios en la expresión de genes en el cromosoma 1 de *Saccharomyces cerevisiae* en un estado de recursos escasos, batch, y en quimiostato, se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas para su análisis, partiendo desde la obtención de los datos en una base de datos, preprocesamiento, control de calidad, alineamiento, análisis de la expresión diferencial y enriquecimiento de los genes resultantes. Se encontraron cambios en múltiples vías de señalización compleja, más allá de las que regulan la producción energética, como fueron rutas de síntesis de aminoácidos, modificaciones de proteínas y receptores externos, lo cual es consistente con trabajos anteriores, y resalta la importancia de los genes localizados en el cromosoma 1 durante la adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes condiciones de entorno.

Palabras clave

transcriptoma, levadura, expresión, vías

I. INTRODUCCIÓN

S. cerevisiae ha sido utilizada durante más de un siglo en la industria de alimentos, como en la producción de pan y cerveza, debido a sus propiedades fermentativas[1]. Además, este microorganismo se ha convertido en un modelo de estudio para dilucidar los mecanismos moleculares que ocurren durante el ciclo celular en células eucariotas[2], [3]. En la producción de bioetanol de segunda generación, *S. cerevisiae* se ha mejorado mediante ingeniería evolutiva para aumentar su eficiencia en la producción de compuestos de interés[4]. También se ha empleado en la biotecnología para la producción de insulina, anticuerpos y albúmina, entre otros productos.[5]

Ha habido muchos estudios transcriptómicos de la levadura en diferentes condiciones de entorno[6], donde se resalta la gran importancia de respuestas al estrés como mecanismos de adaptación a cambios nutricionales en el entorno mediante vías de señalizaciones[7], [8], donde muchos genes como SNF1, GAL, entre otros, se han analizado en detalle por su implicación en muchas de estas vías[9], [10].

El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de genes del primer cromosoma de *Saccharomyces cerevisiae*, en particular de la cepa CEN.PK 113-7D[11] bajo dos condiciones metabólicas diferentes: metabolismo respiro-fermentativo (batch), donde la levadura consume azúcares para producir dióxido de carbono y alcohol, este metabolismo es útil para producir productos de fermentación como cerveza o vino, o totalmente respiratorio (quimiostato), donde la levadura emplea exclusivamente el oxígeno presente para producir energía a través de la respiración

celular, lo que resulta en un crecimiento más lento, pero una mayor producción de biomasa, este metabolismo es útil para producir levadura, para su uso en la fabricación de pan o para la producción de proteínas recombinantes en la industria farmacéutica.

II. MÉTODOS

Especificaciones

Se usó como sistema operativo Ubuntu 22.0.2 mediante WSL2 5.15.90.1 de Windows 10 Pro, en una computadora de escritorio con un procesador Intel(R) Core(TM) i5-7400 de 3.00GHz y 16GB de RAM.

Fuente de datos

Los datos de secuenciación para el análisis fueron obtenidos de un estudio anterior[12], junto con el genoma de referencia y anotación.

Software

Para el análisis exploratorio inicial de los datos se utilizó comandos bash y también la librería FASTQC[13] para generar reportes que luego fueron agrupados por MultiQC[14].

Para el alineamiento se emplearon STAR[15], como herramienta principal, e HISAT2[16], para tener una validación de los resultados. Se empleó Qualimap[17] para hacer un control de calidad a los alineamientos, que fueron agrupados nuevamente por MultiQC, y también fue necesario Samtools[18] para convertir los archivos de salida .sam de HISAT2 a archivos .bam.



Se empleó un script de R con las librerías `pacman`[19], `DeSeq2`[20], `biomaRt`[21], `tidyverse`[22], `ggplot2`[23], `pheatmap`[24] y `ggrepel`[25] para el análisis de expresión diferencial.

También se empleó `YMLA`[26] y `YeastEnrichr`[27], [28] en sus versiones web para enriquecer los genes resultantes.

Metodología

El primer paso consistió en hacer un control de calidad de las muestras, compuestas por 3 réplicas de *Saccharomyces cerevisiae* en estado batch y en quimiostato, dos archivos por cada muestra, conteniendo la secuencia en la hebra plus y minus, ya que se trata de lecturas pair-end.

Una vez comprobada se continuó con el alineamiento, el cual consistió en una primera etapa de creación de índice, con los parámetros `overhang` de 100, `genomeSAindexNbases` en 7 y el resto por defecto, y luego el alineamiento con el índice y la anotación con parámetros por defecto. Para validar el proceso se empleó un segundo alineador, con un proceso similar y parámetros por defecto, se compararon los resultados y luego se continuó con los resultados de STAR.

Posteriormente, se realizó un análisis de expresión diferenciada con los archivos de salida del paso anterior, consistió en el preprocesamiento, anotación con la base de datos de Ensembl, ajuste del modelo estadístico “quimiostato vs batch” y visualización de los resultados.

Finalmente, se ejecutó un análisis de enriquecimiento con `YeastEnrichr` con los genes que se encontraron expresados diferencialmente del script anterior, con un criterio de considerar como `upregulated` a genes que presenten un `log2FoldChange` mayor a 0,5 y tengan un `p-value` menor a 0,005 y como `downregulated` a genes que presenten un `log2FoldChange` menor a -0,5 y tengan un `p-value` menor a 0,005. A su vez, se efectuó otro análisis de enriquecimiento con un set extendido de genes expresados de diferencialmente de todos los cromosomas.

III. RESULTADOS

Control de calidad

Se puede observar que el número de reads varía entre las réplicas entre unos 35.000 y 60.000 reads (fig1 A), también se observa que las lecturas son paired end. El nivel de calidad de la secuencia en las distintas réplicas es muy bueno basado en sus valores `Phred(B, C)` y la baja cantidad de bases `N` (E). Se puede apreciar una diferencia en el porcentaje de GC entre las muestras batch y quimiostato (D). Los largos de las reads parecen estar alrededor de las 100 bases, con algunos menores a tal cantidad que puede deberse a que hayan sido sometidas a un proceso de trimming. En cuanto a los niveles de duplicación, es esperable encontrar un pico de secuencias duplicadas más de 10 veces por la naturaleza del estudio. Finalmente, se observa un enriquecimiento de algunos nucleótidos en las primeras bases secuenciadas por un artefacto inherente a la técnica utilizada en la secuenciación.

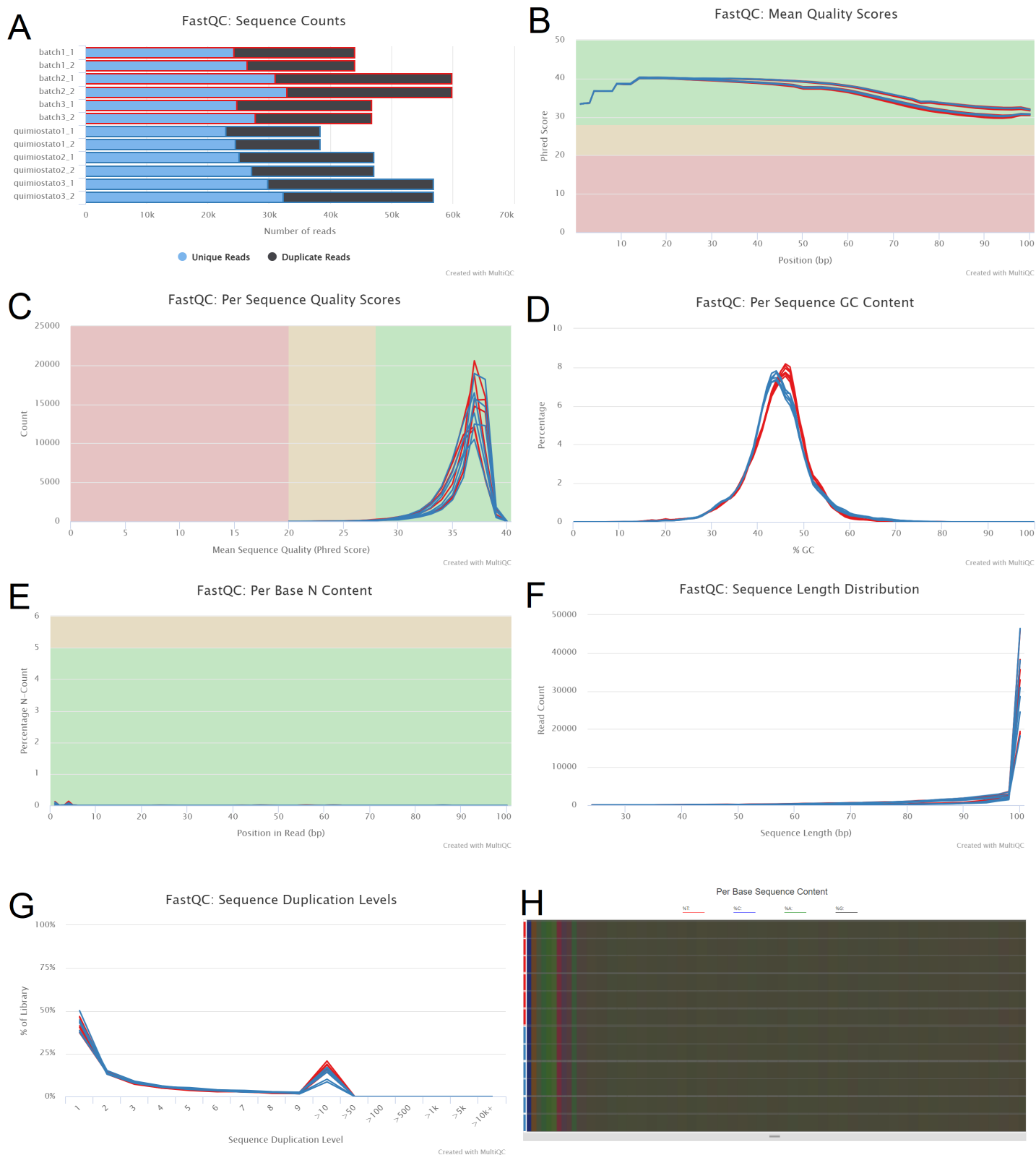


Figura 1. Resultados de FastQC de los datos crudos, visualizados en MultiQC. En rojo las muestras pertenecientes al estado batch y en azul las de quimiostato.

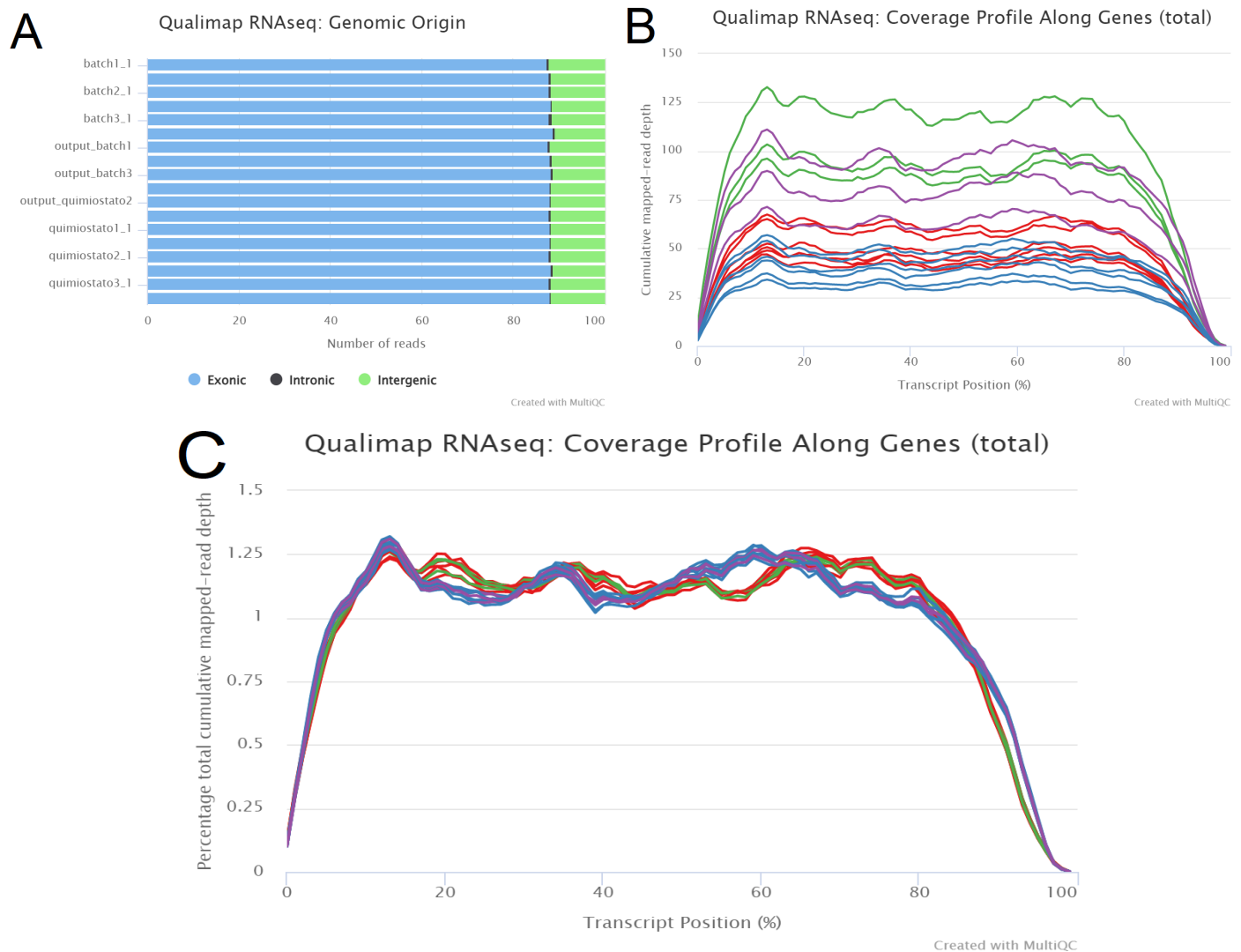


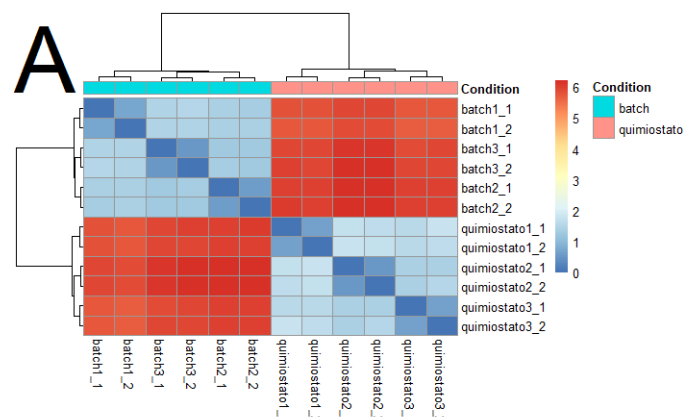
Figura 2. Resultados de Qualimap, visualizados en MultiQC. En rojo las muestras pertenecientes a batch analizadas con STAR, en azul las de quimiostato analizadas con STAR, en verde las batch analizadas con HISAT2 y en violeta las quimiostato analizadas con HISAT2.

Alineamiento

De las salidas de ambos alineadores (fig2) se observa cierta similitud, tanto en el origen genómico (A), como en la cobertura (B, C). En particular, en la cobertura normalizada (C), se observa de manera diferenciada dicha cobertura para las muestras batch y las de quimiostato.

Análisis de expresión diferencial

En el análisis de expresión diferencial (fig3) se observó gran correlación entre las réplicas, diferenciadas por su condición (A), algo que también queda claro en el análisis de componentes (B), donde la condición explica el 92 % de la varianza. Finalmente, se observaron algunos de los genes regulados de manera positiva, como ACS1, GDH3, BDH2, y de manera negativa, PMT2, ADE1, CYS3, (C) con respecto al modelo considerado quimiostato vs batch.



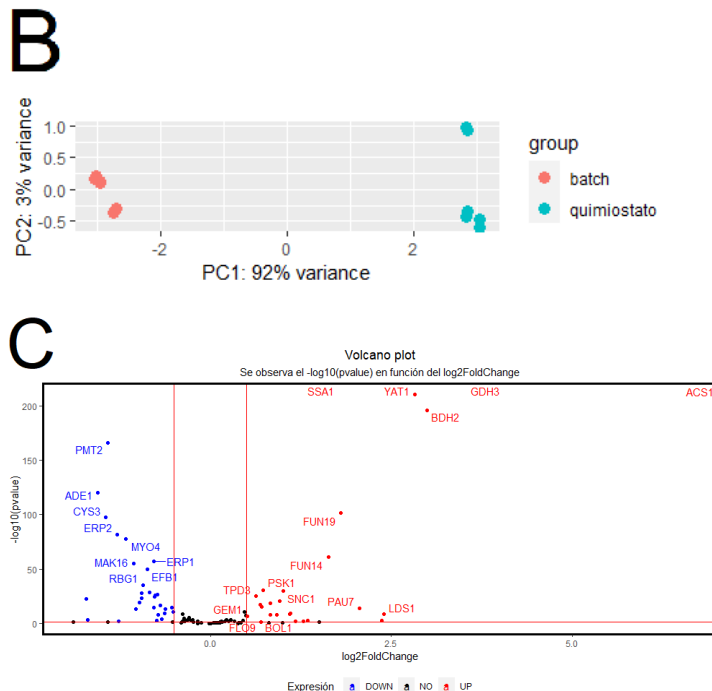


Figura 3. Gráficos generados en R para el análisis diferencial

Análisis de enriquecimiento

De los resultados devueltos por YeastEnrichR (fig4) se puede ver que en el caso de los genes que estaban regulados de manera negativa en quimiostato, principalmente, las funciones biológicas tienen que ver con transporte de proteínas (A), los componentes celulares asociados a Golgi y vesículas (C), su función molecular a unión de GTP (E) y las rutas a factores de transcripción y modificación de proteínas (G).

En el caso de los genes regulados de manera positiva en quimiostato, principalmente, las funciones biológicas están relacionadas con homeostasis de lípidos y reciclado de receptores (B), los componentes celulares en la pared o membrana externa (D), las funciones moleculares a uniones a estructuras flap de ADN y manosa (F) y las rutas a síntesis de glutamato.

Análisis de enriquecimiento extendido

En los resultados del análisis extendido (MS1) se encontraron resultados similares a los encontrados anteriormente analizando los genes por separado, gran parte involucrados en procesos de traducción y generación de ribosomas (A), en componentes citoplasmáticos y citosólicos (B), con actividad oxidoreductasa y de unión (C) y que afectan a rutas de respiración y síntesis de nucleótidos y lípidos (D).

IV. DISCUSIÓN

En este análisis, se encontraron diferencias en los niveles de expresión de genes del cromosoma 1 de levadura en los

estados de quimiostato y batch.

Quimiostato

En quimiostato, las rutas reguladas de manera positiva fueron la de síntesis de glutamato, debido al gen GDH3, el cual está relacionado directamente con la síntesis de glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato, un producto del ciclo de Krebs[29], y la ruta de la glucólisis, particularmente el gen ACS1, el cual regula el paso de acetato a acetyl co-a dentro de la mitocondria para dar inicio al ciclo de Krebs[30].

También se observa mayor transcripción de genes encargados con función biológica de homeostasis de lípidos y de reciclado de receptores, donde también se observó que uno de los componentes celulares principalmente afectados es la pared celular, lo que indica una reorganización de la estructura externa de la célula para adaptarse al medio donde recibe un constante suministro de nutrientes, esto también está relacionado con la mayor expresión de genes de unión de manosa, la cual es importante en la generación de glicoproteínas[31], [32]. La reorganización no solo ocurre en el exterior de la célula, sino también en el interior, ya que muchos de los genes están relacionados con una mayor unión a estructuras flap de ADN.

Batch

En el estado batch, las rutas mayoritariamente afectadas de manera positiva son la de síntesis de cisteína, por el gen CYS3[33], síntesis de novo de nucleótidos de purina, ADE1[34], y modificaciones de proteína, en particular, glicosilación con manosa, mediada por el gen PMT2[35].

Hay una mayor transcripción de genes relacionados con el transporte y modificación de proteínas, lo que indicaría un gran reordenamiento del proteoma en levadura durante procesos de escasez de recursos energéticos, acompañado por una mayor producción de amino ácidos.

Conclusión

Mediante este análisis se observaron los genes del cromosoma 1 que se expresan de manera diferencial en los estados de quimiostato y batch. Muchos de estos genes, lógicamente, involucrados en procesos de respiración oxidativa y fermentación, pero muchos otros involucrados en rutas de síntesis de aminoácidos, modificaciones de proteínas y receptores externos[10], [36].



A Downregulated GO (BP)

intracellular protein transport (GO:0006886)
protein-cofactor linkage (GO:0018065)
protein lipoylation (GO:0009249)
Golgi vesicle transport (GO:0048193)
maintenance of protein localization in endoplasmic reticulum (GO:0035437)
protein retention in ER lumen (GO:0006621)
cellular protein localization (GO:0034613)
Golgi organization (GO:0007030)
peptidyl-lysine modification (GO:0018205)
intracellular mRNA localization (GO:0008298)

B Upregulated GO (BP)

lipid homeostasis (GO:0055088)
protein import into peroxisome matrix, receptor recycling (GO:0016562)
receptor recycling (GO:0001881)
positive regulation of protein ubiquitination (GO:0031398)
mitochondrion organization (GO:0007005)
fermentation (GO:0006113)
regulation of organelle organization (GO:0033043)
positive regulation of endonuclease activity (GO:0032079)
positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal (GO:1903322)
negative regulation of glycogen biosynthetic process (GO:0045719)

C Downregulated GO (CC)

COPI-coated ER to Golgi transport vesicle (GO:0030134)
Golgi-associated vesicle (GO:0005798)
endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (GO:0005793)
coated vesicle (GO:0030135)
preribosome, large subunit precursor (GO:0030687)
preribosome (GO:0030684)
multimeric ribonuclease P complex (GO:0030681)
integral component of endoplasmic reticulum membrane (GO:0030176)
cytoplasmic stress granule (GO:0010494)
nucleolar ribonuclease P complex (GO:0005655)

D Upregulated GO (CC)

fungus-type cell wall (GO:0009277)
intrinsic component of mitochondrial outer membrane (GO:0031306)
nucleus (GO:0005634)
integral component of mitochondrial outer membrane (GO:0031307)
mitochondrion (GO:0005739)
ERMES complex (GO:0032865)
integral component of mitochondrial membrane (GO:0032592)
post-mRNA release spliceosomal complex (GO:0071014)
spore wall (GO:0031160)
chaperonin-containing T-complex (GO:0005832)

E Downregulated GO (MF)

guanyl ribonucleotide binding (GO:0032561)
GTP binding (GO:0005525)
cystathionine gamma-synthase activity (GO:0003962)
microfilament motor activity (GO:0000146)
dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase activity (GO:0004169)
purine ribonucleoside binding (GO:0032550)
acid-amino acid ligase activity (GO:0016881)
nucleobase transmembrane transporter activity (GO:0015205)
histone methyltransferase activity (H3-K4 specific) (GO:0042800)
purine ribonucleoside triphosphate binding (GO:0035639)

F Upregulated GO (MF)

flap-structured DNA binding (GO:0070336)
mannose binding (GO:0005537)
purine ribonucleoside triphosphate binding (GO:0035639)
calcium ion binding (GO:0005509)
protein serine/threonine kinase inhibitor activity (GO:0030291)
O-acetyltransferase activity (GO:0016413)
transcription coactivator activity (GO:0003713)
O-acyltransferase activity (GO:0008374)
histone acetyltransferase activity (GO:0004402)
tRNA binding (GO:0000049)

G Downregulated Pathways

Translation Factors_WP32
Protein Modifications_WP346
Sulfur Amino Acid biosynthesis_WP7
De Novo Biosynthesis of Purine Nucleotides_WP203
Aerobic Glycerol Catabolism_WP224
Sulfate assimilation and copper detoxification_WP4173
Glycolysis_WP253
Superpathway of Histidine, Purine, and Pyrimidine_WP416
Glycolysis and Gluconeogenesis_WP515
Principle Pathways of Carbon Metabolism_WP112

H Upregulated Pathways

Glutamate biosynthesis_WP77
Superpathway of Glutamate Biosynthesis_WP191
Glycolysis and Gluconeogenesis_WP515
Principle Pathways of Carbon Metabolism_WP112

Figura 4. Resultados de YeastEnrichr: para proceso biológico(BP) en la lista de genes downregulados (A) y upregulados (B), para componente celular(CC) en la lista de genes downregulados (C) y upregulados (D), para función molecular(MF) en la lista de genes downregulados (E) y upregulados (F) y para los pathways afectados en la lista de genes downregulados (G) y upregulados (H)

DISPONIBILIDAD DE LOS DATOS

La carpeta con los datos del análisis se encuentran en el siguiente repositorio de Github: <https://github.com/STNasim/University>. En el directorio /Nuevas_tecnologias_secuenciacion/TP_final.

MATERIAL SUPLEMENTARIO



A

cytoplasmic translation	
ribosome biogenesis	
translation	
rRNA processing	
maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (...)	
ribosomal large subunit assembly	
ribosomal large subunit biogenesis	
cellular amino acid biosynthetic process	
endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rRNA fr...	
tricarboxylic acid cycle	
maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (...)	
rRNA export from nucleus	
endonucleolytic cleavage in 5'-ETS of tricistronic rRNA tra...	
glycogen biosynthetic process	
endonucleolytic cleavage to generate mature 5'-end of SS...	
lipid metabolic process	
purine nucleotide biosynthetic process	
ribosomal small subunit assembly	
translational initiation	
fatty acid metabolic process	
ribosomal subunit export from nucleus	
carbohydrate metabolic process	
methylation	
formation of cytoplasmic translation initiation complex	
regulation of translational fidelity	
maturation of LSU-rRNA	
ATP biosynthetic process	

C

oxidoreductase activity	
structural constituent of ribosome	
transferase activity	
catalytic activity	
metal ion binding	
RNA binding	
nucleotide binding	
translation initiation factor activity	
ligase activity	
mRNA binding	
rRNA binding	
pyridoxal phosphate binding	
U3 snoRNA binding	
ATP binding	
NAD binding	
translation initiation factor binding	
transaminase activity	
methyltransferase activity	
oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo gro...	
large ribosomal subunit rRNA binding	

B

cytoplasm	
cytosolic large ribosomal subunit	
cytosolic small ribosomal subunit	
ribosome	
90S preribosome	
nucleolus	
small-subunit processome	
mitochondrion	
cytosol	
peroxisome	
preribosome, large subunit precursor	
endoplasmic reticulum	
cytoplasmic stress granule	
lipid particle	
membrane	
peroxisomal matrix	
plasma membrane	
mitochondrial inner membrane	
integral component of membrane	
eukaryotic 43S preinitiation complex	
endoplasmic reticulum membrane	
DNA-directed RNA polymerase I complex	
peroxisomal membrane	
eisosome	
nucleus	
eukaryotic 48S preinitiation complex	
small ribosomal subunit	

D

TCA cycle, aerobic respiration	
aerobic respiration, electron transport chain	
de novo biosynthesis of purine nucleotides	
fatty acid oxidation pathway	
superpathway of glucose fermentation	
glycogen biosynthesis	

MS1. Resultados de YMLA con set de genes extendido.



REFERENCIAS

- [1] S. Maicas, «The Role of Yeasts in Fermentation Processes», *Microorganisms*, vol. 8, n.º 8, p. 1142, jul. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8081142.
- [2] H. Karathia, E. Vilaprinyo, A. Sorribas, y R. Alves, «Saccharomyces cerevisiae as a model organism: a comparative study», *PloS One*, vol. 6, n.º 2, p. e16015, feb. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016015.
- [3] C. Boone, «Yeast Systems Biology: Our Best Shot at Modeling a Cell», *Genetics*, vol. 198, n.º 2, pp. 435-437, oct. 2014, doi: 10.1534/genetics.114.169128.
- [4] N. Gurdo, «Mejoramiento de la levadura Saccharomyces cerevisiae Y138 por ingeniería evolutiva para la producción de bioetanol de segunda generación», 2016. doi: 10.13140/RG.2.1.4246.3602.
- [5] M. Parapouli, A. Vasileiadis, A.-S. Afendra, y E. Hatziloukas, «Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications», *AIMS Microbiol.*, vol. 6, n.º 1, pp. 1-31, feb. 2020, doi: 10.3934/microbiol.2020001.
- [6] H. Taymaz-Nikerel, A. Cankorur-Cetinkaya, y B. Kirdar, «Genome-Wide Transcriptional Response of Saccharomyces cerevisiae to Stress-Induced Perturbations», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, 2016, Accedido: 31 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2016.00017>
- [7] M. C. Teixeira, N. P. Mira, y I. Sá-Correia, «A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in Saccharomyces cerevisiae», *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, n.º 2, pp. 150-156, abr. 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2010.10.011.
- [8] S. Zaman, S. I. Lippman, L. Schneper, N. Slonim, y J. R. Broach, «Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways», *Mol. Syst. Biol.*, vol. 5, n.º 1, p. 257, ene. 2009, doi: 10.1038/msb.2009.20.
- [9] M. Conrad, J. Schothorst, H. N. Kankipati, G. Van Zeebroeck, M. Rubio-Teixeira, y J. M. Thevelein, «Nutrient sensing and signaling in the yeast Saccharomyces cerevisiae», *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, n.º 2, pp. 254-299, mar. 2014, doi: 10.1111/1574-6976.12065.
- [10] V. M. Boer, J. H. de Winde, J. T. Pronk, y M. D. W. Piper, «The Genome-wide Transcriptional Responses of Saccharomyces cerevisiae Grown on Glucose in Aerobic Chemostat Cultures Limited for Carbon, Nitrogen, Phosphorus, or Sulfur *», *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n.º 5, pp. 3265-3274, ene. 2003, doi: 10.1074/jbc.M209759200.
- [11] J. F. Nijkamp *et al.*, «De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain Saccharomyces cerevisiae CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology», *Microb. Cell Factories*, vol. 11, n.º 1, p. 36, mar. 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-36.
- [12] I. Nookaew *et al.*, «A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in Saccharomyces cerevisiae», *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, n.º 20, pp. 10084-10097, nov. 2012, doi: 10.1093/nar/gks804.
- [13] S. Andrews, «FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data», 2010. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- [14] P. Ewels, M. Magnusson, S. Lundin, y M. Käller, «MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report», *Bioinformatics*, vol. 32, n.º 19, pp. 3047-3048, oct. 2016, doi: 10.1093/bioinformatics/btw354.
- [15] A. Dobin *et al.*, «STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner», *Bioinformatics*, vol. 29, n.º 1, pp. 15-21, ene. 2013, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- [16] D. Kim, J. M. Paggi, C. Park, C. Bennett, y S. L. Salzberg, «Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype», *Nat. Biotechnol.*, vol. 37, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.
- [17] F. García-Alcalde *et al.*, «Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data», *Bioinformatics*, vol. 28, n.º 20, pp. 2678-2679, oct. 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts503.
- [18] P. Danecek *et al.*, «Twelve years of SAMtools and BCFtools», *GigaScience*, vol. 10, n.º 2, feb. 2021, doi: 10.1093/gigascience/giab008.
- [19] T. W. Rinker y D. Kurkiewicz, *pacman: Package Management for R*. Buffalo, New York, 2018. [En línea]. Disponible en: <http://github.com/trinker/pacman>
- [20] M. I. Love, W. Huber, y S. Anders, «Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2», *Genome Biol.*, vol. 15, n.º 12, p. 550, 2014, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- [21] D. Smedley *et al.*, «BioMart--biological queries made easy», *BMC Genomics*, vol. 10, p. 22, ene. 2009, doi: 10.1186/1471-2164-10-22.
- [22] H. Wickham *et al.*, «Welcome to the Tidyverse», *J. Open Source Softw.*, vol. 4, p. 1686, nov. 2019, doi: 10.21105/joss.01686.
- [23] H. Wickham, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. [En línea]. Disponible en: <https://ggplot2.tidyverse.org>
- [24] R. Kolde, «pheatmap: Pretty Heatmaps». 4 de enero de 2019. [En línea]. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>
- [25] K. Slowikowski, *ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with «ggplot2»*. 2023. [En línea]. Disponible en: <https://github.com/slowkow/ggrepel>
- [26] T.-H. Yang *et al.*, «YMLA: A comparative platform to carry out functional enrichment analysis for multiple gene lists in yeast», *Comput. Biol. Med.*, vol. 151, p. 106314, dic. 2022, doi: 10.1016/j.compbio.2022.106314.



- [27] E. Y. Chen *et al.*, «Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool», *BMC Bioinformatics*, vol. 14, p. 128, abr. 2013, doi: 10.1186/1471-2105-14-128.
- [28] M. V. Kuleshov *et al.*, «Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update», *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, n.º W1, pp. W90-97, jul. 2016, doi: 10.1093/nar/gkw377.
- [29] M. Braymer, W. M. Bot, D. Digles, E. Willighagen, M. Summer-Kutmon, y E. Weitz, «Glutamate biosynthesis superpathway», may 2021, Accedido: 30 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.wikipathways.org/instance/WP191>
- [30] Kdahlquist *et al.*, «Glycolysis and gluconeogenesis», may 2021, Accedido: 30 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.wikipathways.org/instance/WP515>
- [31] T. R. Gemmill y R. B. Trimble, «Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1426, n.º 2, pp. 227-237, ene. 1999, doi: 10.1016/s0304-4165(98)00126-3.
- [32] O. Peter y A. K. Menon, «Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids», *J. Lipid Res.*, vol. 48, n.º 5, pp. 993-1011, may 2007, doi: 10.1194/jlr.R700002-JLR200.
- [33] J. Heckman *et al.*, «Sulfur amino acid biosynthesis», ene. 2023, Accedido: 30 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.wikipathways.org/instance/WP7>
- [34] M. Braymer, W. M. Bot, C. Chichester, E. Willighagen, M. Summer-Kutmon, y E. Weitz, «De novo biosynthesis of purine nucleotides», may 2021, Accedido: 30 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.wikipathways.org/instance/WP203>
- [35] M. Braymer, W. M. Bot, D. Digles, E. Willighagen, M. Summer-Kutmon, y E. Weitz, «Protein modifications», may 2021, Accedido: 30 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.wikipathways.org/instance/WP346>
- [36] X. Fu, P. Li, L. Zhang, y S. Li, «RNA-Seq-based transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during solid-state fermentation of crushed sweet sorghum stalks», *Process Biochem.*, vol. 68, pp. 53-63, may 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2018.02.024.