



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

***ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO Y PROTEÓMICO DE CÉLULAS CHO PRODUCTORAS DE
GLICOPROTEÍNAS RECOMBINANTES: HIPOTERMIA MODERADA***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. EN C. A N D R E A B E D O Y A L Ó P E Z

Director de tesis:

DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Miembros Del Comité Tutor:

DR. JUAN MIRANDA RÍOS
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
DR. LORENZO PATRIK SEGOVIA FORCELLA
Instituto de Biotecnología, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Juana quien ha sido, es y será mi razón para seguir adelante
A Santiago mi compañero de vida
A mis padres, mis hermanos y mi familia
quienes siempre han creído en mí y son el motivo para continuar creciendo.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 323954). Además de haber contado con el apoyo económico otorgado a la Dra. Valdez del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 220795, 178528, 181895 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA IN208415; PAPIIT 209113, 210013. Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en los laboratorios C-036, así como en la Unidad de Bioprocesos (a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán) del Departamento de Biotecnología y Biología Molecular.

Al Dr. Alejandro Sanchez, Karel Estrada y Dra. Verónica Jimenez por su apoyo técnico para la secuenciación masiva y los análisis de calidad de las secuencias, la normalización y la generación de los datos de expresión diferencial por bioinformática. Al Ingeniero Abel Blancas por su ayuda técnica.

A los miembros de mi comité tutorial el Dr. Lorenzo Segovia Forcella y Dr. Juan Miranda Rios por sus valiosos aportes.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Norma Adriana Valdez por su apoyo incondicional, tanto en lo personal como en lo académico, por tenerme paciencia tantos años, escucharme y tener en cuenta mis ideas, alentarme a escribir cuando creía que era una labor titánica, por traerme de nuevo a la academia y alentarme a terminar y dar el último paso. Al Dr. Mauricio Trujillo Roldan por tener para mí siempre un momento y un café en su oficina, por sus valiosos consejos, por prestarnos su laboratorio y estar siempre dispuesto a escucharme. A los dos por abrirme las puertas de su laboratorio aún cuando ya no estoy en él. Por darme la seguridad de pertenecer a algún lado e invitarme siempre a seguir.

A todos los que de alguna u otra manera han contribuido en este trabajo, A mis compañeros de grupo Giroshi Bando, Deisy Marin, Andrea Castellanos, Daniel, Mariana, Ramses Garcia, Hector Frayde, Saumel, Monserrat Garcia por sus aportes valiosos en ayudarme a armar una historia congruente con tantos datos y por aguantarse horas de extensos seminarios sin dormirse. A Angeles Cancino por su ayuda y entrenamiento en proteómica, a Isabel y Hector por su ayuda en al inicio del proyecto con el cultivo celular. A Ramses Gamboa, amigo gracias por contar contigo en cualquier momento, gracias por tu apoyo incondicional y por ser ejemplo de tenacidad y de lucha contra los imposibles.

Yo Andrea Bedoya López declaro que esta tesis titulada “ ***ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO Y PROTEÓMICO DE CÉLULAS CHO PRODUCTORAS DE GLICOPROTEÍNAS RECOMBINANTES: HIPOTERMIA MODERADA*** “ y el trabajo presentado en ella no es copia de ningún otro trabajo. El cual fue escrito por mi y revisado por mi tutora. Habiendo consultado otros textos pero siempre refreando las ideas de otros, y reconociendo su trabajo claramente.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistemas de expresión y su capacidad de producción de proteínas heterólogas.	6
Tabla 2. Productos biológicos aprobados por la FDA y producidos en células CHO.	8
Tabla 3. Efecto de la hipotermia moderada sobre la productividad de proteínas recombinantes en células CHO.	13
Tabla 4: Estudios transcriptómicos, genómicos y proteómicos en células CHO.	16
Tabla 5. Iniciadores u oligos usados en la validación transcriptómica.	24
Tabla 6. Parámetros cinéticos entre el cultivo bifásico y control.	27
Tabla 7. Comparación de la expresión diferencial de los genes por RNA-seq y PCR en tiempo real (RT-PCR).	30
Tabla 8. Genes diferencialmente expresados en hipotermia moderada encontrados en la literatura y comparados con los obtenidos en el presente trabajo.	59
Tabla 9. Proteínas diferencialmente expresadas de la fracción membranal, en condiciones de hipotermia moderada a las 48 horas después del cambio de temperatura.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del activador del plasminógeno tisular P00750.	9
Figura 2. Concentración celular (A), porcentaje de viabilidad celular (B), Producción volumétrica de tPA (C), Producción específica por célula de tPA (D) en células CHO TF70R en cultivos a 37°C (■) y bifásico a 30°C (○) (línea punteada marca el cambio de la temperatura de 37 a 30°C).	26
Figura 3. Consumo de glucosa (A), producción de lactato (B) y Consumo de glutamina (C) en células CHO TF-70R en cultivos a 37°C (■) y bifásico a 30°C (○) (línea punteada marca el cambio de la temperatura de 37 a 30°C).	27
Figura 4. Abundancia de los genes (media) en las muestra a las 72 h (a) y 96 h (b) con respecto al control (48 h). En azul se representan todos los genes obtenidos, en verde los genes con expresión diferencial con una $q > 0.8$ y en rojo los genes con una $q > 0.9$.	28

Figura 5. Genes agrupados en las categorías ontológicas A. Proceso biológico, B. Componente celular y C. Función molecular.	29
Figura 6. Diagramas KEGG para respuesta al estrés. Vía de señalización de Mapk. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.	34
Figura 7. Diagramas KEGG para respuesta al estrés. Vía de señalización de Ras. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.	36
Figura 8. Diagramas KEGG para respuesta al estrés. Vía de señalización de Vía de señalización de p53. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.	38
Figura 9. Diagramas KEGG para la categoría ciclo celular. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En verde los genes reprimidos y en rojo los genes sobreexpresados.	42
Figura 10. Diagramas KEGG para la categoría apoptosis. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo los genes sobreexpresados y en verde los genes reprimidos.	46
Figura 11. Diagramas KEGG para el procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático a) 24 h. b) 48 h. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.	51
Figura 12. Diagramas KEGG para el metabolismo. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.	54
Figura 13. Representación gráfica de los genes diferencialmente expresados y su ubicación en los diferentes compartimentos de las células. En verde oscuro los genes reprimidos a las 48 horas después del cambio de temperatura y en verde claro a las 24h. En rojo oscuro los genes sobreexpresados a las 48h y en naranja a las 24h.	
Figura 14. Geles SDS PAGE al 12% con isoelectroenfoco de 3 a 10 a) proteoma preliminar del cultivo control a 37°C, b) proteómica diferencial de cultivo bifásico, c) secretoma diferencial del cultivo control d) secretoma diferencial del cultivo bifásico.	55
Figura 15. Western blot en 2D del secretoma de la línea CHO-TF70R (A) Secretoma 37°C-48h y (B) Secretoma 30°C-96 horas. tPAc = control de tPA comercial.	56
Figura 16. Geles SDS-PAGE al 12% del fraccionamiento células MP: marcador de peso molecular, Cs: citosol, M: membranas, N: núcleo y Ce: citoesqueleto	57
Figura 17. Geles 2D SDS-PAGE al 12% de la fracción membranal a. Gel maestro a 30°C y b. Gel maestro a 37°C.	58

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
BHK	Células de riñón de hámster bebé
CHO	Células de ovario de hámster chino
Cs	Citosol
Cys	Cisteína
DHFR	Enzima dihidrofolato reductasa
EPO	Eritopoyetina
Fab	Fragmento de anticuerpo monoclonal
Fc	Proteína de fusión
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
G	Golgi
GHT	glicina, hipoxantina y timidina
GRAS	<i>Generally Recognised As Safe</i>
GS	Glutamina sintetasa
HEK-293	Células de riñón embrionario humano
hGM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrofagos
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
L	Lisosoma
M	Mitocondria
Mab	Anticuerpo monoclonal
MEM	Membrana
MSX	Metionin-sulfoximina
MTX	Metotrexato
N	Núcleo
NSO	Células de mieloma de ratón
PERC6	Células derivadas de retina humana
PR	Proteínas recombinantes
RE	Retículo endoplasmático
SEAP	<i>Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase</i>
Ser	Serina
TNFR	Factor de necrosis tumoral
tPA	Activador de plasminógeno tisular
V	Vesículas

CONTENIDO

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Agradecimientos a título personal	iii
Índice de tablas	v
Índice de figuras	v
Índice de abreviaturas	vii
Contenido	1
Abstract	3
Resumen	4
Introducción	6
<i>Los cultivos celulares como sistemas de expresión de PR</i>	6
<i>Características del tPA como proteína modelo, sus usos y producción</i>	9
<i>La respuesta celular al estrés por frío</i>	10
Antecedentes	12
<i>Implicación de la hipotermia moderada sobre la productividad de las líneas recombinantes</i>	12
<i>Estudios sobre el transcriptoma y proteoma de las células CHO</i>	14
Planteamiento del problema	18
Hipótesis	19
Objetivos	19
<i>Objetivo general</i>	19
<i>Objetivos específicos</i>	19
Materiales y métodos	20
<i>Línea celular y medio</i>	20
<i>Cultivos celulares</i>	20
<i>Concentración y viabilidad celular</i>	20
<i>Cuantificación de metabolitos por YSI</i>	20
<i>Cuantificación del r-tPA</i>	20
<i>Análisis estadístico</i>	21
<i>Separación de ARN total</i>	21
<i>Secuenciación del transcriptoma</i>	21
<i>Análisis Bioinformático</i>	21
<i>Validación del análisis transcripcional por PCR en tiempo real</i>	22
<i>Aislamiento de proteínas</i>	22
<i>Identificación del tPA en geles de electroforesis SDS-PAGE por Western Blot</i>	22
<i>Enriquecimiento de fracciones celulares</i>	23

<i>Electroforesis en gel SDS/PAGE en dos dimensiones</i>	23
<i>Tinción de proteínas por azul de Coomassie coloidal y análisis de imágenes</i>	24
<i>Análisis de masas</i>	24
Resultados y discusión	25
<i>La hipotermia moderada afecta el crecimiento celular, la viabilidad y la producción de tPA</i>	25
<i>La disminución de la temperatura afecta el consumo de glucosa y producción de lactato, y no el consumo de glutamina</i>	26
Transcriptómica de la línea TF70R bajo condiciones de hipotermia	28
Análisis de la expresión diferencial	30
<i>Respuesta celular al estrés por frío y efecto en los transcritos recombinantes</i>	30
<i>Respuesta a la disminución de la temperatura: vías de señalización</i>	32
<i>Cambios en el ciclo celular por efecto del cambio de temperatura</i>	39
<i>Efecto de la hipotermia moderada sobre la transcripción</i>	40
<i>Efecto de la hipotermia moderada sobre la muerte celular</i>	43
<i>Efecto de la hipotermia moderada sobre la secreción y la síntesis de proteínas</i>	47
<i>Efecto transcripcional de la hipotermia moderada sobre el metabolismo</i>	52
Proteómica diferencial	56
<i>Fraccionamiento celular</i>	57
<i>Identificación de proteínas de la fracción membranal con expresión diferencial</i>	58
Conclusiones	63
Perspectivas	65
Anexos	66
<i>Anexo 1. Genes diferencialmente expresados</i>	66
<i>Anexo 2. Western blot de la fracción membranal para GRP78, GAPDH e histona 3. Ce: citoesqueleto, N: núcleo, M: membrana, Cs: citosol, MP: marcador de peso molecular</i>	85
<i>Anexo 3. Análisis de concentración e integridad de las muestras de RNA total</i>	85
<i>Anexo 4. Pruebas de estabilidad de RNAm. En presencia de un bloqueador de la traducción (Actinomicina D)</i>	86
<i>Anexo 5. Gráfico de la integral de células viables vs tiempo (días). En azul el cultivo a 30°C y en rojo el cultivo control a 37°C</i>	86
<i>Anexo 6. Diagrama KEGG de los genes TRP a las 24 y 48 horas después del cambio de temperatura</i>	87
<i>Anexo 7. Gel maestro 30 y 37 °C en 2D con cuadrículas y los identificadores de las manchas del análisis estadístico</i>	88
Bibliografía	89
Artículo indexado como primer autor	108

ABSTRACT

The use of recombinant proteins (PR) has increased in recent years, promoting research in this field of knowledge. Many therapeutic proteins have complex post transcriptional modifications. Therefore many of them are produced in mammalian cells to obtain similar modifications to those of humans.

In this study, the effect of moderate hypothermia on recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cells cultures producing tissue plasminogen activator (tPA) was assessed, cultures were performed in biphasic conditions (temperature change from 37 to 30 ° C at 48 h of culture). Kinetic parameters and specific yields of consumption and production were determined. A final cell concentration of 2.7×10^6 cells/mL was observed in both cultures, while cell viability was maintained in the biphasic culture for six days. The decrease of the temperature increased the volumetric productivity (2.2 times) and the specific productivity (1.6 times), as well as the decreased in glucose consumption (11%) and lactate production (19%).

With the idea of understanding the transcriptomic response associated with the change in temperature and the increase in productivity, we analyzed by RNA mass sequencing the transcripts produced differently at 24 and 48 h after the insult. The transcripts were mapped to the reference genome of *Cricetulus griseus* (hamster), and sorted using gene ontology (GO). In total, 416 differentially expressed genes were obtained at 72 h and 3,473 at 96 h of culture. In the transcriptome, we detected the overexpression of the genes coding for the Rbm3 and Cirp proteins, related to the cold stress response. Also, changes in transcripts related to the cell cycle, signaling, proliferation, induction of cell arrest and attenuation of apoptosis were observed. No variation was found in the gene encoding for tPA. Changes in genes coding for transcription factors, translation, biogenesis of ribosomes, translocation of proteins to the endoplasmic reticulum (RE), overexpression of chaperone-related 72 h genes and changes in cytoskeletal and vesicle transport genes were observed. The data were validated by real-time PCR analyzing 8 genes, which coincided with the transcriptomic study.

At the proteomic level, we analyzed the change in the fraction of plasma membrane proteins, Golgi, RE and mitochondria. In particular, 43 differential proteins of 348 quantified spots were observed. Their identification by mass spectrometry showed that the proteins with greater differential expression are related to vesicle transport. Both transcriptomic and proteomic data show changes in the classical secretory pathway, in the system involved in the transport, modification, and secretion of proteins that could be related to the increase in PR production.

RESUMEN

El uso de proteínas recombinantes (PR) se ha incrementado en los últimos años, impulsando la investigación en este campo de conocimiento. La mayoría de las PR terapéuticas usadas en humanos tienen algún tipo de modificación postranscripcional. Estas son expresadas en células de mamífero las cuales permiten obtener proteínas similares a las humanas. Uno de los principales retos durante su producción es la mejora en la productividad, siendo la hipotermia moderada una estrategia de cultivo que favorece este proceso.

En este estudio se analizó el efecto de la hipotermia moderada en cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO) recombinantes productoras de activador de plasminógeno tisular (tPA), realizados en condiciones bifásicas (cambio de temperatura de 37 a 30°C a las 48 h de cultivo). Se determinaron los parámetros cinéticos y los rendimientos específicos de consumo y producción. Se observó tanto en el cultivo bifásico (30°C) como en el cultivo control (37°C) una concentración celular final de 2.7×10^6 cel/mL, en el cultivo bifásico la viabilidad se mantuvo seis días más con respecto al cultivo control. La disminución de la temperatura provocó el aumento de la productividad volumétrica (2.2 veces) y de la productividad específica (1.6 veces), así como la disminución del consumo de glucosa (11%) y de la producción de lactato (19%).

Con la idea de mejorar la comprensión de la respuesta transcriptómica asociada al cambio de temperatura y al aumento de productividad, analizamos mediante secuenciación masiva los transcritos producidos diferencialmente a las 24 y 48 h después del estímulo. Los transcritos fueron mapeadas con el genoma de referencia de *Cricetulus griseus* (hámster), y clasificados haciendo uso de la ontología de genes (GO). En total se obtuvieron 416 genes diferencialmente expresados a las 72 h y 3,473 a las 96 h de cultivo. En el transcriptoma se detectó la sobreexpresión de los genes que codifican para las proteínas Rbm3 y Cirp, relacionadas con la respuesta al estrés por frío. También se observaron cambios en transcritos relacionados con el ciclo celular, señalización, proliferación, inducción del arresto celular y la atenuación de la apoptosis. No se encontró variación en la expresión del gen que codifica para el tPA. Aunque se observaron cambios en genes codificantes para factores de transcripción, traducción, biogénesis de ribosomas, translocación de proteínas al retículo endoplasmático (RE), sobreexpresión de genes a las 72 h relacionados con chaperonas y cambios en los genes de citoesqueleto y transporte de vesículas. Los datos se validaron por PCR en tiempo real analizando 8 genes, los cuales coincidieron con el estudio transcriptómico.

A nivel proteómico se analizó el cambio en la fracción de proteínas de membrana plasmática, de Golgi, RE y mitocondrias. Particularmente, se observaron 43 proteínas diferenciales de 348 manchas cuantificadas. Su identificación mediante espectrometría de masas permitió determinar que las proteínas encontradas con mayor expresión diferencial están relacionadas con el transporte de vesículas. Tanto los datos transcriptómicos como proteómicos señalan cambios en la vía de secreción clásica de la célula, justo en el sistema involucrado en el transporte, modificación y secreción de proteínas que podrían estar relacionados con el aumento en la producción de la PR.

INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas recombinantes (PR) a partir de cultivos celulares tuvo sus inicios en el siglo XIX. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante a finales del siglo XX (Hotchkiss, 1965) permitió la creación de líneas celulares con factores de selección y capacidad para expresar proteínas heterólogas (Naylor et al., 1976, Rosenstraus y Chasin, 1975, Gupta, 1980, Thaisuchat et al., 2011). Desde entonces se ha logrado cultivar gran variedad de líneas celulares inmortalizadas con diversas aplicaciones científicas y médicas (Hacker et al., 2009). En la actualidad muchas PR terapéuticas son producidas en células de mamífero y son usadas para el tratamiento de enfermedades como cáncer, artritis, desórdenes sanguíneos, diabetes, entre otras (Walsh, 2014).

Los cultivos celulares como sistemas de expresión de PR

La producción de PR se lleva a cabo en diferentes sistemas de expresión como bacterias, levaduras, células de insecto, vegetales y de mamífero (Palomares et al., 2004; Desai et al., 2010). La selección del sistema de expresión se basa en las características de la PR, principalmente el patrón de glicosilación (estructuras de carbohidratos unidas a las proteínas), los rendimientos de producción, las condiciones de cultivo y el tiempo de producción (Tabla 1).

Tabla 1. Sistemas de expresión y su capacidad de producción de proteínas heterólogas. (Tomado de *Desai et al.*, 2010).

Sistema	Costo de producción	Tiempo de producción	Capacidad de producción	Nivel de expresión	Glicosilación	Costo de almacenamiento
Bacteria	bajo	corto	alto	alto	ausente	moderado
Hongo	mediano	mediano	alto	bajo-alto	alta manosilación	moderado
Insecto	alto	mediano	mediano	bajo-alto	alta manosilación	alto
Animal	alto	largo	muy bajo	bajo-moderado	similar a la humana	alto
Animal transgénico	alto	muy largo	bajo	moderado-alto	similar a la humana	alto
Planta	bajo	corto	alto	moderado-alto	fucosa y xilosa	poco
Planta transgénica	muy bajo	largo	muy alto	moderado-alto	fucosa y xilosa	poco

En el caso de las PR que serán usadas como biofármacos (anticuerpos, citocinas, hormonas, etc), la mayoría posee patrones de glicosilación complejos que influyen directamente en la bioactividad, solubilidad y estabilidad (Durocher et al. 2009; Swiech et al., 2012). El patrón de glicosilación de las PR va a depender del taxa del hospedero. En específico, el patrón de glicosilación de las PR usadas como biofármacos, en algunos casos, pueden ocasionar problemas en el reconocimiento del sistema inmune. Por ejemplo, las células vegetales adicionan α -1,3 fucosa y β -1,3 xilosa, los cuales son alergénicos para los humanos (Walsh and Jefferis, 2006).

Los sistemas de expresión en células de mamífero tienen capacidad para hacer modificaciones post-traduccionales como la glicosilación similares a las encontradas en las proteínas endógenas humanas (Wurm, 2004; Walsh & Jefferis, 2006; Jayapal et al., 2007a; Kantardjieff et al., 2009; Wong et al., 2010). Entre los sistemas más populares para producir PR se encuentran las células de ovario de hámster chino (CHO), las células de mieloma de ratón (NS0), de riñón de hámster bebé (BHK), de riñón embrionario humano (HEK-293) y células derivadas de retina humana (PERC6) (Jayapal et al., 2007b; Walsh, 2014). A nivel industrial las células CHO son las más utilizadas (Kaneko et al., 2010; Walsh, 2014), por características como su rápido crecimiento, los cultivos se llevan a cabo en suspensión, tienen $2n=22$ cromosomas, se pueden manipular genéticamente (Jenkins et al., 1996) y son catalogadas como GRAS (*Generally Recognised As Safe*), por lo que son inocuas para la salud humana y el ambiente (Saef, 2007).

Las células CHO fueron desarrolladas a partir de ovarios de hámster Chino por Tjio y Puck en el año 1957 (Tjio & Puck, 1958). Las líneas parentales se conocen como CHO-K1, la cual es glicina dependiente, y CHO pro3, que es prolina dependiente; de ambas se derivan las demás líneas recombinantes conocidas. Las líneas recombinantes más usadas son DUKX-X11 que es derivada de CHO-K1 (línea parental de la usada en este estudio) y la línea DG44 derivada de CHO pro3. Ambas son deficientes de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) responsable de la biosíntesis de purina (hipoxantina) y timidina (Lee et al., 2010). Esto hace que se requiera para su cultivo medios adicionados con glicina, hipoxantina y timidina (GHT). En particular, las líneas de DUKX-X11 o DUKX-XB11 tienen un alelo del gen *dhfr* deletado y el otro alelo del gen se encuentra mutado por métodos químicos, mientras las líneas DG44 tienen deletados ambos alelos por radiación ionizante (Lee et al., 2010; Wurm & Hacker, 2011; Wuest et al., 2012). Para la producción de PR se introducen en la célula vectores que contienen una copia del gen *dhfr* y el gen de interés, por lo que las células que incorporan el vector sobreviven en el medio sin GHT o adicionado con metotrexato (MTX), que bloquea la acción de la enzima DHFR.

La primera PR producida en células CHO recombinantes y aprobada por la FDA, fue el activador de plasminógeno tisular (tPA) en el año 1987 (Barnes & Dickson, 2006). Subsecuentemente, se han desarrollado más líneas que producen PR a escala industrial como los anticuerpos monoclonales (Geisse & Fux, 2009), el factor de crecimiento de

hepatocitos (Park et al., 2010b), enzimas, proteínas de fusión, interferones, entre otros (Tabla 2) (Jayapal et al., 2007a; Geisse & Fux, 2009; Hossler et al., 2009; Park et al., 2010c; Walsh, 2014). En la actualidad alrededor del 70% de las PR de uso farmacéutico aprobado por la FDA son producidas en células de mamífero (Jayapal et al., 2007a; Walsh, 2014).

Tabla 2. Productos biológicos aprobados por la FDA y producidos en células CHO (Modificado de Walsh 2014).

PRODUCTO	TIPO	USO TERAPÉUTICO	PRODUCTOR	AÑO DE APROBACIÓN (FDA)
VariZIG,	Human IgG	Varicela	Cangene Corp.	2012
Flucelvax	Virus influenza	Vacuna para influenza	Novartis	2012
Myozyme	α -glucosidasa	Cáncer colorectal metastásico	Amgen	2006
Naglazyme	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa	Mucopolisacaridosis VI	BioMarin Pharmaceutical	2005
Advate	Factor VIII	Hemofilia A	Baxter	2003
Xolair	Anti-IgE mAb	Asma severo/moderado	Genentech	2003
Humira	Anti-TNF α mAb	Artritis Reumatoide	Abbott	2002
Aranesp	Eritropoyetina	Anemia	Amgen	2001
Campath	Anti-CD52 mAb	Leucemia linfocítica crónica	Genzyme, Bayer	2001
Tenecteplase	Activador de plasminógeno tisular	Infarto de miocardio	Genentech	2000
Herceptin	Anti-HER2 mAb	Cáncer de seno metastásico	Genentech	1998
Benefix	Factor IX	Hemofilia B	Wyeth	1997
Cerezyme	β -glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher	Genzyme	1994
Pulmozyme	Desoxirribonucleasa I	Fibrosis quística	Genentech	1993

En las últimas décadas, la demanda de PR representa un mercado creciente cercano a los 140 mil millones de dólares (Walsh, 2014). De ahí que ha sido necesario el desarrollo de procedimientos que incrementen los rendimientos de los cultivos y que mantengan la calidad (Yoon et al., 2006; Kaneko et al., 2010; Wong et al., 2010). Entre las estrategias implementadas se encuentran: mejoramiento de la transfección celular, adición de modificadores de la cromatina, diseños de nuevos medios de cultivos, uso de diferentes configuraciones de cultivo (continuo o perfusión), empleo de distintos bioreactores, manipulación de las condiciones de oxígeno y disminución de la temperatura (Yoon et al., 2004; Fox et al., 2005; Al-Fageeh & Smales, 2006; Hacker et al., 2009). A la fecha se ha aumentado la producción específica de PR hasta alrededor de 90 pg/cel/día (Trummer et al., 2006; Hacker et al., 2009; Becerra et al., 2011; De Jesus & Wurm, 2011).

Características del tPA sus usos y producción

El tPA (Figura 1) tiene un peso molecular de 68 kDa y forma parte de la familia de las serin-proteasas. Posee 527 aminoácidos con una serina (Ser) en el extremo amino-terminal, 17 puentes disulfuros y una cisteína (Cys) adicional libre en la posición 83 (Collen & Lijnen, 2004). Posee 4 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-117, 184, 218 y 448), de los cuales solo el de Asn-184 es de ocupación variable y el sitio Asn-218 no es ocupado pues presenta la secuencia Asn-Pro-Ser donde la prolina, por su rotación, interfiere con los procesos de N-glicosilación (Andersen et al., 2000). En particular el tPA se relaciona con la regulación de la fibrinólisis al actuar sobre el plasminógeno para producir plasmina (Kim et al., 2011b), la que a su vez actúa sobre la fibrina para disolver trombos o coágulos (Anglés-Cano et al., 2001). Se secreta por células endoteliales y ejerce su efecto primario en el sistema vascular donde tiene una concentración de 5 µg/L en plasma. Este participa en el proceso de hemostasia, el cual consiste de un conjunto de mecanismos bioquímicos que se encargan de detener procesos hemorrágicos en el cuerpo. La uroquinasa produce un corte en Arg561-Val562 mientras que el tPA interactúa en conjunto con la fibrina y el plasminógeno maximizando la actividad del sistema fibrinolítico (Andersen et al., 2000).

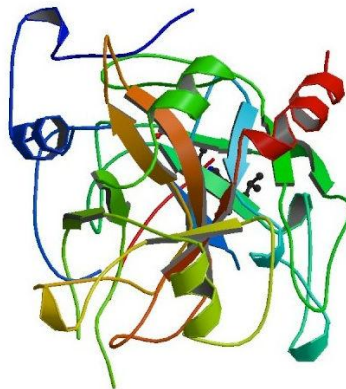


Figura 1. Estructura del activador del plasminógeno tisular P00750 (PDB-www.pdb.org).

El tPA producido en sistemas nativos y recombinantes está compuesto por una mezcla de dos glicoproteínas: tPA de tipo I con tres posibles sitios de glicosilación ocupados y tPA tipo II con dos sitios glicosilados (Asn-117 y Asn-448) (Andersen et al., 2000). El tPA tipo II 50% es más activo que el tipo I (Spellman et al., 1989) y con una mayor afinidad por la lisina y fibrina (Mori et al., 1995), interfiriendo de este modo con la unión a la lisina del plasminógeno (Rudd et al., 1995). La composición de glicanos es determinante en la función del tPA y se ha visto que el residuo Asn-117 tiene oligomanosilación que es

importante en el reconocimiento del tPA por receptores de manosa y galactosa por los hepatocitos para su depuración en el hígado (Otter et al., 1991). Los residuos Asn-184 (presente en el tipo I) y Asn-448 (tipo I y II) están N-glicosilados y contienen (Parekh et al., 1989; Spellman et al., 1989) un ácido siálico terminal que le protege de la degradación proteolítica (Hossler et al., 2009).

La respuesta celular al estrés por frío

La respuesta celular inducida por la disminución de la temperatura ha sido descrita en modelos como la termogénesis adaptativa, la tolerancia al frío y en bioprocesos (Fujita, 1999; Phadtare et al., 1999; Al-Fageeh & Smales, 2006; Underhill et al., 2007). Los estudios muestran que las células han desarrollado estrategias para sobrevivir a cambios de temperatura (Fujita, 1999). El efecto de la disminución de temperatura ha sido estudiado en tejidos, como corazón (Schmidt-Schweda et al., 2013), fibroblastos (Mayer et al., 1987) y cerebro (Yoshida et al., 1998; Liu et al., 2010; Cho et al., 2012) y en células como CHO, HEK293, THP1, entre otras. En general, la respuesta provocada por la disminución de la temperatura se encuentra conservada desde procariotas hasta eucariotes superiores (Jones et al., 1987; Fujita, 1999; Sahara et al., 2002). También se ha propuesto que mientras no se alcance la hipotermia extrema (10-0°C), la respuesta al estrés por frío puede permitir la adaptación y proliferación celular, mediante la activación de mecanismos de protección y sobrevivencia (Sahara et al., 2002; Al-Fageeh & Smales, 2006; Kantardjieff et al., 2010).

La inducción del estrés por frío en un rango de temperatura entre 28 y 34°C se conoce como hipotermia moderada y se usa en el tratamiento de accidentes vasculares, derrames, infartos e isquemias (Schaller & Graf, 2003; González-Ibarra et al., 2011; Frink et al., 2012; Stegman et al., 2012; Schmidt-Schweda et al., 2013), así como en el cultivo de tejidos (Moore et al., 1997; Kaufmann et al., 1999) y para la producción de PR (Tabla 3).

La hipotermia moderada en células de mamífero es percibida a través de canales iónicos como los canales TRP (Transient Receptor Potencial) (Gavva et al., 2012; Cao et al., 2014). La respuesta a la hipotermia ocurre vía fosforilación de los factores de iniciación y elongación (Pain, 1996), como la fosforilación de eIF2a, que provoca la disminución de la traducción de algunos mRNA-protegidos con estructuras cap (Webb & Proud, 1997). Además de la expresión diferencial de genes en respuesta al estímulo (Baik et al., 2006; Yee et al., 2009; Kou et al., 2011). Después se activan mecanismos postranscripcionales que modifican la traducción del RNAm disminuyendo la síntesis general de proteínas (Phadtare et al., 1999). En células de mamífero, la hipotermia moderada provoca la traducción selectiva en algunos RNAm con base en regiones no codificantes 5'UTR y 3'UTR, y su procesamiento alternativo (Sutherland et al., 2005; Xia et al., 2012a; Liu et al., 2013). También se favorece la traducción de mensajeros que contienen elementos

conformacionales como sitios internos de unión a ribosomas (“integral ribosome entry sites”; IRES) y aquellos ricos en adenina y uracilo (AREs) (Chappell et al., 2001; Fox et al., 2004; Dresios et al., 2005; Yee et al., 2009; Al-Fageeh & Smales, 2013). Por ejemplo, las regiones IRES, que se conoce que reclutan factores de iniciación y a la subunidad ribosomal 40S (Baird et al., 2006; Fitzgerald & Semler, 2009), así como a factores *trans* de unión a IRES, formando complejos que promueven el inicio de la traducción y mejoran la estabilidad de los mensajeros (Baird et al., 2006; Filbin & Kieft, 2009). Los sitios AREs asociados a proteínas específicas pueden aumentar la vida media de los mensajeros (Mazan-Mamczarz et al., 2003; Barreau et al., 2005; Gruber et al., 2011). En el mismo sentido, existe evidencia de la sobreexpresión de proteínas de unión al RNA conocidas como RBP (“RNA binding proteins”), mismas que se han asociado con el metabolismo, regulación y función de los RNAs (Lukong et al., 2008). Tal es el caso de la RBP llamada CIRP (“cold-inducible RNA binding protein”) (18 kDa) o la proteína con motivos de unión al RNA RBM3 (“RNA binding motive”) (17 kDa) que son inducidas en condiciones de hipotermia (Danno et al., 1997; Chappell et al., 2001; Yoon et al., 2003a; Fox et al., 2004; Dresios et al., 2005; Yoon et al., 2006; Sureban et al., 2008; Tong et al., 2013). La proteína CIRP es una chaperona de RNA que previene la formación de estructura secundaria a bajas temperaturas (Han & Yenari, 2007), mejorando la estabilidad de los mensajeros. Dicha chaperona reconoce las regiones 5´ y 3´ no traducidas (5´ y 3´ untranslated region; 5´UTR; 3´UTR), protegiendo su conformación (Nishiyama et al., 1997; Sonna et al., 2002; Xia et al., 2012b). El gen codificante para dicha chaperona es expresado de forma clona dependiente, ya sea constitutivamente o de forma periódica (Nishiyama et al., 1998).

En el caso de la proteína RBM3, el cambio de temperatura de 37°C a 32°C provoca el aumento de su transcrito codificante (Danno & Itoh, 2000). Se conoce que RBM3 interactúa con microRNAs o se une a la subunidad 60s de los ribosomas, modificando la degradación de los RNAm o incrementando la síntesis de algunas proteínas en condiciones de hipotermia moderada (Dresios et al., 2005). En particular, el gen codificante de RBM3 se expresa de forma endógena en tejidos específicos como el cerebro y músculo (Al-Fageeh & Smales, 2006; Pilotte et al., 2009; Ferry et al., 2011; Pilotte et al., 2011).

ANTECEDENTES***Implicación de la hipotermia moderada sobre la productividad de las líneas recombinantes***

Una estrategia ampliamente utilizada para mejorar la productividad específica y/o volumétrica en diferentes cultivos celulares, es la hipotermia moderada. La hipotermia moderada en los cultivos celulares provoca la disminución de la velocidad de crecimiento, entre un 3% y hasta un 60%, mientras aumenta la viabilidad, en comparación con cultivos a 37°C (Hendrick et al., 2001; Yoon et al., 2003b; Fox et al., 2004; Gammell et al., 2007; Ahn et al., 2008; Kumar et al., 2008; Park et al., 2010a; Vergara et al., 2014; Vergara et al., 2015; Coronel et al., 2016). También disminuye la proliferación, el flujo metabólico, la actividad de algunas proteasas y la generación de radicales libres (Fox et al., 2004; Dresios et al., 2005; Al-Fageeh & Smales, 2006; Kumar et al., 2007; Al-Fageeh & Smales, 2013).

Se ha reportado que las células cultivadas entre 28-34°C arrestan su ciclo celular en la fase G0/G1, reduciendo el porcentaje de células en fase S (Fussenegger et al., 1999; Coronel et al., 2016). En la fase G1 se producen componentes celulares, por lo que es la fase óptima de síntesis de PR (Fussenegger et al., 1999; Bi et al., 2004). El arresto del ciclo celular prolonga el tiempo de cultivo evitando la activación de la muerte celular programada (Moore et al., 1997; Fussenegger et al., 1999; Al-Fageeh et al., 2005). Además existe un reporte que describe el arresto en fase G2/M de alrededor del 50% de células NS0 (Swiderek & Al-rubeai, 2007). El arresto celular mantuvo la viabilidad y provocó el aumento en más de 2 veces la concentración máxima de anticuerpo (Swiderek & Al-rubeai, 2007). Esto probablemente debido a que durante la fase G2 continúa la síntesis de proteínas y RNA en preparación para la mitosis.

En diferentes células sometidas a hipotermia moderada, como las de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de embrión humano 293 (HEK293), células monocíticas (THP1), células de cáncer cervical (HeLa) y células de mieloma murino NS0, se han reportado incrementos en la productividad que van desde 0.16 hasta 5.6 veces (Tabla 3). Por ejemplo, se ha reportado un incremento de 4.9 veces en la productividad específica de interferón gamma en cultivos bifásicos a 32 °C (Fox et al., 2004), un aumento en más de 5 veces de la productividad específica de eritropoyetina (Ahn et al., 2008) y hasta 13 veces más hormona estimuladora de folículos (FSH), en células CHO (Yoon et al., 2007) (Tabla 3). Dicho aumento se ha atribuido al arresto celular y al aumento de la transcripción de los genes que codifican para proteínas de unión a RNA (RBM3 y CIRP) (Fox et al., 2005; Al-Fageeh & Smales, 2006; Kantardjieff et al., 2010).

Tabla 3. Efecto de la hipotermia moderada sobre la productividad de proteínas recombinantes en células CHO. Tomada de Bedoya-López et al., en preparación.

Referencia	Temperatura (°C)	Proteína recombinante	Productividad específica (veces)	Productividad volumétrica (veces)
Kaufmann et al., 1999	30	SEAP	1.7	-
Hendrick et al., 2001	32	tPA	1.7	-
Yoon et al., 2003a	30	Mab Anti-4-1BB	No incrementa	-3.90
	33		0.16	No incrementa
Yoon et al., 2003b	30	EPO	4.0	No incrementa
	33		5.4	2.5
Schatz et al., 2003	28	Fab quimérico	-	14.0
Bollati-Fogolín et al., 2004	33	hGM-CSF	-	2.1
Fox et al., 2004	32	INF - γ	4.9	2.0
Chen et al., 2004	34	Pro-uroquinasa	1.7	1.5
	31	Pro-uroquinasa	-	1.3
Rodriguez et al., 2005	30	INF - β	-	2.0
Shi et al., 2005	30	Anticuerpo II2	-	2.8
Trummer et al., 2006	30	EPO-fc	-	1.9
Yoon et al., 2007	32	FSH	-	13
Zamani et al., 2008	30	IFN- γ	-	2.0
Nam et al., 2008	33	SEAP	1.3	3.0
Tharmalingam et al., 2008	32	INF - β	-	4.2
Ahn et al., 2008	28	EPO	4.5	5.0
	30		5.0	6.0
	33		4.0	6.5
Berrios et al., 2007	33	EPO	1.5	-
Vergara et al., 2009	33	tPA	1.7	-
Kantardjieff et al., 2010	30	IgG	-	2.0
Kou et al., 2011	30	TNFR-FC	-	5.0
Vergara et al., 2012	31	tPA	1.5	-
Vergara et al., 2014	33	tPA	1.3	-

La estrategia de la hipotermia moderada ha sido conjugada con otras estrategias que aumentan la transcripción aleatoriamente al inhibir a las desacetilasas de histonas, como la adición de butirato de sodio que ha mostrado mejoras en la productividad específica. Por ejemplo, la producción de un anticuerpo fue mejorada en aproximadamente 2 veces en células CHO, comparado con sólo el uso de la hipotermia moderada (Kantardjieff *et al.*, 2010).

Estudios sobre el transcriptoma y proteoma de las células CHO

En el área biotecnológica, la comprensión de las respuestas celulares que ocurren en las células más utilizadas para producir PR permitirá mejorar su productividad (Lai et al., 2013; Dalton & Barton, 2014; Kantardjieff & Zhou, 2014). Hasta ahora, se han realizado estudios transcriptómicos de células enfrentadas a estímulos como hipotermia moderada, butirato de sodio, osmolaridad, entre otros (Yee et al., 2009; Kantardjieff et al., 2010). Sin embargo, una de las principales limitantes para estos estudios ha sido la disponibilidad de datos genómicos.

Los primeros transcriptomas realizados para conocer la respuesta celular de líneas recombinantes productoras de proteínas heterólogas expuestas a diversos estímulos se desarrollaron usando microarreglos hibridados con genes de ratón y/o rata (Baik et al., 2006; Sonna et al., 2006; Yee et al., 2009). Uno de los primeros estudios del efecto de la hipotermia moderada sobre células de leucemia monocítica (THP-1) se hizo usando microarreglos, describiéndose 167 secuencias diferencialmente expresadas relacionadas con la transducción de señales, el crecimiento celular, el metabolismo y cambios en proteínas CSP (Sonna et al., 2006). El trabajo de Baik et al. (2006), realizado con células CHO y usando microarreglos preparados a partir de 1,655 genes de rata y 4,643 genes de ratón, mostró cambios en 301 genes de rata y 162 genes de ratón relacionados con el metabolismo, transporte y señalización celular. Se debe mencionar que una de las limitantes de este trabajo fue la construcción de los chips. A partir de los datos disponibles en GeneBank, Yee et al. 2009 (Tabla 4) tomó alrededor de 4,509 genes bien anotados de 14,112 disponibles en la base de datos y 7,085 genes de cerebro de ratón (BMAP) y construyeron librerías de microarreglos, donde evaluaron el efecto de la hipotermia moderada en células CHO productoras de IgG. Se reportaron 237 genes diferencialmente expresados a las 18 h del cambio de temperatura, relacionados con cambios en el metabolismo energético, la glicolisis, el TCA, reorganización del citoesqueleto, el ciclo celular, la síntesis de proteínas, el transporte vesicular, entre otros. Los trabajos de Baik et al., 2006 y Yee et al., 2009 son pioneros en el entendimiento de la respuesta molecular al estrés por frío, dejando una ventana abierta a estudios con herramientas más poderosas de secuenciación de la respuesta global de la célula.

En la última década, la obtención de datos genómicos y transcriptómicos de los organismos, ha mejorado con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva (next generation sequencing; NGS) gracias al desarrollo de secuenciadores de nueva generación y la formulación de nuevos algoritmos bioinformáticos que simplifican la secuenciación (Mardis, 2008). Tradicionalmente, la secuenciación se realizaba usando la tecnología Sanger. Sin embargo, las tecnologías de segunda generación implican metodologías como síntesis (Illumina), ligación (ABI SOLiD), pirosecuenciación (454 life science, Roche), semiconductores (Ion Torrent), hasta la lectura de una sola molécula de DNA en tiempo real (Pacific Bio). Esta tecnología ha permitido identificar un gran número de secuencias a bajo costo y en poco tiempo (Fan et al., 2006; Hrach et al., 2007; Morozova & Marra,

2008; Kantardjieff et al., 2009; Birzele et al., 2010; Christodoulou et al., 2011; Hammond et al., 2011; Puthier, 2011; Bilyk & Cheng, 2013; Datta et al., 2013; Xiao et al., 2013; Becker et al., 2014; Jamnikar et al., 2015; Le et al., 2015). Por ejemplo, usando la tecnología de pirosecuenciación (454) se obtuvieron 43,679 marcadores de secuencias expresadas (expressed sequence tag; EST) con 28,000 transcritos únicos de células CHO. Los datos obtenidos fueron anotados usando especies cercanas pues aún no se contaba con el genoma secuenciado de células CHO, y esto sirvió de base para la construcción de microarreglos para el estudio de transcriptomas (Kantardjieff et al., 2009; Kantardjieff et al., 2010). En 2011, Xu et al, publicaron el primer genoma de células CHO-K1El (Xu et al.2011). Éste contó con 24,383 genes únicos predichos, mapeados y ensamblados de novo usando como referencia el genoma de ratón y rata. De ahí, 11,895 genes fueron anotados en términos de ontología de genes (GO) (Hammond et al., 2011; Xu et al., 2011). En años recientes se han secuenciado otras líneas de CHO como DG44 y CHO-S con alrededor de 24,000 genes predichos únicos, permitiendo obtener más de 19,000 genes anotados en términos GO (Lewis et al., 2013). Actualmente, se trabaja en el ordenamiento del genoma por cromosomas, para facilitar su comprensión (Brinkrolf et al., 2013; Rupp et al., 2014; Le et al., 2015).

A la par con la secuenciación del genoma, se han realizado estudios transcriptómicos de clonas de CHO usando estímulos como el butirato de sodio, cambios de temperatura, en productividad, pH (Becker et al., 2011a; Hernández Bort et al., 2011; Rupp et al., 2014; Harreither et al., 2015; Jamnikar et al., 2015) con metodologías como los microarreglos y la secuenciación masiva del RNAm. Por ejemplo, usando microarreglos construidos a partir de los genes secuenciados de células CHO, Clarke et al., (2011) estudiaron el transcriptoma de 70 líneas celulares CHO con diferentes velocidades de crecimiento para identificar genes sobreexpresados asociados con la productividad. Vishwanathan et al. (2014) estudiaron la productividad de líneas transformadas de manera estable y transitoria para establecer genes asociados con la sobreproducción de PR. Por secuenciación masiva del RNAm se describió el perfil de varias líneas (Rupp et al., 2014), así como el efecto del uso de compuestos como el butirato de sodio (Kantardjieff et al., 2010). En células CHO productoras de IgG se describió el efecto del tratamiento con butirato de sodio en el transcriptoma ensamblado de novo (Birzele et al., 2010), Posteriormente se hizo la comparación entre el transcriptoma de células CHO productoras de IgG, obtenidos por secuenciación masiva y chips de ADN de Affimetrix (Jacob et al., 2010). En 2011, Becker et al, llevó a cabo la transcriptómica por secuenciación masiva de múltiples líneas CHO bajo diversas condiciones de cultivo e hizo la reconstrucción de las vías metabólicas y de vías de N glicosilación. (Becker et al., 2011a) los datos anteriores de secuenciación masiva han sido las bases para la construcción de bases de datos transcriptómicas de las células CHO y la anotación de los genes (Tabla 4).

Por otro lado, también se han realizado diferentes estudios proteómicos de líneas celulares CHO. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto de la alta producción de PR (Whelan & Hart, 2003; Meleady et al., 2008; Carlage et al., 2009; Kim et al., 2009; Kuystermans et al., 2010; Jin et al., 2011; Clarke et al., 2012; Doolan et al., 2013), tratamientos con butirato de

sodio (Yee et al., 2008; Baik & Lee, 2010), en crecimiento (Doolan et al., 2010), cambios en presión osmótica (Lee et al., 2003; Kim et al., 2012), las condiciones de cultivo (Wei et al., 2011; Kim et al., 2011c) y la respuesta al estrés por frío (Baik et al., 2006; Underhill et al., 2007; Kumar et al., 2008). De acuerdo a los tratamientos utilizados, se ha encontrado variación en diferentes proteínas involucradas en el metabolismo, crecimiento celular, apoptosis, transporte, entre otros (Carlage et al., 2009; Kantardjieff et al., 2010; Kim et al., 2011a).

De los estudios proteómicos se han generado perfiles proteómicos de la línea parental CHO-DG44 con 2,160 manchas en geles 2-D-PAGE, 810 manchas en un intervalo de pH entre 3 a 10 y 1,350 en un pH de 5 a 8. Por espectrometría de masas (MALDI TOF MS y MS/MS) se describieron 106 proteínas localizadas en citosol, núcleo, mitocondria, RE y membrana (Lee et al., 2010). En células CHO productoras de IgG bajo tratamiento con butirato de sodio y temperatura, se observó la sobreproducción de proteínas involucradas con el tráfico de vesículas, proteínas del aparato de Golgi, ciclo celular y matriz extracelular (Yee et al., 2008; Meleady et al., 2011). La hipotermia moderada también ha sido estudiada en células CHO LGE10-9-27, y se observaron cambios en proteínas como ERP57, PDI, β -tubulina y vimentina (Baik et al., 2006) (Tabla 4) mientras en la línea parental CHO-K1 la hipotermia moderada causó cambios en las proteínas vimentina, β -actina y el factor de iniciación de la traducción 4E (Kumar et al., 2008) (Tabla 4).

Tabla 4: Estudios transcriptómicos, genómicos y proteómicos en células CHO.

Referencia	Línea celular	T (°C)	Cultivo	Tiempo de muestreo (h)	Variable	Transcriptómica	Proteómica
Sonna et al., 2006	THP-1	37 bf 32 confluencia	A/L	24	Temp	Microarreglos	-
Baik et al., 2006	CHO-EPO	37 bf a 33 (24 h)	A/L	Confluencia	Temp	Microarreglos	2D-PAGE
Underhill et al., 2007	HeLa	37, bf 32 (24 h)	A/L	24	Temp	-	2D-PAGE
Wulhfard et al., 2008	CHO.IgG y GFP	37/ bf 29, 31,33 post transfección	S/L		Temp	qRT-PCR	-
Kumar et al., 2008	CHO-K1	37°C/ bf a 31°C (72 h)	S/L	72	Temp	-	2-D DIGE
Yee et al., 2009	CHO-IgG	37°C/ bf a 33°C (18 h)	S/L	18	Temp	Microarreglos	-
Carlage et al., 2009	CHO-Bcl-XL	37	S/L/B	0, 5 10, 13 días	Productividad	-	LC-MS Cromato.
Jacob et al., 2010	CHO-IgG	37°C	S/L	mitad fase exp.	Secuenciación	Illumina Solexa	-
Doolan et al., 2010	CHO-IgG	37	S/L	72	Crecimiento celular	Affimetrix microarreglos	DIGE
Lee et al., 2010	CHO-DG44	37°C	S/L	72	Prot. de referencia	-	2D-PAGE
Wong et al., 2010	CHO-INF γ	37°C	S/L		Precursores de nucleótidos	qRT-PCR/ microarreglos	-

Continúa en la siguiente página

Park et al., 2010d	Células de islo de rata INS-1E/insulina	37°C	A/L	12, 24, 36 y 48	Ácido micofenólico	Illumina Solexa	-
Birzele et al., 2010	CHO-IgG	37°C	S/LA/B	0, 96, 144, 192	Bu/Na	Illumina Solexa	-
Kantardjieff et al., 2010	CHO-IgG	37°C control y bf a 33°C (24 h)	S/L	0, 46, 76, 96, 116	Bu/Na y temp -	qRT-PCR Microarreglos Affimetrix	-
Clarke et al., 2011	CHO-K1/Dux-IgG	37 bf 31 (72 h)	S/L	5-10 días	Producción	Microarreglos	-
Becker et al., 2011b	CHO k1/DG44	37°C, bf 42°C/32°C (48 h)	S/L	48 (37°C) 30min (42)/48 (32°C)	Transcriptómica	GS FLX/PCR emulsión	-
Hammond et al., 2011	CHO-SEAP	37°C	A/L	37	Genoma	Illumina Solexa-MAQ	-
Kou et al., 2011	CHO-TNFR-Fc	30°C y 37°C	S/L/B	30	temp	qRT-PCR	-
Klausing et al., 2011	CHO-DP12	37	S/L/B	72	BuNa	Microarreglos	-
Kim et al., 2011a	CHO-IgG	37	S/L	-	Hidrolizados	ND	2D-PAGE
Xu et al., 2011	CHO-K1	37	S-A/L	-	Genoma	Illumina	-
Courtes et al., 2013	CHO DG44/IgG	37	S/L	10 min	Cicloheximida	Polisomas - Microarreglos	-
Vishwanathan et al., 2014	CHO DUXB 11/hIgG	37	S/L	96, 168	Productividad líneas	Microarreglos qRT	-
Neutelings et al., 2013	Wi26-fibroblasto/MG-63, HeLa, Hmec, HBME	37/1-5 días 25/ 24 h 37/ 72 h	A/L	24	Recalentamiento	qRT-PCR	-
Le et al., 2013	CHO-IgG	37	S/L		Expresión	Microarreglos	-
Wilmes et al., 2013	RPTEC/TER T1	37	S/L	1,3 y 14	Ciclosporina A	Illumina	iTRAQ
Lewis et al., 2013	CHO-K1	37	S/L		Genoma	Illumina	-
Brinkrolf et al., 2013	CHO-K1	37	S/L		Genoma	Illumina	-
Rupp et al., 2014	CHO K1	31, 37	S/LA		Temp y pH	Illumina	-
Becker et al., 2014	CHO-K1	37	S/L	72	Medio de cultivo	Microarreglos	-
Bedoya-López et al., 2016	CHO-TF70R	37 y bifásico (30°C)	S/L	72 y 96	Temp	Illumina	2D-PAGE fracción membranal

Tomada de Bedoya-López et al., en preparación. L: Lote, B: Bioreactor, LA: Lote Alimentado, A: Adherente, S: Suspensión

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hipotermia moderada en células CHO (30 °C) puede generar en algunas líneas celulares un incremento en la producción de PR de hasta 5.6 veces. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales sucede dicho incremento no son claros (Bollati-Fogolín et al., 2004; Fox et al., 2005; Al-Fageeh & Smales, 2006; Galbraith et al., 2006). En específico, la línea celular de CHO TF70R productora de tPA, al ser sometida a hipotermia moderada, aumenta su productividad (Lloyd et al., 2000; Hendrick et al., 2001; Altamirano et al., 2006), por lo que se pretende estudiar y comprender los eventos que a nivel molecular provocan este efecto. Dado que los estudios transcriptómicos anteriores se encuentran sesgados por el número de genes analizados en microarreglos (Baik et al., 2006; Yee et al., 2009), se propone usar técnicas de secuenciación masiva y los datos genómicos existentes a la fecha, con el fin de describir con mayor profundidad la respuesta molecular de las células TF70R expuestas al cambio de 37°C a 30°C, lo que se sabe mejora la producción de la PR. También se analizarán los cambios en el proteoma compartimentado con el fin de obtener datos proteómicos diferenciales, asociados principalmente con proteínas implicadas en la vía de secreción clásica.

HIPÓTESIS

La respuesta molecular de las células a la hipotermia moderada modifica el transcriptoma y proteoma de la vía de secreción clásica y del ciclo celular, aumentando la viabilidad de los cultivos y la producción de la proteína recombinante.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar y comprender la variación del transcriptoma y proteoma de células CHO TF70R cultivadas bajo condiciones de hipotermia moderada, con énfasis en los mecanismos moleculares de biosíntesis de glicoproteínas recombinantes.

Objetivos Específicos

- Evaluar las cinéticas de crecimiento de la línea CHO TF70R a 37°C (control) y en cultivo bifásico (cambio de temperatura de 37°C a 30°C a las 48 h de cultivo).
- Determinar las diferencias en el transcriptoma causadas por la hipotermia moderada (30°C) a las 24 y 48h después del cambio de temperatura, por secuenciación masiva.
- Analizar el proteoma diferencial de la fracción membranal de los cultivos (bifásico y control) a las 48 h después del cambio de temperatura.
- Proponer un modelo de respuesta de las células CHO TF70R ante la hipotermia moderada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular y medio: Se usó la línea CHO TF70R que expresa la PR tPA, obtenida de Pharmacia and Upjohn S. A. Sweden. Las células se cultivaron en el medio químicamente definido CD-OptiCHO GIBCO® (GIBCO ThermoFisher, Carlsbad; CA, USA) libre de suero y suplementado con glutamina 6 mM (Biowest LLC, Kansas City, MO, USA), insulina 4 µg/mL (Humulin (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA), penicilina 100 U/mL (Antibióticos de México, México D.F., México), estreptomina 0.01 mg/mL (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany), Pluronic F-68 0.01 g/L (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany), metotrexato 200 nM (Pfizer, New York, NY, USA) y 4% extracto de levadura (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), pH 7.

Cultivos celulares: El inóculo se preparó en frascos T de 75 cm² (Nunc, Roskilde, Denmark) y se incubaron a 37°C, con atmósfera modificada con 5% de CO₂. Se inocularon frascos agitados (spinner flasks) con 3.5 x 10⁵ cel/mL y una viabilidad por arriba del 90%. Se usó un volumen de trabajo de 100 mL a 90 rpm por agitación magnética. Los cultivos se realizaron por triplicado. Los cultivos inicialmente fueron crecidos por 48 horas a 37°C, a las 48 h, 3 frascos fueron puestos a 30°C (denominados cultivos bifásicos), mientras los otros 3 se dejaron a 37°C como control. Los cultivos se muestrearon cada 24 h hasta que la viabilidad disminuyó el 60%. Las cinéticas completas se hicieron por triplicado.

Concentración y viabilidad celular: La determinación de la concentración y viabilidad celular se hizo por conteo en cámara Neubauer usando el método de exclusión molecular por tinción con azul de tripano (Strober, 2001) y el contador automático Cell counter TC10 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Cuantificación de metabolitos por YSI: La determinación de la concentración de glucosa, glutamina y lactato del medio, se realizó en un equipo YSI 2900 (YSI Life Sciences, Ohio, USA) y las membranas con enzimas inmovilizadas: YSI 2365 para glucosa (glucosa oxidasa), YSI 2329 para L-lactato (Lactato oxidasa) y YSI 2735 para glutamina (glutaminasa). Las mediciones se realizaron a muestras colectadas cada 24 h y por triplicado.

Cuantificación del r-tPA: La determinación de la concentración del r-tPA en el sobrenadante se realizó por medio de ELISA usando el anticuerpo monoclonal de cabra anti-tPA humano (Adcam, Cambridge, U.K.) y el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa (HRP por sus siglas en inglés) (Pierce ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA). La reacción se reveló con el reactivo OPC (o-phenylenediamine dihydrochloride)

(Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) y se midió a 450 nm en lector de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan FC, UK). Como control estándar de r-tPA se usó Actilyse (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany). La productividad (qtPA) se calculó usando la fórmula: $q_{tPA} = ((\text{pg/cel})/\text{día}) = (\text{concentración final de r-tPA} - \text{concentración inicial de r-tPA}) / (\text{concentración celular final} - \text{concentración celular inicial}) \times \mu (\text{día}^{-1})$

Análisis estadístico: Los parámetros cinéticos y estequiométricos en los cultivos bifásicos y control (crecimiento, viabilidad, consumo de glucosa y glutamina, producción de lactato y producción de la proteína recombinante) fueron calculados en al menos tres experimentos independientes y son expresados como media \pm desviación estándar. Se usó el test estadístico t-Student para determinar las diferencias significativas entre el control (37°C) y el tratamiento bifásico (30°C) con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Separación de ARN total: Se tomaron muestras por duplicado (de tres cinéticas) a las 48, 72 y 96 h de cultivo, para un total de 6 muestras (control y bifásicos). Se adicionó a cada muestra RNAlater® (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA) para preservar el ARN. El ARN total se aisló usando el kit RNeasy (Quiagen, Germantown MD, USA), con 5×10^7 células y siguiendo el protocolo señalado por el fabricante. La concentración celular se determinó por el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA). La integridad del ARN extraído fue verificada con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Tech, Santa Clara, CA, USA) y se procesaron aquellas muestras con un índice integridad del RNA (RIN) superior a 7 (Anexo 1) y una concentración mayor a 200 ng/uL.

Secuenciación del transcriptoma: Las muestras aisladas de ARN mensajero (ARNm) fueron preparadas para la secuenciación usando el equipo de reactivos “mRNA-Seq Sample preparation kit” (Illumina, San Diego, CA, USA) según las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron secuenciadas usando la plataforma GAIIX (Illumina, San Diego, CA, USA). Las muestras y sus réplicas biológicas se secuenciaron usando dos configuraciones, la primera corresponde con una configuración de lecturas simples (Single reads) de 36 pb para las muestras a las 48 y 72 horas y la segunda configuración con fragmentos de 72 pb con lecturas pareadas (paired-end reads) para las muestras a las 48 h y 96 h, con el apoyo de la unidad de secuenciación masiva del Instituto de Biotecnología-UNAM.

Análisis Bioinformático: Los datos en FASTA de las secuencias se analizaron y alinearon usando los programas computacionales de distribución libre Pearl y RMAP. Las secuencias se pasaron por controles de calidad (Q) que se calculó por la fórmula $Q_{PRED} = -10 * \log_{10}(Pe)$, donde Pe es la probabilidad estimada de cometer un error en la estimación del nucleótido, pe. $Q=40$ es la probabilidad de error del 0.0001%. Las muestras con un Q por

encima de 35 fueron consideradas para el análisis de expresión diferencial (Anexo 2). Las lecturas fueron alineadas con el genoma de referencia de CHO-K1 publicado en www.chogenome.org usando el algoritmo SMALT (Short-read aligner) (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/smalt/>) v7.4. Los datos para cada secuencia de ADN codificante (CDS) de cada condición se analizaron usando el algoritmo en R no paramétrico y adaptado a los datos NOISeq (Tarazona et al., 2011). Se realizó una normalización TMM (media ponderada entre los Log de la muestra y la referencia) (Dillies et al., 2013; Maza, 2016). Los genes con expresión diferencial fueron analizados usando el algoritmo en R topGO para lograr el enriquecimiento por ontología de genes (Enrichment Analysis for Gene Ontology, Bioconductor package version 2.6.0).

Validación del análisis transcripcional por PCR en tiempo real: Usando muestras colectadas a las 48 h y 96 h, se separó el ARN total con el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany). Las muestras fueron tratadas con DNasa I (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA) y se sintetizó cDNA usando el kit RevertAid con oligo dT (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA). El cDNA se cuantificó por absorbancia a 260/280. Para la cuantificación del número de transcritos se usó el qPCR SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA). Se hicieron reacciones de 12 μ L con 6 μ L de SYBR green PCR master mix, 150 nM oligos (Tabla 6) y 50 nM de cADN. Se llevó a cabo el siguiente programa térmico: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min y 40 ciclos de 95°C por 15s y 60°C por 1 min en un termociclador Thermo Scientific™ PikoReal™ Thermal (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA) y los datos fueron analizados en el software PikoReal software 2.1™ (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA) usando el método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ y normalizando con respecto al gen control *Gst1* (*housekeeping*). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y se incluyeron controles negativos. Previamente, determinamos el mejor gen de referencia para la línea TF70R en las condiciones de hipotermia, de entre otros tres genes reportados (Bahr et al., 2009) que fueron *Gapdh*, *Actb* y *Gst1*.

Aislamiento de proteínas: Se tomaron 25 mL de muestra por frasco agitado a las 48 h y 96 h de cultivo. Se separó el concentrado celular (pellet) y el sobrenadante por centrifugación a 500 rpm por 5 min. El concentrado celular fue lavado con PB. Ambas muestras (sobrenadante y concentrado celular) se les adiciona inhibidor de proteasas Complete® (Sigma Aldrich, St Luis, MO, USA). Los sobrenadantes se dializaron en membranas Spectra/por MWCO 3500, cat. 132724 y se liofilizaron para concentrar las muestras. Las muestras fueron tratadas con el kit ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit Bio-Rad® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para eliminarlos lípidos y sales resuspendidas (9 M urea, 4% CHAPS, 2 M tiourea, 40 mM DTT y 2% solución amortiguadora IPG). Las muestras se cuantificaron con el kit 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Las proteínas del concentrado celular (proteoma) y de los liofilizados (secretoma) fueron guardados a -70°C.

Identificación del tPA en geles de electroforesis SDS-PAGE por Western Blot: La identificación de tPA recombinante en las muestras de sobrenadante fue realizada en geles desnaturalizantes SDS-PAGE que fueron teñidos con Azul Coomassie y con plata. Para la inmunodetección del tPA recombinante mediante Western Blot (WB) se utilizaron membranas INMOBILON-P Millipore®, y marcador de peso molecular de 1 kDa PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA). Se usó el anticuerpo primario de cabra en una concentración 1:1,000 de anti-tPA humano (Adcam, Cambridge, U.K.) y el anticuerpo secundario anti mouse IgG-HRP, Santa Cruz en una dilución 1:2,000. Se reveló con el sustrato Super signal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA).

Enriquecimiento de fracciones celulares: A partir de concentrados celulares frescos se obtuvieron fracciones enriquecidas de proteínas de membrana, núcleo, citoplasma y citoesqueleto, y usando el kit Qproteome Cell Compartment kit (Qiagen, USA) se obtuvieron fracciones enriquecidas de proteínas de membrana, núcleo, citoplasma y citoesqueleto. El método se basa en la adición secuencial de buffers al pellet celular y proteínas de los diferentes compartimentos celulares para hacer una separación selectiva. En particular, la fracción de membrana contiene las proteínas de las membranas plasmáticas y de los organelos (retículo endoplasmático, Golgi y mitocondria). Las fracciones fueron desalinizadas por precipitación con acetona (Lee et al., 2010), resuspendidas en solución amortiguadora de rehidratación y cuantificadas con el kit 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Se hicieron geles de electroforesis SDS/PAGE para determinar el enriquecimiento de las muestras. Los geles fueron transferidos a INMOBILON-P Millipore® y se realizó la inmunodetección usando el Western blot kit (Abcam ab139415) para determinar la presencia de proteínas marcador del fraccionamiento celular. El kit contiene una mezcla de anticuerpos: anti-GRP78 (HSP70-78 kDa) marcador para el RE y lumen, anti-GAPDH (37kDa) como marcador para el citosol y el anticuerpo anti-histona H3 (17 kDa) para marcar la presencia del núcleo.

Electroforesis en gel SDS/PAGE en dos dimensiones: A partir de 225 µg de proteína total de la fracción membranal enriquecida, se hizo la separación de las proteínas mediante isoelectroenfoque (IEF) con un voltaje lineal de 5000 V. Se usaron tiras IPG (pH 3-10, 7 y 11cm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) en el equipo PROTEAN IEF BIORAD® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), re-hidratadas activamente con la muestra por 12 h a 50V. Las tiras fueron equilibradas por 10 min en la solución de equilibrio (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 2% SDS y 30% glicerol adicionado con 2% DTT) y por 15 min en la solución de equilibrio (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 2% SDS y 30% glicerol y adicionada con 2.5% iodoacetamida). La segunda dimensión (2D) se obtuvo al colocar las tiras equilibradas en geles de SDS-PAGE al 12% (C.B.S. Scientific, San Diego, CA)

Tinción de proteínas por azul de Coomassie coloidal y análisis de imágenes: Los geles 2D SDS-PAGE se fijaron en solución (50% metanol, 3% ácido fosfórico, agua) y teñidos con Coomassie coloidal R250. Las imágenes fueron analizadas usando el programa PDQuest software (Bio-Rad Laboratories, California-USA). Las manchas proteicas fueron normalizadas basadas en el volumen total de manchas (píxeles) de cada gel para determinar la intensidad de manchas de proteína. Las manchas con diferencia significativa ($P < 0.05$) fueron seleccionadas para su análisis mediante espectrometría de masas.

Análisis de masas: Las manchas fueron analizadas en el Mass Spectrometry Core Laboratory de UTMB, USA y en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica-LANSE-CINVESTAV. Para la detección se usó una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y con una intensidad de láser MS: 3700 a un número de espectro MS: 1000 y una intensidad láser para espectro MS/MS: 4400, con un número de disparos MS/MS de 3000. Los espectros MS/MS obtenidos fueron comparados con la base de datos disponible para *Crisetulus griseus*, *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens* (Uniprot: 23884, 32983, 67493) con el uso del programa Protein Pilot software (ABSciex) y el algoritmo Paragon con un % de confiabilidad ≥ 1.3)

Tabla 5. Oligonucleótidos usados en la validación transcriptómica por RT-PCR, R: Reverso, F: Forward

Iniciador/Oligo		Secuencias (5'-3')
β 1,4-Gal transferasa I	F R	TGCGCTTTGATGGTTTGAAC GTCCCGATGTCCACTGTGATT
R- tPA	F R	GGATGCAATGAAGAGAGG TCTGAATCGGGCATGGATTT
RBM3	F R	ATGARCAGGCACTTGAAGACC CCCCGGGATCTTTGAGTCTC
CIRP	F R	AGTGAGCACCTTGTCCCCAC AAAGTCTGGTCACGAGGCCA
GRP78	F R	CGCGTGGAGATCATAGCCA CATCGCCAATCAGACGCTC
PDI	F R	GAGGCTTGCCCCTGAGTATG GGTGTGTTGTTGGCAGTGC
β -actina	F R	AGCTGAGAGGGAAATTGTGCG AGGAAGAGGATGCAGCAGTG
Sec61	F R	TCC GTG TCC TCG TCC TCT TA GGG TGG ACG TGG TCA CAT AG
Hspa5	F R	CCA CCT ATT CCT GCG TTG GT AGT GAA GGC CAC ATA CGA CG
Ldha	F R	GTC CTA GGG GAG CAT GGA GA TTG TCG GTA TCA GTG CCC AG
Vim	F R	TCC GTG TCC TCG TCC TCT TA GGG TGG ACG TGG TCA CAT AG
GAPDH	F R	TCC TAC CCC CAA CGT GTC C AGG TCC ACC ACT CTG TTG CTG T
GST1	F R	TGG TGA ATG ATG GGG TGG AA GGC AGG GCC TTC ACA TAG TC

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La hipotermia moderada afecta el crecimiento celular, la viabilidad y la producción de tPA

La evaluación de los parámetros cinéticos del cultivo indicó que las células crecieron a una velocidad máxima de (μ) $0.023 \pm 0.012 \text{ h}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, luego del cambio de temperatura disminuyó significativamente hasta $0.005 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$. La concentración máxima de células en el cultivo control fue alcanzada al cuarto día ($2.7 \pm 0.15 \times 10^6 \text{ cel/mL}$), y en los cultivos bifásicos se alcanzó la máxima densidad celular al octavo día de cultivo ($2.67 \pm 0.10 \times 10^6 \text{ cel/mL}$). Además, en los cultivos bifásicos, la viabilidad celular se mantuvo por arriba del 60% por 13 días, no así en los cultivos control que en el mismo lapso presentan una viabilidad del 20% (Figura 2 A y B). Bajo condiciones de cultivo similares se han reportado resultados que concuerdan con los descritos en el presente trabajo, un aumento en la viabilidad celular, en la productividad específica de proteína recombinante (Andersen et al., 2000; Hendrick et al., 2001; Yoon et al., 2003a; Yoon et al., 2006). El aumento en la viabilidad de los de cultivo, que afecta directamente en la duración de los mismos, se han atribuido al arresto del ciclo celular y la evasión de la apoptosis (Yoon et al., 2003b; Fox et al., 2005; Al-Fageeh & Smales, 2006; Yoon et al., 2006).

El cambio de temperatura en los cultivos bifásicos favoreció la acumulación de r-tPA ($11.15 \pm 0.40 \text{ mg/L}$) que se obtuvo a los 10 días de cultivo y que representó 2.2 veces más la cantidad obtenida en los cultivos control ($4.6 \pm 0.32 \text{ mg/L}$) (Figura 2C). También la productividad específica (q_{tPA}) fue mayor 1.6 veces ($0.82 \pm 0.05 \text{ pg/célula/día}$) en los cultivos bifásicos, comparada con aquella alcanzada por las células control ($0.43 \pm 0.04 \text{ pg/célula/día}$) (Figura 2D). La mejora en la productividad específica es acorde a lo reportado en trabajos realizados con esta línea celular en condiciones de hipotermia moderada (Hendrick et al., 2001; Berrios et al., 2007; Vergara et al., 2014). En general, el incremento en la productividad se ha relacionado con el arresto en el ciclo celular en fases donde se favorece la síntesis de proteína o con el incremento en la estabilidad del mRNA (Yoon et al., 2003b; Fox et al., 2005; Oguchi et al., 2006; Hendrick et al., 2001; Swiderek & Al-rubeai, 2007).

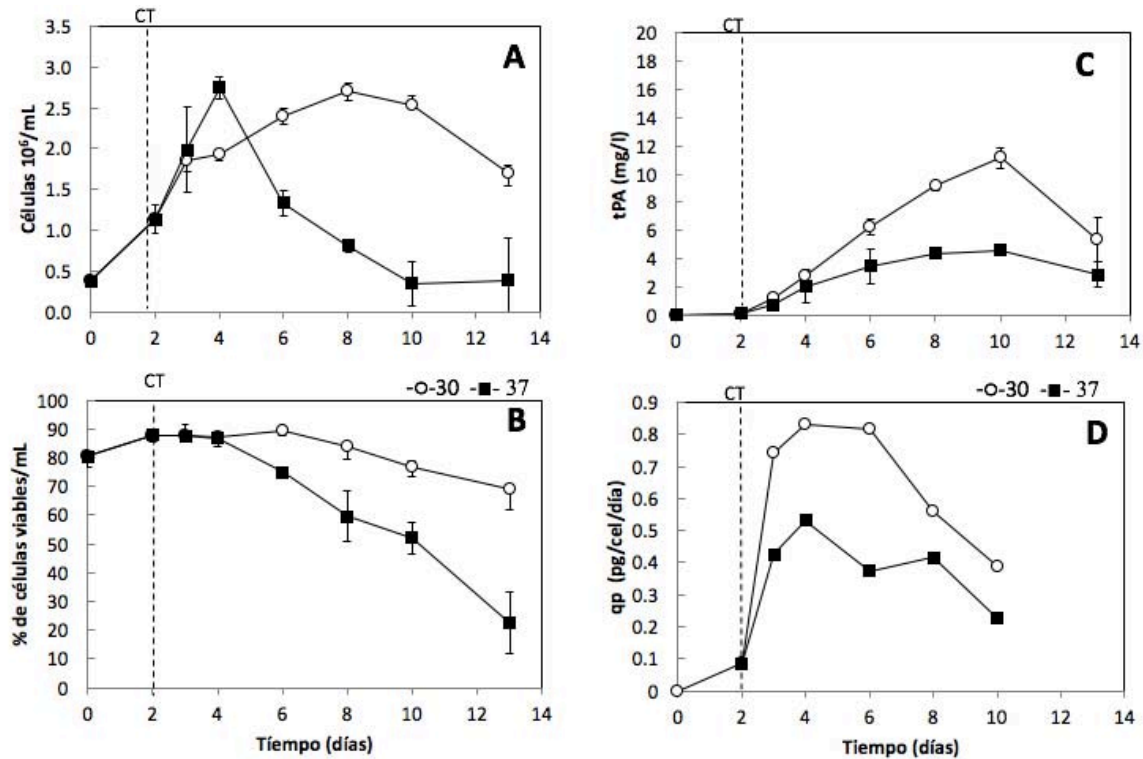


Figura 2. Comportamiento cinético de los cultivos celulares de células CHO TF70R bajo condiciones de hipotermia moderada de los cultivos control a 37°C (■) y bajo hipotermia moderada (bifásico) a 30°C. La línea punteada marca el cambio de la temperatura de 37°C a 30°C. (A) Concentración celular en millones de células por mL, (B) Porcentaje de viabilidad celular, (C) Producción volumétrica de tPA en mg/ml, (D) Producción específica por célula de tPA (D). Tomado de Bedoya-López et al., 2016.

La disminución de la temperatura afecta el consumo de glucosa y producción de lactato, y no el consumo de glutamina

La concentración de glucosa disponible en el medio (Figura 3 A) fue mayor en los cultivos bifásicos (11%), de acuerdo a este resultado y los cálculos de consumos específicos (Tabla 6), las células en condiciones de hipotermia moderada consumieron un 14% menos de glucosa que los cultivos control. La producción de lactato (Figura 3C) fue 19% menos en los cultivos bifásicos, alcanzando 17 mM/L que se mantiene con pequeñas variaciones desde el día 5 hasta la finalización del cultivo (Figura 2B). En los cultivos control la producción de lactato fue mayor alcanzando un máximo de 27 mM/L al día 8 de cultivo, a partir del día 9 se observó una etapa de consumo o reutilización del lactato en el medio que

coincide con el agotamiento de la glucosa y con una baja viabilidad del cultivo. La reutilización del lactato se ha descrito previamente por Altamirano et al., 2006 y 2004 en esta misma línea celular y por Luo et al., 2012; Zagari et al., 2012; Sou et al., 2015b; Toussaint et al., 2016 en otras líneas celulares de CHO productoras de proteínas recombinantes.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de los cultivos bifásico y control.

Parámetros	Control 37°C	Bifásico 30°C
μ (h ⁻¹)*	0.021±0.02	0.005±0.001
X max (10 ⁶ cel)	2.7±0.15	2.67±0.1
CV (%)	87.6± 1.5	89.6±2
Y _{lac/glc} (mol/mol)	0.85 ± 0.01	0.69 ± 0.02
q _{tPA} (pg/cell d)	0.53 ± 0.02	0.82± 0.03
t-PA max (mg/L)*	4.6 ± 1.2	11.15 ± 0.4
q _{gln} (nmol/10 ⁶ cell.h)	26.9 ± 0.81	25.9 ± 1.24
q _{glc} (nmol/10 ⁶ cell.h)	112 ± 1.67	98.4 ± 3.54
q _{lac} (nmol/10 ⁶ cell.h)	160 ± 1.23	130± 7.32

El consumo de glutamina fue similar en ambas condiciones de cultivo. Sin embargo, de acuerdo a la gráfica de crecimiento celular, las células en condiciones bifásicas tienen mayor cantidad de células viables (Figura 2B), un menor consumo de metabolitos como puede observarse en en la gráfica de consumo de glucosa (Figura 3A) que puede estar reacionado con el arresto del ciclo celular y el hecho que la hipotermia moderada en células CHO reduce las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos; por ejemplo, en CHO K1 se ha reportado una disminución de 1.2 a 1.5 veces, mientras en líneas BHK se reporta un incremento de 1.6 a 1.8 veces (Bollati-Fogolín et al., 2004).

La glutamina es la principal fuente de nitrógeno de las células para la síntesis de aminoácidos y se relaciona con la producción de proteínas recombinantes en relación con lo descrito por Altamirano et al. (2001). Al analizar las gráficas de producción de proteína recombinante (figura 2D) los cultivos bifásicos produjeron 1.8 veces más proteína recombinante que los cultivos control lo que indica una mayor demanda del metabolito.

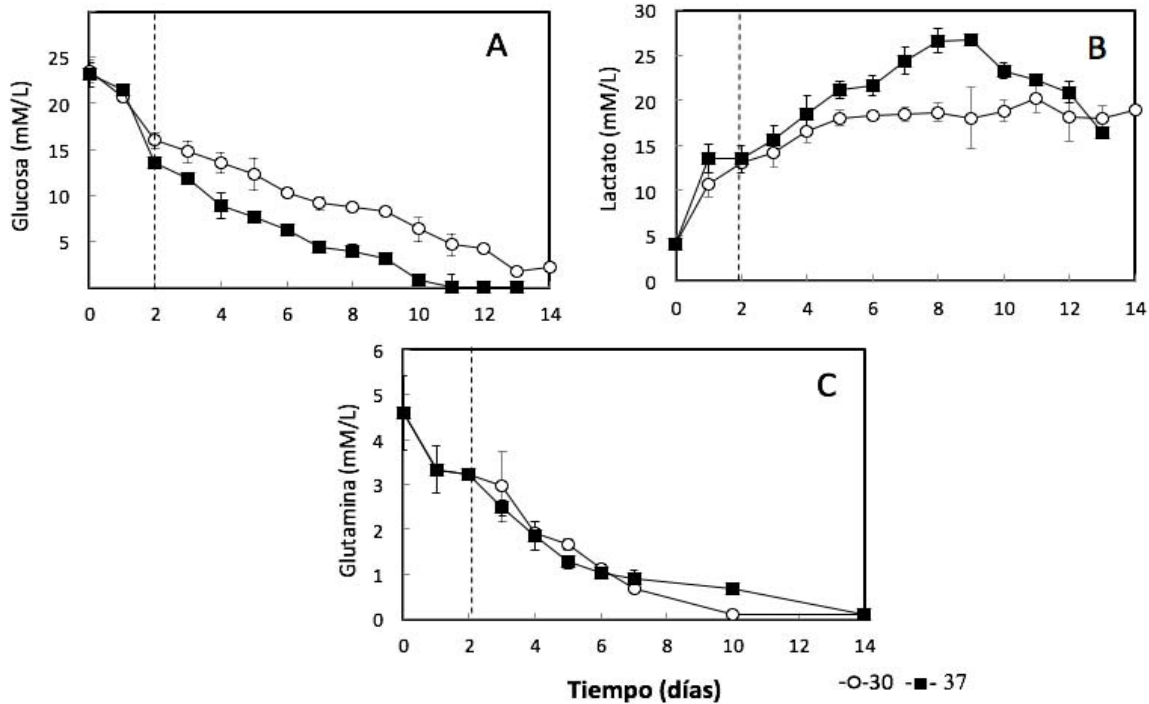


Figura 3. Consumo de glucosa (A) para el cultivo bifásico y control, producción de lactato (B) y consumo de glutamina (C) en células CHO TF70R en cultivos a 37°C (■) y bifásico a 30°C (○) (línea punteada marca el cambio de la temperatura de 37 a 30°C). Tomado de Bedoya- López et al., 2016.

TRANSCRIPTÓMICA DE LA LÍNEA TF70R BAJO CONDICIONES DE HIPOTERMIA

A partir de las muestras tomadas antes del cambio de temperatura (37°C) y a las 24 h y 48 h (30°C) después del cambio de temperatura en los cultivos de células CHO, se mapearon un total de 21,789 transcritos, tomando como base el genoma de referencia de las células CHO-K1 con aproximadamente 28,000 genes en Genebank (www.genomecho.org; Hammond and Lee, 2012) y la base de *Mus musculus* (ratón) con 50,000 genes en Ensembl (www.ensembl.org). La última base fue usada como soporte en la anotación de los genes al ser el organismo más cercano y con una anotación más completa. Con las secuencias obtenidas, se anotaron un total de 19,775 genes (Figura 4). Al aplicar los algoritmos para determinar la expresión diferencial de los genes a las 24 h y 48 h después del cambio de temperatura, se obtuvieron 416 ($q > 0.8$; Figura 4A) y 3,472 ($q > 0.9$; Figura 4B) transcritos, respectivamente, con igual o más de 1.6 veces de cambio. El punto a las 24 y 48 h después del cambio de temperatura fueron estudiados por ser los tiempos en los que las células se encuentran próximas a alcanzar el máximo de producción de PR (24 h) y una vez que lo han alcanzado (48 h), antes de que los cultivos comiencen a disminuir su viabilidad, según los datos cinéticos.

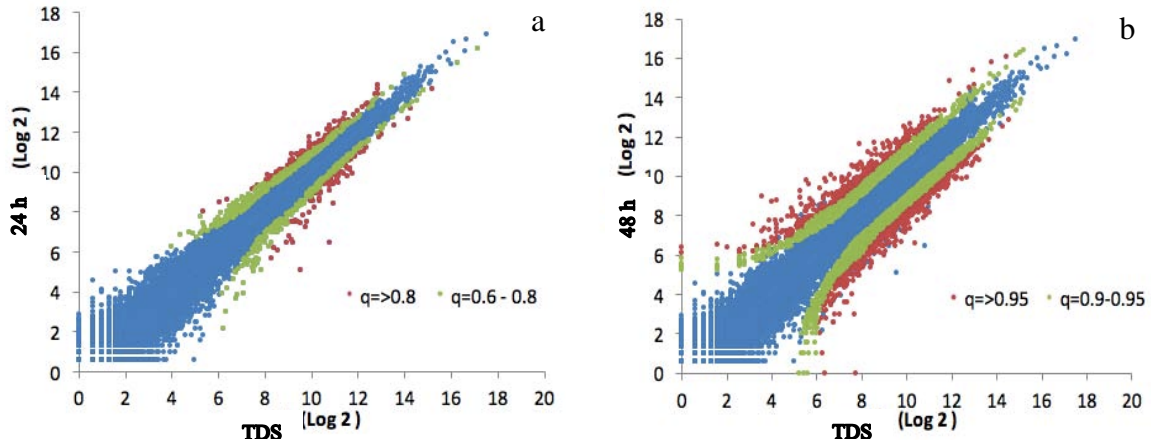
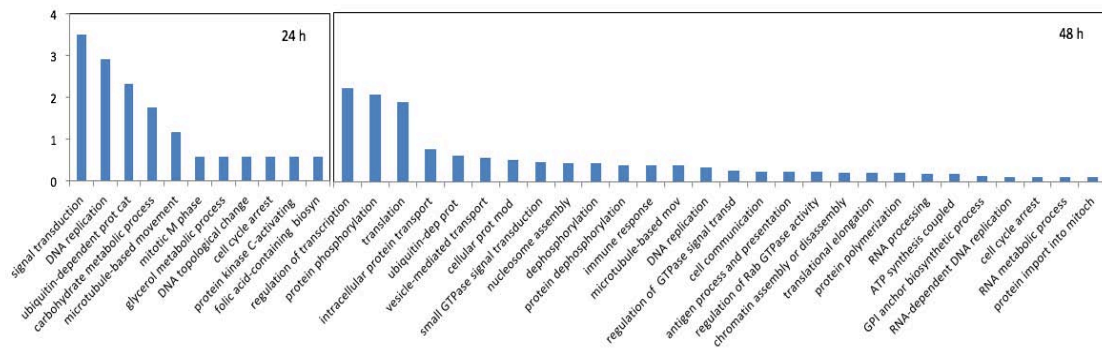


Figura 4. Abundancia de los genes (media) en las muestras a las 24 h (a) y 48 h después del cambio de temperatura (b) a 30°C con respecto al control (TDS) a 37°C. En azul se representan todos los genes obtenidos, en verde los genes con expresión diferencial con una $q > 0.8$ y en rojo los genes con una $q > 0.9$.

Los datos de expresión diferencial fueron agrupados de acuerdo a la ontología de genes usando el algoritmo topGO (Figura 5). En la categoría de proceso biológico (Figura 5A) se clasificaron alrededor de 1,421 genes, los cuales se agruparon en 57 subcategorías. Las categorías más representadas a las 24 h después del cambio de temperatura fueron las de transducción de señales y la replicación del ADN, mientras que a las 48 h fueron las categorías involucradas en regulación de la transcripción, fosforilación del ADN y traducción. La categoría de los componentes celulares agrupó a 568 genes en 27 subcategorías (Figura 5B), siendo los genes más representados los pertenecientes al núcleo, cromosomas, ribosomas y al citoplasma. En la categoría función molecular se agruparon 609 genes asociados a 50 subcategorías y como se puede observar en la figura 5C el mayor número de genes se relacionó con la unión al ATP, unión a iones de calcio, proteínas y ácidos nucleicos



a

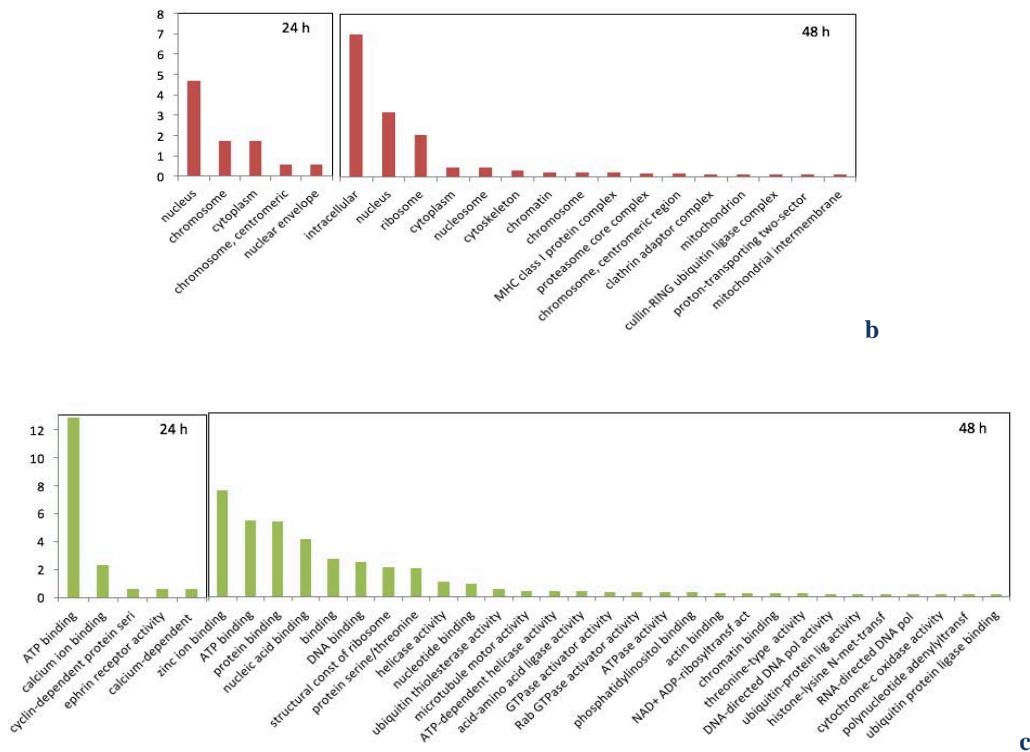


Figura 5. Genes agrupados en las categorías ontológicas a. Proceso biológico, b. Componente celular y c. Función molecular (Tomado de Bedoya-López et al., 2016).

Los datos transcriptómicos fueron validados por medio de PCR en tiempo real (RT – PCR) (Richard et al., 2010 ; Jagya et al , 2014). Para ello se analizaron nueve genes, y se seleccionó como gen de referencia a *GST1* por ser de los genes que tuvieron una variación mínima en el análisis transcripcional comparado con los demás genes evaluados (*gapdh*, α -*tubulina*, y β -*actina*). La expresión diferencial de los genes evaluados *tPA*, *SEC61*, *LDHA*, *Pdia3* y *Neu2* fue similar a los datos obtenidos por RNA-seq (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de la expresión diferencial de los genes por RNA-seq y RT-PCR.

Gen	Veces de cambio RNA- seq 96 h (q)	Veces de cambio RT-PCR 96 h (media \pm DE)
<i>Rbm3, Rnpl</i>	13.54 (0.99)	14.01 \pm 0.55
<i>Cirbp, Cirp</i>	7.76 (0.99)	7.38 \pm 0.28
<i>tPA</i>	1.13 (0.34)	1.08 \pm 0.08
<i>Sec61b</i>	2.27 (0.92)	1.57 \pm 0.23
<i>Ldha</i>	3.15 (0.95)	2.38 \pm 0.18
<i>Gstp1</i>	1.02 (0.54)	1.01 \pm 0.02
<i>Actb</i>	2.15 (0.92)	2.10 \pm 0.04
<i>Pdia3, Erp, Erp60,</i>	1.44 (0.72)	1.48 \pm 0.16

<i>Grp58</i>		
<i>Neu2</i>	3.78 (0.95)	4.42 ± 0.06
<i>Gapdh</i>	1.00 (0.21)	1.02 ± (0.03)
<i>Vim</i>	2.37 (0.93)	2.73 ± (0.23)

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Respuesta celular al estrés por frío y efecto en los transcritos recombinantes

Las células perciben la temperatura exterior por medio de canales TRP, las células CHO responden a las bajas temperaturas por medio de canales de calcio TRPM8 y responden a temperaturas cálidas (>33°C) activando el canal iónico TRPV3 (Peier et al., 2002; Story et al., 2003; Morrison, 2016). En el presente estudio los transcritos asociados a los canales TRP se mantuvieron en niveles basales; sin embargo, al analizar los diagramas KEGG (Anexo 6) se observa la sobreexpresión del gen *Ip3r* que codifica para el receptor de membrana de inositol que media directamente el calcio intracelular (Birnbaumer et al., 2003). Es posible que este canal, en asociación con la respuesta de alguno de los canales TRPV, inicien la respuesta molecular hacia el cambio de temperatura. Por otro lado, se ha descrito en las células CHO, bajo condiciones de hipotermia moderada, el aumento en la expresión de las proteínas RBM3 y CIRP (Danno et al., 1997; Neutelings et al., 2013; Ilmjärv et al., 2014). Mediante NGS se corroboró la sobre-expresión de los transcritos codificantes para dichas proteínas a las 24 h y 48 h después del cambio de temperatura (Anexo 1). Los transcritos de RBM3 se sobre-expresaron en 5.8 veces a 24 h y 13.55 veces a las 48 h después del cambio de temperatura, y los transcritos que codifican para CIRP fueron sobre-expresados 3.32 veces a las 24 h y 7.77 veces a las 48 h después del cambio de temperatura. Ambas respuestas son acordes con la respuesta al estrés por frío observada en células CHO-CRL122 productoras de IgG a 32°C (Hidalgo, 2010), en células CHO-K1 a las 144 h (Kumar et al., 2008) y la sobreexpresión del gen *Cirp* (4.2 veces) en células CHO a 32°C a las 18 h (Yoon et al., 2006).

Por otro lado, los transcritos de los genes que codifican para las proteínas endógenas DHFR y tPA no cambiaron, aunque el aumento de la productividad de las proteínas recombinantes se ha asociado con aumentos en su abundancia de ARNm y en su vida media (Fox et al., 2004; Oguchi et al., 2006). En el Anexo 4 se observa el efecto de la temperatura sobre la estabilidad del ARN total al usar el bloqueador de la transcripción actinomicina D. Se observó una estabilización del RNA total de 2.2 veces con respecto al control (células a 37°C). Los resultados sugieren que el aumento de tPA en hipotermia moderada puede ser debido a cambios en eventos postraduccionales, la estabilización del RNAm o por cambios en la vía de secreción (Coronel et al., 2016; Zalai et al., 2016).

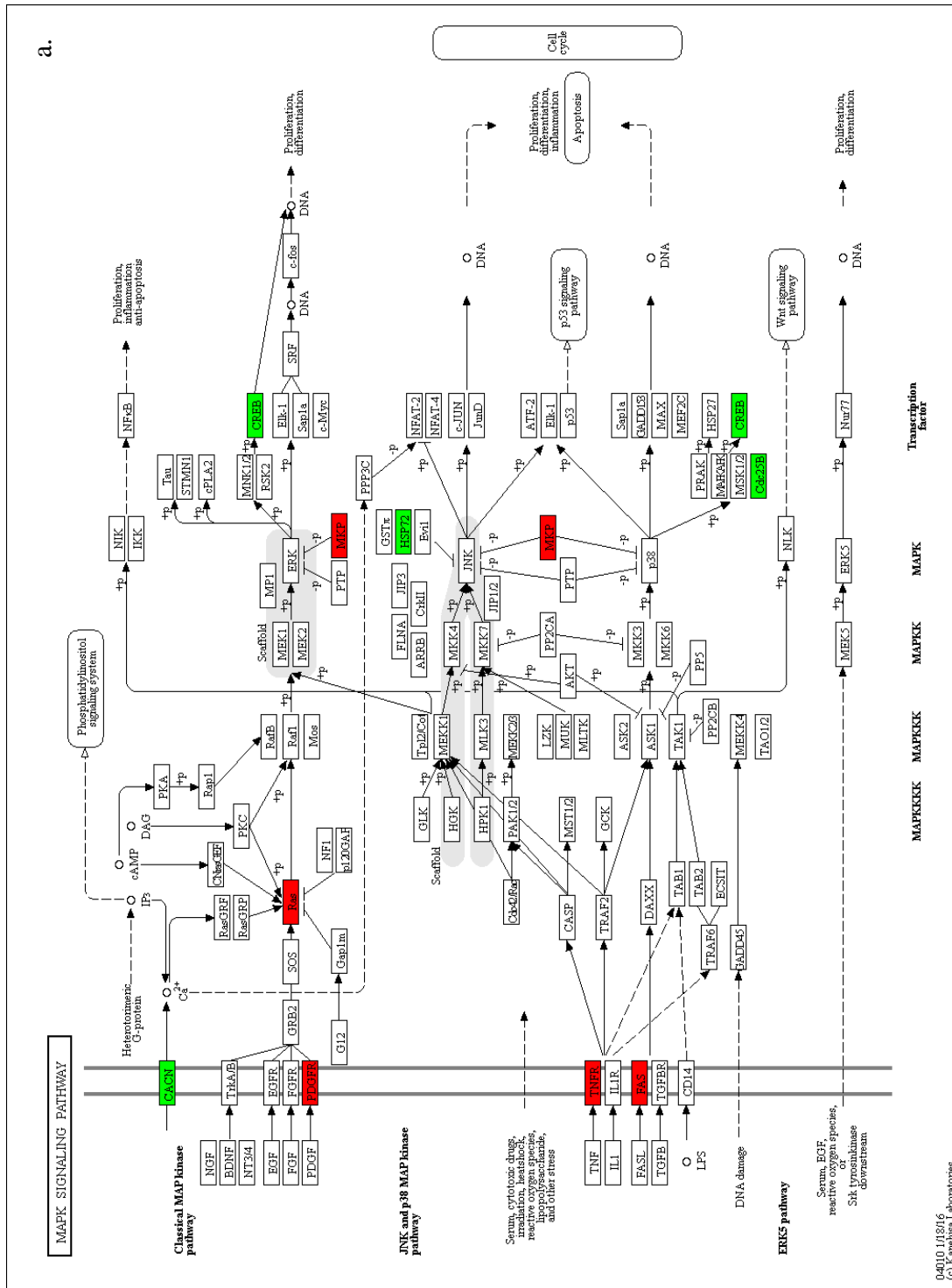
Respuesta a la disminución de la temperatura: vías de señalización

Tras el análisis de la ontología de genes y los resultados gráficos obtenidos usando la base de datos del KEGG, se describen cambios importantes en las vías de señalización de las células. La vía de las MAP Kinasas (MAPK) presentó 11 genes diferencialmente expresados a las 24 h y 36 genes a las 48 h después del cambio de temperatura (Figura 6a y 6b) A las 24 h del cambio de temperatura se observó la sobreexpresión (rojo) de los genes que codifican para TNFR, FAS y PDGFR, los cuales actúan como receptores de membrana e inicio de la cascada de señalización. El gen Ras se encuentra sobreexpresado a las 24 h. Sin embargo, no se observan cambios en los efectores finales (NfκB, C-fos). A las 48 horas después del cambio de temperatura, el gen *Ras* se reprimió al igual que los genes que lo regulan (SOS, PKC, Gap1m, NF1), los genes que codifican para las proteínas efectoras NfκB, NFAT4, ATF2 y Sap1a, se encuentran reprimidos por lo que la respuesta indica una disminución en la proliferación celular (Figura 6a y 6b).

En la vía de señalización de Ras (Figura 7 a y b), el gen *Ras* se encuentra sobreexpresado a las 24 h y los genes codificantes para los efectores RasF1 y PAK que median la apoptosis y la regulación del citoesqueleto de actina, respectivamente, se encuentran reprimidos. A las 48 h de cultivo tanto el gen *Ras* como la mayoría de los genes efectoras de la vía de señalización se encuentran apagados, como el gen que codifica para *Mst1* que participa en la apoptosis y arresto del ciclo celular (Graves et al., 1998; Oh et al., 2006; Zhang et al., 2016), NF-κB que media en la sobrevivencia (O'Neill & Kaltschmidt, 1997; Brown et al., 2015), crecimiento, migración y progresión del ciclo celular y PLA que participa en la expresión de genes (Oka & Arita, 1991; Pradhan et al., 2012). La función sobre estos genes sugiere que habría una disminución de la apoptosis, arresto del ciclo celular, disminución del crecimiento celular, corroborando los datos cinéticos obtenidos en éste y otros trabajos previos (Kubbies & Stockinger, 1990; Andersen et al., 2000; Yoon et al., 2003^a; Fox et al., 2005).

Otra de las vías claves que se relaciona directamente con la regulación del ciclo y la muerte celular es la vía de p53 (Figura 8 a y b). La proteína p53 induce la transcripción o represión de genes involucrados en el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Tomasini et al., 2003; Levine et al., 2006). El cambio de temperatura no causó la expresión diferencial del gen que codifica para p53 pero si reprimió el gen codificante para ATM, que participa en la fosforilación de p53 (Khanna et al., 1998) y actúa en la replicación de las células (Cimprich & Cortez, 2008). Se observó que a las 24 h después del cambio de temperatura se sobreexpresó el gen que codifica para MDM2, el cual es un represor directo del gen que codifica para p53, mientras que los genes que codifican para las proteínas activadoras de p53, ATM y CHK1, fueron reprimidos. La proteína p53 actúa sobre el gen que codifica para p21 (sobreexpresado) y éste a su vez reprime a su efector Cdk 4/6 que lleva al arresto del ciclo celular en G1 (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993; Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995). Así mismo, los transcritos de los genes relacionados con el inicio de la

respuesta a la apoptosis *Fsa*, *Bax* y *PAG60* se encontraron sobreexpresados; sin embargo, los efectores finales como *Casp9* y *Casp3* no presentaron cambio. Estos resultados a nivel de transcritos y de vía de señalización son acordes con los resultados observados en otros trabajos sobre el arresto del ciclo celular en fase G0/G1 y la evasión de la apoptosis (Kaufmann et al., 1999; Yoon et al., 2003^a; Fox et al., 2005; Al-Fageeh & Smales, 2006; Yoon et al., 2006).



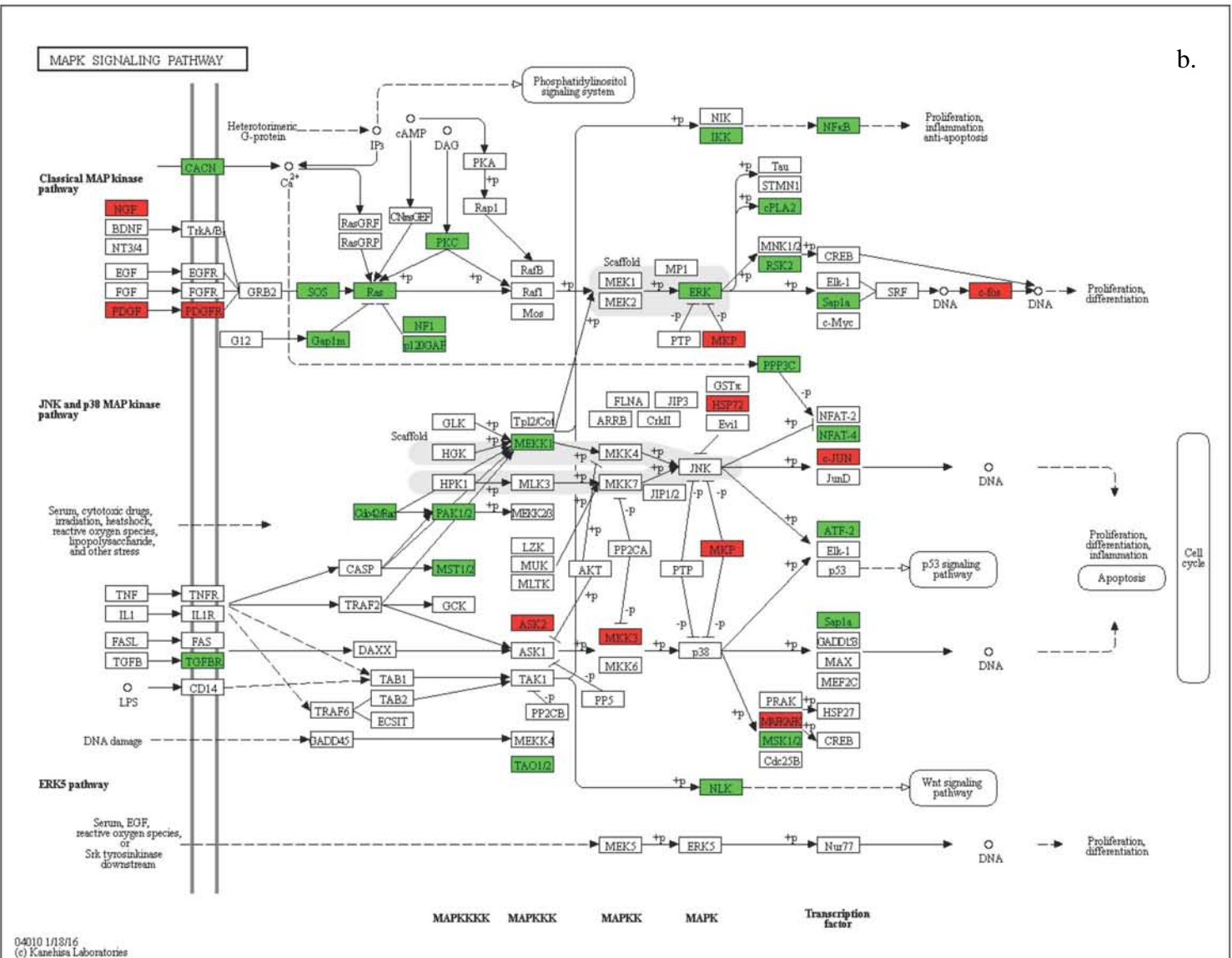
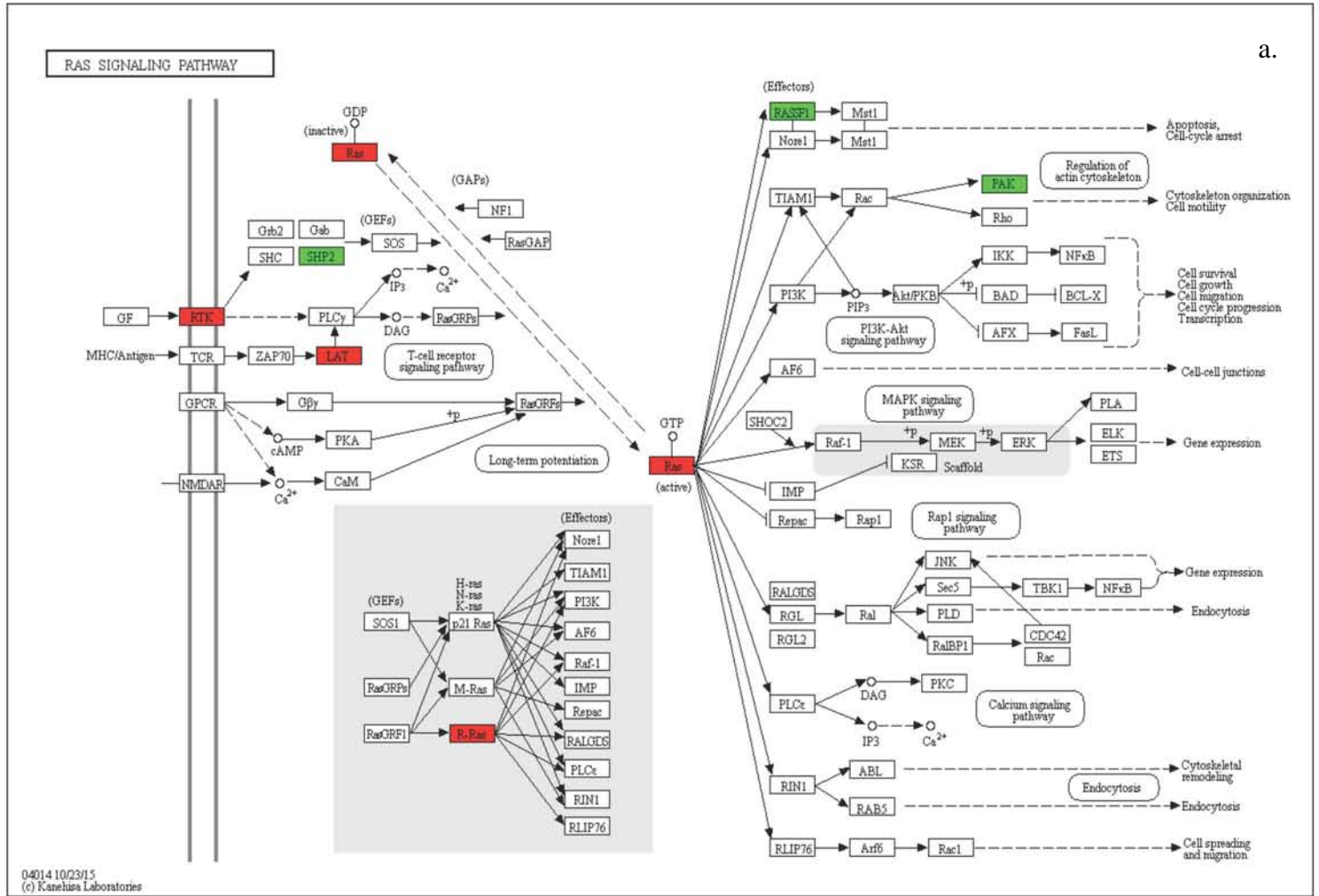


Figura 6. Diagramas KEGG para respuesta al estrés. Vía de señalización de MAPK. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobre expresados y en verde genes reprimidos.

Continúa en la siguiente página



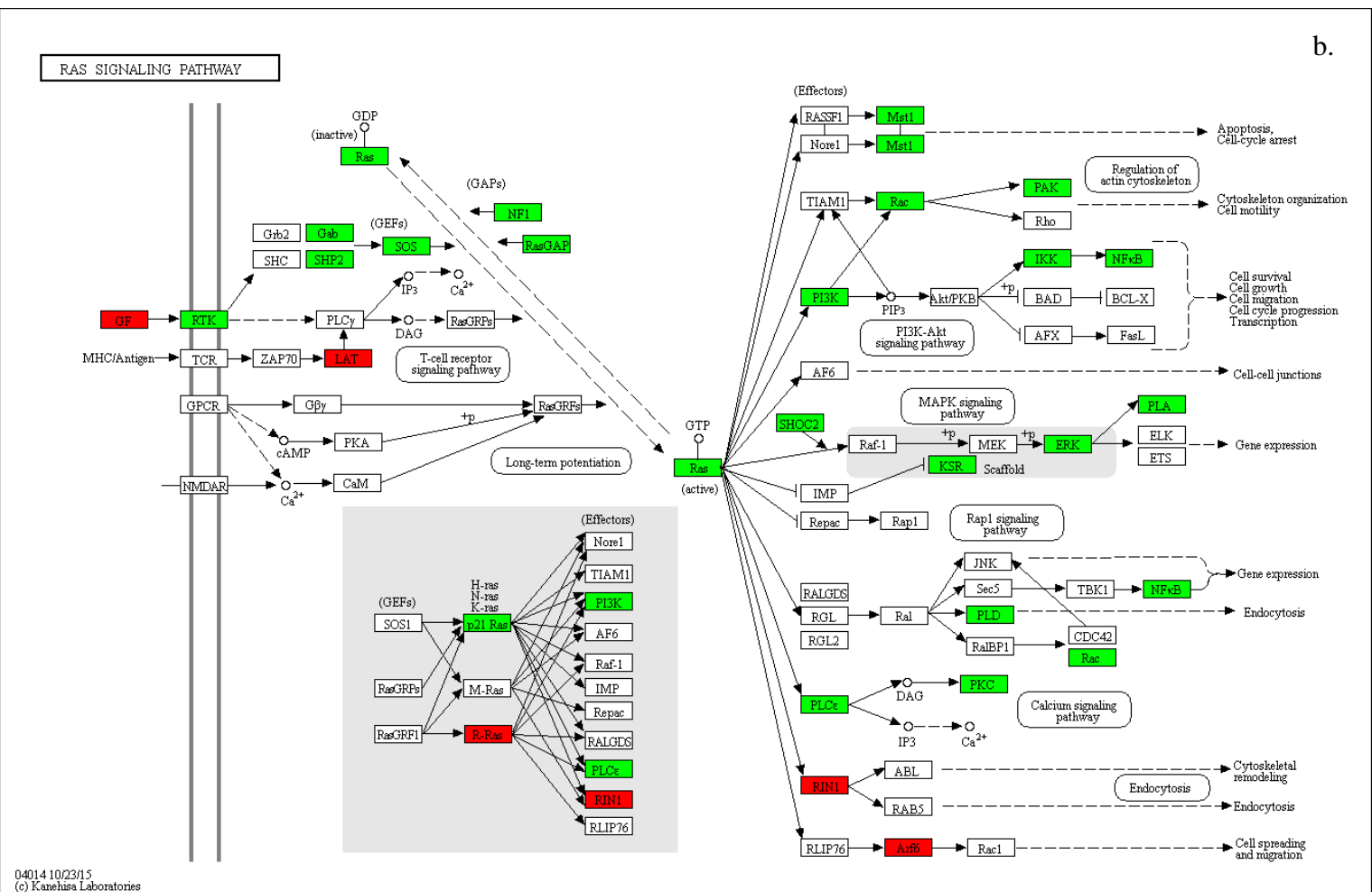
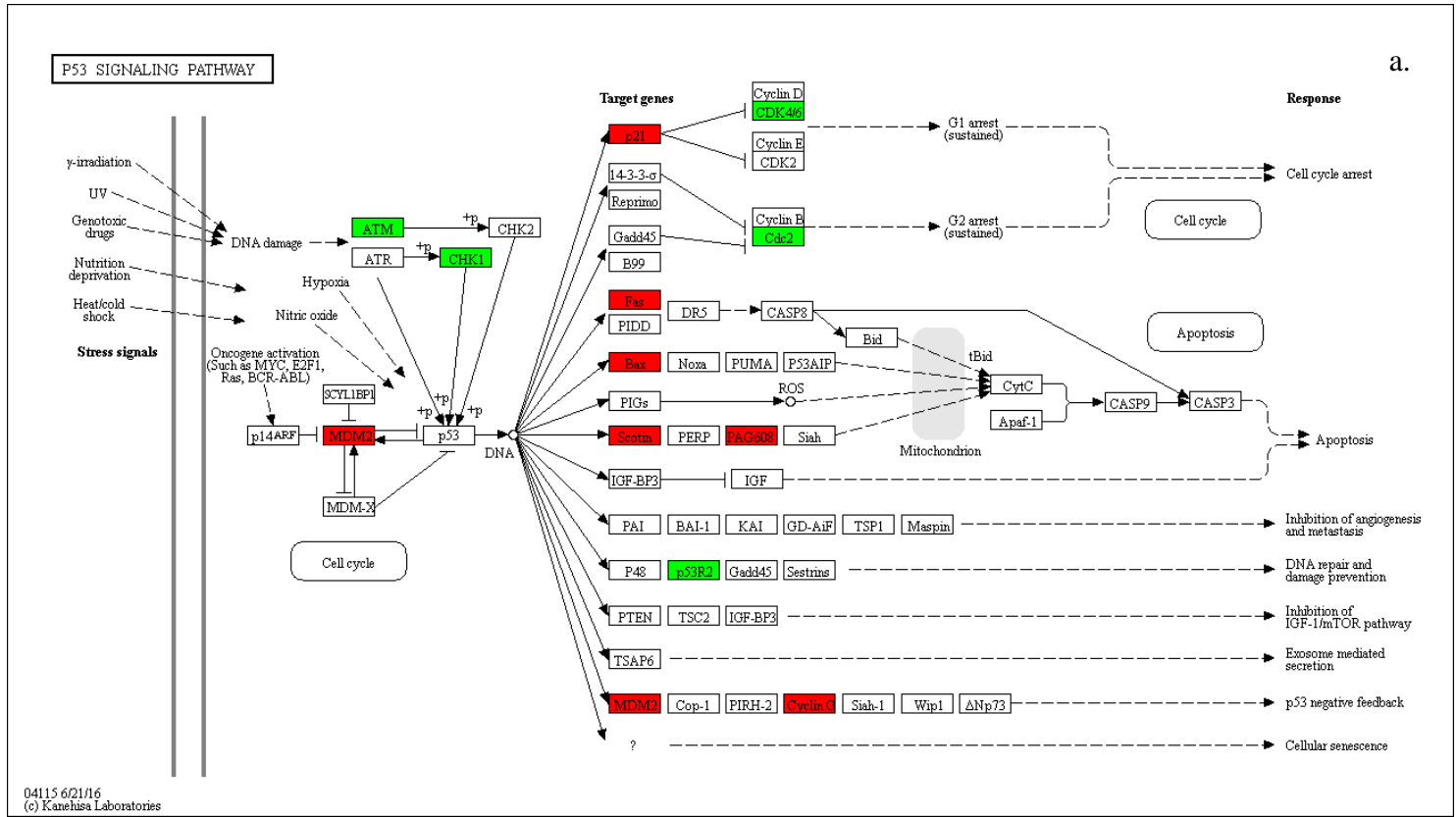


Figura 7. Diagramas KEGG para respuesta al estrés. Vía de señalización de Ras. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.

Continúa en la siguiente página



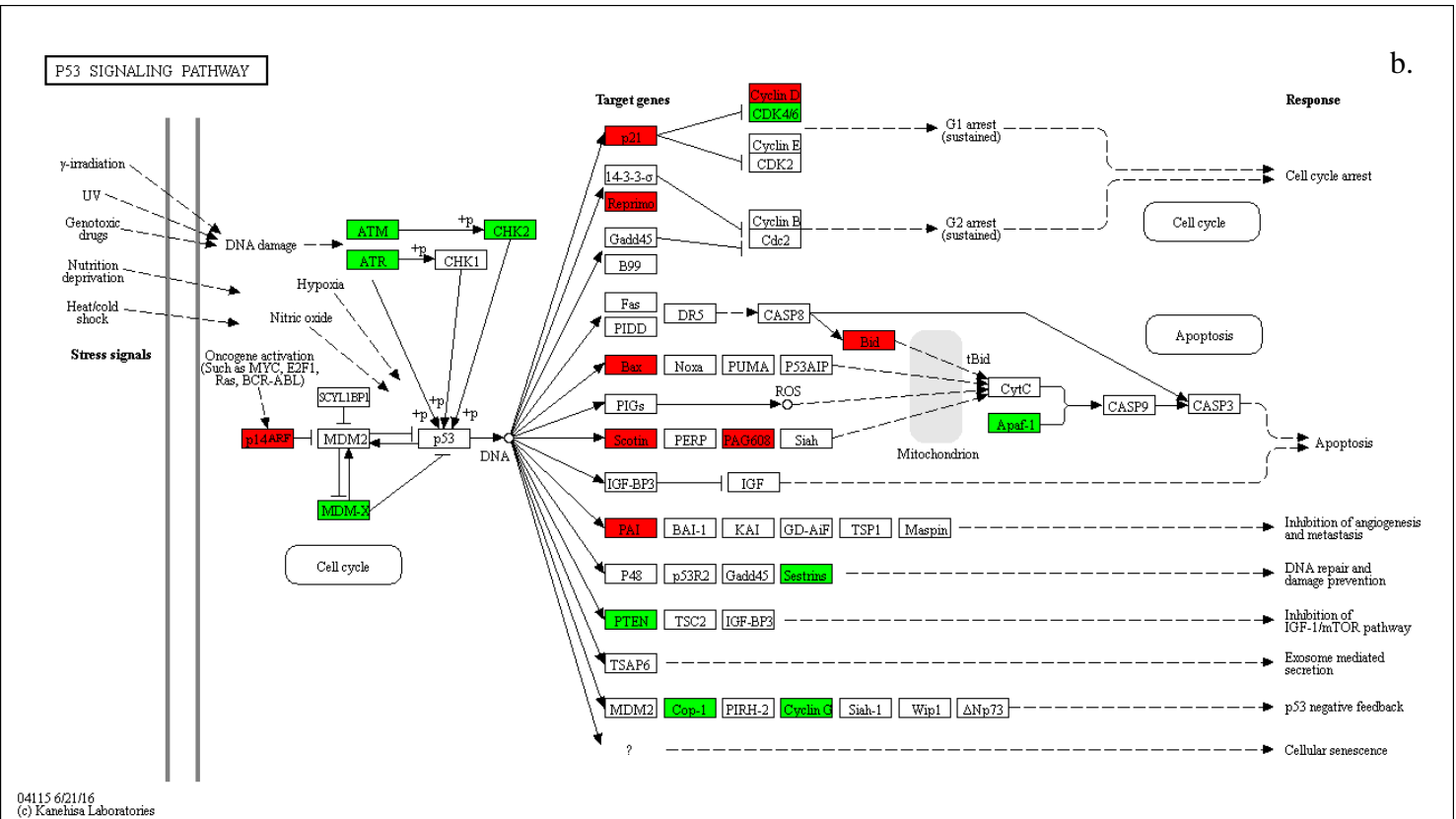


Figura 8. Diagramas KEGG para respuesta al estrés. Vía de señalización de p53. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.

Cambios en el ciclo celular por efecto del cambio de temperatura

A las 24 y 48 h después del cambio de temperatura se expresaron diferencialmente 89 y 218 transcritos, respectivamente, que codifican para genes con funciones dentro del ciclo celular como el control de la progresión del ciclo celular, la transcripción, la diferenciación y la proliferación, entre otros (Anexo 1, Figura 9A y B). Los genes podrían estar relacionados con el arresto celular en fase G1/G0, como reportó previamente Sonna et al. 2002, Al-fageeh et al. 2005, Al-Fageeh y Smales, 2006.

Como se observa en el diagrama KEGG (Figura 9 A y B), p53 regula la transcripción de genes como MDM2, TP53INP1, WAF1 / CIP1 y Bax (Riley et al., 2008; Bieging et al., 2014). Después de 24 h del cambio de temperatura, los genes que codifican para MDM2 y la proteína tumor antiproliferativa proteína p53 TP53INP1 inducible nuclear 1, se sobreexpresaron (Tomasini et al., 2003). Como se observó en la vía de señalización de p53, hay un efecto directo sobre los transcritos del gen *Cdkn1a* (que codifica para p21). El cual fue sobreexpresado en 3.26 veces a las 24 h y 9.15 veces a las 48 h del cambio de temperatura. La sobreexpresión de *Cdkn1a* es consistente con los datos reportados, donde el efecto de p21 se ha asociado a una inhibición de la proliferación celular, el arresto de la mitosis (Jaime et al., 2002; Chen et al., 2005; Nakaya et al., 2007) y el aumento de la productividad de PR (Bi et al., 2004). Adicionalmente, se encontró la sobreexpresión del gen *CDKN2A*, que codifica para p16INK4a y p14ARF involucradas en el arresto celular (Serrano et al., 1993; Quelle et al., 1995; Sano et al., 2002; Rutter et al., 2003). A las 24 h después del cambio de temperatura, se observó la represión del gen que codifica para *TSPYL2*, que regula negativamente la progresión del ciclo celular mediante p21 (Tao et al., 2011)(Anexo 1).

El cambio de temperatura (bajo los dos puntos analizados) causó la represión de genes que codifican para *BRCA2* y del gen *Gas2* que están ligados con el arresto del crecimiento. Ambos genes se han asociado con células que no se dividen (Tripathi et al., 2005; Misra et al., 2010) y con una respuesta anti-apoptótica a través de p53 (Kenyon & Gerson, 2007; Fadloun et al., 2008). Otros de los genes reprimidos en ambos tiempos de estudio (Anexo 1) y que inhiben la proliferación celular fueron *BRCA1 / BARD1* (Irminger-Finger et al., 1998; Meza et al., 1999). Durante la hipotermia moderada, los genes que codifican para las proteínas *FANCM*, *FANCD1 / BRCA2*, *FANCI*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BLM* y *RMI1*, fueron reprimidos. En enfermedades causadas por inestabilidad genómica estos genes normalmente son sobreexpresados (Meetei et al., 2003; Smogorzewska et al., 2007; Schlacher et al., 2012). Los datos obtenidos indican una respuesta transcripcional relacionada con el arresto del ciclo celular, y el control negativo de la proliferación celular, sin percibir daño del ADN. Estos datos amplían la información observada por Yoon et al. (2003) concuerdan con el modelo propuesto por Al-fageeh et al. (2005) en el cual se relaciona la reducción en la velocidad de crecimiento y reducción del metabolismo con el arresto del ciclo celular en fase G0/G1.

Efecto de la hipotermia moderada sobre la transcripción

De los transcritos diferencialmente expresados categorizados por su GO en el grupo de transcripción, se encontraron 21 y 93 genes a las 24 y 48 h después del cambio de temperatura, respectivamente. El gen que codifica para el factor *Eif4a2* se reprimió en 3.5 veces a las 72 h, mientras se ha reportando que su expresión es importante en el inicio de la traducción y se le ha asociado con aumento en la productividad (Nielsen & Trachsel, 1988). Por otro lado, el gen *Rasl11a*, que codifica para GTPasa asociada con la regulación positiva de la actividad transcripcional de una ARN polimerasa I (Pistoni et al., 2010), se sobreexpresó 22 veces a las 24 h y 19 veces a las 48 h. A las 48 h se sobreexpresó el gen codificante para la ribonucleasa H, relacionada con el catabolismo del RNAm (Shaban et al., 2010) y *Ankrd1* (7 veces a las 48 h) que regula la transcripción y tiene efecto positivo sobre el promotor de la RNA polimerasa II (Cheng et al., 1997; Zou et al., 1997; Nomiyama et al., 2009).

También los genes que codifican para factores de transcripción celular Myc y c-FOS se sobreexpresaron a las 48 h después del cambio de temperatura. Ambos participan en la regulación de genes asociados al crecimiento y la progresión del ciclo celular entre otros (Eilers & Eisenman, 2008; Durchdewald et al., 2009). Particularmente, la sobreexpresión de c-fos en células OVCAR8 y SKOV3 estimula la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en la O y N – glicosilación, como *FucA1*, *Man1a1*, *Ganab* y *Neu1* y reprimen a *Fut11*, *Galnt12*, *Galnt14*, entre otros (Oliveira-Ferrer et al., 2013). En nuestro trabajo, la hipotermia moderada causó una regulación similar, provocando la sobreexpresión de *FucA1*, *Neu1/2* mientras reprimió a *Fut11*, *Galnt1*, *Galnt7*, *Galnt10* y *Galnt13* ($q > 0,7$)

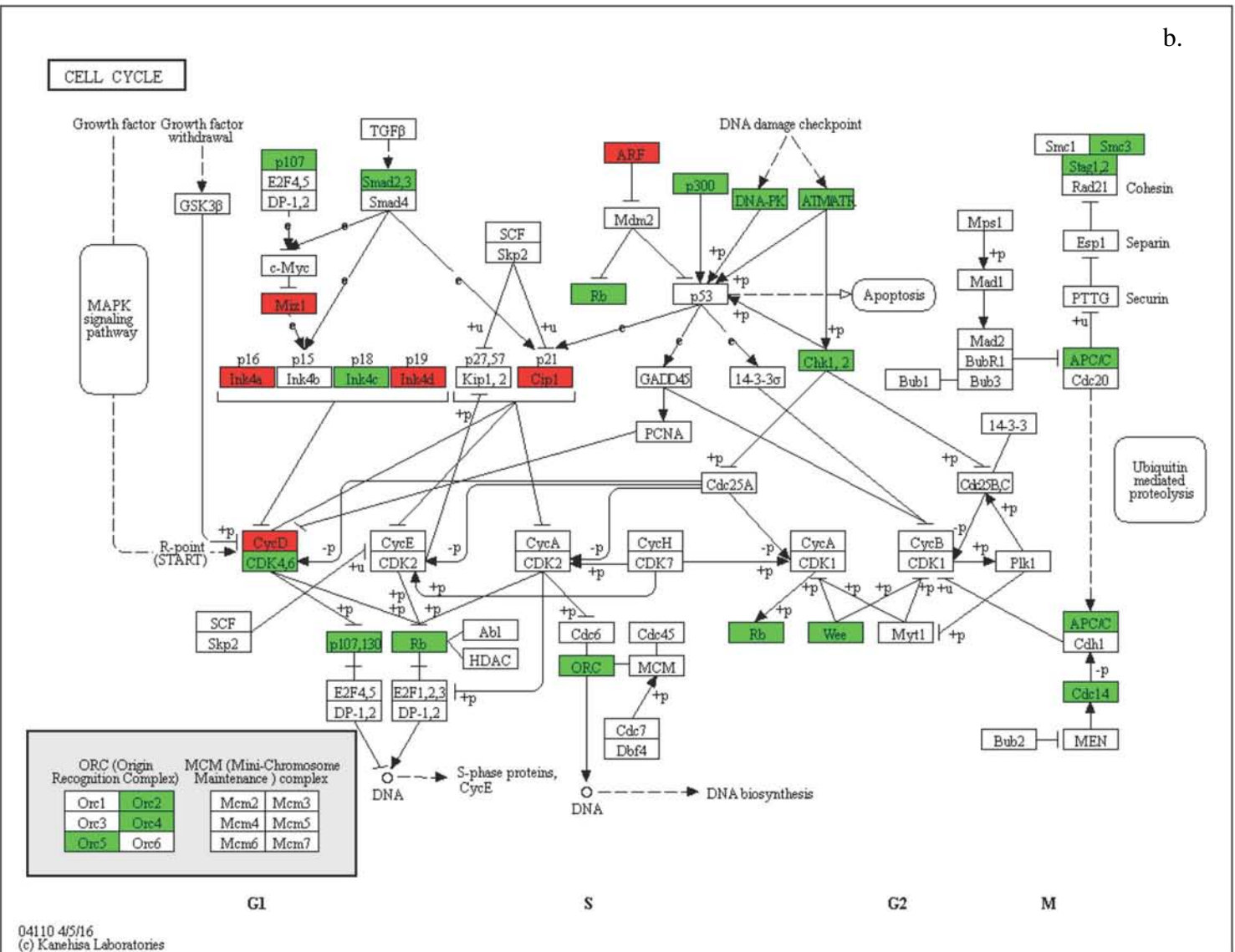


Figura 9. Diagramas KEGG para la categoría ciclo celular. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En verde los genes reprimidos y en rojo los genes sobreexpresados.

Efecto de la hipotermia moderada sobre la muerte celular

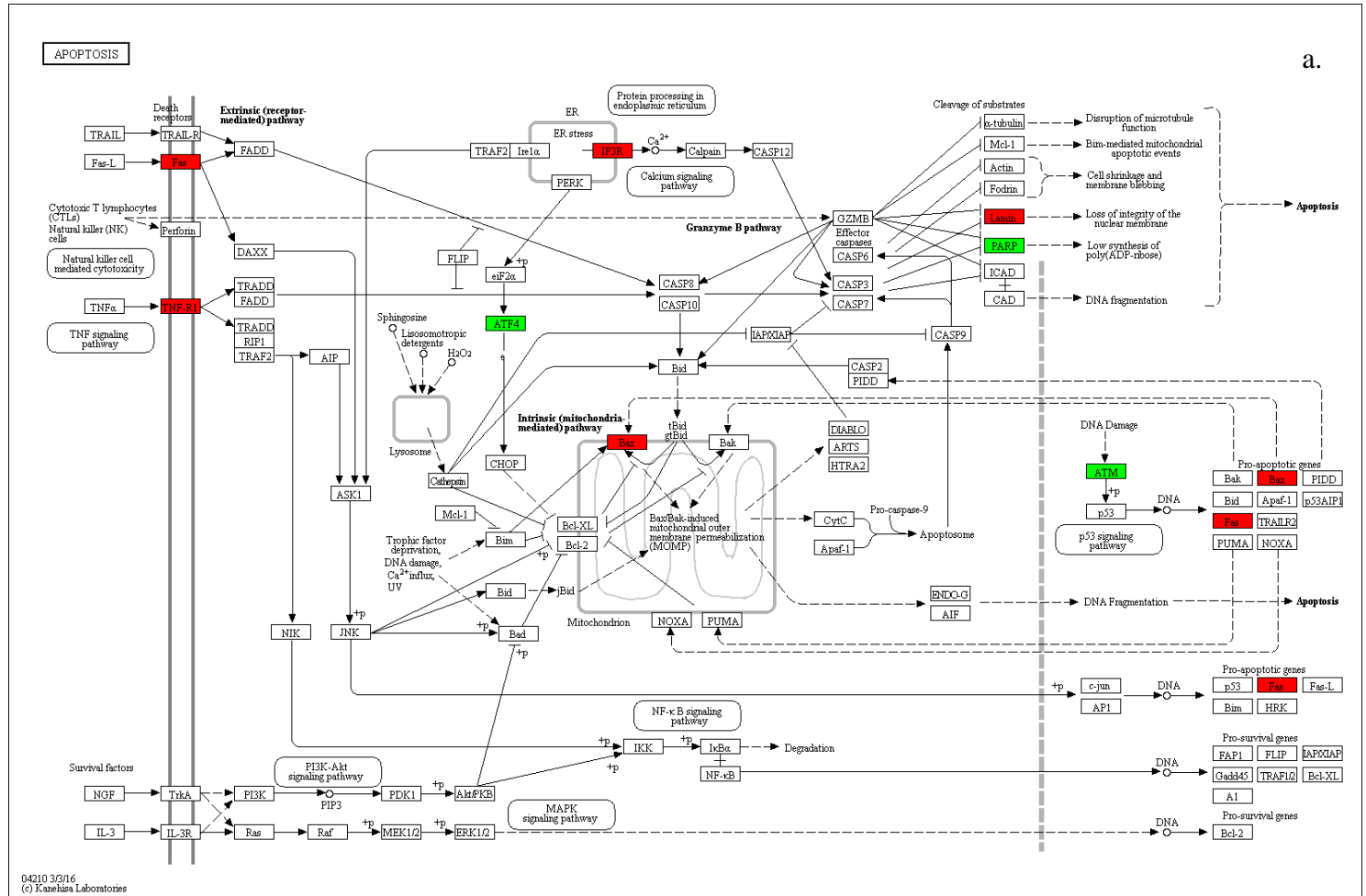
La muerte celular en cultivos puede ser desencadenada por el agotamiento de nutrientes, anoxia, hipoxia, variaciones de pH, de oxígeno y la acumulación de desechos tóxicos para las células, entre otros (Moore et al., 1997; Zanghi et al., 1999; Osman et al., 2001; Sauerwald et al., 2003; Arden & Betenbaugh, 2004; Chen et al., 2011). Sin embargo, la hipotermia moderada la retrasa (Moore et al., 1997). Se expresaron diferencialmente 8 y 16 genes a las 24 h y 48 h respectivamente después del cambio de temperatura. Estos genes están relacionados con los grupos ontológicos de autofagia y apoptosis. Los genes sobreexpresados son en su mayoría genes antagonistas de la muerte celular programada y promotores de la proliferación celular, aunque también se observaron genes que codifican para proteínas proapoptóticas (Figura 10 a y b). Por ejemplo, hay sobreexpresión de los genes relacionados con las etapas iniciales de la apoptosis (Figura 10), como los genes *Tradd*, *Bad* a las 96 h, *Fas* y *Tnfr1a* las 48 h. Sin embargo, los genes efectores como la *caspasa 12* fueron reprimidos. Seis genes que codifican para las proteínas relacionadas con la activación de la apoptosis se reprimieron, al igual que el gen que codifica para la peptidil-prolil cis-trans isomerasa D (PPID) relacionada con la formación de poros mitocondriales (Oka & Komuro, 2008; Karimian et al., 2012; Altieri, 2013) y el plegamiento de proteínas (Yokoi et al., 1996). De igual forma los genes que codifican para las proteínas quinasa serin / treonina beta BUB1, IFIH1 y el mediador de la muerte celular Bim, disminuyeron después de 48 h. En contraste, los genes que codifican para las proteínas pro-apoptóticas (*Aen*, *Bax*, *Phlda3*) fueron reprimidos en ambos tiempos. *Fam176a*, asociado con procesos apoptóticos y autofagia, fue sobreexpresado 5.36 veces a las 48 h, al igual que *Aen* que codifica para una exonucleasa que participa en la apoptosis (2.68 veces a 24 h y 6.22 veces a las 48 h). *Nle1*, cuyo producto se relaciona con la vía de señalización de Notch y de las endopeptidasas involucradas en apoptosis (Cormier et al., 2006; Podcheko et al., 2007; Lossie et al., 2012), se sobre-expresó 3.31 veces a las 48 h.

Por otro lado, el gen *Trp53inp2* fue sobreexpresado 5.5 veces a las 24 h, cuya proteína codificante se ha relacionado con el ensamble de cuerpos autofágicos en humanos (Sancho et al., 2012). A las 48 h se reprimen los genes *Atg4*, cuya proteína codificante se ha implicado en el ensamble de vacuolas autofágicas en -4.44 veces y *Rb1cc1* (-3.87 veces), asociado con el ensamble de estructuras preautofagosomales (Hara et al., 2008; Ganley et al., 2009) y la regulación de la apoptosis por Gan et al, (2006).

Genes que codifican para inhibidores de la muerte celular, como la proteína Bcl-2l (Bcl-X) (Aritomi et al., 1997) y Bcl-2-como la proteína 2 (BCLW), que media la supervivencia celular mediante la supresión de la muerte (Gibson et al., 1996), se sobreexpresaron a las 48 h del cambio de temperatura (1.49 veces y 1.93 veces, respectivamente; $q > 0.7$). La

proteína Bcl-xL, que es una isoforma de Bcl-X, evita la translocación de BAX, y se ha relacionado con la conservación del tejido cardíaco en frío (Huang et al., 2005). El gen que codifica para la proteína BCL2A1, que puede retardar la apoptosis y mantener la supervivencia celular por interacción con las proteínas BAK1, BID, BMF, BCL2L11 / BIM, y BAX (Schmitt et al., 2000; Zhang et al., 2012), se sobreexpresó a las 48 h después del cambio de temperatura (2.1 veces; q de 0.79). Del mismo modo, los genes que codifican para PINK1, que pueden proteger contra la muerte celular inducida por CAD C2-ceramida a través de la vía PI3K / AKT (Sánchez-Mora et al., 2012) y BIRC5 (Beltran et al., 2011), aumentar la proliferación celular y prevenir la apoptosis, se sobreexpresaron a las 48 h (de 1.8 y 1.7 veces, respectivamente; $q > 0.75$). De acuerdo a los resultados descritos, se sugiere que como efecto de la hipotermia moderada hay una regulación negativa de la apoptosis.

Continúa en la siguiente página



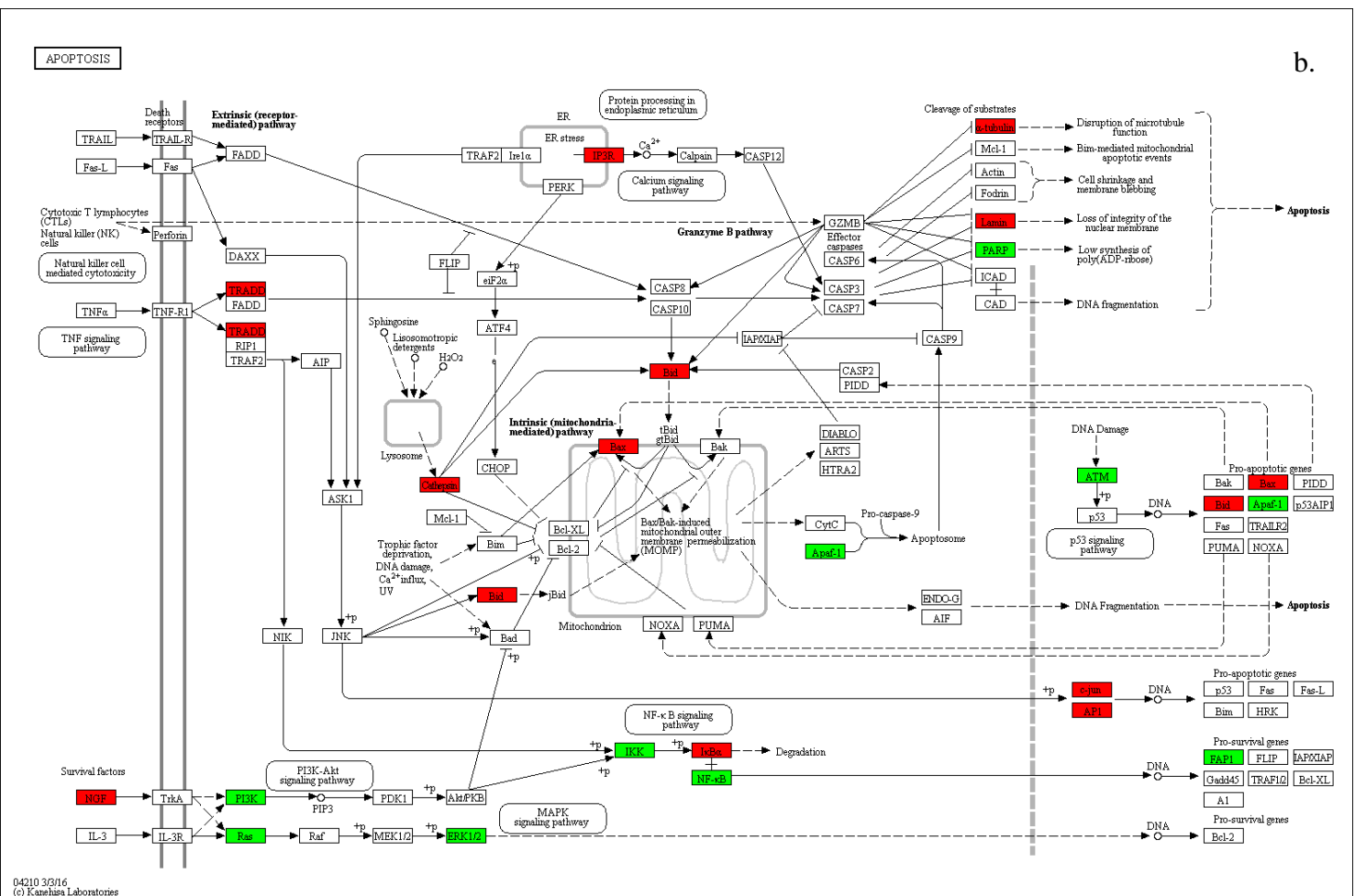


Figura 10. Diagramas KEGG para la categoría apoptosis. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo los genes sobreexpresados y en verde los genes reprimidos

Efecto de la hipotermia moderada sobre la secreción y la síntesis de proteínas

En los genes con GO asociados a la secreción y síntesis de proteínas se observó una regulación positiva significativa de genes relacionados con la biogénesis ribosomal (3 genes a las 24 h y hasta 40 genes a las 48 h). Dieciséis genes de las familias RPS fueron sobreexpresados a las 48 h después del cambio de temperatura. Esto contrasta con los datos reportados por Yee et al., (2009), quien observó una represión de los genes de las mismas familias (Tabla 9).

Varios de los genes que codifican para proteínas integrales de membrana que se encuentran en el REL, Golgi, vesículas y membrana extracelular fueron sobreexpresados. Por ejemplo, *grina* (2.2 veces), *tmem43* (2.5 veces), *tmem203* (3.3 veces) y 2 isoformas de *Col7a* (1.7-2.7 veces), éste último también fue sobreexpresado 4 veces a las 48 h de cultivo. Se sabe que *Col7a* tiene funciones diversas por ejemplo: morfogénesis, proliferación celular, adhesión celular, entre otras (Schuger et al., 1992; Patton et al., 1997; Bolcato-Bellemin et al., 2003; Kadoya et al., 2003; Fukumoto et al., 2006).

Con respecto a cambios en genes codificantes para proteínas del RE los genes *Sec61β* y *Sec61δ*, que codifican para proteínas del complejo de translocación hacia el lumen del RE, fueron sobreexpresados (2.26 y 1.96 veces, respectivamente, a las 48 h después del cambio de temperatura; $q > 0.78$). A las 24 h estaban reprimidos los transcritos de varias isoformas de genes que codifican para las chaperonas *Hspa8* en -2 veces, que correlaciona con el análisis proteómico de la línea parental CHO-K1 en condiciones de hipotermia moderada realizado por Kumar et al. (2008). Además se observó la represión de chaperonas *Dnajc 13* y *10*, en más de 3 veces a las 96 h. El gen que codifica para la chaperona Bip (*Hspa5*) que es un regulador maestro del plegamiento y que participa en la estabilización de la cadena naciente (Hamman et al., 1998), fue sobreexpresado en 1.9 veces a las 24 h.

Diferentes genes codificantes para enzimas que remodelan las proteínas en el lumen del ER y participa en la N-glicosilación fueron expresados diferencialmente. Por ejemplo, el gen *Mogs* que codifica para la glucosidasa I que se encuentra en el RE y el gen codificante para la UDP-Glc glicoproteína glucosiltransferasa (*UGGT1*), un sensor de plegado en el control de calidad ER (ERQC) (Helenius & Aebi, 2004; Lederkremer, 2009), fueron reprimidos a las 48 h (1.64 veces $q < 0.77$ y 2.97 veces; $q < 0.94$, respectivamente). Un hallazgo interesante fue que después de 48 h, se sobreexpresó el gen que codifica para la calreticulina (CLR) en 1.7 veces, mientras que en el mismo tiempo el gen que codifica la calnexina CLN fue reprimido en 1.7 veces, mientras el gen que codifica para PDIA3 mantuvo en valor constante.

Las proteínas monoglucosiladas son ligandos para el chaperonas CLN y CLR, que pueden interactuar con las proteínas oxidoreductasas y la disulfuro isomerasa A3 (*ERp57* / PDIA3) para el rearreglo de los enlaces disulfuro y estructuración de la proteína naciente

(Lederkremer, 2009). Las proteínas que no adquieren su correcto plegamiento son enviadas para su degradación después de ser reconocidas por α -manosidasa I, y la α -manosidasa tipo 1 (EDEM) (Smith et al., 2011). Después de 24 h, el gen *Man1b1*, que codifica para la α -manosidasa I se reprimió en 2.38 veces (q 0.81), así como el gen *Ssr3* que codifica para la proteína asociada con la subunidad gamma del translocon (TRAPG) se reprimió después de 48 h. TRAPG también se une a proteínas mal plegadas para su degradación (Nagasawa et al., 2007). El gen *Pmm1*, que codifica para una enzima que participa en la síntesis de GDP-manosa y dolicol-fosfato-manosa (Silvaggi et al., 2006), fue sobre-expresado en ambos tiempos. A las 48 h los genes que codifican para la N-palmitoil (PORCN) y manosiltransferasa dolicol 3-fosfato (*Dpm3*) fueron sobreexpresados.

Por efecto de la temperatura, a las 48 h se encontraron cambios en los genes *Bip*, *Calreticulina* y *Herpud* que codifican para chaperonas que pudieran estar relacionado con una respuesta inicial de UPR (Kokame et al., 2000; Bommasamy & Popko, 2011). Particularmente, el gen *Herpud1* se sobre expresó 2.06 veces a las 72 h. Este gen se asocia con el RE, participando en el proceso de respuesta al estrés del RE (UPR) en cultivos de HUVECs sometidas a tratamientos inductores de estrés en el retículo (Kokame et al., 2000). Este aumento en chaperonas puede favorecer la sobrevivencia celular y aumentar la secreción de proteínas.

El gen *Fut1*, relacionado con la fucosilación (Domino et al., 1997) fue sobreexpresado 4.8 veces y *Sulf2* que codifica para N-acetilglucosamina-6-sulfatasa (Lamanna et al., 2008), fue sobreexpresado 4.43 veces, lo que puede estar relacionado con cambios en los patrones de glicosilación observados por Andersen et al. (2000) en el tPA. También se reguló negativamente el gen que codifica para la proteína *Man1*, la cual hace parte de la membrana del Golgi (Bell et al., 2001) y participa en la maduración de los N-glicanos (Tremblay et al., 2007). El gen *Abca5*, cuya proteína codificante se ha localizado en el Golgi y el endosoma tardío (Korotkov et al., 2002), fue reprimido a las 96 h en -3.4 veces. De forma similar el gen codificante para *Fktn* o fukutina asociada con el aparato de Golgi y posiblemente con actividad de glicosiltransferasa (Hayashi et al., 2001; Schro et al., 2002) fue reprimido en -2.89 y -3.86 a las 72 y 96 h, respectivamente. El gen codificante para *Selm* selenoproteína M (*SelM*), que podría funcionar como tiol disulfuro oxidoreductasa fue sobreexpresado en 6.69 veces a las 96 h.

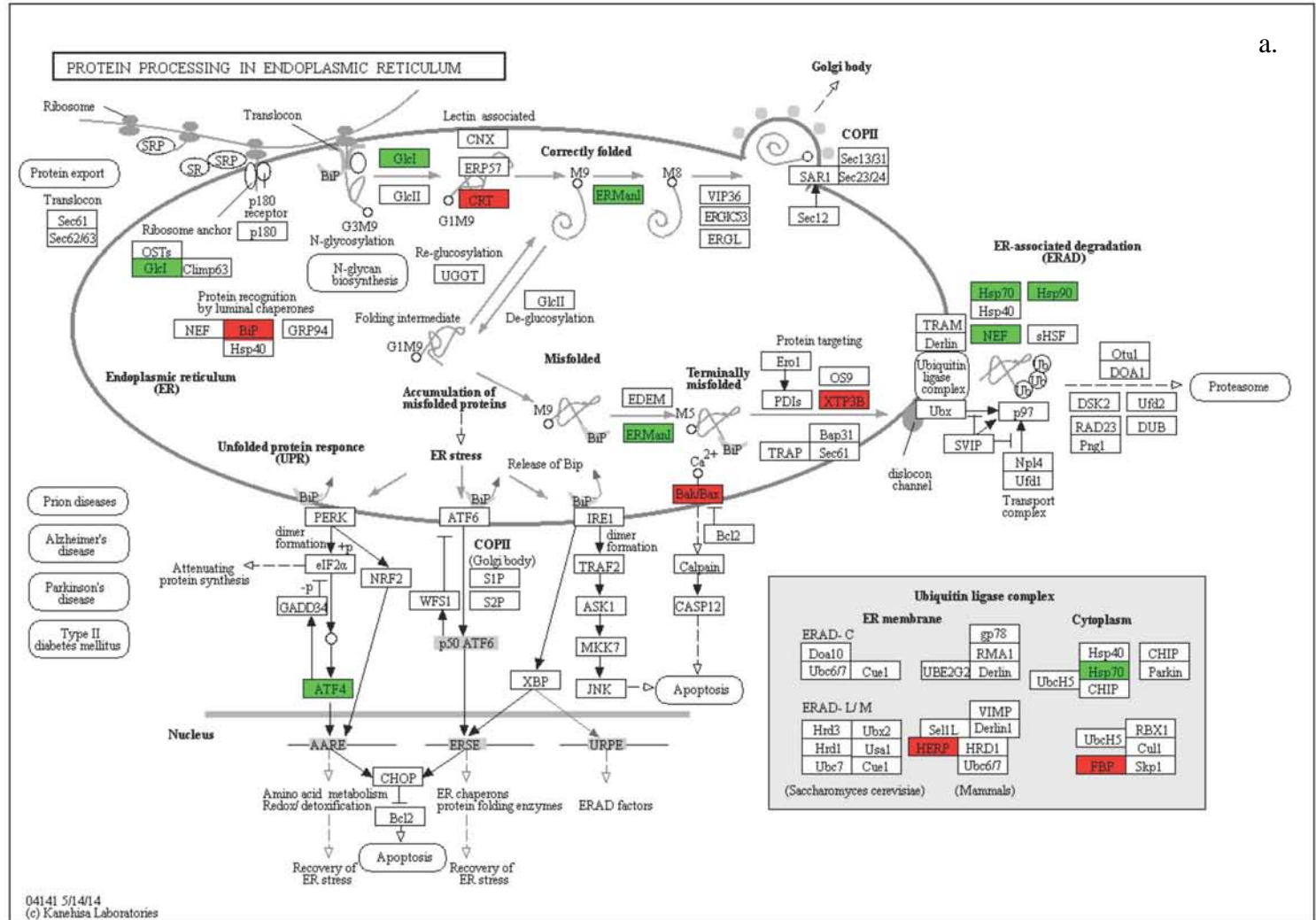
Los resultados sugieren la modificación en el procesamiento de proteínas en el RE que puede afectar directamente a la PR t-PA que contiene varios sitios de glicosilación y que es secretado vía RE-Golgi. La información sobre todas estas modificaciones de genes puede ser útil para la comprensión del efecto de la disminución de la temperatura sobre la glicosilación de proteínas (Figura 11 a y b).

Los genes *usp1*, *usp40* *ttc3*, cuyas proteínas codificantes se involucran con el proceso de ubiquitinación, y *senp1*, *usp31*, *ermp1*, *barp*, entre otros, relacionados con la proteólisis (Turcu et al., 2009; Faesen et al., 2011; Lee et al., 2011; Ye et al., 2011) fueron reprimidos. Esto puede indicar que las células modifican la expresión de transcritos en respuesta al estrés disminuyendo su capacidad para degradar proteínas.

Por otro lado, se encontraron sobreexpresados genes codificantes para proteínas relacionadas con el ensamble de vesículas de endocitosis o con el citoesqueleto. Ejemplo de estos genes son *grn*, *zfpl* y *tmbin1*, que codifican para proteínas relacionadas con el transporte mediado por vesículas (2.1 veces, 2.3 veces, 2.57 veces, a las 72 h de cultivo, respectivamente). La sobreexpresión de estos genes podría indicar que la célula está mejorando su capacidad para secretar proteína y sea éste uno de los motivos por el cual la PR se encuentre en mayor cantidad en los cultivos en condiciones de hipotermia moderada.

Kantardjieff et al. (2010) y Yee et al., (2009) observaron que en células CHO en condiciones de hipotermia moderada y en presencia de butirato de sodio hay desregulación de genes de citoesqueleto y de proteínas involucradas en la biogénesis de actina. En la categoría del citoesqueleto se encontraron 247 genes relacionados con funciones a nivel de membranas, organización de fibras de colágeno, movimiento de microtúbulos y filamentos de lamina que pudieran estar acopladas con la secreción de proteínas y el rearrreglo al interior de la célula. Por ejemplo, se reprimieron genes como *lmn1* (-1.7 veces a las 24 h de cultivo) relacionado con la formación de filamentos de lamina y envoltura nuclear (Fiume et al., 2009) y *p4ha1* (-2.04 a las 96 h de cultivo) relacionado con reorganización de fibras de colágeno (matriz intracelular) y procesos de óxido-reducción (Holster et al., 2007) solo a las 24 h después del cambio de temperatura.

Continua en la siguiente página



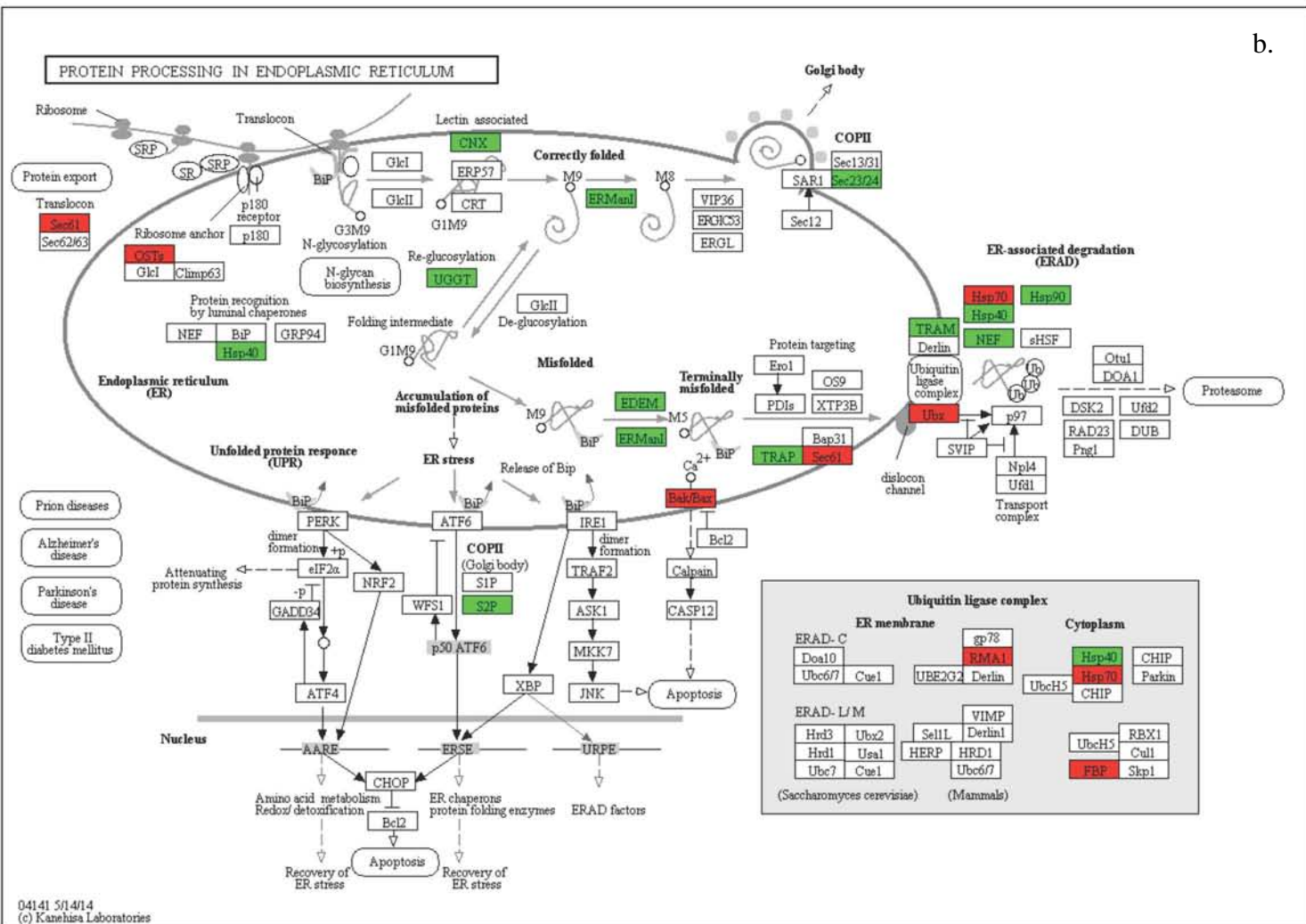


Figura 11. Diagramas KEGG para el procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.

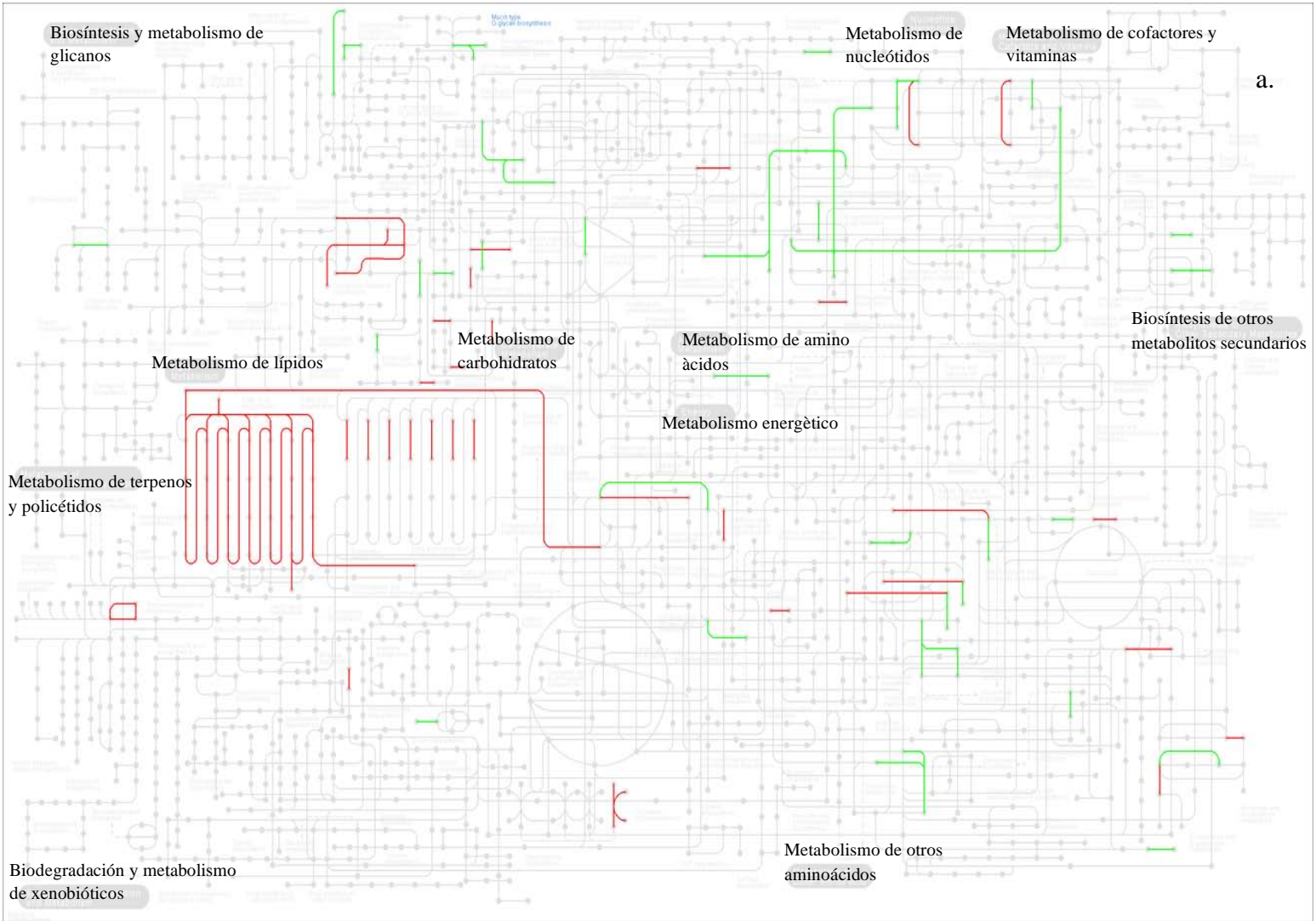
Efecto transcripcional de la hipotermia moderada sobre el metabolismo

Las células CHO-TF70R, reducen el consumo de glucosa y la producción de lactato por efecto del cambio de temperatura (Figura 2), tanto a las 24 como a las 48 h después del cambio se observó la sobreexpresión de genes, relacionados con la biosíntesis de lípidos y la represión de genes del metabolismo de carbohidratos, biosíntesis de glicanos y metabolismo de nucleótidos (Figura 12). A las 48 h se observó mayor cantidad de genes con expresión diferencial, principalmente genes relacionados con la represión del metabolismo de carbohidratos, biosíntesis de glicanos, metabolismo de nucleótidos, metabolismo energético, de aminoácidos y metabolitos secundarios (Figura 12 b). Una de las fuentes de carbono de las células CHO es la glutamina (Altamirano & Becerra, 2006). Del análisis transcriptómico el gen *pfas* relacionado con el metabolismo de la glutamina se reprimió en 2.2 veces a las 24 h. En contraste, no se observó una correlación directa con el consumo de glutamina, el que no varió entre el cultivo control y el bifásico (Figura 3), en comparación con los resultados de otros autores (Chuppa et al., 1997; Al-Fageeh & Smales, 2006; Marchant et al., 2008; Zagari et al., 2013).

El gen codificante para la lactato deshidrogenasa (*Ldhc*) que participa en la conversión reversible de piruvato a lactato, se sobreexpresó 19 veces y 5.54 veces, a las 24 y 48 h después del cambio de temperatura, respectivamente. El gen codificante para la fosfo-pantotenoilcisteína descarboxilasa (*Ppcdc*) relacionada con la biosíntesis de acetil CoA, también fue sobreexpresado en 3.2 y 3.7 veces. Los datos sugieren que las células están tomando el lactato acumulado y dirigiéndolo hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos para la generación de energía (Sou et al., 2015b), lo que coincide con la disminución de la acumulación de lactato en el cultivo bifásico. En otros reportes, el gen codificante para la LDH se ha encontrado sobreexpresado durante el consumo de lactato en las células CHO (Zagari et al., 2013). Además se ha observado aumento de la actividad LDH durante la aclimatación al frío de músculo esquelético de rata (Stancic et al., 2013).

Otro cambio importante fue la sobreexpresión de un grupo de diez genes asociados con el metabolismo de energía en las mitocondrias. A las 96 h en especial se observó la sobreexpresión de genes relacionados con proteínas de translocación como *Isoc2a* (4.14 veces) y *Ball 1* (7.09 veces) y la represión de genes con funciones redox.

Otro proceso metabólico donde se encontraron cambios fue la glutaminólisis, el gen *Gls* se sobreexpresó a las 48 horas y está asociado con la conversión de glutamina en glutamato y amonio. Además el gen que codifica para ASCT2, un transportador de glutamina, se sobreexpresó a las 48 h después del cambio de temperatura. Genes del metabolismo central como PPCDC, Pgp y Galk1 también se sobreexpresaron. El primero codifica para una enzima citoplasmática necesaria para la biosíntesis de la acetil-CoA (Daugherty et al., 2002), mientras los otros dos genes codifican para la fosfatasa fosfoglicosilada y galactoquinasa.



a.

Continúa en la siguiente página

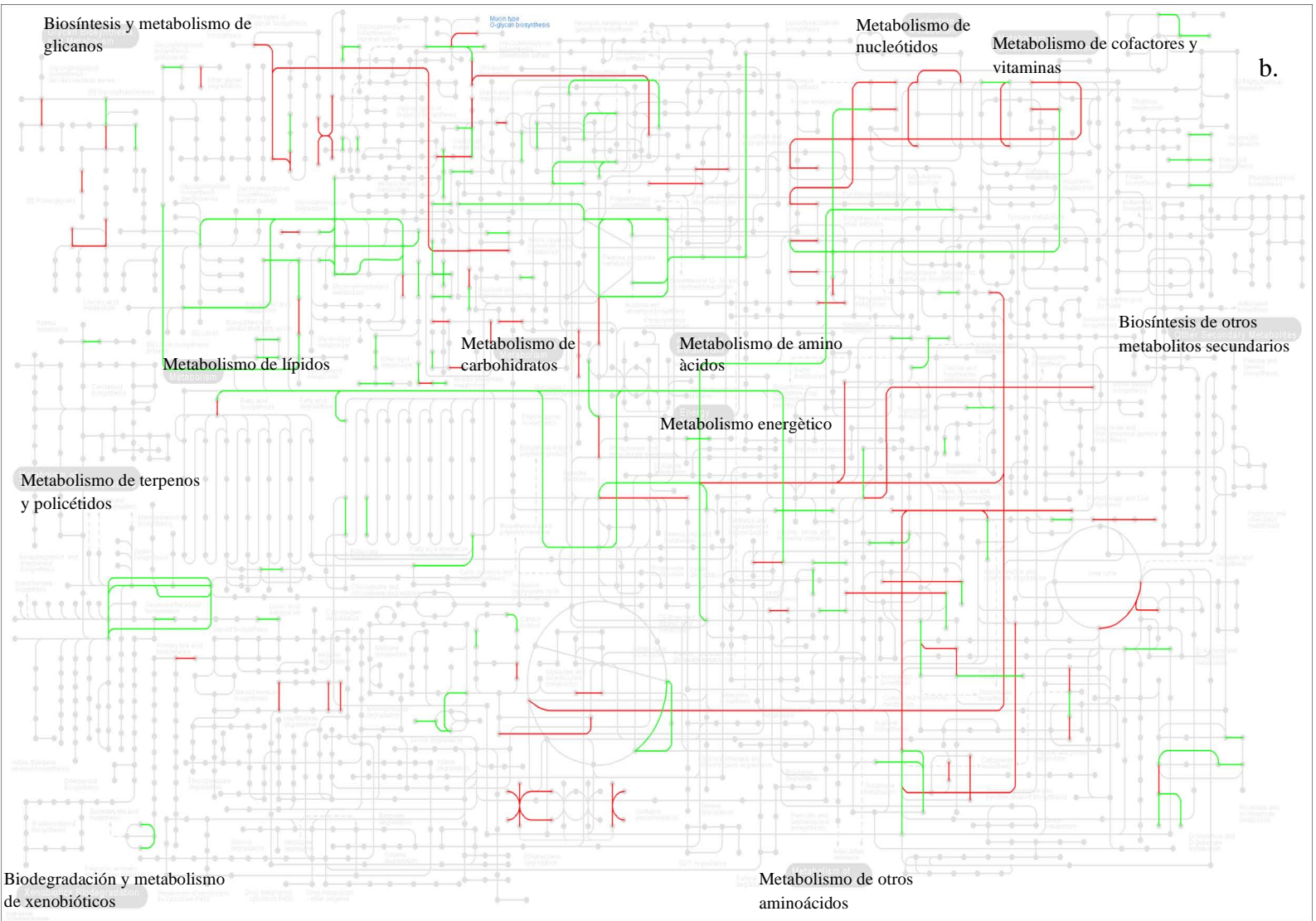


Figura 12. Diagramas KEGG para el metabolismo. 24 h (a) y 48 h (b) después del cambio de temperatura. En rojo genes sobreexpresados y en verde genes reprimidos.

En resumen la hipotermia moderada tiene efecto sobre la transcripción, el estímulo térmico desencadena cascadas de señalización celular que llegan al núcleo, la expresión diferencial de los genes provocan la atenuación de la transcripción, la reorganización de la cromatina, el arreto celular y la atenuación de las señales de apoptosis. Cambios en los lisosomas Efecto sobre el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos y lípidos. Alteración en las mitocondrias y sobreexpresión de genes para biosíntesis de ATP y NADH. La sobreexpresión de los genes que codifican para las proteínas CIRP y RBM3 pueden indicar una estabilización de las proteínas y el RNAm. Se estimula la biogénesis de ribosomas y la sobreexpresión del complejo de traslocación, hay cambios en las proteínas procesadas por el RE y posiblemente en los patrones de glicosilación. Cambios en el transporte en el RE y Golgi. Cambios en la membrana celular y sobreexpresión de receptores. Cambios en la formación de vesículas secretoras y en el transporte de moléculas, sobreexpresión de genes y proteínas del citoesqueleto, que sugiere variación en la secreción de proteínas. Que pueden estar relacionados con el aumento en la producción de proteína recombinante (Figura 13).

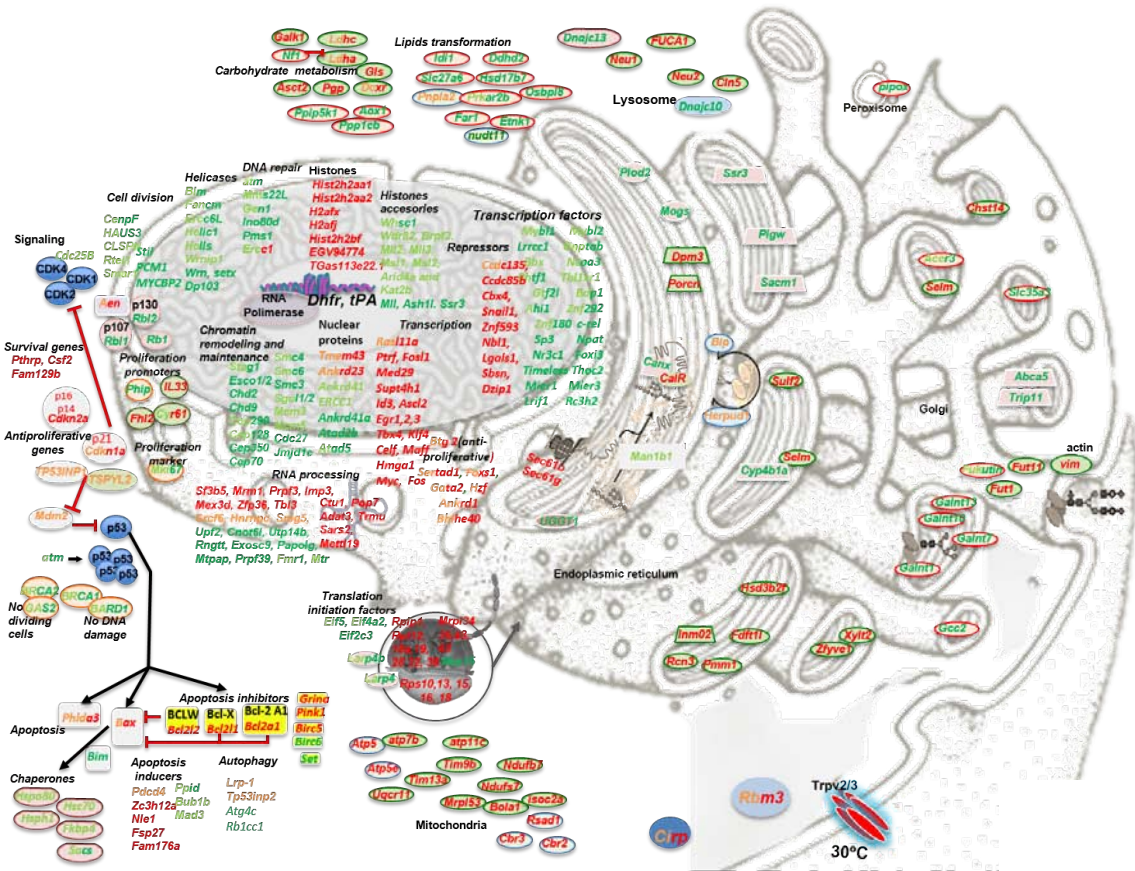


Figura 13. Representación gráfica de los genes diferencialmente expresados y su ubicación en los diferentes compartimentos de las células. En verde oscuro los genes reprimidos a las 48 horas después del cambio de temperatura y en verde claro a las 24h. En rojo oscuro los genes sobreexpresados a las 48h y en naranja a las 24h.

PROTEÓMICA DIFERENCIAL

La separación de proteínas de células o de sobrenadantes de los cultivos bifásicos se realizó en geles en dos dimensiones (2-D) teñidos con azul de Coomassie (Figura 14). La figura 13A y 13B muestra dos geles comparativos de la muestra a las 48 h control y la correspondiente a las 96 h de cultivo, respectivamente. Las imágenes muestran un enriquecimiento entre el pH 4 y 7, similar a lo reportado para otras líneas de CHO (Meleady et al., 2008; Carlage et al., 2009; Kim et al., 2009). Se observó un enriquecimiento de las proteínas con un peso molecular por arriba de 50 kDa y concentradas preferencialmente. Sin embargo, se observó un enriquecimiento de proteínas en el gel. Esto puede deberse a que la alta densidad de proteínas de las muestras no logró ingresar en su totalidad a los geles en la primera dimensión. Con flechas rojas se señalan aquellas manchas que presentaron algún tipo de variación entre las imágenes analizadas.

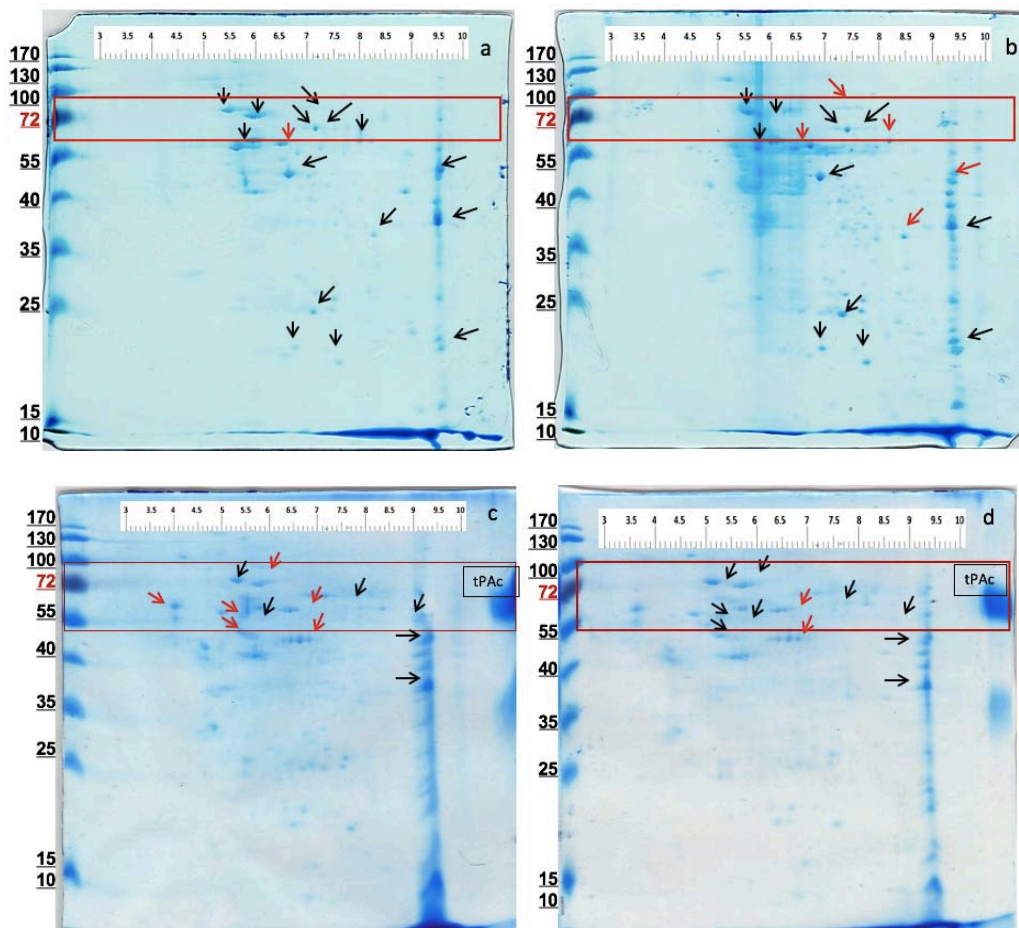


Figura 14. Geles SDS PAGE al 12% con isoelectroenfoque de 3 a 10 de pH a) proteoma del cultivo control a 37°C, b) proteómica diferencial de cultivo bifásico, c) secretoma diferencial del cultivo control d) secretoma diferencial del cultivo bifásico. tPAc: tPA comercial como control. En flechas rojas manchas con cambios.

Para confirmar la presencia del tPA en los geles del secretoma se realizó un Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-tPA. En la figura 15 se observan los patrones

obtenidos para cada una de las muestras. La comparación de la imagen que corresponde con la muestra a las 0 h - 37°C con la imagen 14B que corresponde a las 48 h - 30°C, mostró diferencias en los patrones de distribución de las manchas. A 37 °C, el tPA se concentró en una línea en el extremo derecho del gel, y varias manchas entre 6.5 y 8 que se pueden relacionar con las isoformas reportadas para el tPA por el cambio de temperatura (Andersen et al., 2000). A 30 °C se observan 5 manchas a pH entre 6.5 y 8 mientras a 37 °C se observan 3 manchas, estas diferencias podrían deberse a los cambios ocurridos en la vía de secreción, con los genes relacionados con el plegamiento y glicosilación de proteínas discutidos anteriormente. Como fue observado por Hendrick et al., 2001, quienes demostraron diferencias en el reconocimiento en los patrones de glicosilación con las lectinas GMA (Manosa), SNA (ácido siálico) y MAA (ácido siálico glicoconjugado)

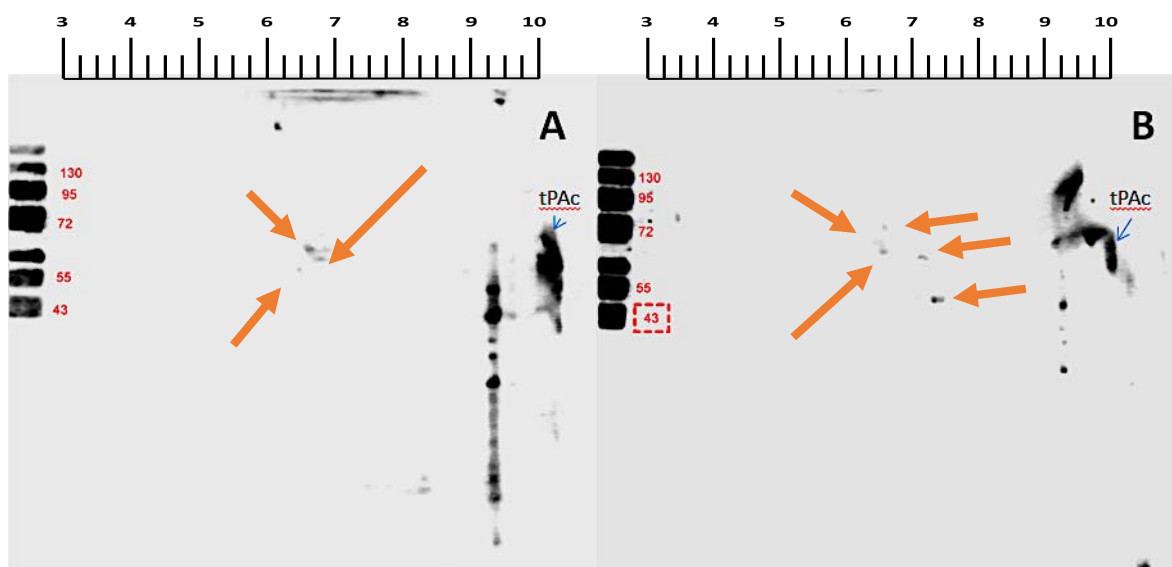


Figura 15. Western blot en 2D del secretoma de la línea CHO-TF70R (A) Secretoma 37°C-48h y (B) Secretoma 30°C-96 horas de cultivo. tPAc = control de tPA comercial. Las flechas señalan las manchas de tPA

Fraccionamiento celular

A partir de las células obtenidas por centrifugación de cultivos celulares, se realizó un enriquecimiento de fracciones usando el kit comercial Cell compartment kit de Quiagen (Figura 16). Se obtuvieron 4 fracciones: citoesqueleto, núcleo, membranas y citosol, las cuales se analizaron independientemente mediante cromatografía en gel (Figura 15). En la fracción membranal, se observaron 6 bandas por arriba de 40 kDa y la presencia de proteínas de membrana, como GRP78 (78 kDa flecha azul), marcador de RE. En la fracción de núcleo la banda más intensa se observa por debajo de 15 kDa y corresponde con los pesos moleculares de las histonas. En el análisis por western blot (Anexo 2) se observa una banda dada por el reconocimiento del anticuerpo anti- histona 3 (17 kDa

flecha verde). En la fracción de citoplasma se observó la banda que corresponde a GAPDH (37 kDa flecha naranja) (Anexo 2). A partir de las fracciones enriquecidas se seleccionó la fracción membranal para el análisis proteómico pues permite el análisis de las proteínas claves en la secreción de la proteína recombinante.

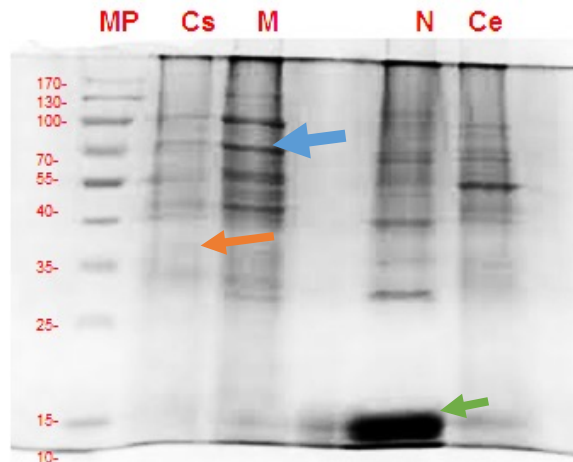


Figura 16. Geles SDS-PAGE al 12% del fraccionamiento células MP: marcador de peso molecular, Cs: citosol, M: membranas, N: núcleo y Ce: citoesqueleto. Flecha azul banda corresponde a GRP78 (78 kDa), Flecha verde banda de histona 3 (17 kDa) y flecha naranja banda de GAPDH (37 kDa)

Separación e identificación de proteínas de la fracción membranal con expresión diferencial

Se obtuvieron 348 manchas detectables, las manchas se isoelectroenfocaron por su punto isoeléctrico en un intervalo de pH entre 4.5 – 9, para ambas condiciones de cultivo. Al analizar los 12 geles obtenidos (6 para 30°C y 6 para 37°C), usando el estadístico t – Student, se determinó que 43 manchas presentaron expresión diferencial con un $p < 0.05$, 7 manchas tenían un cambio mayor a 2.0 veces (Anexo 7).

Posteriormente, mediante espectrometría de masas y usando la estrategia de huella digital, se identificaron las 43 proteínas expresadas diferencialmente (Tabla 9). De las proteínas analizadas se encontró la sobreexpresión de la proteína endógena DHFR en 1.90 veces, lo que puede indicar un aumento en la expresión del tPA y hacen sentido con los datos transcriptómicos. Éstos resultados correlacionan con estudios proteómicos de células CHO altamente productoras donde se ha observado la sobre expresión de la ciclofilina a, b, MapK1y DHFR con fenotipos altamente productivos (Sanny, 2006; Lwa et al., 2010; Clarke et al., 2011) . La proteína peptidil-prolil cis- trans isomerasa A (ciclofilina A)

presentó una expresión diferencial de 5.36 veces comparadas con el control, mientras que su gen codificante presentó una represión de -1,71 veces a las 48 horas. Esta proteína está asociada con el plegamiento y tráfico de proteínas. Estudios sugieren que es una chaperona citosólica (Nigro et al., 2013) y puede ser secretada por la células en respuesta al estrés (Slade et al., 2012), lo cual explicaría su presencia en la fracción membranal. También se ha asociado como un regulador de la apoptosis (Sevrioukova, 2011). La ciclofilina b fue sobreexpresada en 14.21 veces, esta proteína se secreta al medio cuando ocurren alteraciones a nivel mitocondrial, estrés en el retículo endoplasmático (Wilmes et al., 2013) y también se ha asociado el plegamiento de proteínas en el ER (Shaffer et al., 2004).

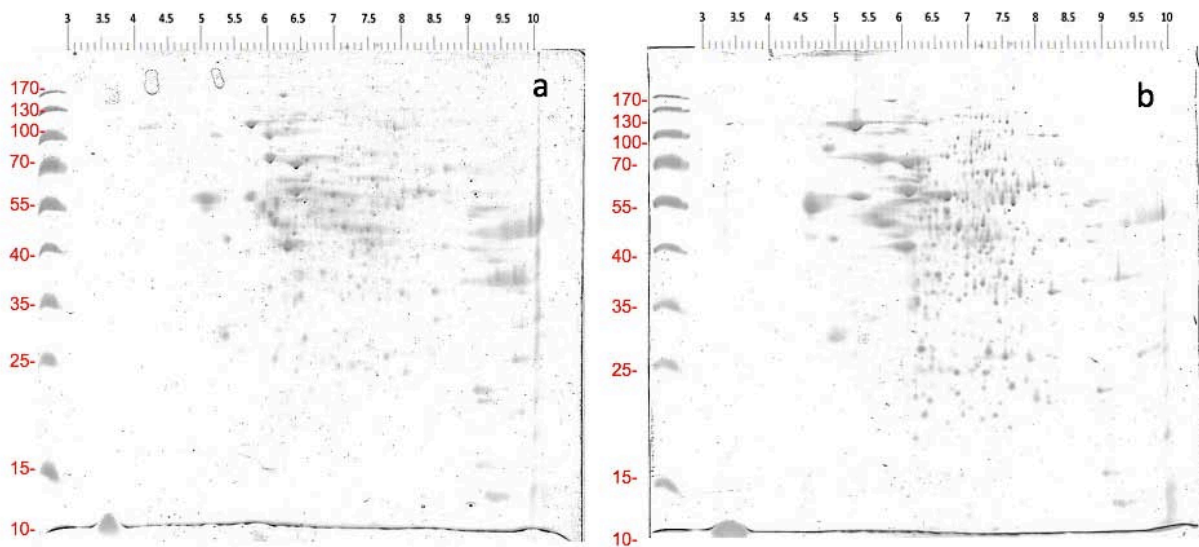


Figura 17. Geles 2D SDS-PAGE al 12% de la fracción membranal a. Gel maestro a 30°C y b. Gel maestro a 37°C.

Muchas de las proteínas sobreexpresadas a causa del cambio de temperatura son chaperonas como Serpin H1(4.4 veces) HSPA5 (2 veces), calreticulina (1.3 veces), DnaJ (1.14 veces), Hsp70 (1.12 veces), Hsp71 (1.13 veces) y Hsp (1.01 veces). Estos resultados indican un mejoramiento en el procesamiento de proteínas, lo que está ligado al aumento en la producción de tPA. Se ha reportado datos similares de estudios proteómicos en células CHO con fenotipos altamente productores (Nissom et al., 2006; Sanny, 2006; Clarke et al., 2011; Meleady et al., 2011; Wingens et al., 2015). Por otro lado, se observaron proteínas relacionadas con el metabolismo energético de las células, lo que es acorde con los resultados transcriptómicos, como las proteínas isocitrato tioreductasa, fumarato hidratasa, gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y carnitina o palmitoil transferasa, todas estas asociadas a la oxidación de ácidos grasos (Johnson et al., 2009; Zolkipli et al., 2011) y el metabolismo energético.

En cuanto al Golgi, se observó la sobreexpresión de la proteína RAB 6A que juega un papel importante en la reorganización de las vesículas en el Golgi (Søgaard et al., 1994; Zerial & McBride, 2001; Dunst et al., 2015; Liu & Storrie, 2015). De las proteínas reprimidas, destacan el EEF1D (-5.0 veces), la proteína de regulación hipoxia (-5.3 veces), TUFM (-5.0 veces) y la proteína GNB1, todas estas proteínas asociadas con factores involucrados en la elongación.

Al analizar la literatura, en especial trabajos en los cuales se ha estudiado la respuesta de las células CHO a la hipotermia moderada, por DIGE- 2D, Kumar et al., (2008) encontró a la proteína vimentina sobreexpresada. En el presente trabajo se observó la sobreexpresión de esta misma proteína en 2 veces a las 48 h, La vimentina es un filamento intermedio (IF) del citoesqueleto ubicuo (Steinert & Roop, 1988), la que se le han atribuido procesos migratorios (Gilles et al., 1999; Ackland et al., 2003). Sin embargo, la coincidencia de sobreexpresión durante la hipotermia moderada en varios estudios sugiere su participación durante la respuesta, la cual aún no se ha definido (Tabla 8).

Tabla 8. Genes diferencialmente expresados en hipotermia moderada encontrados en la literatura y comparados con los obtenidos en el presente trabajo

Gen	Descripción	Yee et al., 2009 Microarray reglos	Baik et al., 2006 2D-Page	Kumar et al., 2008 DIGE	72 h Este trabajo Illumina	96 h Este trabajo Illumina	96 h Este trabajo RT-PCR
Ldha	Lactate dehydrogenase 1, A chain	-1.50			2.06	3.15	
Eif4a2	Eukaryotic translation initiation factor 4A2	-1.40			-3.49	-3.29	
Rpl10	Ribosomal protein L10a	-1.70				2.35	
Rpl23a	Ribosomal protein L23a	-1.60				-2.02	
Rpl5	Ribosomal protein L5	- 1.50				3.16	
Rpl8	Ribosomal protein L8	- 1.50				2.074	
Rps9	Ribosomal protein S9	- 1.10				2.32	
Rbm3	RNA binding motif 3	2.10			5.80	13.54	14.04 ±0.5
Vamp4	Vesicle associated membrane protein 4	1.50				-2.84	
Vim	Vimentin	1.60	5.70	2.05		2.37	2.32±0.01

Tabla 9. Proteínas de la fracción membranal diferencialmente expresadas en condiciones de hipotermia moderada a las 48 horas después del cambio de temperatura .MEM: membrana, C: citosol, V: vesículas, N: núcleo, RE: retículo endoplasmático, G: Golgi, L: lisosoma, M: mitocondria.

Nu m. Man cha	Acceso UniProt KB/Swis s-Prot	Descripción	Peso molec ular	Cambio a 48h	Estadísti co	Local izació n	Gen	Transcript ómica	
								Cambio a 48h	q
101	P62258	14-3-3 protein epsilon	29.80	3.23	1.58E-47	MEM/ C/V	YWHAE	-1.59	0.76
601	Q8K3H7	Calreticulin	54.10	1.30	1.26E-53	RE	CalR	1.61	0.77
811	Q60432	Hypoxia up-regulated protein 1	80.81	1.20	3.15E-17	RE	HYOU1	-1.40	0.72
1101	P63101	14-3-3 protein zeta/delta	27.82	8.90	3.97E-16	C/N	Ywhaz	-1.65	0.77
1103	Q4R4H7	Annexin A5	32.02	1.12	3.97E-30	C	ANXA5	1.19	0.57
1201	Q8BH97	Reticulocalbin-3	34.47	1.08	3.97E-18	RE	Rcn3	3.47	0.96
1202	P53787	Elongation factor 1-delta	35.02	-5.00	9.98E-08	RE	EEF1D	2.14	0.93
1206	Q7ZU99	Transitional endoplasmic reticulum ATPase		1.06	5.00E-13	C/N	vcp	-1.02	0.26
1301	Q90593	78 kDa glucose-regulated protein	37.66	1.07	2.51E-48	RE	HSPA5	-1.09	0.40
1803	Q90593	78 kDa glucose-regulated protein	86.33	1.04	5.00E-73	RE	HSPA5		
1906	G31973	Hypoxia up-regulated protein 1	130.06	-5.30	5.00E-15				
2004	P20340	Ras-related protein Rab-6A	23.09	5.71	1.99E-34	G	RAB6A	-1.98	0.79
2103	P67778	Prohibitin	28.30	1.54	5.00E-122	M	Phb	1.32	0.67
2201	Q9D6R2	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	34.38	1.03	2.51E-58	M	ldh3a	-1.06	0.34
2203	P62871	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 OS	33.07	-1.60	1.58E-12	L	GNB1	1.20	0.58
2303	Q9D6R2	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	37.16	1.07	3.15E-43	M	ldh3a		
2801	P06761	78 kDa glucose-regulated protein	103.51	2.00	6.29E-75	RE	HSPA5		
3002	P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	24.33	1.05	1.58E-10	M	PRDX3	-1.43	0.72
3103	Q0MQG7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	27.46	1.23	6.29E-27	M	NDUFS3	1.02	0.25
3201	P05388	60S acidic ribosomal protein P0	35.21	1.22	1.99E-14	C, N	RPLP0	2.56	0.94
3202	Q9UBS4	DnaJ homolog subfamily B member 11	35.01	1.14	3.97E-18	RE	DNAJB11	1.04	0.31
3204	Q61LA8	ADP-ribosylation factor 1-like 2	17.01	1.03	7.92E-44				
3303	Q93092	Transaldolase	37.00	1.02	9.98E-27	exoso ma/ C	Taldo1	-1.11	0.37
3304	P39749	Flap endonuclease 1	40.02	2.99	1.26E-07	N/M	Fen1	1.20	0.59
4003	Q8VHV7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	24.20	1.04	3.15E-24	N	Hnrnp1	-1.50	0.75
4203	P07150	Annexin A1	35.76	2.77	6.29E-29	N	Anxa1	-1.14	0.50
4303	P63086	Mitogen-activated protein kinase 1	38.18	1.96	6.29E-21	N/ C	Mapk1	-2.12	0.92
4408	P49410	Elongation factor Tu, mitochondrial	42.41	-5.00	1.99E-71	M	TUFM	1.57	0.76

5002	B1LBU1	Adenine phosphoribosyltransferase	21.27	18.87	5.00E+00	C	apt		
5502	Q68FR6	Elongation factor 1-gamma	52.17	1.05	3.15E-58	RE	Eef1g	1.62	0.77
5503	P26443	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	46.26	1.45	5.00E-41	M	Glud1		
6001	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	24.13	-1.88	7.92E-26	N	HNRNP A3	-1.40	0.72
6105	G3IDD4	Serpin H1	24.67	4.40	5.00E-15				
6203	P45376	Aldose reductase	35.84	1.05	3.97E-06	C	Akr1b1	1.01	0.25
6601	P14618	Pyruvate kinase PKM	56.98	1.02	5.00E-40		PKM	1.84	0.78
6602	P24270	Catalase	56.11	1.01	1.26E-19	P	Cat	-1.65	0.77
6606	P14618	Pyruvate kinase PKM	55.39	2.19	6.29E-43	C/V/N/ M	PKM		
6804	P18886	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	80.11	1.51	5.00E-06	M	Cpt2	1.19	0.57
7203	P07356	Annexin A2	34.77	-4.80	9.98E-67	MEM	Anxa2	1.88	0.79
7205	P51640	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	34.88	1.12	5.00E-10	C	GAPDH	1.80	0.79
7405	P14408	Fumarate hydratase, mitochondrial	44.63	1.45	1.58E-28	M	Fh	1.05	0.34
7602	P17244	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	59.16	1.46	5.00E-35	C	GAPDH		
8001	G3HIQ1	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase A	12.53	5.36	5.00E-15		Ppia	-1.71	0.77
8002	P00375	Dihydrofolate reductase	21.47	1.90	1.58E-32	C	Dhfr	-1.09	0.40
8003	G3H533	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase B	15.83	14.21	5.00E-15		Ppib	-1.30	0.66
8203	P04636	Malate dehydrogenase, mitochondrial	35.17	-1.92	6.29E-18	M	Mdh2	1.39	0.71
8206	G3IJG4	Malate dehydrogenase, mitochondrial	37.24	-4.00	5.00E-35		Mhd2	1.29	0.66
8503	P19324	Serpin H1	46.35	1.05	9.98E-52	RE	Serpinh 1	1.20	0.58
1	F1M953	Stress-70 protein, mitochondrial	74.24	1.12	5.00E-35		Hspa9		
2	MOR8M9	Heat shock cognate 71 kDa protein	72.34	1.13	5.00E-75		Hspa8	-1.64	0.77
3	G3HL13	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	73.65	1.01	5.00E-15		Hspd1	-1.70	0.78

CONCLUSIONES

- La hipotermia moderada tiene efecto sobre el crecimiento de las células CHO TF70R alargando el tiempo de cultivo y la viabilidad celular hasta en 6 días, consumen 11% menos glucosa y producen 19% menos lactato con respecto a los cultivos control a 37°C. Además, mejoró la producción de rtPA 2.2 veces con respecto al control, y la productividad específica en 1.6 veces.
- Se comprobó la sobre-expresión de los genes que codifican para las proteínas RBM3 y CIRP, con respecto al control, en respuesta al cambio de temperatura.
- La hipotermia moderada no provocó el aumento en la expresión de genes codificantes para el rtPA y DHFR como se había reportado, sugiriendo otros mecanismos involucrados en la mejora de la productividad, como por ejemplo los cambios observados en la vía de secreción (RE-Golgi), como la falta de control de calidad en RE o la disminución de la degradación de proteína.
- Los resultados transcriptómicos y proteómicos muestran un aumento en las chaperonas presentes en el RE, membrana y vesículas, que podrían hacer más eficiente el procesamiento de proteínas a través de la vía de secreción y por ende explica el aumento en la cantidad de proteína recombinante tPA expresada.
- El metabolismo energético de las células presenta cambios a nivel transcriptómico y proteómico, que indican una mejora en la biosíntesis de ATP, NADH y el metabolismo de lípidos.
- El análisis proteómico mostró que después de 48 h del cambio de temperatura hay cambios en la distribución de patrones de proteína tanto para el secretoma como para el proteoma. Al hacer la inmunodetección hay evidencias de diferencias en las isoformas del rtPA que podrían relacionarse con cambios en la glicosilación.

- La comparación e integración de datos transcriptómicos, proteómicos y de cultivo bajo condiciones de hipotermia moderada, señalan la modulación de la respuesta celular para sobrevivir al estímulo, que desencadena cambios en las cascadas de señalización, arresto del ciclo celular, disminución de la muerte celular, mejora del metabolismo energético y del aumento del procesamiento y secreción de proteínas vía RE y Golgi que llevan al incremento en la producción de la proteína recombinante.

PERSPECTIVAS

- Los resultados aquí analizados permiten la comprensión de la respuesta celular y detallan la expresión diferencial de genes y proteínas, conocimiento que puede ser aplicado para realizar ingeniería genética y mejorar los bioprocesos para optimizar la calidad y la productividad de proteínas biofarmacéuticas.
- A futuro sería interesante estudiar a fondo el perfil proteómico de los organelos por separado, usando técnicas que permitan evaluar una mayor cantidad de proteínas recombinantes para describir con mayor precisión los cambios ocurridos en la vía de secreción clásica.
- Se propone continuar con el estudio del proteoma diferencial de las fracciones enriquecidas que no se evaluaron en el presente estudio, de citoesqueleto, núcleo y citosol.
- Continuar con el presente trabajo evaluando los patrones de glicosilación del tPA por efecto de la temperatura y observar los cambios que se generan en el glicosecretoma de las células por efecto de la temperatura.
- También sería interesante evaluar el silenciamiento o sobreexpresión de genes relacionados con la translocación de transcritos como Sec61 y de algunas chaperonas sobreexpresadas que puedan mejorar la producción de PR por esta línea celular y de otras líneas.

ANEXOS

Anexo 1. Genes diferencialmente expresados

Genes diferencialmente expresados a las 24 y 48 horas después del cambio de temperatura, entre la muestra a 30°C y la muestra control a 37°C.

	24/48h	24/72h	Nombre	Acceso GeneBank	q 24/48 h	q 24/72 h
Ciclo celular	3.26	9.15	Cdkn1a,Cip1,Waf1	EGW12095	0.91	1.00
	-2.16	-7.49	Atm	EGW14189	0.69	1.00
	-2.68	-5.75	Brca2,Fancd1	EGV98879	0.75	0.99
		-5.28	N4bp2	EGW09169		0.99
		4.53	Sac3d1	EGW12257		0.98
	-2.22	-4.34	Cenpf	EGV92559	0.79	0.98
		-3.99	Pcm1	EGV99922		0.98
	-2.15	-4.04	Haus3	EGW11038	0.65	0.98
		5.42	Rprm	EGW13478		0.98
		-4.37	Mll5	EGV97016		0.98
		-4.49	Lrrcc1	EGV93499		0.98
		-4.29	Fign	EGW05697		0.96
	-2.12	-3.71	Pds5b,Aprin,As3,Kiaa0979	EGV98876	0.79	0.96
	-3.31	-3.97	Erc61	EGW14035	0.86	0.96
	3.38	3.77	Psrl	EGW10029	0.89	0.96
	-2.41	-3.56	Fignl1,S30	EGW07731	0.68	0.96
	-2.41	-3.35	Hells,Lsh,Passg	EGV98688	0.81	0.96
	-3.29	-3.53	Cep128	EGW05822	0.77	0.96
		-3.29	Mycbp2,Kiaa0916,Pam	EGW02134		0.96
		3.24	Cdkn2a	EGV95216		0.95
	-2.99	Stil	EGV94551		0.95	
	3.13	Pelo	EGV92177		0.95	
	3.07	Gadd45gip1	EGW00619		0.95	
	-3.41	Taf1	EGW15071		0.95	
-3.65	-3.35	Gas2,Gas-2	EGV94150	0.73	0.95	
	3.00	E4f1	EGW09739		0.95	
	2.18	E4f1	EGW09739		0.95	

		-3.49	Mitd1	EGW10903	0.95	
		-3.36	Sass6	EGW02968	0.95	
		3.85	Fbx115	EGV98257	0.95	
	-2.60		Clspn	EGW01090	0.82	
	-2.28		Rtel1	EGW11083	0.82	
	2.28		Anxa1,Anx1	EGW02515	0.85	
	3.38		Psrc1,Dda3	EGW10029	0.89	
	2.80		Ccng1,Ccng	EGV97646	0.84	
	-2.63		Banp,Smar1	EGV94090	0.83	
	-2.26		Cdc25b,Cdc25m2	EGV92415	0.82	
	-4.72	-6.02	Gen1	EGW02732	0.59	0.99
	-4.72	-3.69	Gen1	EGW02732	0.59	0.99
	-3.40	-4.19	Bard1	EGW07526	0.76	0.98
	-2.74	-4.03	Fancm,Kiaa1596	EGV96874	0.74	0.98
		-3.88	Ino80d	EGW02355		0.95
	-3.27	-3.54	Mms22l,C6orf167	EGW02936	0.68	0.95
		-3.25	Poli,Rad30b	EGW01126		0.95
		-3.09	Setx	EGW12320		0.95
	-2.42		Tonsl,Ikbr,Nfkbil2	EGV92699	0.82	
	-2.15		Wrnip1,Whip	EGV99238	0.81	
Unión a cromatina		-4.81	Esco2	EGW05781		0.98
	-1.94	-3.81	Stag1	EGV96702		0.96
		-3.39	Chd2	EGV94692		0.96
		-3.03	Esco1	EGW07573		0.95
		-3.06	Rbl2	EGV92006		0.95
		-3.01	Chd9,Kiaa0308,Pric320	EGV92004		0.95
Cromosomas	-2.60	-4.72	Mphosph9	EGW14952	0.77	0.98
		-4.12	Cep350	EGW10151		0.98
	-2.17	-3.89	Smc4,Capc,Smc4l1	EGW14560	0.81	0.96
		-4.62	Kiaa0586	EGW13522		0.96
	-1.83	-3.41	Smc6,Kiaa4103,Smc6l1	EGW02731	0.65	0.96
		-3.34	Kiaa1731	EGV97879		0.96
	-2.23	-3.36	Sgol2	EGV92175	0.80	0.96
	-2.61	-3.41	Blm	EGW13408	0.76	0.96
		-3.22	Smc3,Bam,Bmh,Cspg6,Smc3l1	EGW10414		0.96
	-2.07	-3.23	Mki67	EGW11758	0.82	0.96
		-3.27	Cep70	EGV98744		0.95
	-2.45	-3.12	Sgol1,Sgo1	EGV96424	0.72	0.95
-2.24	-3.17	Cenpk	EGW03513	0.61	0.95	

Núcleo		16.00	Hist2h2aa1,Hist2h2aa2	EGV94775		1.00
		11.62	Hist2h2aa1,Hist2h2aa2	EGV94775		1.00
		41.25	H2afj	EGV96660		1.00
		6.96	EGV94774	EGV94774		0.99
		-5.00	Brip1,Bach1,Fancj	EGV98907		0.99
		4.37	H2afx,H2ax	EGV99105		0.98
	2.01	4.06	Ankrd23	EGW06453	0.61	0.97
		4.24	EGV94288	EGV94288		0.97
		4.54	Hist2h2bf	EGV94771		0.97
		3.73	Fam129b	EGW07686		0.96
		-3.95	Mll3	EGV91769		0.96
		-3.79	Pms1,Pms11	EGW06544		0.96
		-3.66	Cdc27	EGV96757		0.96
		-3.75	Cdc27	EGW11571		0.96
		3.47	H1f0,H1fv	EGW02232		0.96
	1.73	3.41	Tgas113e22.1	EGW02037	0.63	0.96
	1.73	3.31	Tgas113e22.1	EGW02037	0.63	0.96
	-2.92	-3.36	Whsc1,Kiaa1090,Nsd2	EGW00396	0.89	0.96
		-2.04	Mll2,Alr,Kmt2b	EGW10393		0.95
		-3.23	Jmjd1c	EGW00908		0.95
	2.55	2.98	Tmem43	EGV97713	0.86	0.95
		-3.41	S100pbp	EGW00101		0.95
	-2.18	-3.03	Ints6	EGW10363	0.74	0.95
	-3.31	3.21	Ercc1,Ercc-1	EGW05346		0.95
		-3.16	Arid4b,Sap180	EGV95692		0.95
		-3.26	Rragb	EGW13363		0.95
		-3.29	Msl1	EGW13030		0.95
	-2.64		Brpf3,Kiaa1286	EGW03613	0.86	
	-3.08		Ankle1,Ankrd41,Lem3	EGV97491	0.85	
	-2.29		EGV92912	EGV92912	0.82	
-2.07		Parp1,Adprt	EGW11182	0.82		
-2.20		Wdr82,Cdw5	EGW05670	0.80		
2.14		Tspyl2,Cinap,Dentt,Dxbwg1396e,Tspx	EGW12451	0.82		
Replicación		-4.69	Rev3l,Polz,Sez4	EGW10119		0.98
		-3.66	Rmi1	EGW07101		0.96
	-3.18	-3.88	Polq,Polh	EGV92665	0.82	0.96
	-2.61	-2.36	Blm	EGW13408	0.76	0.96
	-2.42		Pold1	EGW13445	0.85	
	-2.47		Mcm5,Cdc46,Mcnd5	EGW03570	0.87	
	-2.42		Mcm3,Mcnd,Mcnd3	EGW10037	0.86	
2.33		Obfc1,Stn1	EGW08413	0.83		

21.65	19.20	Rasl11a	EGV93376	0.94	1.00
2.42	9.74	Sertad1	EGW06411	0.77	1.00
-2.42	-7.18	Znf292,Kiaa0530	EGW05057	0.69	0.99
4.23	9.30	Btg2	EGW02253	0.73	0.99
2.26	6.55	Foxs1,Fkh3,Fkhl18,Freac10	EGW00291	0.83	0.99
	-8.27	Znf483,Kiaa1962,Zkscan16	EGW11192		0.99
	-6.17	Znf595	EGW02064		0.99
	7.48	Fos	EGW02797		0.99
	14.13	Id3	EGW04769		0.99
	-7.23	Rel	EGW11604		0.99
	6.59	Cebpd,Celf	EGW06574		0.99
	9.74	Egr2,Egr-2,Krox-20,Krox20	EGV91557		0.99
	-5.07	Mga,Kiaa4252	EGV97255		0.99
	5.39	Tceb2	EGW13825		0.98
	3.48	Tceb2	EGW13825		0.98
	2.90	Tceb2	EGW13825		0.98
	-5.83	Rcor1,D12wsu95e,Kiaa0071	EGV94872		0.98
	4.85	Ccdc85b	EGV99361		0.98
3.98	8.58	Ankrd1	EGW00744	0.70	0.98
	-2.15	Znf208,Znf911	EGW02063		0.98
	4.11	Fosl1,Fra1	EGV99360		0.98
-1.97	-4.33	Bdp1,Kiaa1241,Tfmr	EGW04154	0.63	0.98
	-4.96	Rc3h2,Mnab,Rnf164	EGW04601		0.98
	-4.37	Znf518a,Zfp518,Znf518	EGV99258		0.98
	-6.39	Znf827,Zfp827	EGW00223		0.98
-2.80	-4.07	Phtf1	EGW08739	0.82	0.98
	-2.43	Thoc2	EGW11919		0.98
	-2.78	Thoc2	EGW11919		0.98
	-4.08	Thoc2	EGW11919		0.98
	-2.77	Sp3	EGV95684		0.98
	-4.46	Sp3	EGV95684		0.98
	-4.01	Znf160,Kiaa1611	EGW13760		0.98
	-2.21	Znf638,Np220,Zfml	EGW12480		0.98
	-4.46	Znf638,Np220,Zfml	EGW12480		0.98
	-4.22	Znf182,Znf21	EGV92942		0.98
	6.50	Egr3,Egr-3	EGV91970		0.98
	-4.11	Zbtb10,Rinzf	EGW09915		0.97
	31.00	Tbx4	EGV94939		0.97
	4.84	Ascl2,Bhlha45,Hash2	EGW08475		0.97
	4.87	Maff	EGW06784		0.97
	-4.89	Znf329,Zfp329	EGW09797		0.96
	13.00	Cux2,Cutl2	EGW07437		0.96

-1.74	-3.82	Bbx,Hbp2	EGV96821	0.60	0.96
	-3.76	Npat	EGW14188		0.96
	3.90	Med29,Ixl	EGV93043		0.96
-2.10	-3.64	Rbl1	EGV97973	0.75	0.96
	-3.56	Csde1,D3jfr1	EGW00037		0.96
	-5.19	Hnf4a,Hnf4,Nr2a1,Tcf14	EGW09397		0.96
	-3.74	Nr3c1,Grl	EGW10246		0.96
	3.85	Supt4h1,Qtsa-10763	EGV96618		0.96
	-3.66	Zfp60,Mfg3	EGW06402		0.96
	3.39	Myc	EGW14653		0.96
	-3.37	Nfat5,Kiaa0827,Tonebp	EGW04760		0.96
	-3.58	Zfp120	EGW14883		0.96
	-6.41	Zfp120	EGW14883		0.96
	-4.92	Zfp120	EGW14883		0.96
	-3.12	Zfp120	EGW14883		0.96
	3.43	Ptrf	EGW08042		0.96
	-3.47	Mier1	EGV99055		0.96
	3.38	Apba3,Mint3	EGW03128		0.96
	3.22	Egr1,Egr-1,Krox-24	EGW06690		0.96
	3.01	Aes	EGW03108		0.95
-1.74	-3.04	Gnptab,Gnpta,Kiaa1208	EGV93312	0.61	0.95
	3.22	Psmid9	EGW07471		0.95
	-3.05	Aff4	EGW03017		0.95
-1.91	-3.18	Ncoa3,Aib1,Pcip,Rac3,Tram1	EGV97663	0.64	0.95
2.26	3.34	Bhlhe40,Bhlhb2,Clast5,Stra13	EGV92035	0.81	0.95
-2.49	-3.35	Znf180	EGW14754	0.69	0.95
-3.11	-3.52	Ahi1	EGV96104	0.71	0.95
-1.83	-3.10	Tbl1xr1	EGW10254	0.61	0.95
	-2.99	Wrn	EGV98431		0.95
-2.79	-3.20	Gtf2i	EGV96864	0.82	0.95
	3.11	Hmga1	EGW01700		0.95
	-3.56	Znf791	EGV96159		0.95
	-3.29	Cnot6	EGW02876		0.95
	3.01	Znf593,Zfp593	EGW10195		0.95
	-3.57	Vgll3	EGW00233		0.95
	-3.26	Znf280c,Kiaa1584,Suhw3,Zfp280c	EGW03595		0.95
	-3.39	Mier3,Qtsa-14674,Qtsa-16550	EGV96933		0.95
-2.15	-3.29	Znf770,Zfp770	EGV92902	0.63	0.95
2.07	3.49	Gata2	EGW09469	0.73	0.95
2.49	3.29	Znf385a,Hzf,Rzf,Znf385	EGW09966	0.79	0.95
	-3.05	Lrif1	EGW03533		0.95
	-3.32	Arid4a,Rbbp1,Rbp1	EGW06494		0.95
	-3.96	Foxi3	EGW13915		0.95

		-3.56	Ddx20,Dp103,Gemin3	EGW10738	0.95		
		-3.75	Mybl1,Amyb	EGW04194	0.95		
		3.12	Cbx4,Pc2	EGW08244	0.95		
		-2.99	Kat2b,Pcaf	EGV96425	0.95		
		-3.03	Znf175	EGW12542	0.95		
		-3.08	Znf43,Kox27,Znf39,Znf3911	EGV93056	0.95		
		-3.26	Znf426,Zfp426	EGV96226	0.95		
		3.31	Snai1,Sna	EGW05514	0.95		
	-2.49		Timeless	EGW12497	0.85		
Diferenciación		6.67	Ccdc135	EGW12725	0.89	1.00	
			Gm16517	EGV99459		0.99	
			6.11	Ttc3,Derr1,Rnf105,Tprd	EGW12577	0.91	0.98
		-2.99	-4.54	Ubn1	EGW05579	0.59	0.98
		-1.73	-4.06	Nbl1	EGV96847		0.98
			4.21	Ift80	EGW14558		0.98
			-4.39	Krt80	EGW13664		0.98
			-5.23	Lgals1	EGV94322		0.96
			3.93	Sbsn	EGW03711		0.96
			3.96	Tdrkh	EGW10750		0.96
			-6.07	Strbp,Spnr	EGW04607		0.96
			-3.53	Rod1	EGW00664	0.61	0.96
		-1.86	-3.54	Tanc2	EGV96769		0.95
			-3.15	Lkap	EGV92997		0.95
			-3.15	Klf4,Ezf,Gklf,Zie	EGV91809		0.95
		3.08	Dzip1,Kiaa0996	EGV94434	0.88		
	3.86						
Proliferación			Pthlh,Pthrp	EGW08966		0.98	
			Kiaa1524	EGV96784		0.98	
			5.74	Csf2,Csfgm	EGW08817		0.96
			-4.05	Mll,All1,Hrx,Mll1	EGW05718		0.96
			8.20	Tsc1	EGW02657		0.95
		-3.98	Cdca7	EGV95681	0.83		
		-3.23					
	-2.31						
Microtubulos			Map6	EGW15319		0.99	
			Map1s	EGV97464		0.98	
			4.16	Kif14,Kiaa0042	EGW02200	0.83	0.98
		-2.78	-4.09	Kif2a,Kif2	EGV92062		0.96
			-3.55	Dnahc8	EGW02903		0.96
			-3.84	Lmna	EGW07066	0.65	0.96
		1.79	3.22	Kif1c	EGV99747	0.62	0.95
		-1.96	-3.26	Kif20b,Mphosph1	EGW00741	0.83	0.95
		-2.24	-3.13	Centp	EGW13494	0.60	0.95
	-1.69	-3.02					

	-2.52		Kif4,Kif4a,Kns4	EGV92321	0.80
	-3.00		Mybl2,Bmyb	EGW09404	0.91
		-11.81	Dmd	EGW13991	0.99
		-5.83	Dst	EGW14010	0.97
	4.16	3.90	Cdc42ep2,Borg1,Cep2	EGW14746	0.88 0.96
		-3.39	Nckap1	EGV92867	0.96
		-3.32	Fmnl2,Fhod2,Kiaa1902	EGW13987	0.95
	1.80	3.06	Fhl3	EGW00532	0.63 0.95
		-3.00	Vcl	EGV97813	0.95
		-3.04	Wasf1	EGV98856	0.95

S i n t e s i s d e p r o t e í n a s	Ribosoma	9.82	Rpl36	EGW06669	0.99
		6.22	Rpl36	EGW06669	0.99
		4.05	Rpl36	EGW06669	0.99
		12.42	Rpl18a	EGV98345	0.98
		6.77	Rpl18a	EGV98345	0.98
		5.76	Rpl18a	EGV98345	0.98
		2.75	Rpl18a	EGV98345	0.98
		2.38	Rpl18a	EGV98345	0.98
		4.77	Rps10	EGW08573	0.98
		2.59	Rps10	EGW08573	0.98
		4.67	Rps15,Rig	EGW11787	0.98
		3.45	Rps15,Rig	EGW11787	0.98
		4.12	Mrpl36	EGW14938	0.98
		4.35	Mrpl43	EGW13045	0.98
		4.46	Mrp63	EGV92219	0.98
		4.45	Mrpl34	EGV97487	0.98
		6.52	Rps16	EGW13189	0.98
		2.22	Rps16	EGW13189	0.98
		4.78	Plekhg6	EGV98513	0.98
		20.75	Rps18	EGW13313	0.96
		4.26	Rps18	EGW13313	0.96
		3.05	Rps18	EGW13313	0.96
		2.14	Pcbp4	EGW08877	0.82 0.96
			Rps13	EGW01891	0.96
			Rpl28	EGW07502	0.96
			Rplp1,Rrp1	EGW14924	0.96
			Rplp1,Rrp1	EGW14924	0.96
			Rplp1,Rrp1	EGW14924	0.96
	Rplp1,Rrp1	EGW14924	0.96		
	3.15	Eif6,Eif3a,Itgb4bp,Ok/Sw-C1.27	EGW02770	0.95	

		3.40	ErbB3	EGW12520		0.95
	1.79	3.02	Mrpl14	EGW01349	0.61	0.95
		3.32	Rpl12	EGV94795		0.95
		3.18	Rpl12	EGV94795		0.95
		3.46	Rpl32	EGV94768		0.95
		3.22	Rpl19	EGV98458		0.95
		2.45	Rpl19	EGV98458		0.95
		2.42	Rpl19	EGV98458		0.95
		2.23	Rpl19	EGV98458		0.95
		2.01	Rpl19	EGV98458		0.95
		-3.12	Mrpl15	EGW09774		0.95
	1.69	3.02	Fth1,Fth	EGV98455	0.62	0.95
		-3.16	Exosc9	EGW01325		0.95
Traducción		-2.24	Larp4b	EGV95107	0.78	1.00
			Mrps18a	EGW14044		0.98
			Eif2c3,Ago3	EGW01096		0.96
			EGV93609	EGV93609		0.96
		-2.24	Ddx50	EGV93790	0.83	0.96
			Rps8	EGV98707		0.96
			Tnks,Parp5a,Parp1,Tin1,Tinf1,Tnks 1	EGV98450		0.96
		-2.44	Eif5	EGV94879	0.80	0.96
		-3.49	Eif4a2	EGW01984	0.92	0.96
		-2.15	Dhx29	EGV96945	0.76	0.95
		-2.17	Larp4	EGW13334	0.63	0.95
		-2.17	Larp4	EGW13334	0.63	0.95
			Sars2	EGV93032		0.95
	-2.22	Smg5,Est1b,Kiaa1089	EGW09206	0.84		
Procesamiento ARN		5.52	Sf3b5	EGW02527		0.99
		4.49	Imp3	EGW03778		0.98
		4.37	Pop7,Rpp20	EGW06330		0.98
		-2.15	Fmr1	EGW09643	0.71	0.98
			Rngtt,Cap1a	EGV93811		0.98
			Rngtt,Cap1a	EGV93811		0.98
			Ctu1	EGW11580		0.98
			Mrm1	EGV94922		0.97
			Mettl19	EGV91596		0.97
			Rpusd3	EGW06198		0.96
			Prpf31	EGW07369		0.96
		-1.78	Smek2,Kiaa1387,Pp4r3b,Ppp4r3b	EGW07856	0.63	0.96
			Cnot6l	EGW08961		0.96

		3.23	Tbl3	EGW04439		0.95
		-3.24	Prpf39	EGW09175		0.95
		-3.36	Prpf39	EGW09175		0.95
		-3.25	Papolg	EGW01801		0.95
		3.32	Zfp36,Tis11,Tis11a	EGV93044		0.95
		-3.21	Upf2,Kiaa1408,Rent2	EGV95423		0.95
		-3.46	Upf2,Kiaa1408,Rent2	EGV95423		0.95
		-3.30	Utp14b,Jsd	EGW14732		0.95
		3.03	Mex3d,Rkhd1	EGV99510		0.95
		-3.09	Mtpap	EGV95239		0.95
		3.23	Trmu	EGW00758		0.95
		3.89	Adat3	EGV99525		0.95
	-2.40		Srsf6,Sfrs6,Srp55	EGW07715	0.82	
	-2.00		Hnrnpc,Hnrpc	EGW08439	0.80	
RE/Golgi		6.69	Selm	EGW07118		0.99
		4.44	Sulf2	EGV97661		0.98
		-4.18	Gcc2	EGW10288		0.98
	-2.41	-4.39	Acer3,Aphc,Phca	EGW04282	0.62	0.98
		4.54	Porcn	EGW06115		0.98
		-13.75	Cyp4b1,Cyp4b-1	EGV94559		0.98
		4.56	Xylt2	EGW08286		0.97
		-5.25	Fmo5	EGW09227		0.97
		4.81	Fut1	EGW03975		0.96
		6.06	Zfyve1,Dfcp1,Kiaa1589,Taff1,Zfnf2a1,Pp10	EGW01617		0.96
	-1.73	-3.91	Ascc3,Helic1	EGW08159	0.61	0.96
		-3.96	Sacm11	EGW08360		0.96
		-3.93	Slc35a3	EGW02964		0.96
		3.47	Rcn3	EGV99178		0.96
		3.39	Inm02	EGW07333		0.96
		-3.49	Abca5	EGW09269		0.96
		-3.41	Ash11	EGV98072		0.96
	-2.89	-3.87	Fktn	EGV97303	0.70	0.95
		-3.13	Trip11	EGW14619		0.95
		-3.00	Ssr3	EGV93553		0.95
	-1.91	-3.15	Sh3d19	EGW04045	0.62	0.95
		3.07	Rcl	EGW09325		0.95
	3.06	Fv1	EGW07325		0.95	
	-3.90	Fv1	EGW07325		0.95	
	-3.16	Ubxn2a	EGV91882		0.95	
	3.35	Dpm3	EGV98090		0.95	
	3.66	Chst14,D4st1	EGW09319		0.95	

		-3.38	Pigw	EGV94927	0.95
	-2.72	-3.08	Nbea	EGW02378	0.64 0.95
	-2.72	-3.94	Nbea	EGW02379	0.64 0.95
	-2.08	-3.41	Nmt2	EGV95455	0.62 0.95
	-2.08	-3.02	Nmt2	EGV95455	0.62 0.95
		-2.99	Cln5	EGW02135	0.95
	1.70		Calr	EGW00614	0.62
	2.06		Herpud1	EGW00061	0.81
Chaperonas		-3.66	Dnajc13,Kiaa0678,Rme8	EGW05650	0.96
		-3.16	Dnajc10,Erdj5,Jpdi	EGV92871	0.95
	-2.43		Hsph1,Hsp105,Hsp110,Kiaa0201	EGV93342	0.86
	-2.07		Fkbp4,Fkbp52	EGV98481	0.82
	-2.64		Hsc70	EGW10857	0.88
	-2.20		Hspa8,Hsc70	EGW10858	0.87
	-2.06		Hspa8,Hsc70	EGW10858	0.87
	-2.49		Hspa8,Hsc70	EGW10858	0.87
	-2.02		Hspa8,Hsc70,Hsc73	EGW08749	0.81
	-2.01		Hspa8,Hsc70,Hsc73	EGW08749	0.81
	-1.86		Hspa8,Hsc70,Hsc73	EGW08749	0.81
Modificación transcripc		9.47	Fkbp1	EGV95253	1.00
		-3.51	Ate1,Qfla-16011	EGW11696	0.96
		-3.39	Slmap,Kiaa1601,Slap	EGW00679	0.96
		3.29	Fkbp11	EGW10401	0.96
Degradación de proteínas	1.81	4.21	Psmb8	EGW09109	0.64 0.98
		-3.79	Spopl	EGW06666	0.96
	-2.09	-3.51	Casp8ap2	EGV93826	0.63 0.96
		3.03	Psmg4	EGV98213	0.95
		-4.16	Wwp1	EGW03234	0.98
		-4.37	Dtx3l,Bbap	EGV96421	0.98
		-2.58	Dcun1d1	EGV93060	0.97
		-4.86	Dcun1d1	EGW10878	0.97
		-4.09	Pcmd1	EGW04114	0.97
		-3.66	Usp9x,Faf1,Fam	EGV96558	0.96
	-2.44	-3.78	Usp1	EGW01028	0.81 0.96
	-2.44	-4.83	Usp1	EGW01029	0.81 0.96
		-3.92	Dzip3	EGV96785	0.96
	-1.91	-3.51	Nedd4,Kiaa0093,Nedd4-1,Pig53	EGV99884	0.68 0.96
		-3.33	Huwe1,Kiaa0312,Kiaa1578,Ureb1,Hspc272	EGW02329	0.96

	-2.73	-3.33	Usp31,Kiaa1203	EGW13022	0.85	0.96
	-2.27	-3.36	G2e3,Kiaa1333	EGV97534	0.77	0.96
		-3.35	Ube4a	EGW05712		0.96
		-3.30	Hace1,Kiaa1320	EGW13180		0.96
		-3.15	Usp24	EGV91717		0.95
		-3.17	Birc6,Kiaa1289	EGW02704		0.95
		3.18	Mib2,Skd	EGW09937		0.95
		-3.27	Usp37,Kiaa1594	EGW11889		0.95
		-3.04	Cul4b,Kiaa0695	EGW01006		0.95
		-3.08	Ube3a,E6ap,Epve6ap,Hpve6a	EGW13353		0.95
		-3.17	Ptprh,Sap1	EGW15098		0.95
		-3.07	Fbxo30	EGV99968		0.95
	-6.59	-3.45	Mkks,Bbs6	EGV93075	0.80	0.95
		-3.43	Usp12,Ubh1	EGW00513		0.95
	2.26		Mdm2	EGV96011	0.85	
Proteolisis	-4.72	-5.59	Senp7,Kiaa1707,Susp2	EGW00792	0.82	0.99
		7.90	EGV96302	EGV96302		0.97
		8.90	Gzmm	EGV99461		0.96
		-4.85	Agbl3	EGW11837		0.96
		3.85	Mmp9,C1g4b	EGV97682		0.96
		3.58	Ncln	EGW03112		0.96
	-1.85	-3.57	C2cd3	EGW09027	0.61	0.96
	-2.88	-3.42	Ermp1,Fxna	EGW00424	0.87	0.96
		-3.47	Prepl,Kiaa0436	EGW03201		0.96
		-3.25	Mll2,Alr,Kmt2b	EGW10393		0.95
	-1.74	-3.19	Ide	EGW00756	0.61	0.95
		3.03	Furin,Fur,Pcsk3	EGW12796		0.95
		-3.03	Senp6,Kiaa0797,Susp1	EGW01187		0.95
	-2.31	-3.17	Senp5,Smt3ip3	EGV96368	0.76	0.95
		-3.30	Senp1,Supr2	EGW14138		0.95
		-3.06	Pppde1	EGW00807		0.95
		-3.92	Lonrf3,Rnf127	EGV98376		0.95
	-3.05	Phlpp2,Phlpp1	EGW04131		0.95	
	3.22	Adam19,Mltmb	EGW01403		0.95	
	-2.98	Lonrf1,Rnf191	EGV96443		0.95	
	-2.03	Esp1,Esp1,Kiaa0165	EGV95374	0.81		
Lisoso		-6.72	Lyst	EGW00901		0.99
		-3.92	Lmbrd1	EGV92892		0.96
	2.55		Sidt2	EGW10871	0.87	
P e p	2.78	4.10	Col7a1	EGV92133	0.87	0.98

		2.80	4.76	Wfikkn1,Gasp2	EGW04373	0.76	0.98		
		3.35	3.82	Ctla2b	EGW06748	0.91	0.96		
			-3.97	Lnpep	EGV98387		0.96		
			11.33	Rhbd12	EGV92571		0.95		
			-4.45	Pik3c2a,Cpk	EGV92624		0.98		
			4.18	Vps37d	EGW01821		0.97		
		-2.81	-3.59	Eea1	EGW14167	0.79	0.96		
			-3.13	Picalm,Calm,Fit1	EGW05901		0.95		
			3.47	Ccdc115	EGW14005		0.95		
			-3.24	Kiaa1033	EGV93842		0.95		
		2.58		Tmbim1,Recs1,Pp1201,Psec0158	EGW09735	0.86			
T r a n s p o r t e y s e c r e c i ó n d e p r o t e í n a s	Exoci		5.48	S100a6,Cacy	EGV98153		0.99		
			-2.54	-4.70	Mum111	EGW13755	0.66	0.98	
				-4.30	Ptx3	EGV93547		0.96	
				3.53	S100a5,S100d	EGV98152		0.95	
			-3.32		Cpne1,Cpn1	EGW02780	0.90		
	O r g			-6.85	Dync2h1,Dhc1b,Dlp4,Dnch2,Dnchc2	EGV95528		0.99	
				-4.96	Ppp2r5a	EGV96684		0.96	
				-3.31	Hps3	EGW13340		0.95	
				-3.15	Lztfl1	EGW08366		0.95	
	S P			6.04	Olfm2	EGV96221		0.98	
			4.52	R102.4	EGV97886		0.96		
T r a n s p o r t e y s e c r e c i ó n d e p r o t e í n a s	T r a n s p o r t e y s e c r e c i ó n d e p r o t e í n a s		-1.97	-6.04	Vps13a,Chac,Kiaa0986	EGW07549	0.66	0.99	
				8.94	Ier5	EGW10142		0.99	
				4.72	Trappc5	EGW00206		0.98	
				-4.49	Chml	EGW05761		0.98	
				4.14	Arl4c,Arl7	EGW11166		0.98	
				-4.65	Wdr19,Kiaa1638	EGW12074		0.98	
				-4.18	Rhoq,Tc10	EGW14329		0.98	
				5.81	Arl11	EGW04616		0.98	
				4.38	Slc7a6os	EGW10091		0.97	
				3.62	Rap2b	EGW05407		0.96	
				-2.22	-2.99	Ipo7,Ranbp7	EGW10582	0.84	0.95
				-2.69	-3.15	Kpna4,Qip1	EGW02042	0.86	0.95
					-4.52	Kpna6,Ipoa7	EGW08341		0.95
					-3.07	Lrrk2	EGW00676		0.95
			3.22	Rhob,Arhb	EGW08219		0.95		

	-2.80	-3.48	Rab11fip2,Kiaa0941 Kpnb1,Impnb	EGV96719 EGW05268	0.95 0.89	
Transporte	-1.77	-4.98	Ranbp2	EGW10295	0.63	0.99
		10.40	Kenk15	EGV98288		0.98
		4.77	EGW03121	EGW01935		0.98
	1.79	3.58	Slc39a7,H2-Ke4,Hke4	EGW09099		0.96
	2.17	3.45	Ano1	EGW01935	0.65	0.96
	-2.42	-3.06	Slc39a10,Kiaa1265,Zip10	EGV95466	0.76	0.95
Vesículas		4.57	Cno	EGV91610		0.98
		-4.12	Fcho2	EGW04164		0.98
		4.04	C1qtnf5	EGV96912		0.98
		-3.82	Myo6,Kiaa0389	EGW01186		0.96
	2.22		Zfp11	EGW12253	0.81	
Vac		3.97	Atp6v1g2,Atp6g2,Ng38	EGV95297		0.95
		-3.28	Ap1s2,Dc22	EGW05846		0.95
Unión pr	-2.14	-5.46	Trim59,Mrf1	EGW14563	0.59	0.99
	-3.03	-4.10	Bracl	EGW08077	0.90	0.98
		4.83	Hic1	EGW14223		0.98
		-4.01	Zbtb41	EGW10913		0.98
		-3.42	Mid2,Fxy2,Trim1	EGW13074		0.95
		-3.62	Zbtb33,Kaiso	EGW01011		0.95
Citoesqueleto	-2.03	-5.33	Cep290	EGV96278	0.64	0.99
	1.92	5.11	Dusp6,Mkp3	EGV92485	0.62	0.99
	1.79	4.60	Tubb6	EGW00717	0.64	0.98
	1.92	3.47	Tubb6	EGW00717	0.64	0.98
	2.88	4.05	Frmf8	EGW14742	0.89	0.98
	-2.11	-4.12	Ptpn4	EGV99078	0.62	0.98
		-4.91	Sfi1	EGW07104		0.98
		3.81	Baiap2	EGW06229		0.96
		-3.51	Kifap3	EGW10332		0.96
		-3.46	Jak2	EGW11816		0.96
		-3.14	Cntln	EGW03864		0.95
		-3.47	Cntln	EGW03864		0.95
		-4.46	Cntln	EGW03864		0.95
		-2.99	Camsap111	EGW02198		0.95
		3.21	Mzt2	EGW14250		0.95
		3.59	Fam110a	EGW06856		0.95
		3.96	Dusp5,Vh3	EGW12856		0.95

		3.04	Dusp15	EGW00290	0.95		
		-4.90	Pclo	EGW10218	0.95		
M e t a b o l i s m o e n e r g é t i c o	Unión ATP	-5.72	-8.29	Atp11c	EGV96455	0.76	1.00
		-2.75	-4.70	Atad5,Frag1	EGV94362	0.71	0.98
			-4.25	Stard9	EGV97229		0.98
		-2.97	-4.41	Atp7b,Wnd	EGV95005	0.62	0.98
			3.89	Atp5d	EGV99489		0.96
		-2.06	-3.61	Crybg3	EGW10275	0.79	0.96
			-3.67	Slfn12	EGW14914		0.96
			3.28	Atp5i	EGW07978		0.96
			-3.31	Atad2b,Kiaa1240	EGV91883		0.95
		M i t o c h o n d r i a	Mitochondria	7.09		Bola1	EGV94781
4.14				Isoc2a,Isoc2	EGW07506		0.98
3.77				Fxc1,Tim9b,Timm9b	EGW13693		0.96
3.98				Mrpl53	EGW11797		0.96
3.44				Atp5e	EGV91885		0.96
3.77				Dnlz	EGW12770		0.96
3.46				Timm13,Tim13a,Timm13a	EGW01991		0.96
3.00				Timm13,Tim13a,Timm13a	EGW01991		0.96
3.14				Uqcr11,Uqcr	EGV99514		0.95
3.27				Nme3	EGW04425		0.95
N A D H	NADH	4.44		Ndufb7	EGW00659		0.98
		-5.15		Parp8	EGV96795		0.98
		4.23		Cbr3	EGW12588		0.98
		4.59		Cbr2	EGW06280		0.97
		3.10		Ndufs7	EGV99498		0.95
R e d o x	Redox	-5.98		Aox1,Ao,Ro	EGW11977		0.99
		-6.28		Aox1,Ao,Ro	EGW11977		0.99
		-7.12		Aox1	EGV99451		0.99
		-6.06		Pipox,Pso	EGW14985		0.96
		-1.80	-3.82	Plod2	EGW10258	0.62	0.96
		1.84	3.18	Sh3bgrl3,P1725	EGW10190	0.65	0.95
M e t a b o	Biosintesis	6.36		Rsad1	EGW08280		0.99
		1.73	4.05	Aprt	EGV94074	0.63	0.98
			4.45	Hsd3b2	EGW09208		0.97
		2.03	3.42	Pmm1	EGW14817	0.74	0.96
		2.03	2.56	Pmm1	EGW14817	0.74	0.96

li s m o	-2.08	-3.10	Mtr	EGW01906	0.79	0.95
		-3.34	Bco2	EGW03823		0.95
	3.49		Tk1	EGV97892	0.87	
	-2.12		Umps	EGV96405	0.80	
	2.03		Fdft1,Erg9	EGW10357	0.81	
	-2.07		Mthfd2,Nmdmc	EGW09962	0.82	
	-2.19		Nampt,Pbef1	EGW07127	0.80	
	-2.09		Lct,Lph	EGW00948	0.81	
	-2.72		Pfas,Kiaa0361	EGV93868	0.87	
Catalis s		-7.65	Ppm11,Pp2ce	EGW02040		0.98
	2.51	5.66	Spata20	EGW08279	0.61	0.98
	3.27	3.74	Ppcdc,Coac	EGW04011	0.82	0.96
Lípidos		-5.09	Idi1	EGV95102		0.99
	1.83	5.03	Pafah1b3,Pafahg	EGW10452	0.63	0.99
	-2.29	-4.61	Sacs,Kiaa0730	EGW04618	0.78	0.98
		-4.11	Tecta	EGW10638		0.98
		-4.12	Hsd17b7	EGW06167		0.98
		4.14	Gpr39	EGW02382		0.97
		-4.59	Slc27a6,Acsv12,Facv12,Fatp1	EGW06764		0.97
	-2.25	-3.97	Ankrd26	EGW08323	0.73	0.96
	-3.26	-3.97	Prkar2b	EGW04272	0.82	0.96
		-3.28	Ddhd2,Kiaa0725,Samwd1	EGV94663		0.96
		-2.99	Far1,Mlst2	EGW14513		0.95
		-3.47	Etnk1	EGV97870		0.95
		-3.04	Osbp18,Kiaa1451,Orp8,Osbp10	EGV97330		0.95
		-3.11	Acad11	EGW05647		0.95
		3.32	Acaa1b,Acaa1	EGW00823		0.95
		2.24	Acaa1b,Acaa1	EGW00823		0.95
	-5.53	Gpr116,Gprhep	EGW10645		0.95	
	2.24	Pnpla2,Atgl	EGW05549	0.83		
Metabolismo de carbohidratos	19.66	5.65	Ldhc,Ldh-3,Ldh3	EGW00383	0.98	0.99
	1.95	4.86	Dexr	EGW06279	0.64	0.98
		4.01	Amdhd2	EGW09758		0.98
		-4.11	Gbe1	EGW10062		0.98
		6.50	Nudt11,Dipp3b,Mncb-1696	EGW11287		0.98
		3.95	Pgp	EGW04455		0.96
		3.78	Neu2	EGV94738		0.96
		3.58	Galk1,Galk,Glk	EGW04660		0.96
	2.03	3.15	Ldha,Pig19	EGW00382	0.82	0.95
		-3.20	Ppp1cb,Tegg049h05.1	EGV98330		0.95

			-3.11	Ppip5k1,Hisppd2a,Kiaa0377,Vip1	EGV97210		0.95
		2.33		Grina,Nmdara1	EGV92726		0.85
Estres por frío		5.81	13.55	Rbm3,Rnpl	EGW06112		0.96 1.00
		3.32	7.77	Cirbp,Cirp	EGV99492		0.90 1.00
Ra			-3.28	Shoc2	EGW05944		0.95
Cinasas		2.90	6.38	Tk1	EGV97892		0.87 0.99
		2.90	4.56	Tk1	EGV97892		0.87 0.99
			-5.31	Prkdc,Xrcc7	EGW06573		0.99
			-4.36	Mobk1a	EGW00580		0.98
			-3.63	Wnk1	EGW09383		0.96
		-2.14	-3.19	Uhmk1,Kis,Kist	EGW06173	0.70	0.95
		-2.07		Wnk2,Kiaa1760	EGV99811	0.82	
Metilación			3.15	Comtd1	EGV97825		0.95
P53			4.31	Mif	EGW12157		0.98
		-1.74	-3.11	Ptges3	EGW12489	0.62	0.95
MAPK			-7.48	Itgal	EGV92178		0.99
			3.93	Gadd45b	EGW03148		0.96
			3.27	Mpg,Mid1	EGW10378		0.95
ROX			3.05	Romo1	EGW02783		0.95
Señalización		-2.27	-7.25	Rock1	EGV91660	0.72	1.00
		-2.68	-6.66	Arhgap5,Rhogap5	EGW12688	0.87	0.99
			7.07	Spry2	EGV97540		0.99
		2.22	5.97	Cxcr7,Cmkor1,Rdc1	EGW14644	0.79	0.99
		-2.82	-6.29	Cnksr2	EGV98780	0.60	0.99
		-2.82	-3.65	Cnksr2	EGV98780	0.60	0.99
		-2.46	-5.20	Myo9a,Myr7	EGW04529	0.81	0.99
			12.77	Ngf,Ngfb	EGW00029		0.99
			-5.02	Rpe65	EGV93975		0.99

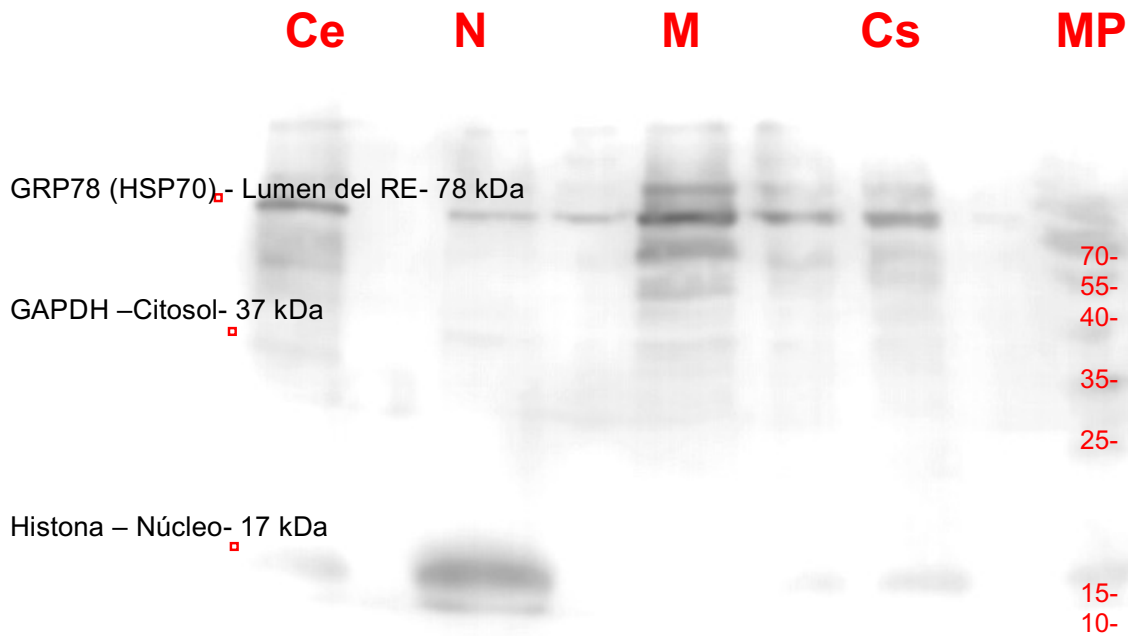
R
e
s
p
i
e
s
t
a
l
e
s
t
r
e
s

-2.08	-4.80	Ralgapa1,Garnl1,Kiaa0884,Tulip1	EGW11724	0.79	0.98
-2.48	-5.26	Ppm1e,Camkn,Kiaa1072	EGV96623	0.60	0.98
-2.13	-4.67	Tbc1d8b	EGW07632	0.69	0.98
-1.91	-4.27	Dennd4a	EGW10969	0.63	0.98
	-4.37	Ccdc88a	EGW07854		0.98
	-4.36	Akap11	EGW09123		0.98
	-5.81	Fam13b,Fam13b1	EGW06699		0.98
	-4.51	Tbck	EGW11325		0.98
2.51	4.37	I11r11	EGV92291	0.70	0.98
	-5.35	Dennd5b	EGW10829		0.98
	4.33	Or5ak2	EGW01526		0.98
	4.80	Gpr39	EGW02382		0.97
2.11	5.21	Camk2n2	EGV97790	0.59	0.97
	-5.00	Dnah12,Dnah12l,Dnah71,Dnahc12, Dnahc71	EGW00688		0.96
	-4.03	Olf1r181,Mor184-4	EGW12958		0.96
-2.20	-3.70	Ralgapa2,Kiaa1272	EGV95387	0.79	0.96
	-3.78	Rasa2	EGW00483		0.96
	-3.57	Dennd4c	EGW14455		0.96
	3.60	Sphk1	EGW04691		0.96
	3.57	Ddit4,Dig2,Redd1,Rtp801	EGV98210		0.96
	-3.80	Nlr1	EGV99100		0.96
-2.07	-3.68	Arhgap19	EGV99279	0.65	0.96
-1.91	-3.17	Zfp106,H3a,Sh3bp3,Sirm,Znf474	EGV97233	0.68	0.95
	-3.16	Itsn2,Ese2,Sh3d1b	EGV95823		0.95
-1.67	-3.08	Rock2	EGW08488	0.60	0.95
2.37	3.16	Dgka,Dagk1	EGW12525	0.84	0.95
-2.07	-3.00	Ect2	EGW00004	0.78	0.95
	-3.11	Nf1	EGV94354		0.95
-2.19	-3.38	Snx27	EGW03080	0.70	0.95
-1.91	-3.10	Iqgap2	EGW04240	0.63	0.95
-1.81	-2.99	Slc6a15,B0at2,Ntt73	EGW08102	0.59	0.95
	-3.37	Olr1496	EGW12338		0.95
-2.25	-2.99	Snx25	EGW15040	0.77	0.95
	-3.04	Arhgap12	EGW05184		0.95
3.25	4.52	Lat	EGV95597	0.59	0.95
	-3.00	Tlr4	EGW02588		0.95
-2.85	-3.05	Aim2,Gm1313,Ifi210	EGV93426	0.75	0.95
	-3.30	Rprip11	EGV92009		0.95
	-3.02	Rabgap11	EGV93294		0.95
	-3.02	Tbc1d12,Kiaa0608	EGV98687		0.95
	3.67	Socs1,Cish1,Ssi1	EGV96317		0.95
	3.16	Nfkbib	EGV93028		0.95

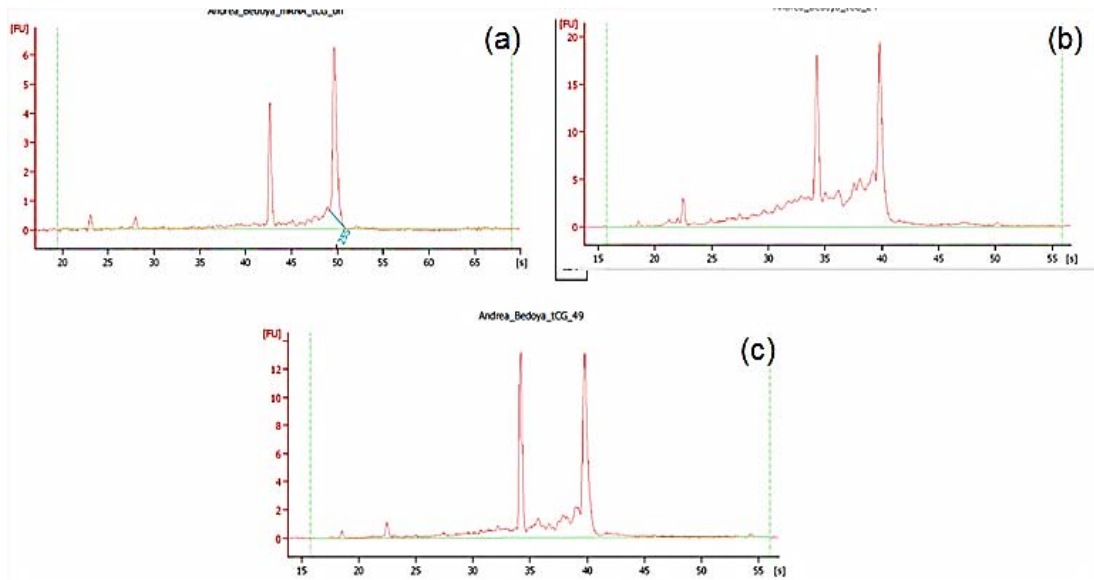
	-5.36		Cxcl3,Cinc2	EGW00999	0.82	
	-2.04		Rangap1,Fug1	EGW05207	0.81	
	-3.09		Pask,Kiaa0135	EGV95324	0.81	
	2.71		Npr2	EGW07876	0.85	
kinase signaling	-2.10	-4.25	Nek1	EGW01379	0.71	0.98
		-4.50	Peak1,Kiaa2002,Sgk269	EGW03772		0.98
		-4.33	Pak3	EGW12031		0.98
		-4.15	Csnk1g3	EGV94535		0.97
	-2.21	-3.90	Cdc42bpa,Kiaa0451	EGW11188	0.71	0.96
		-3.41	Tlk1	EGV95663		0.96
		-3.39	Nek7	EGW10922		0.96
	-2.95	-3.49	Mlk1	EGW07301	0.79	0.96
	-2.17	-3.11	Plk4,Sak	EGW06341	0.80	0.95
		3.79	Dyrk3	EGV92824		0.95
		3.20	Sgk223,D8ertd82e	EGV96442		0.95
		-3.30	Sik2,Snf1lk2	EGW03804		0.95
		-3.04	Mastl,Gw,Gwl	EGV97839		0.95
	-2.24	-3.10	Hipk3,Fist3	EGV94193	0.74	0.95
	-3.81	Ttbk2,Kiaa0847,Ttbk1	EGV97224		0.95	
Señalización n proteína G		-3.99	Dock11,Ziz2	EGV98377		0.98
		-4.27	Gnaq	EGW10015		0.97
		-5.13	Gnaq	EGW10015		0.97
		3.06	Gnat1	EGW08913		0.95
Señalización Wnt	-2.07	-4.17	Ppp2r3a	EGV96709	0.63	0.98
		-3.28	Mllt3	EGV95883		0.95
		-3.63	Rnf138	EGW05845		0.95
M u e r t e c e l u l a r		23.05	Ii33	EGW13913		1.00
	2.68	6.22	Aen,Isg2011	EGW13741	0.86	0.99
	2.02	6.58	Phlda3	EGW02186	0.75	0.99
		5.58	Tnfrsf12a	EGV93656		0.99
		5.94	Fhl2	EGV98814		0.99
		-4.44	Phip	EGV98200		0.98
		4.44	Zc3h12a	EGW00553		0.98
		-4.56	Ifih1	EGW01901		0.98
	1.77	3.90	Cyr61,Ccn1,Igfbp10	EGV99691	0.62	0.96
		-3.34	Opt	EGV93284		0.96
	1.96	3.18	Bax	EGW03981	0.66	0.95
		3.31	Cidec,Fsp27	EGW06200		0.95
	-3.22	-3.27	Ppid	EGW00520	0.78	0.95

		-3.09	Fnip1,Kiaa1961	EGW08818	0.95
		5.32	Fam176a	EGV96803	0.95
		3.31	Nle1	EGV94393	0.95
	2.07		Lrp1,A2mr	EGW02265	0.82
	-2.34		Bub1b,Mad3l	EGW14538	0.81
	2.31		Pdcd4,Ma3,Tis	EGW05942	0.80
Autofa gia		-6.42	Atg4c	EGW01026	0.98
		-3.87	Rb1cc1	EGW10581	0.96
	5.56		Tp53inp2,Dor,Trp53inp2	EGW02761	0.83

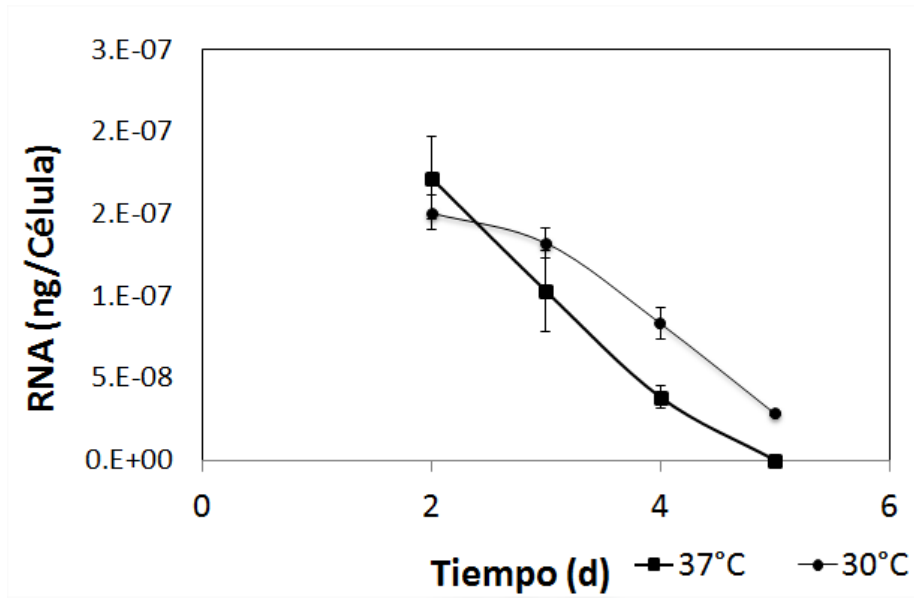
Anexo 2. Western blot de la fracción membranal para GRP78, GAPDH e Histona 3. Ce: citoesqueleto, N: Núcleo, M: membrana, Cs: citosol, MP: Marcador de peso molecular



Anexo 3. Análisis de concentración e integridad de las muestras de RNA total. (a) 37°C a las 48 h, (b) 30°C a las 72 h, (c) 30°C a las 96 h. Los cromatogramas fueron obtenidos en un equipo Biodoc analizar (agilent).

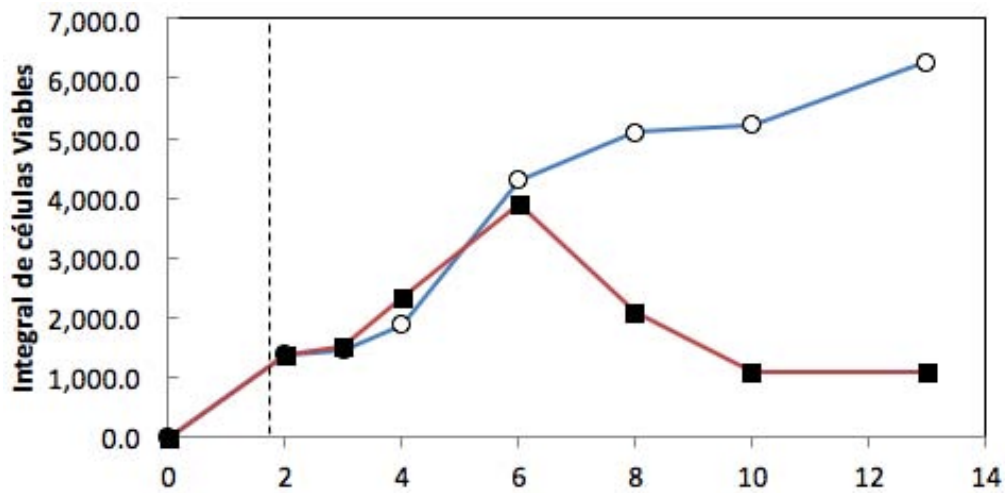


Anexo 4. Pruebas de estabilidad de RNAm. En presencia de un bloqueador de la traducción (Actinomicina D)

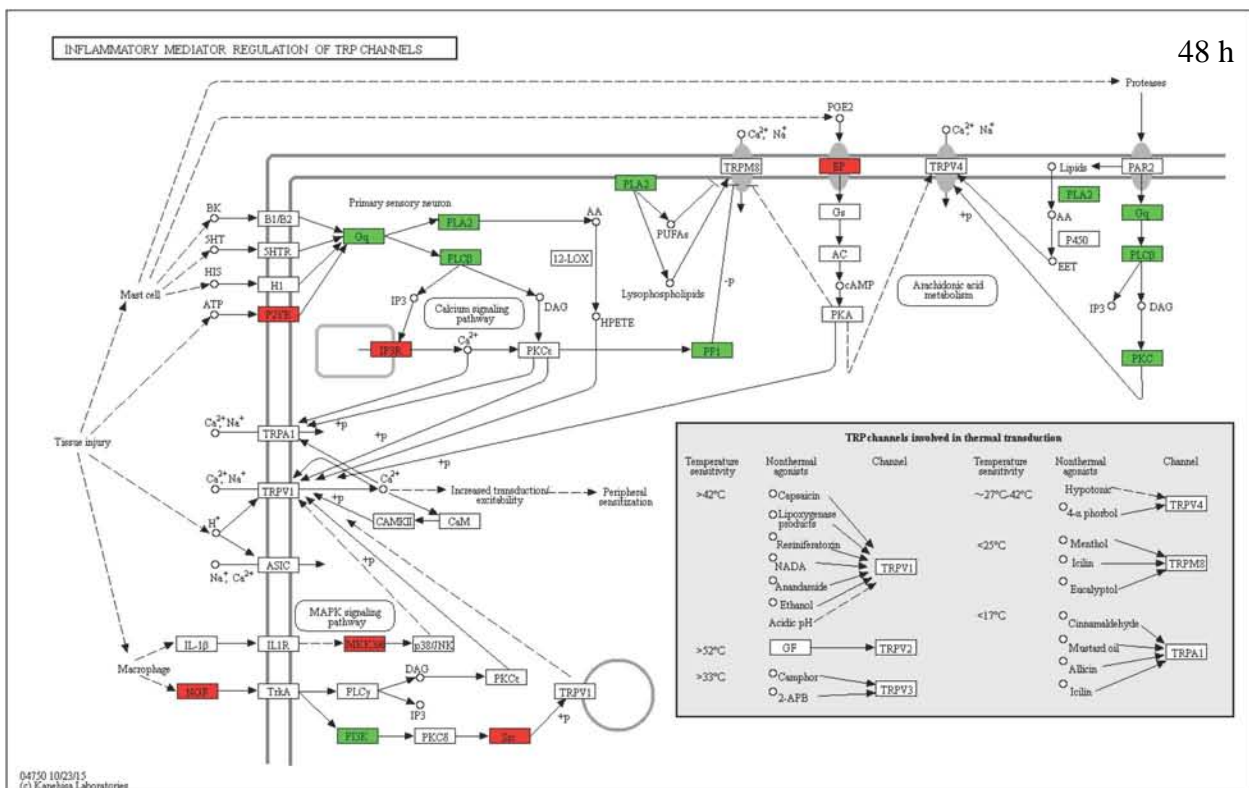
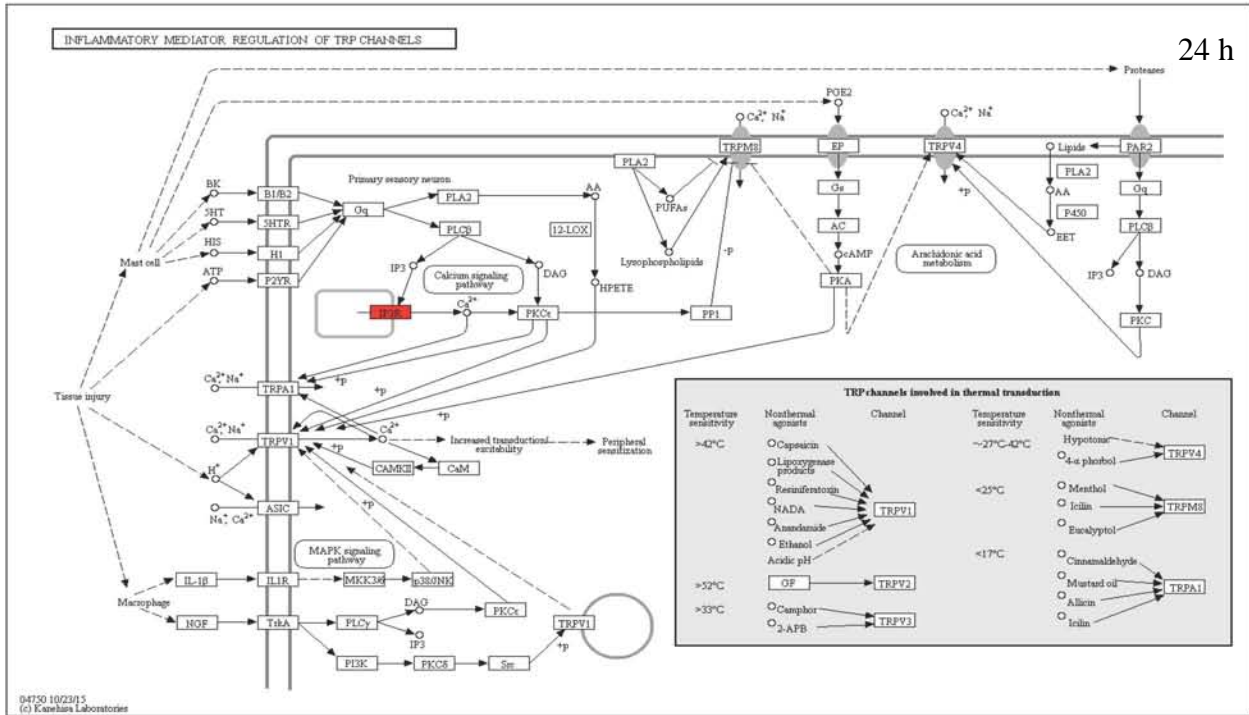


RNA total específico por célula en el tiempo en presencia de Actinomicina D a 30°C (●) y 37°C (■).

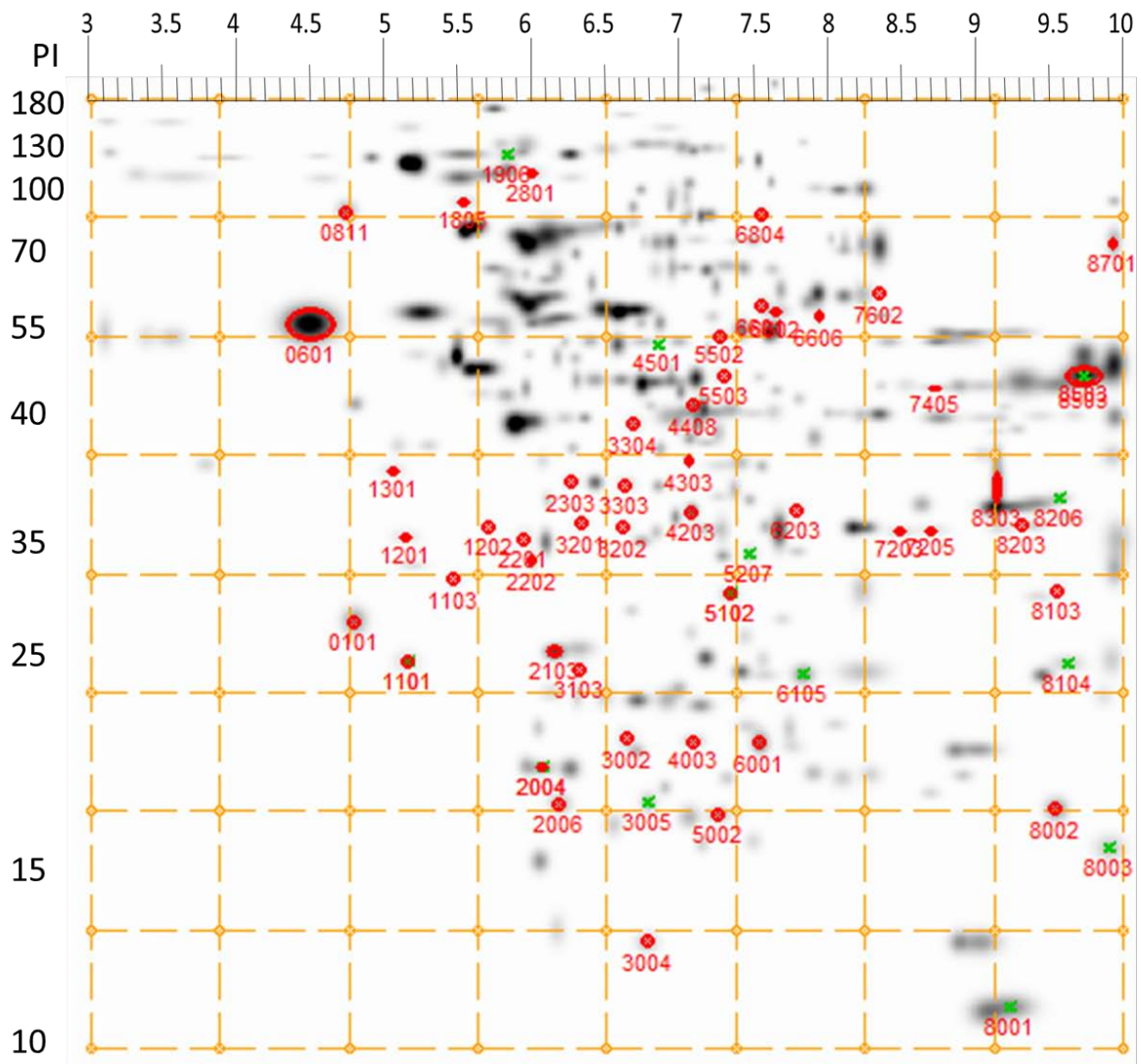
Anexo 5. Gráfico de la integral de células viables vs tiempo (días). En azul el cultivo a 30°C y en rojo el cultivo control a 37°C



Anexo 6. Diagrama KEGG de los genes TRP a las 24 y 48 horas después del cambio de temperatura en rojo los genes sobreexpresados y en verde los genes reprimidos



Anexo 7. Gel maestro 30 y 37 °C en 2D con cuadrículas y los identificadores de las manchas del análisis estadístico.



BIBLIOGRAFÍA

- Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, Waltham MC, Arvanitis A, Minichiello J, Price JT, Thompson EW. 2003. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab. Investig.* **83**:435–448.
- Ahn WS, Jeon J-J, Jeong Y-R, Lee SJ, Yoon SK. 2008. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **101**:1234–44.
- Al-fageeh MB, Marchant RJ, Carden MJ, Smales CM. 2005. The Cold-Shock Response in Cultured Mammalian Cells : Harnessing the Response for the Improvement of Recombinant Protein Production. *Biotechnology.*
- Al-Fageeh MB, Smales CM. 2006. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem. J.* **397**:247–59.
- Al-Fageeh MB, Smales CM. 2013. Alternative promoters regulate cold inducible RNA-binding (CIRP) gene expression and enhance transgene expression in mammalian cells. *Mol. Biotechnol.* **54**:238–49.
- Altamirano C, Illanes a, Casablancas a, Gámez X, Cairó JJ, Gòdia C. 2001. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol. Prog.* **17**:1032–41.
- Altamirano C, Becerra S. 2006. Specific nutrient supplementation of defined serum-free medium for the improvement of CHO cells growth and t-PA production. *Electron. J. Biotechnol.* **9**.
- Altamirano C, Berrios J, Vergara M, Becerra S. 2013. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electron. J. Biotechnol.* **16**.
- Altamirano C, Illanes A, Becerra S, Cairó JJ, Gòdia F. 2006. Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *J. Biotechnol.* **125**:547–56.
- Altieri DC. 2013. Mitochondrial HSP90s and tumor cell metabolism. *Autophagy* **9**:244–245.
- Andersen DC, Bridges T, Gawlitzek M, Hoy C. 2000. Multiple Cell Culture Factors Can Affect the Glycosylation of Asn-184 in Plasminogen Activator.
- ANGLÉS-CANO E, DÍAZ ADELAP, LOYAU S. 2001. Inhibition of Fibrinolysis by Lipoprotein(a). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**:261–275.
- Arden N, Betenbaugh MJ. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.* **22**:174–80.
- Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, Ishibashi Y, Ohta S, Morikawa K. 1997. Crystal Structure of Rat Bcl-xL : IMPLICATIONS FOR THE FUNCTION OF THE Bcl-2 PROTEIN FAMILY . *J. Biol. Chem.* **272**:27886–27892.
- Bahr SM, Borgschulte T, Kayser KJ, Lin N. 2009. Using microarray technology to select housekeeping genes in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **104**:1041–6.
- Baik JY, Lee GM. 2010. A DIGE approach for the assessment of differential expression of the CHO proteome under sodium butyrate addition: Effect of Bcl-x(L) overexpression. *Biotechnol. Bioeng.* **105**:358–67.
- Baik JY, Lee MS, An SR, Yoon SK, Joo EJ, Kim YH, Park HW, Lee GM. 2006. Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression

- in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnol. Bioeng.* **93**:361–71.
- Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M. 2006. Searching for IRES Searching for IRES:1755–1785.
- Bajanca F, Luz M, Raymond K, Martins GG, Sonnenberg A, Tajbakhsh S, Buckingham M, Thorsteinsdóttir S. 2006. Integrin alpha6beta1-laminin interactions regulate early myotome formation in the mouse embryo. *Development* **133**:1635–44.
- Barnes LM, Dickson AJ. 2006. Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**:381–386.
- Barreau C, Paillard L, Osborne HB. 2005. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* **33**:7138–50.
- Becerra S, Berrios J, Osses N, Altamirano C. 2011. Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity. *Biochem. Eng. J.*
- Becker J, Hackl M, Rupp O, Jakobi T, Schneider J, Szczepanowski R, Bekel T, Borth N, Goesmann A, Grillari J, Kaltschmidt C, Noll T, Pühler A, Tauch A, Brinkrolf K. 2011a. Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *J. Biotechnol.* **156**:227–35.
- Becker J, Timmermann C, Jakobi T, Rupp O, Szczepanowski R, Hackl M, Goesmann A, Tauch A, Borth N, Grillari J, Pühler A, Noll T, Brinkrolf K. 2011b. Next-generation sequencing of the CHO cell transcriptome. *BMC Proc.* **5 Suppl 8**:P6.
- Becker J, Timmermann C, Rupp O, Albaum SP, Brinkrolf K, Goesmann A, Pühler A, Tauch A, Noll T. 2014. Transcriptome analyses of CHO cells with the next-generation microarray CHO41K: Development and validation by analysing the influence of the growth stimulating substance IGF-1 substitute LongR(3.). *J. Biotechnol.* **178**:23–31.
- Bedoya-López A, Estrada K, Sanchez-Flores A, Ramírez OT, Altamirano C, Segovia L, Miranda-Ríos J, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA. 2016. Effect of Temperature Downshift on the Transcriptomic Responses of Chinese Hamster Ovary Cells Using Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Production Culture. *PLoS One* **11**:e0151529.
- Bell a W, Ward M a, Blackstock WP, Freeman HN, Choudhary JS, Lewis a P, Chotai D, Fazel a, Gushue JN, Paiement J, Palcy S, Chevet E, Lafrenière-Roula M, Solari R, Thomas DY, Rowley a, Bergeron JJ. 2001. Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **276**:5152–65.
- Beltran E, Fresquet V, Martinez-Useros J, Richter-Larrea JA, Sagardoy A, Sesma I, Almada LL, Montes-Moreno S, Siebert R, Gesk S, Calasanz MJ, Malumbres R, Rieger M, Prosper F, Lossos IS, Piris MA, Fernandez-Zapico ME, Martinez-Climent JA. 2011. A cyclin-D1 interaction with BAX underlies its oncogenic role and potential as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**:12461–12466.
- Berrios J, Paredes C, Vergara M, Altamirano C. 2007. Effect of low temperatures on metabolism of CHO cells cultured on different carbon and energy sources. *J. Biotechnol.* **1315**:s133–s187.
- Bi J-X, Shuttleworth J, Al-Rubeai M. 2004. Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1-arrested CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **85**:741–749.
- Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. 2014. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **14**:359–370.

- Bilyk KT, Cheng C-HC. 2013. Model of gene expression in extreme cold - reference transcriptome for the high-Antarctic cryopelagic notothenioid fish *Pagothenia borchgrevinki*. *BMC Genomics* **14**:634.
- Birnbaumer L, Yidirim E, Abramowitz J. 2003. A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium* **33**:419–432.
- Birzele F, Schaub J, Rust W, Clemens C, Baum P, Kaufmann H, Weith A, Schulz TW, Hildebrandt T. 2010. Into the unknown: expression profiling without genome sequence information in CHO by next generation sequencing. *Nucleic Acids Res.* **38**:3999–4010.
- Bolcato-Bellemin A-L, Lefebvre O, Arnold C, Sorokin L, Miner JH, Kedinger M, Simon-Assmann P. 2003. Laminin $\alpha 5$ chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev. Biol.* **260**:376–390.
- Bollati-Fogolín M, Wagner R, Etcheverrigaray M, Kratje R. 2004. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J. Biotechnol.* **109**:179–91.
- Bommiasamy H, Popko B. 2011. Animal models in the study of the unfolded protein response. *Methods Enzymol.* 1st ed. Elsevier Inc. Vol. 491 91-109p.
- Brinkrolf K, Rupp O, Laux H, Kollin F, Ernst W, Linke B, Kofler R, Romand S, Hesse F, Budach WE, Galosy S, Müller D, Noll T, Wienberg J, Jostock T, Leonard M, Grillari J, Tauch A, Goesmann A, Helk B, Mott JE, Pühler A, Borth N. 2013. Chinese hamster genome sequenced from sorted chromosomes. *Nat. Biotechnol.* **31**:694–5.
- Brown AJ, Sweeney B, Mainwaring DO, James DC. 2015. NF- κ B, CRE and YY1 elements are key functional regulators of CMV promoter-driven transient gene expression in CHO cells. *Biotechnol. J.* **10**:1019–1028.
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JJ, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**:552–557.
- Cao Z, Balasubramanian A, Marrelli SP. 2014. Pharmacologically induced hypothermia via TRPV1 channel agonism provides neuroprotection following ischemic stroke when initiated 90 min after reperfusion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **306**:R149-56.
- Carlage T, Hincapie M, Zang L, Lyubarskaya Y, Madden H, Mhatre R, Hancock WS. 2009. Proteomic profiling of a high-producing Chinese hamster ovary cell culture. *Anal. Chem.* **81**:7357–62.
- Chappell S a, Owens GC, Mauro VP. 2001. A 5' Leader of Rbm3, a Cold Stress-induced mRNA, Mediates Internal Initiation of Translation with Increased Efficiency under Conditions of Mild Hypothermia. *J. Biol. Chem.* **276**:36917–22.
- Chen S-D, Yang D-I, Lin T-K, Shaw F-Z, Liou C-W, Chuang Y-C. 2011. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* **12**:7199–215.
- Chen Y-R, Chen C-L, Liu X, Li H, Zweier JL, Mason RP. 2004. Involvement of protein radical, protein aggregation, and effects on NO metabolism in the hypochlorite-mediated oxidation of mitochondrial cytochrome c. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:1591–603.
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**:725–730.

- Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto a. 1997. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* **16**:1865–75.
- Cho YM, Lim YS, Yang HJ, Park W Bin, Cho JS, Kim JJ, Hyun SY, Lee MJ, Kang YJ, Lee G. 2012. Blood ammonia is a predictive biomarker of neurologic outcome in cardiac arrest patients treated with therapeutic hypothermia. *Am. J. Emerg. Med.* **30**:1395–1401.
- Christodoulou DC, Gorham JM, Kawana M, DePalma SR, Herman DS, Wakimoto H. 2011. Quantification of gene transcripts with deep sequencing analysis of gene expression (DSAGE) using 1 to 2 µg total RNA. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 25**:Unit25B.9.
- Chuppa S, Tsai Y, Yoon S, Shackelford S, Rozales C, Bhat R, Tsay G, Matanguihan C, Konstantinov K, Naveh D, Corp B, Way D, Box PO. 1997. Fermentor Temperature as a Tool for Control of High-Density Perfusion Cultures of Mammalian Cells.
- Cimprich KA, Cortez D. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **9**:616–627.
- Clarke C, Doolan P, Barron N, Meleady P, O’Sullivan F, Gammell P, Melville M, Leonard M, Clynes M. 2011. Predicting cell-specific productivity from CHO gene expression. *J. Biotechnol.* **151**:159–65.
- Clarke C, Henry M, Doolan P, Kelly S, Aherne S, Sanchez N, Kelly P, Kinsella P, Breen L, Madden SF, Zhang L, Leonard M, Clynes M, Meleady P, Barron N. 2012. Integrated miRNA, mRNA and protein expression analysis reveals the role of post-transcriptional regulation in controlling CHO cell growth rate. *BMC Genomics* **13**:656.
- Collen D, Lijnen HR. 2004. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *J. Thromb. Haemost.* **2**:541–546.
- Cormier S, Bras L, Vandormael-pournin S, Babinet C, Baldacci P, Cohen-tannoudji M. 2006. The Murine Ortholog of Notchless , a Direct Regulator of the Notch Pathway in *Drosophila melanogaster* , Is Essential for Survival of Inner Cell Mass Cells **26**:3541–3549.
- Coronel J, Klausung S, Heinrich C, Noll T, Figueredo-Cardero A, Castilho LR. 2016. Valeric acid supplementation combined to mild hypothermia increases productivity in CHO cell cultivations. *Biochem. Eng. J.* **114**:101–109.
- Courtes FC, Lin J, Lim HL, Ng SW, Wong NSC, Koh G, Vardy L, Yap MGS, Loo B, Lee D-Y. 2013. Translatome analysis of CHO cells to identify key growth genes. *J. Biotechnol.* **167**:215–24.
- Dalton AC, Barton W a. 2014. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci.* **23**:517–25.
- Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Xue JH, Itoh K, Matsuda T, Fujita J. 1997. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**:804–7.
- Danno S, Itoh K. 2000. Decreased Expression of Mouse Rbm3 , a Cold-Shock Protein , in Sertoli Cells of Cryptorchid Testis **156**:1685–1692.
- Datta P, Linhardt RJ, Sharfstein ST. 2013. An ’omics approach towards CHO cell engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **110**:1255–71.
- Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. 1995. Mice lacking p21 CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*

- 82**:675–684.
- Desai PN, Shrivastava N, Padh H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnol. Adv.* **28**:427–35.
- Dillies M-A, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J. 2013. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief. Bioinform.* **14**:671–683.
- Domino SE, Hiraiwa N, Lowe JB. 1997. Steven E. DOMINO*, Nozomu HIRAIWA †‡ , and John B. LOWE †§ **115**:105–115.
- Doolan P, Clarke C, Kinsella P, Breen L, Meleady P, Leonard M, Zhang L, Clynes M, Aherne ST, Barron N. 2013. Transcriptomic analysis of clonal growth rate variation during CHO cell line development. *J. Biotechnol.* **166**:105–13.
- Doolan P, Meleady P, Barron N, Henry M, Gallagher R, Gammell P, Melville M, Sinacore M, McCarthy K, Leonard M, Charlebois T, Clynes M. 2010. Microarray and proteomics expression profiling identifies several candidates, including the valosin-containing protein (VCP), involved in regulating high cellular growth rate in production CHO cell lines. *Biotechnol. Bioeng.* **106**:42–56.
- Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklisch PW, Edelman GM, Mauro VP. 2005. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits , alters microRNA levels , and enhances global protein synthesis:2–7.
- Dunst S, Kazimiers T, von Zadow F, Jambor H, Sagner A, Brankatschk B, Mahmoud A, Spann S, Tomancak P, Eaton S. 2015. Endogenously tagged rab proteins: a resource to study membrane trafficking in Drosophila. *Dev. Cell* **33**:351–365.
- Durchdewald M, Angel P, Hess J. 2009. The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease. *Histol. Histopathol.* **24**:1451–1461.
- Eilers M, Eisenman RN. 2008. Myc's broad reach. *Genes Dev.* **22**:2755–2766.
- Fadloun a, Kobi D, Delacroix L, Dembélé D, Michel I, Lardenois a, Tisserand J, Losson R, Mengus G, Davidson I. 2008. Retinoic acid induces TGFbeta-dependent autocrine fibroblast growth. *Oncogene* **27**:477–489.
- Faesen AC, Luna-Vargas MPA, Geurink PP, Clerici M, Merckx R, van Dijk WJ, Hameed DS, El Oualid F, Ovaa H, Sixma TK. 2011. The differential modulation of USP activity by internal regulatory domains, interactors and eight ubiquitin chain types. *Chem. Biol.* **18**:1550–1561.
- Fan J-B, Gunderson KL, Bibikova M, Yeakley JM, Chen J, Wickham Garcia E, Lebruska LL, Laurent M, Shen R, Barker D. 2006. Illumina universal bead arrays. *Methods Enzymol.* **410**:57–73.
- Ferry AL, Vanderklisch PW, Dupont-Versteegden EE. 2011. Enhanced survival of skeletal muscle myoblasts in response to overexpression of cold shock protein RBM3. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**:C392-402.
- Filbin ME, Kieft JS. 2009. Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**:267–276.
- Fitzgerald KD, Semler BL. 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1789**:518–528.
- Fox SR, Patel U a, Yap MGS, Wang DIC. 2004. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* **85**:177–84.
- Fox SR, Tan HK, Tan MC, Wong SCNC, Yap MGS, Wang DIC. 2005. A detailed

- understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon-gamma by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **41**:255–64.
- Frink M, Flohé S, van Griensven M, Mommsen P, Hildebrand F. 2012. Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechanisms following major challenge. *Mediators Inflamm.* **2012**:762840.
- Fujita J. 1999. Cold shock response in mammalian cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:243–55.
- Fukumoto S, Miner JH, Ida H, Fukumoto E, Yuasa K, Miyazaki H, Hoffman MP, Yamada Y. 2006. Laminin alpha5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J. Biol. Chem.* **281**:5008–16.
- Fussenegger M, Bailey JE, Hauser H, Mueller P. 1999. Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. *Trends Biotechnol* **17**:35–42.
- Galbraith DJ, Tait AS, Racher AJ, Birch JR, James DC. 2006. Control of culture environment for improved polyethylenimine-mediated transient production of recombinant monoclonal antibodies by CHO cells. *Biotechnol. Prog.* **22**:753–62.
- Gammell P, Barron N, Kumar N, Clynes M. 2007. Initial identification of low temperature and culture stage induction of miRNA expression in suspension CHO-K1 cells. *J. Biotechnol.* **130**:213–8.
- Gan B, Peng X, Nagy T, Alcaraz A, Gu H, Guan J-L. 2006. Role of FIP200 in cardiac and liver development and its regulation of TNFalpha and TSC-mTOR signaling pathways. *J. Cell Biol.* **175**:121–33.
- Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **284**:12297–305.
- Gavva NR, Davis C, Lehto SG, Rao S, Wang W, Zhu DXD. 2012. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels are involved in body temperature regulation. *Mol. Pain* **8**:36.
- Geisse S, Fux C. 2009. Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells. *Methods Enzymol.* 1st ed. Elsevier Inc. Vol. 463 223-38p.
- Gibson L, Holmgreen SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM, Cory S. 1996. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* **13**:665–675.
- Gilles C, Polette M, Zahm JM, Tournier JM, Volders L, Foidart JM, Birembaut P. 1999. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J. Cell Sci.* **112**:4615–4625.
- González-Ibarra FP, Varon J, López-Meza EG. 2011. Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action. *Front. Neurol.* **2**:4.
- Graves JD, Gotoh Y, Draves KE, Ambrose D, Han DKM, Wright M, Chernoff J, Clark EA, Krebs EG. 1998. Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *EMBO J.* **17**:2224–2234.
- Gruber AR, Fallmann J, Kratochvill F, Kovarik P, Hofacker IL. 2011. AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res.* **39**:D66–9.
- Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM. 2009. Review Paper: 25 Years of Recombinant Proteins from Reactor-Grown Cells - Where Do We Go From Here? *Biotechnol. Adv.*
- Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE. 1998. BiP Maintains the Permeability Barrier

- of the ER Membrane by Sealing the Luminal End of the Translocon Pore before and Early in Translocation. *Cell* **92**:747–758.
- Hammond S, Kaplarevic M, Borth N, Betenbaugh MJ, Lee KH. 2011. Chinese hamster genome database: An online resource for the CHO community at www.CHOgenome.org. *Biotechnol. Bioeng.* **xxx**:1–4.
- Han HS, Yenari MA. 2007. Effect on gene expression of therapeutic hypothermia in cerebral ischemia. *Future Neurol.* **2**:435–440.
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S-I, Natsume T, Guan J-L, Mizushima N. 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **181**:497–510.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**:805–816.
- Harreither E, Hackl M, Pichler J, Shridhar S, Auer N, Labaj PP, Scheideler M, Karbiener M, Grillari J, Kreil DP. 2015. Gene expression patterns of host cell subclones with increased production capacity. *Biotechnol J* **10**:1625–1638.
- Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K. 2001. Selective deficiency of α -dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology* **57**:115–121.
- Helenius A, Aebi M. 2004. ROLES OF N-LINKED GLYCANS IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:1019–1049.
- Hendrick V, Winnepeninckx P, Abdelkafi C, Vandeputte O, Cherlet M, Marique T, Renemann G, Loa A, Kretzmer G, Werenne J. 2001. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology* **36**:71–83.
- Hernández Bort J a, Hackl M, Höflmayer H, Jadhav V, Harreither E, Kumar N, Ernst W, Grillari J, Borth N, Bort J a H. 2011. Dynamic mRNA and miRNA profiling of CHO-K1 suspension cell cultures. *Biotechnol. J.* **7**:1–16.
- Hidalgo MR. 2010. Estudio transcripcional de las vias de N-Glicosilación en células de ovario de hamster chino (CHO) cultivadas en condiciones de hipotermia moderada; Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hossler P, Khattak SF, Li ZJ. 2009. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* **19**:936–49.
- Hrach J, Heydebreck A Von, Hewitt P. 2007. Affymetrix and illumina, a rat toxicogenomic based interplatform comparison. *Toxicol. Lett.* **Abstracts**:S1–S240.
- Huang J, Nakamura K, Ito Y, Uzuka T, Morikawa M, Hirai S, Tomihara K, Tanaka T, Masuta Y, Ishii K, Kato K, Hamada H. 2005. Bcl-xL Gene Transfer Inhibits Bax Translocation and Prolongs Cardiac Cold Preservation Time in Rats. *Circ.* **112**:76–83.
- Ilmjärvi S, Hundahl CA, Reimets R, Niitsoo M, Kolde R, Vilo J, Vasar E, Luuk H. 2014. Estimating differential expression from multiple indicators. *Nucleic Acids Res.* **42**:e72.
- Irminger-Finger I, Soriano J V, Vaudan G, Montesano R, Sappino A-P. 1998. In vitro repression of Brca1-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* **143**:1329–1339.
- Jacob NM, Kantardjieff A, Yusufi FNK, Retzel EF, Mulukutla BC, Chuah SH, Yap M, Hu W-S. 2010. Reaching the depth of the Chinese hamster ovary cell transcriptome. *Biotechnol. Bioeng.* **105**:1002–9.

- Jaime M, Pujol M, Serratosa J, Pantoja C, Canela N, Casanovas O, Serrano M, Agell N, Bachs O. 2002. The p21(Cip1) protein, a cyclin inhibitor, regulates the levels and the intracellular localization of CDC25A in mice regenerating livers. *Hepatology* **35**:1063–71.
- Jamnkar U, Nikolic P, Belic A, Blas M, Gaser D, Francky A, Laux H, Blejec A, Baebler S, Gruden K. 2015. Transcriptome study and identification of potential marker genes related to the stable expression of recombinant proteins in CHO clones. *BMC Biotechnol.* **15**:98.
- Jayapal KPK, Wlaschin KF, Hu W-S, Yap MGS, Wei-Shou H. 2007a. Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells — 20 Years and Counting. *CHO Consort. SBE Spec. Sect.*:40–47.
- Jayapal KP, Lian W, Glod F, Sherman DH, Hu W-S. 2007b. Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. *BMC Genomics* **8**:229.
- Jenkins N, Parekh RB, James DC. 1996. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.* **14**:975–961.
- De Jesus M, Wurm FM. 2011. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78**:184–8.
- Jin J, Kwon Y-W, Paek JS, Cho H-J, Yu J, Lee JY, Chu I-S, Park I-H, Park Y-B, Kim H-S, Kim Y. 2011. Analysis of differential proteomes of induced pluripotent stem cells by protein-based reprogramming of fibroblasts. *J. Proteome Res.* **10**:977–89.
- Johnson DT, Harris R a, French S, Aponte A, Balaban RS. 2009. Proteomic changes associated with diabetes in the BB-DP rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**:E422–E432.
- Jones PG, VanBogelen R a, Neidhardt FC. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:2092–5.
- Kadoya Y, Mochizuki M, Nomizu M, Sorokin L, Yamashina S. 2003. Role for laminin- α 5 chain LG4 module in epithelial branching morphogenesis. *Dev. Biol.* **263**:153–164.
- Kaneko Y, Sato R, Aoyagi H. 2010. Evaluation of Chinese hamster ovary cell stability during repeated batch culture for large-scale antibody production. *J. Biosci. Bioeng.* **109**:274–80.
- Kantardjiev A, Jacob NM, Yee JC, Epstein E, Kok Y-J, Philp R, Betenbaugh M, Hu W-S. 2010. Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. *J. Biotechnol.* **145**:143–59.
- Kantardjiev A, Nissom PM, Chuah SH, Yusufi F, Jacob NM, Mulukutla BC, Yap M, Hu W-S. 2009. Developing genomic platforms for Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Adv.* **27**:1028–35.
- Kantardjiev A, Zhou W. 2014. Mammalian cell cultures for biologics manufacturing. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Vol. 139 1-9p.
- Karimian G, Buist-Homan M, Tietge UJF, Faber KN, Moshage H. 2012. Mitochondrial permeability transition pore proteins are up-regulated in fatty hepatocytes that show an increased susceptibility to necrosis. *Signal Transduct. Pathways Hepatocyte Cell Death*:29.
- Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M, Bailey JE. 1999. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **63**:573–82.
- Kenyon J, Gerson SL. 2007. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells.

- Nucleic Acids Res.* **35**:7557–7565.
- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP. 1998. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat. Genet.* **20**:398–400.
- Kim JY, Kim Y-G, Baik JY, Joo EJ, Kim YH, Lee GM. 2009. A proteomic approach for identifying cellular proteins interacting with erythropoietin in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Prog.* **26**:246–51.
- Kim JY, Kim Y-G, Han YK, Choi HS, Kim YH, Lee GM. 2011a. Proteomic understanding of intracellular responses of recombinant Chinese hamster ovary cells cultivated in serum-free medium supplemented with hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**:1917–28.
- Kim JY, Kim Y-G, Lee GM. 2012. Differential in-gel electrophoresis (DIGE) analysis of CHO cells under hyperosmotic pressure: osmoprotective effect of glycine betaine addition. *Biotechnol. Bioeng.* **xxx**.
- Kim JW, Lee SH, Ko HM, Kwon KJ, Cho KS, Choi CS, Park J-H, Kim HY, Lee J, Han S-H, Ignarro LJ, Cheong JH, Kim W-K, Shin CY. 2011b. Biphasic regulation of tissue plasminogen activator activity in ischemic rat brain and in cultured neural cells: essential role of astrocyte-derived plasminogen activator inhibitor-1. *Neurochem. Int.* **58**:423–33.
- Kim SY, Kim M-J, Jung H, Kim WK, Kwon SO, Son MJ, Jang I-S, Choi J-S, Park SG, Park BC, Han Y-M, Lee SC, Cho YS, Bae K-H. 2011c. Comparative Proteomic Analysis of Human Somatic Cells, Induced Pluripotent Stem Cells, and Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.*:1–54.
- Klausing S, Krämer O, Noll T. 2011. Bioreactor cultivation of CHO DP-12 cells under sodium butyrate treatment - comparative transcriptome analysis with CHO cDNA microarrays. *BMC Proc.* **5 Suppl 8**:P98.
- Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. 2000. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **275**:32846–53.
- Korotkov K V, Novoselov S V, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2002. Mammalian Selenoprotein in Which Selenocysteine (Sec) Incorporation Is Supported by a New Form of Sec Insertion Sequence Element **22**:1402–1411.
- Kou T-C, Fan L, Zhou Y, Ye Z-Y, Liu X-P, Zhao L, Tan W-S. 2011. Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature. *J. Biosci. Bioeng.* **111**:365–9.
- Kubbies M, Stockinger H. 1990. Cell cycle-dependent DHFR and t-PA production in cotransfected, MTX-amplified CHO cells revealed by dual-laser flow cytometry. *Exp. Cell Res.* **188**:267–71.
- Kumar N, Gammell P, Clynes M. 2007. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture : A summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. *Cytotechnology* **53**:33–46.
- Kumar N, Gammell P, Meleady P, Henry M, Clynes M. 2008. Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC Biotechnol.* **8**:42.
- Kuystermans D, Dunn MJ, Al-Rubeai M. 2010. A proteomic study of cMyc improvement of CHO culture. *BMC Biotechnol.* **10**:25.
- Lai T, Yang Y, Ng S. 2013. Advances in Mammalian Cell Line Development

- Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals* **6**:579–603.
- Lamanna WC, Frese M-A, Balleininger M, Dierks T. 2008. Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* **283**:27724–35.
- Le H, Chen C, Goudar CT. 2015. An evaluation of public genomic references for mapping RNA-Seq data from Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **112**:2412–2416.
- Le H, Vishwanathan N, Kantardjieff A, Doo I, Srienc M, Zheng X, Somia N, Hu W-S. 2013. Dynamic gene expression for metabolic engineering of mammalian cells in culture. *Metab. Eng.* **20**:212–20.
- Lederkremer GZ. 2009. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**:515–523.
- Lee JS, Park HJ, Kim YH, Lee GM. 2010. Protein reference mapping of dihydrofolate reductase-deficient CHO DG44 cell lines using 2-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **10**:2292–302.
- Lee MJ, Lee B-H, Hanna J, King RW, Finley D. 2011. Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes. *Mol. Cell. Proteomics* **10**:R110–3871.
- Lee Y, Kim S, Cho C, Seo M, Cho D, Kwak S, Juhn Y. 2003. Coordinate expression of the K and L subunits of heterotrimeric G proteins involves regulation of protein degradation in CHO cells. *Cancer Res.* **555**:329–334.
- Levine AJ, Feng Z, Mak TW, You H, Jin S. 2006. Coordination and communication between the p53 and IGF-1–AKT–TOR signal transduction pathways. *Genes Dev.* **20**:267–275.
- Lewis NE, Liu X, Li Y, Nagarajan H, Yerganian G, O'Brien E, Bordbar A, Roth AM, Rosenbloom J, Bian C, Xie M, Chen W, Li N, Baycin-Hizal D, Latif H, Forster J, Betenbaugh MJ, Famili I, Xu X, Wang J, Palsson BO. 2013. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat. Biotechnol.* **31**:759–65.
- Liu A, Zhang Z, Li A, Xue J. 2010. Effects of hypothermia and cerebral ischemia on cold-inducible RNA-binding protein mRNA expression in rat brain. *Brain Res.* **1347**:104–10.
- Liu S, Storrie B. 2015. Chapter One-How Rab Proteins Determine Golgi Structure. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **315**:1–22.
- Liu Y, Hu W, Murakawa Y, Yin J, Wang G, Landthaler M, Yan J. 2013. Cold-induced RNA-binding proteins regulate circadian gene expression by controlling alternative polyadenylation. *Sci. Rep.* **3**:2054.
- Lloyd DR, Holmes P, Jackson LP, Emery a N, Al-Rubeai M. 2000. Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology* **34**:59–70.
- Lossie AC, Lo C-L, Baumgarner KM, Cramer MJ, Garner JP, Justice MJ. 2012. ENU mutagenesis reveals that Notchless homolog 1 (*Drosophila*) affects Cdkn1a and several members of the Wnt pathway during murine pre-implantation development. *BMC Genet.* **13**:106.
- Lukong KE, Chang K, Khandjian EW, Richard S. 2008. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.* **24**:416–25.
- Luo J, Vijayasankaran N, Autsen J, Santuray R, Hudson T, Amanullah A, Li F. 2012.

- Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol. Bioeng.* **109**:146–156.
- Lwa TR, Tan CH, Lew QJ, Chu KL, Tan J, Lee YY, Chao S-H. 2010. Identification of cellular genes critical to recombinant protein production using a *Gaussia* luciferase-based siRNA screening system. *J. Biotechnol.* **146**:160–8.
- Marchant RJ, Al-Fageeh MB, Underhill MF, Racher AJ, Smales CM. 2008. Metabolic rates, growth phase, and mRNA levels influence cell-specific antibody production levels from in vitro-cultured mammalian cells at sub-physiological temperatures. *Mol. Biotechnol.* **49**:277–277.
- Mardis ER. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **9**:387–402.
- Mayer PJ, Bradley MO, Nichols WW. 1987. The effect of mild hypothermia (34 degrees C) and mild hyperthermia (39 degrees C) on DNA damage, repair and aging of human diploid fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **39**:203–22.
- Maza E. 2016. In Papyro Comparison of TMM (edgeR), RLE (DESeq2), and MRN Normalization Methods for a Simple Two-Conditions-Without-Replicates RNA-Seq Experimental Design. *Front. Genet.* **7**.
- Mazan-Mamczarz K, Galbán S, López de Silanes I, Martindale JL, Atasoy U, Keene JD, Gorospe M. 2003. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:8354–9.
- Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, Hoatlin ME, Wang W. 2003. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol. Cell. Biol.* **23**:3417–3426.
- Meleady P, Doolan P, Henry M, Barron N, Keenan J, O’Sullivan F, Clarke C, Gammell P, Melville MW, Leonard M, Clynes M. 2011. Sustained productivity in recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC Biotechnol.* **11**:78.
- Meleady P, Henry M, Gammell P, Doolan P, Sinacore M, Melville M, Francullo L, Leonard M, Charlebois T, Clynes M. 2008. Proteomic profiling of CHO cells with enhanced rhBMP-2 productivity following co-expression of PACESol. *Proteomics* **8**:2611–24.
- Meza JE, Brzovic PS, King M-C, Klevit RE. 1999. Mapping the functional domains of BRCA1 interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *J. Biol. Chem.* **274**:5659–5665.
- Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE. 2004. Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* **131**:2247–56.
- Misra S, Sharma S, Agarwal A, Khedkar S V, Tripathi MK, Mittal MK, Chaudhuri G. 2010. Cell cycle-dependent regulation of the bi-directional overlapping promoter of human BRCA2/ZAR2 genes in breast cancer cells. *Mol. Cancer* **9**:50.
- Moore a, Mercer J, Dutina G, Donahue CJ, Bauer KD, Mather JP, Etcheverry T, Ryll T. 1997. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology* **23**:47–54.
- Mori K, Dwek RA, Downing AK, Opdenakker G, Rudd PM. 1995. The Activation of Type 1 and Type 2 Plasminogen by Type I and Type II Tissue Plasminogen Activator. *J. Biol. Chem.* **270**:3261–3267.
- Morozova O, Marra M a. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies

- in functional genomics. *Genomics* **92**:255–64.
- Morrison SF. 2016. Central control of body temperature. *F1000Research* **5**.
- Nagasawa K, Higashi T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K. 2007. Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO Rep.* **8**:483–489.
- Nakaya N, Hemish J, Krasnov P, Kim S-Y, Stasiv Y, Michurina T, Herman D, Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G. 2007. Noxin, a Novel Stress-Induced Gene Involved in Cell Cycle and Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **27**:5430–44.
- Nam JH, Zhang F, Ermonval M, Linhardt RJ, Sharfstein ST. 2008. The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **100**:1178–1192.
- Neutelings T, Lambert C a, Nusgens B V, Colige AC. 2013. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One* **8**:e69687.
- Nielsen PJ, Trachsel H. 1988. The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J.* **7**:2097–105.
- Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. 2013. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis.* **4**:e888.
- Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Itoh K, Danno S, Matsuda T, Fujita J. 1997. Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene* **204**:115–20.
- Nishiyama H, Xue JH, Sato T, Fukuyama H, Mizuno N, Houtani T, Sugimoto T, Fujita J. 1998. Diurnal change of the cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) expression in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**:534–8.
- Nissom P, Sanny A, Kok Y, Hiang Y, Chuah S, Shing T, Lee Y, Wong T, Hu W, Sim M, Philp R. 2006. Transcriptome and proteome profiling to understanding the biology of high productivity CHO cells. *Mol. Biotechnol.* **34**:125–140.
- Nomiyama T, Zhao Y, Gizard F, Findeisen HM. 2009. NIH Public Access **119**:577–586.
- O'Neill L a, Kaltschmidt C. 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* **20**:252–8.
- Oguchi S, Saito H, Tsukahara M, Tsumura H. 2006. pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology* **52**:199–207.
- Oh HJ, Lee K-K, Song SJ, Jin MS, Song MS, Lee JH, Im CR, Lee J-O, Yonehara S, Lim D-S. 2006. Role of the tumor suppressor RASSF1A in Mst1-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **66**:2562–2569.
- Oka S, Arita H. 1991. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. *J. Biol. Chem.* **266**:9956–9960.
- Oka T, Komuro I. 2008. Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure. *Circ. J.* **72**:A13–A16.
- Oliveira-Ferrer L, Rößler K, Hausteiner V, Schröder C, Wicklein D, Maltseva D, Khaustova N, Samatov T, Tonevitsky A, Mahner S. 2013. c-FOS suppresses ovarian cancer progression by changing adhesion. *Br. J. Cancer* **110**:753–763.
- Osman JJ, Birch J, Varley J. 2001. The response of GS-NS0 myeloma cells to pH shifts and pH perturbations. *Biotechnol. Bioeng.* **75**:63–73.

- Otter M, Barrett-Bergshoeff MM, Rijken DC. 1991. Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose receptor. *J. Biol. Chem.* **266**:13931–13935.
- Pain VM. 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **236**:747–71.
- Parekh RB, Dwek RA, Thomas JR, Opdenakker G, Rademacher TW, Wittwer AJ, Howard SC, Nelson R, Siegel NR, Jennings M. 1989. Cell-type-specific and site-specific N-glycosylation of type I and type II human tissue plasminogen activator. *Biochemistry* **28**:7644–7662.
- Park JS, Kim H, Park J, Yu S, Kim D, Lee J, Oh H, Baek K, Yoon J. 2010a. Overproduction of recombinant human hepatocyte growth factor in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr. Purif.* **70**:231–235.
- Park JS, Kim H, Park J, Yu S, Kim D, Lee J, Oh H, Baek K, Yoon J. 2010b. Overproduction of recombinant human hepatocyte growth factor in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr. Purif.* **70**:231–5.
- Park JY, Yamatani M, Wadano S, Takagi Y, Honda K, Omasa T, Ohtake H. 2010c. Effects of palindrome structure on Dhfr amplification in Chinese hamster ovary cells. *Genome Biol.* **45**:1845–1851.
- Park S, Kim W, Kim Y, Son YD, Lee S-C, Kim E, Kim SH, Kim JH, Kim H-S. 2010d. Array-based analysis of secreted glycoproteins for rapid selection of a single cell producing a glycoprotein with desired glycosylation. *Anal. Chem.* **82**:5830–7.
- Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR. 1997. Distribution and Function of Laminins in the Neuromuscular System of Developing, Adult, and Mutant Mice **139**:1507–1521.
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P. 2002. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science (80-.)*. **296**:2046–2049.
- Phadtare S, Alsina J, Inouye M. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins Sangita Phadtare , Janivette Alsina and Masayori Inouye *. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:175–180.
- Pilote J, Cunningham B a, Edelman GM, Vanderklish PW. 2009. Developmentally regulated expression of the cold-inducible RNA-binding motif protein 3 in euthermic rat brain. *Brain Res.* **1258**:12–24.
- Pilote J, Dupont-Versteegden EE, Vanderklish PW. 2011. Widespread regulation of miRNA biogenesis at the Dicer step by the cold-inducible RNA-binding protein, RBM3. *PLoS One* **6**:e28446.
- Pistoni M, Verrecchia A, Doni M, Guccione E, Amati B. 2010. Chromatin association and regulation of rDNA transcription by the Ras-family protein RasL11a. *EMBO J.* **29**:1215–24.
- Podcheko A, Northcott P, Bikopoulos G, Lee A, Bommareddi SR, Kushner J a, Farhang-Fallah J, Rozakis-Adcock M. 2007. Identification of a WD40 repeat-containing isoform of PHIP as a novel regulator of beta-cell growth and survival. *Mol. Cell. Biol.* **27**:6484–96.
- Pradhan K, Pant T, Gadgil M. 2012. In situ pH maintenance for mammalian cell cultures in shake flasks and tissue culture flasks. *Biotechnol. Prog.*:1–19.
- Puthier D. 2011. Introduction to transcriptome analysis using High- Throughput Sequencing technologies (HTS).
- Quelle DE, Ashmun RA, Hannon GJ, Rehberger PA, Trono D, Richter KH, Walker C, Beach D, Sherr CJ, Serrano M. 1995. Cloning and characterization of murine

- p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene* **11**:635–645.
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **9**:402–412.
- Rodriguez J, Spearman M, Huzel N, Butler M. 2005. Enhanced Production of Monomeric Interferon- β by CHO Cells through the Control of Culture Conditions. *Biotechnol. Prog.* **21**:22–30.
- Rudd PM, Woods RJ, Wormald MR, Opdenakker G, Downing AK, Campbell ID, Dwek RA. 1995. The effects of variable glycosylation on the functional activities of ribonuclease, plasminogen and tissue plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta* **1248**:1.
- Rupp O, Becker J, Brinkrolf K, Timmermann C, Borth N, Pühler A, Noll T, Goesmann A. 2014. Construction of a public CHO cell line transcript database using versatile bioinformatics analysis pipelines. *PLoS One* **9**:e85568.
- Rutter JL, Goldstein AM, Dávila MR, Tucker MA, Struewing JP. 2003. CDKN2A point mutations D153spl (c. 457G> T) and IVS2+ 1G> T result in aberrant splice products affecting both p16INK4a and p14ARF. *Oncogene* **22**:4444–4448.
- Sahara T, Goda T, Ohgiya S. 2002. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol. Chem.* **277**:50015–21.
- Sánchez-Mora R, Arboleda H, Arboleda G. 2012. PINK1 Overexpression Protects Against C2-ceramide-Induced CAD Cell Death Through the PI3K/AKT Pathway. *J. Mol. Neurosci.* **47**:582–594.
- Sancho A, Duran J, García-España A, Mauvezin C, Alemu E a, Lamark T, Macias MJ, DeSalle R, Royo M, Sala D, Chicote JU, Palacín M, Johansen T, Zorzano A. 2012. DOR/Tp53inp2 and Tp53inp1 constitute a metazoan gene family encoding dual regulators of autophagy and transcription. *PLoS One* **7**:e34034.
- Sanny A. 2006. IDENTIFYING KEY SIGNATURES OF HIGH PRODUCTIVITY FROM TRANSCRIPTOME AND PROTEOME PROFILES OF CHO CELLS.
- Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. 2002. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol. Int.* **52**:375–383.
- Sauerwald TM, Oyler GA, Betenbaugh MJ. 2003. Study of caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **81**:329–340.
- Schaller B, Graf R. 2003. Hypothermia and stroke: the pathophysiological background. *Pathophysiology* **10**:7–35.
- Schatz SM, Kerschbaumer RJ, Gerstenbauer G, Kral M, Dorner F, Scheiflinger F. 2003. Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnol. Bioeng.* **84**:433–8.
- Schlacher K, Wu H, Jasin M. 2012. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* **22**:106–116.
- Schmidt-Schweda S, Ohler A, Post H, Pieske B. 2013. Moderate hypothermia for severe cardiogenic shock (COOL Shock Study I & II). *Resuscitation* **84**:319–25.
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Dever-Bertrand J, Bertrand R. 2000. Characterization of Bax- ζ , a Cell Death-Inducing Isoform of Bax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**:868–879.
- Schro M, Scha R, Friedl P. 2002. Induction of Protein Aggregation in an Early Secretory Compartment by Elevation of Expression Level.
- Schuger L, Varani J, Killen PD, Skubitz AMYPN, Gllbride K. 1992. Laminin Expression

- in the Mouse Lung Increases With Development and Stimulates Spontaneous Organotypic Rearrangement of Mixed Lung Cells **54**.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**:704–707.
- Sevrioukova IF. 2011. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **14**:2545–79.
- Shaban NM, Harvey S, Perrino FW, Hollis T. 2010. The structure of the mammalian RNase H2 complex provides insight into RNA:NA hybrid processing to prevent immune dysfunction. *J. Biol. Chem.* **285**:3617–24.
- Shaffer a L, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee A-H, Qian S-B, Zhao H, Yu X, Yang L, Tan BK, Rosenwald A, Hurt EM, Petroulakis E, Sonenberg N, Yewdell JW, Calame K, Glimcher LH, Staudt LM. 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**:81–93.
- Shi M, Xie Z, Yu M, Shen B, Guo N. 2005. Controlled Growth of Chinese Hamster Ovary Cells and High Expression of Antibody-IL-2 Fusion Proteins by Temperature Manipulation. *Biotechnol. Lett.* **27**:1879–1884.
- Silvaggi NR, Zhang C, Lu Z, Dai J, Dunaway-Mariano D, Allen KN. 2006. The X-ray crystal structures of human α -phosphomannomutase 1 reveal the structural basis of congenital disorder of glycosylation type 1a. *J. Biol. Chem.* **281**:14918–14926.
- Slade PG, Hajivandi M, Bartel CM, Gorfien SF. 2012. Identifying the CHO secretome using mucin-type O-linked glycosylation and click-chemistry. *J. Proteome Res.* **11**:6175–86.
- Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS. 2011. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science (80-.)*. **334**:1086–1090.
- Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald III ER, Hurov KE, Luo J, Ballif BA, Gygi SP, Hofmann K, D'Andrea AD. 2007. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* **129**:289–301.
- Søgaard M, Tani K, Ye RR, Geromanos S, Tempst P, Kirchhausen T, Rothman JE, Söllner T. 1994. A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* **78**:937–948.
- Sonna L a, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. 2002. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* **92**:1725–42.
- Sonna L a, Kuhlmeier MM, Carter HC, Hasday JD, Lilly CM, Fairchild KD. 2006. Effect of moderate hypothermia on gene expression by THP-1 cells: a DNA microarray study. *Physiol. Genomics* **26**:91–8.
- Sou SN, Sellick C, Lee K, Mason A, Kyriakopoulos S, Polizzi KM, Kontoravdi C. 2015a. Understanding the impact of different bioprocess conditions on monoclonal antibody glycosylation in CHO cell cultures through experimental and computational analyses. *BMC Proc.* **9**:O6.
- Sou SN, Sellick C, Lee K, Mason A, Kyriakopoulos S, Polizzi KM, Kontoravdi C. 2015b. How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation? *Biotechnol. Bioeng.* **112**:1165–1176.
- Spellman MW, Basa LJ, Leonard CK, Chakel JA, O'Connor J V, Wilson S, van Halbeek H. 1989. Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **264**:14100–14111.
- Stancic A, Buzadzic B, Korac A, Otasevic V, Jankovic A, Vucetic M, Markelic M,

- Velickovic K, Golic I, Korac B. 2013. Regulatory role of PGC-1 α /PPAR signaling in skeletal muscle metabolic recruitment during cold acclimation. *J. Exp. Biol.* **216**:4233–4241.
- Stegman BM, Newby LK, Hochman JS, Ohman EM. 2012. Post-myocardial infarction cardiogenic shock is a systemic illness in need of systemic treatment: is therapeutic hypothermia one possibility? *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**:644–7.
- Steinert PM, Roop DR. 1988. Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:593–625.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**:819–829.
- Strober W. 2001. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In: . *Curr. Protoc. Immunol.* John Wiley & Sons, Inc.
- Sureban SM, Ramalingam S, Natarajan G, May R, Subramaniam D, Bishnupuri KS, Morrison a R, Dieckgraefe BK, Brackett DJ, Postier RG, Houchen CW, Anant S. 2008. Translation regulatory factor RBM3 is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. *Oncogene* **27**:4544–56.
- Sutherland LC, Rintala-Maki ND, White RD, Morin CD. 2005. RNA binding motif (RBM) proteins: a novel family of apoptosis modulators? *J. Cell. Biochem.* **94**:5–24.
- Swiderek H, Al-rubeai M. 2007. Functional Genome-Wide Analysis of Antibody Producing NS0 Cell Line Cultivated at Different Temperatures **98**:616–630.
- Tao KP, Fong SW, Lu Z, Ching YP, Chan KW, Chan SY. 2011. TSPYL2 is important for G1 checkpoint maintenance upon DNA damage. *PLoS One* **6**:1–8.
- Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. 2011. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* **21**:2213–23.
- Tharmalingam T, Sunley K, Butler M. 2008. High yields of monomeric recombinant β -interferon from macroporous microcarrier cultures under hypothermic conditions. *Biotechnol. Prog.* **24**:832–838.
- Tjio JH, Puck TT. 1958. GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS : II. CHROMOSOMAL CONSTITUTION OF CELLS IN TISSUE CULTURE. *J. Exp. Med.* **108**:259–268.
- Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, Malissen B, Dagorn J-C, Iovanna JL, Dusetti NJ. 2003. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J. Biol. Chem.* **278**:37722–37729.
- Tong G, Endersfelder S, Rosenthal L-M, Wollersheim S, Sauer IM, Bühner C, Berger F, Schmitt KRL. 2013. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res.* **1504**:74–84.
- Toussaint C, Henry O, Durocher Y. 2016. Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *J. Biotechnol.* **217**:122–131.
- Tremblay LO, Nagy Kovács E, Daniels E, Wong NK, Sutton-Smith M, Morris HR, Dell A, Marcinkiewicz E, Seidah NG, McKerlie C, Herscovics A. 2007. Respiratory distress and neonatal lethality in mice lacking Golgi alpha1,2-mannosidase IB involved in N-glycan maturation. *J. Biol. Chem.* **282**:2558–66.
- Tripathi MK, Misra S, Khedkar S V, Hamilton N, Irvin-Wilson C, Sharan C, Sealy L, Chaudhuri G. 2005. Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor

- protein in human breast cells. *J. Biol. Chem.* **280**:17163–17171.
- Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, Vorauer-uhl K, Weik R, Borth N, Katinger H, Mu D. 2006. Process Parameter Shifting : Part I . Effect of DOT , pH , and Temperature on the Performance of Epo-Fc Expressing CHO Cells Cultivated in Controlled Batch Bioreactors.
- Turcu FER, Ventii KH, Wilkinson KD. 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**:363.
- Underhill MF, Smales CM, Issue NS. 2007. The cold-shock response in mammalian cells: investigating the HeLa cell cold-shock proteome. *Cytotechnology* **53**:47–53.
- Vergara M, Becerra S, Altamirano C. 2009. Glycosylation stage leads production of extracellular rh-tPA at sub-physiological temperatures of culture. *N. Biotechnol.* **25**.
- Vergara M, Becerra S, Berrios J, Osses N, Reyes J, Rodríguez-Moyá M, Gonzalez R, Altamirano C. 2014. Differential effect of culture temperature and specific growth rate on CHO cell behavior in chemostat culture. *PLoS One* **9**:e93865.
- Vergara M, Becerra S, Diaz-Barrera A, Berrios J, Altamirano C. 2012. Simultaneous environmental manipulations in semi-perfusion cultures of CHO cells producing rh-tPA. *Electron. J. Biotechnol.* **15**:1–9.
- Vergara M, Berrios J, Martínez I, Díaz-Barrera A, Acevedo C, Reyes JG, Gonzalez R, Altamirano C. 2015. Endoplasmic reticulum-Associated rht-PA Processing in CHO Cells: Influence of mild hypothermia and specific growth rates in batch and chemostat cultures. *PLoS One* **10**:1–12.
- Vishwanathan N, Le H, Jacob NM, Tsao Y-S, Ng S-W, Loo B, Liu Z, Kantardjieff A, Hu W-S. 2014. Transcriptome dynamics of transgene amplification in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **111**:518–28.
- Walsh G. 2014. 2015-Review-Biopharmaceutical benchmarks 2014 **32**.
- Walsh G, Jefferis R. 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol.* **24**:1241–52.
- Webb BLJ, Proud CG. 1997. Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**:1127–1131.
- Wei Y-YC, Naderi S, Meshram M, Budman H, Scharer JM, Ingalls BP, McConkey BJ. 2011. Proteomics analysis of chinese hamster ovary cells undergoing apoptosis during prolonged cultivation. *Cytotechnology* **63**:663–77.
- Whelan S a, Hart GW. 2003. Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation. *Circ. Res.* **93**:1047–58.
- Wilmes A, Limonciel A, Aschauer L, Moenks K, Bielow C, Leonard MO, Hamon J, Carpi D, Ruzek S, Handler A, Schmal O, Herrgen K, Bellwon P, Burek C, Truisi GL, Hewitt P, Di Consiglio E, Testai E, Blaauboer BJ, Guillou C, Huber CG, Lukas A, Pfaller W, Mueller SO, Bois FY, Dekant W, Jennings P. 2013. Application of integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling for the delineation of mechanisms of drug induced cell stress. *J. Proteomics* **79**:180–94.
- Wingens M, Jochem G, Schmidt A, Albaum SP, Büntemeyer H, Noll T, Hoffrogge R. 2015. 2D-DIGE screening of high-productive CHO cells under glucose limitation—Basic changes in the proteome equipment and hints for epigenetic effects. *J. Biotechnol.* **201**:86–97.
- Wong NSC, Wati L, Nissom PM, Feng HT, Lee MM, Yap MGS. 2010. An investigation of intracellular glycosylation activities in CHO cells: effects of nucleotide sugar

- precursor feeding. *Biotechnol. Bioeng.* **107**:321–36.
- Wuest DM, Harcum SW, Lee KH. 2012. Genomics in mammalian cell culture bioprocessing. *Biotechnol. Adv.* **30**:629–38.
- Wulhfard S, Tissot S, Bouchet S, Cevey J, De Jesus M, Hacker DL, Wurm FM. 2008. Mild hypothermia improves transient gene expression yields several fold in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Prog.* **24**:458–65.
- Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**:1393–8.
- Wurm FM, Hacker D. 2011. First CHO genome. *Nat Biotech* **29**:718–720.
- Xia Z-P, Zheng X-M, Zheng H, Liu X-J, Liu G-Y, Wang X-H. 2012a. Downregulation of cold-inducible RNA-binding protein activates mitogen-activated protein kinases and impairs spermatogenic function in mouse testes. *Asian J. Androl.* **14**:884–9.
- Xia Z, Zheng X, Zheng H, Liu X, Yang Z, Wang X. 2012b. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) regulates target mRNA stabilization in the mouse testis. *FEBS Lett.* **586**:3299–308.
- Xiao M, Zhang Y, Chen X, Lee E-J, Barber CJS, Chakrabarty R, Desgagné-Penix I, Haslam TM, Kim Y-B, Liu E, MacNevin G, Masada-Atsumi S, Reed DW, Stout JM, Zerbe P, Zhang Y, Bohlmann J, Covello PS, De Luca V, Page JE, Ro D-K, Martin VJJ, Facchini PJ, Sensen CW. 2013. Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *J. Biotechnol.* **166**:122–34.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**:701–704.
- Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, Chen W, Xie M, Wang W, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang J, Gui Y, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J. 2011. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat. Biotechnol.* **29**:735–41.
- Ye Y, Akutsu M, Reyes-Turcu F, Enchev RI, Wilkinson KD, Komander D. 2011. Polyubiquitin binding and cross-reactivity in the USP domain deubiquitinase USP21. *EMBO Rep.* **12**:350–357.
- Yee JC, Gatti MDL, Philp RJ, Yap M, Hu W. 2008. Genomic and Proteomic Exploration of CHO and Hybridoma Cells Under Sodium Butyrate Treatment. *Biotechnology* **99**:1186–1204.
- Yee JC, Gerdtzen ZP, Hu W-S. 2009. Comparative transcriptome analysis to unveil genes affecting recombinant protein productivity in mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **102**:246–63.
- Yokoi H, Shimizu Y, Anazawa H, Lefebvre CA, Korneluk RG, Ikeda J-E. 1996. The structure and complete nucleotide sequence of the human cyclophilin 40 (PPID) gene. *Genomics* **35**:448–455.
- Yoon SK, Hong JK, Choo SH, Song JY, Park HW, Lee GM. 2006. Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. *J. Biotechnol.* **122**:463–72.
- Yoon SK, Hwang SO, Lee GM. 2004. Enhancing Effect of Low Culture Temperature on Specific Antibody Productivity of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells: Clonal Variation. *Biotechnol. Prog.* **20**:1683–1688.
- Yoon SK, Kim SH, Lee GM. 2003a. Effect of low culture temperature on specific

- productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Prog.* **19**:1383–6.
- Yoon SK, Song JY, Lee GM. 2003b. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **82**:289–298.
- Yoon S, Ahn Y-H, Jeong M. 2007. Effect of culture temperature on follicle-stimulating hormone production by Chinese hamster ovary cells in a perfusion bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**:83–89.
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia a J, Hakem a, Hakem R, Penninger JM, Mak TW. 1998. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* **94**:739–50.
- Zagari F, Jordan M, Stettler M, Broly H, Wurm FM. 2012. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N. Biotechnol.* **0**.
- Zagari F, Jordan M, Stettler M, Broly H, Wurm FM. 2013. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N. Biotechnol.* **30**:238–245.
- Zalai D, Hevér H, Lovász K, Molnár D, Wechselberger P, Hofer A, Párta L, Putics Á, Herwig C. 2016. A control strategy to investigate the relationship between specific productivity and high-mannose glycoforms in CHO cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*:1–14.
- ZAMANI A, OSHVANDI K, BAZMAMOUN H. Lower culture-temperature effects on recombinant IFN- γ production in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells.
- Zanghi JA, Fussenegger M, Bailey JE. 1999. Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **64**:108–119.
- Zerial M, McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **2**:107–117.
- Zhang M, Zhang L, Hu J, Lin J, Wang T, Duan Y, Man W, Feng J, Sun L, Jia H. 2016. MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice. *Diabetologia* **59**:2435–2447.
- Zhang X, Weng C, Li Y, Wang X, Jiang C, Li X, Xu Y, Chen Q, Pan L, Tang H. 2012. Human Bop is a novel BH3-only member of the Bcl-2 protein family. *Protein Cell* **3**:790–801.
- Zolkipli Z, Pedersen CB, Lamhonwah A-M, Gregersen N, Tein I. 2011. Vulnerability to oxidative stress in vitro in pathophysiology of mitochondrial short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: response to antioxidants. *PLoS One* **6**:e17534.
- Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR. 1997. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* **124**:793–804.

ARTÍCULO INDEXADO COMO PRIMER AUTOR

RESEARCH ARTICLE

Effect of Temperature Downshift on the Transcriptomic Responses of Chinese Hamster Ovary Cells Using Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Production Culture

Andrea Bedoya-López¹, Karel Estrada², Alejandro Sanchez-Flores², Octavio T. Ramírez³, Claudia Altamirano⁴, Lorenzo Segovia⁵, Juan Miranda-Ríos¹, Mauricio A. Trujillo-Roldán¹, Norma A. Valdez-Cruz^{1*}

1 Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, **2** Unidad Universitaria de Apoyo Bioinformático, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. México, **3** Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. México, **4** Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile, **5** Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. México

* adri@biomedicas.unam.mx



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Bedoya-López A, Estrada K, Sanchez-Flores A, Ramírez OT, Altamirano C, Segovia L, et al. (2016) Effect of Temperature Downshift on the Transcriptomic Responses of Chinese Hamster Ovary Cells Using Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Production Culture. PLoS ONE 11(3): e0151529. doi:10.1371/journal.pone.0151529

Editor: Jonathan A Coles, Glasgow University, UNITED KINGDOM

Received: November 13, 2015

Accepted: February 28, 2016

Published: March 18, 2016

Copyright: © 2016 Bedoya-López et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was partially financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, www.conacyt.mx/, projects 220795, 104951-Z, 178528), and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM, www.dgapa.unam.mx, projects IN-210013 and IN-209113). ABL, thanks the "Programa de

Abstract

Recombinant proteins are widely used as biopharmaceuticals, but their production by mammalian cell culture is expensive. Hence, improvement of bioprocess productivity is greatly needed. A temperature downshift (TDS) from 37°C to 28–34°C is an effective strategy to expand the productive life period of cells and increase their productivity (q_p). Here, TDS in Chinese hamster ovary (CHO) cell cultures, initially grown at 37°C and switched to 30°C during the exponential growth phase, resulted in a 1.6-fold increase in the q_p of recombinant human tissue plasminogen activator (rh-tPA). The transcriptomic response using next-generation sequencing (NGS) was assessed to characterize the cellular behavior associated with TDS. A total of 416 ($q > 0.8$) and 3,472 ($q > 0.9$) differentially expressed transcripts, with more than a 1.6-fold change at 24 and 48 h post TDS, respectively, were observed in cultures with TDS compared to those at constant 37°C. In agreement with the extended cell survival resulting from TDS, transcripts related to cell growth arrest that controlled cell proliferation without the activation of the DNA damage response, were differentially expressed. Most upregulated genes were related to energy metabolism in mitochondria, mitochondrial biogenesis, central metabolism, and avoidance of apoptotic cell death. The gene coding for rh-tPA was not differentially expressed, but fluctuations were detected in the transcripts encoding proteins involved in the secretory machinery, particularly in glycosylation. Through NGS the dynamic processes caused by TDS were assessed in this biological system.

Doctorado en Ciencias Biomédicas”, UNAM, and the scholarship from CONACYT-México. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Recombinant proteins that require posttranslational modifications, similar to those found in humans, are preferentially produced in mammalian cells [1]. Chinese hamster ovary (CHO) cells have been used as the preferred heterologous expression system to produce recombinant glycoproteins, which are in increasingly high demand for the treatment of various diseases [1,2]. Hence, there exists a critical need to improve these bioprocesses in order to increase recombinant protein yields while maintaining product stability, activity, and biosafety [1,3,4]. One strategy used to improve specific and volumetric productivity is to decrease the culture temperature [5–8]. Effects of temperature downshifts (TDS) from 37°C to temperatures ranging from 28°C to 34°C (a procedure known as “biphasic cultures under moderate hypothermia”) have been reported, with the optimal conditions dependent on the product and cell line under investigation [9,10]. TDS usually reduces cell growth but increases cell viability, slows cell metabolism, delays cell death, and prolongs RNA half-life. Such effects have been related to increases in recombinant protein production [2,3,10–13].

Recent transcriptomic and proteomic studies have increased our understanding of the genetic and physiological processes in CHO cell cultures [14,15]. A transcriptomic analysis of a moderate hypothermic effect in CHO cells was performed using mouse and rat DNA microarrays [16–18]. The expression of 301 genes (from 1,655 known genes in rat cDNA chips) and 162 genes (from 4,643 known genes in mouse cDNA chips) were modified in CHO cells that were cultured at 33°C, as compared to those cultured at 37°C [16]. Other recombinant CHO cells under TDS showed 237 genes that were differentially expressed from 4,509 well-annotated genes using CHO cDNA microarrays [18].

Next-generation sequencing (NGS) technologies are more effective for deep sequencing analyses of genomes and transcriptomes compared to Sanger-based sequencing techniques, and are not limited by DNA chips [19,20], allowing the identification of a large number of RNA transcripts. For the CHO-K1 cell line genome, Illumina’s sequencing platform showed an estimate size of 2.45-Gb and 24,383 predicted genes [21,22], allowing a better description of the transcriptome data set [19,23]. Recently, data were obtained using NGS on CHO cultures undergoing TDS from 36°C to 31°C, which caused a decrease in protein productivity [24].

Since high productivity is associated with particular cell responses and different transcriptomic states [18,25], we aimed to analyze and illustrate the effects of TDS on the transcriptomic profile of CHO TF70R cells. TDS performed in this study resulted in an increased production of recombinant rh-tPA and viability, as also observed by others using the same cell line [10,26,27]. The effects of TDS on cell metabolism and the secretion pathway through the endoplasmic reticulum (ER) were also determined and described here. The NGS analysis shown is helpful for the development of clones with high productivity. In particular, it is proposed that specific changes in the ER and Golgi are the main responses associated to the increased recombinant protein production observed in the biological system used here.

Materials and Methods

Cell lines and culture conditions

The cell line, CHO TF70R, which produces rh-tPA, was obtained from Pharmacia & Upjohn S. A. Sweden and was a kind gift of Torsten Björllig. The cells were cultured in serum-free, chemically defined CD-OptiCHO[®] medium (GIBCO ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 6 mM glutamine (Biowest LLC, Kansas City, MO, USA), 4 mg/mL insulin HUMULIN (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA), 100 U/mL penicillin (Antibióticos de México, México D.F., México), 0.01 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany), 0.001

g/L Pluronic[®] F-68 (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany), 200 nM methotrexate (Pfizer, New York, NY, USA), and 4% yeast extract (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at pH 7.0. Inocula were prepared in 75-cm² T-flasks (Nunc, Roskilde, Denmark) and incubated at 37°C with humidified air containing 5% CO₂. Six spinner flasks were inoculated with 3.5 × 10⁵ cells/mL at 90% viability in a working volume of 100 mL, and were cultured at 90 rpm with 5% CO₂ atmosphere in a humidified incubator. After 48 h, three spinners were switched to 30°C (biphasic cultures) and three were kept at 37°C (control cultures). Samples were taken every 24 h until viability dropped to 40%. The cell concentration and cell viability were determined using a cell counter (TC10 BioRad, Hercules, CA, USA) and a Neubauer chamber following the trypan blue dye exclusion method.

Determination of glucose, glutamine, lactate, and rh-tPA concentrations

The concentration of glucose, glutamine, glutamate, and lactate was measured with a YSI 2900 (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH, USA). The concentration of rh-tPA in the culture supernatants was measured by ELISA using a monoclonal goat anti-human tPA antibody (Abcam, Cambridge, UK) and an anti-goat IgG (H+L) secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Pierce ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA, cat. 31430), which was revealed with *o*-Phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany). The reaction color was measured at 450 nm (Thermo Scientific, Multiskan FC, UK), and the rh-tPA was quantified with a calibration curve using Actilyse[®] as a standard (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany). The rh-tPA productivity (q_{tPA}) was calculated using Eq 1.

$$q_{tPA} = \left(\frac{\text{pg}}{\text{cell}} \right) \frac{\text{day}}{\text{day}} = \left[\frac{\text{final tPA concentration} - \text{initial tPA concentration}}{\text{final cell concentration} - \text{initial cell concentration}} \right] \times \mu \text{ (day}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

RNA isolation and library preparation

Duplicate samples for the transcriptome analysis were taken 24 h and 48 h after TDS. The control RNA was collected at 48 h from cultures grown at 37°C. RNeasy[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) was added to preserve RNA in each sample. Total RNA was isolated from 1 × 10⁷ cells using an RNeasy kit (Qiagen, Germantown MD, USA) and quantified on a NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA integrity was verified using an Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA). The RNA-seq libraries from mRNA samples were prepared from total RNA using an Illumina[®] TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). mRNA sample preparation was performed using an mRNA-Seq Sample preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA).

Transcriptome sequencing

The mRNA samples were sequenced using an Illumina GAIIX platform with two different configurations (GAIIX, Illumina Inc., San Diego, CA, USA). The first configuration corresponded to 36 bp, with single reads for 48-h (control) and 72-h (24 h after TDS, biphasic) samples. The second sequencing configuration corresponded to 72 bp, with paired-end reads for samples collected at 48 h (control) and 96 h (48 h after TDS, biphasic). All libraries were prepared and performed with one biological replicate.

Bioinformatic analysis

After quality control check and adapter removal, the Illumina reads for each condition were mapped to the CHO-K1 reference genome published on www.chogenome.org [28], using the short-read aligner, SMALT (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/smalt/>) v7.4. Two libraries were prepared from biological replicates: the first contained samples from 48 h and 72 h (24 h after TDS) of culture, and the second contained samples from 48 h and 96 h (48 h after TDS) of culture. The read counts for each coding DNA sequence (CDS) in each condition were analyzed with the non-parametric and data-adaptive algorithm NOISeq R package [29], following TMM normalization (S1 Fig). The resulting differentially expressed genes were analyzed using the topGO algorithm in the R package for enrichment analysis of gene ontology [30] (topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology, Bioconductor package version 2.6.0).

Validation of transcriptional analysis by real time-PCR

Total RNA from samples collected at 48 h (control) and 96 h (48 h after TDS) was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The RevertAid kit (Fermentas, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) was used to obtain cDNA. For PCR detection, we used SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA). Reactions of 12 µL were evaluated, containing 6 µL of SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, CA, USA), 150 nM primers, and 50 ng of template cDNA. The reaction was incubated at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and for 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Amplification was carried out in a PikoReal 24 Real-Time PCR System and analyzed with PikoReal software 2.2 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). All samples were run in triplicate, and negative controls were included. Data was analyzed using the 2-ΔΔCq method [31] and normalized using *Gst1* as an endogenous control. The primers used are listed in Table 1.

Statistical analysis

Kinetics and stoichiometric parameters in biphasic and control cultures (growth, viability, consumption of glucose and glutamine, lactate production, and recombinant protein production) were calculated from at least three independent experiments and are expressed as mean ± standard deviation. The Student’s *t*-test was employed to determine significant differences between the control (37°C) and low temperature treatment (30°C), using a significance level of $p < 0.05$.

Table 1. List of primer sequences used for verification of differentially expressed genes determined by NGS.

PrimerGen ID	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amplicon (bp)
<i>Rbm3</i>	ATGACAGGCACTTGAAGACC	CCCCGGGATCTTTGAGTCTC	90
<i>Cirp</i>	AGTGAGCACCTTGCCCCAC	AAAGTCTGGTCACGAGGCCA	91
<i>Ldha</i>	GTCCTAGGGGAGCATGGAGA	TTGTCGGTATCAGTGCCCAG	107
<i>rh-tPA</i>	GAGGAAGGAAATTGCAGGGC	GGCTCTATGTCGGAAGATTT	91
<i>Sec61</i>	GTTGGCCCTGTTCCAGTGTT	GCAGCCAAATCTATGAGC GT	100
<i>Gstp1</i>	TGGTGAATGATGGGGTGGAA	GGCAGGGCCTTCACATAGTC	97
<i>Actinb</i>	AGCTGAGAGGGAAATTGTGCG	AGGAAGAGGATGCAGCAGTG	95
<i>Neu2</i>	CAAGACGGATGAGCATGCAG	CACCTCCTCAGCTTGCCACT	91
<i>Pdia3</i>	GAGGCTTGCCCCGAGTATG	GGTGTGTTGTTGGCAGTGC	91
<i>Gadph</i>	AGAAGGTGGTGAAGCAGGCAT	CAAAGGTGGAAGAGTGGGAGTC	87

doi:10.1371/journal.pone.0151529.t001

Results

Effect of TDS on cell growth, glucose consumption, and rh-tPA productivity

CHO TF70R cells that were subjected to moderate hypothermia showed affected growth, viability, and recombinant protein production (Fig 1A–1D). The specific growth rate (μ) before TDS was $0.023 \pm 0.012 \text{ h}^{-1}$, which decreased significantly to $0.005 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ ($p < 0.05$) after TDS. The maximum viable cell concentration was reached in control cultures (37°C) after 4 days ($2.70 \pm 0.15 \times 10^6$ cells/mL), whereas in biphasic cultures (TDS from 37°C to 30°C at 48 h of culture) similar concentration was obtained only after 8 days ($2.67 \pm 0.10 \times 10^6$ cells/mL) (Fig 1A). Cell viability in biphasic cultures remained above 75% for ten days, whereas in control cultures, it decreased to around 20% (Fig 1B). Similar differences between control and biphasic cultures with respect to cell growth and viability have been previously reported [4,13,27,32], which have been related to the arrest of the cell cycle in the G1/G0 phase and avoidance of apoptosis [4,5,13,33,34].

A maximum rh-tPA concentration of $11.15 \pm 0.40 \text{ mg/L}$ and maximum q_{tPA} of $0.82 \pm 0.03 \text{ pg/cell-day}$ were obtained in biphasic cultures, which represented a 2.2- and 1.6-fold increase, respectively, as compared to control cultures (Fig 1C and 1D). Such increases in rh-tPA concentration and productivity are similar to results reported by Hendrick *et al.* [27] who reached a rh-tPA concentration of approximately 13 mg/L after 10 days of culture. Moreover, productivity was similar to that reported by Vergara *et al.* [35], with productivity of approximately 0.50 pg/cell-day at 37°C and 0.65 pg/cell-day at 33°C.

Glucose and glutamine concentrations are shown in Fig 1E and 1G, respectively, while lactate concentrations are shown in Fig 1F. Biphasic cultures had 14% lower specific consumption rates of glucose (q_{glc}) than control cultures (Table 2), resulting in a longer availability (at least 4 more days) of the carbon source. The lactate production rate (q_{lac}) in biphasic cultures was 19.6% lower than in the control cultures, while the glutamine consumption rate (q_{gln}) was similar under both conditions (Table 2). A similar q_{gln} indicated that pyrimidine synthesis and amino acid synthesis were similar in both culture strategies [36], and that glutamine transport was not substantially affected by TDS. Most likely, TDS increased the amount of glutamine that was converted to protein, while a minor portion was deaminated. Furthermore, the lactate yield from glucose ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) was about 19% lower after TDS than in 37°C cultures (Table 2). These data show that TDS results in lower glucose consumption and lactate production as compared to cultures at 37°C. Similar information has been previously reported [3,37,38]. In fact, moderate hypothermia decreases the specific consumption rate and specific production rate of by-products in a cell line-dependent manner [8,13,34].

Differential expression after TDS

In total, 21,789 transcripts were mapped, and we annotated 19,775 genes based on the CHO-K1 reference genome (www.chogenome.org [28]). A total of 416 ($q > 0.8$) and 3,472 ($q > 0.9$) transcripts with more than a 1.6-fold change were determined to be differentially expressed at 24 and 48 h after TDS, respectively. The normalized expression levels and fold changes of each biological replicate are shown in Fig 2. The differential transcription data was analyzed using the topGO algorithm for GO term enrichment. This analysis grouped 1,421 genes in 57 biological processes categories (Fig 3A). In addition, 568 genes were assigned to 27 cellular component categories (Fig 3B). In the molecular function level, 609 genes were assigned, and they clustered in 50 groups (Fig 3C). As shown in Fig 3, TDS caused most gene

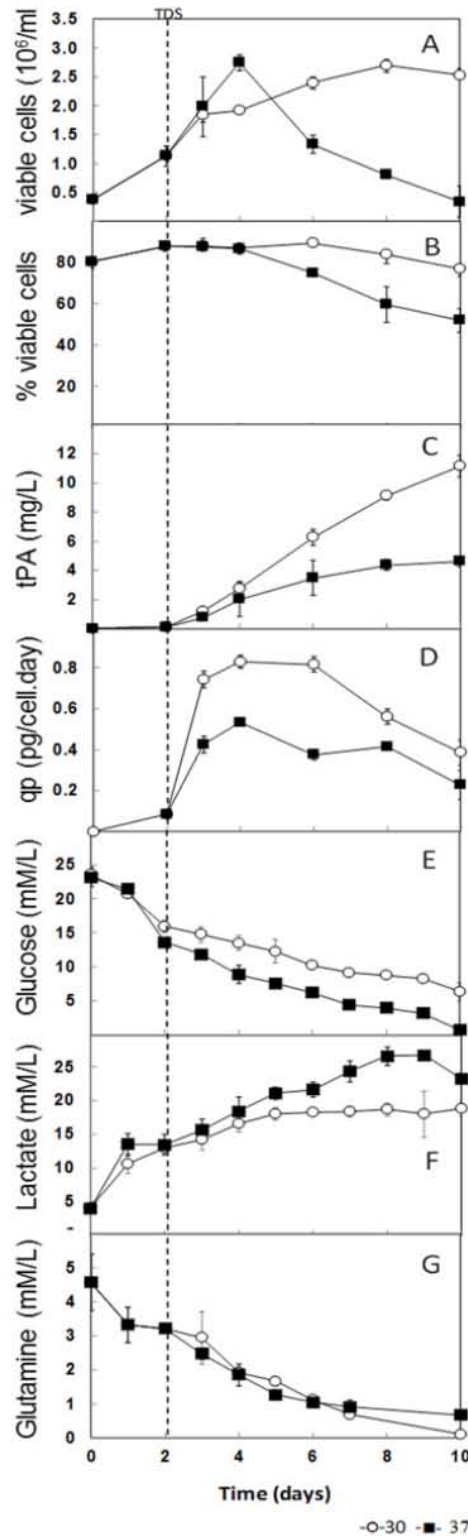


Fig 1. Kinetics of cell growth and rh-tPA production. Recombinant CHO TF70R viable cell density (A), percentage of cell viability (B), rh-tPA production (C), cell-specific rh-tPA production (D), glucose consumption (E), lactate production (F), and glutamine consumption (G) of cell cultures at 37°C (closed squares), and under temperature downshift (TDS) to 30°C at 48 h (open circles). Dotted line denotes TDS from 37 to 30°C, and transcriptomic samples were taken at 24 and 48 h after TDS.

doi:10.1371/journal.pone.0151529.g001

Table 2. Kinetic and stoichiometric parameters of CHO cells in the biphasic and control cultures.

Parameters	Control 37°C	Biphasic 30°C
μ (h ⁻¹) *	0.021 ± 0.02	0.005 ± 0.001 ^a
X _{max} (10 ⁶ cell/ml)	2.70 ± 0.15	2.67 ± 0.10
Cell viability (%)	87.60 ± 1.50	89.60 ± 2.00
Y _{lac/glc} (mol/mol)	0.85 ± 0.01	0.69 ± 0.02 ^a
q _{tPA} (pg/cell-day)	0.53 ± 0.02	0.82 ± 0.03 ^a
rh-tPA max (mg/L)	4.60 ± 1.20	11.15 ± 0.40 ^a
q _{gln} (nmol/10 ⁶ cell h)	26.9 ± 0.81	25.9 ± 1.24
q _{glc} (nmol/10 ⁶ cell h)	112 ± 1.67	98.4 ± 3.54 ^a
q _{lac} (nmol/10 ⁶ cell h)	160 ± 1.23	130 ± 7.32 ^a

*The specific growth rate (μ) was calculated for the first 4 days in those cultures carried out at 37°C; for biphasic cultures, μ was calculated for the 4 days after temperature downshift.

^aBiphasic culture data with statistically significant differences (Student's t-test with a significance level of $p < 0.05$) from the control culture (37°C) data.

doi:10.1371/journal.pone.0151529.t002

changes in the ontological group of biological process, which included signal transduction, DNA replication, transcription, and translation.

Protein -coding genes with >1.6 fold change were clustered in eight groups and are presented in [S1 Table](#). In total, 241 protein-coding genes with $q \geq 0.6$ were obtained at 24 h after TDS, and 638 protein-coding genes with $q \geq 0.95$ were obtained at 48 h after TDS ([S1 Table](#)). When the discussion requires it, we present protein-coding genes with smaller q but whose changes are ≥ 1.6 fold.

RNA-seq transcriptome validation by real-time PCR

Although RNA-seq studies are sensitive and specific, we analyzed 11 genes by real-time PCR (RT-PCR) to validate our transcriptome data, as has been done in previous studies [39,40]. To determine a reference gene, different markers (*gst1*, *Gapdh*, α -*tubulin*, and β -*actin*) were analyzed. Our results indicated that *gst1* was the most stably expressed reference gene in CHO TF70R cells under TDS conditions ([Table 3](#)). Genes quantified by RT-PCR included *Rbm3* and *Cirp* as controls for the TDS response, and *rh-tPA* and *Pdia3* as control genes demonstrating no change. In addition, the expression of the *Ldha*, *Sec61*, and *Neu2* genes was analyzed by RT-PCR to verify the overexpression shown in the transcriptomic data. [Table 3](#) shows a comparison of the genes analyzed by RT-PCR and using RNA-seq data. The difference in gene expression using both techniques was less than 30%, thereby validating our results.

Discussion

TDS (from 37°C to 30°C) after 48 h of culture affected the growth of CHO TF70R cells, but extended their cultivation time and maintained higher cell viability for up to 7 days longer than those cultures that were maintained at 37°C. This resulted in a 2.3-fold and 1.6-fold increase in rh-tPA volumetric and specific productivity, respectively, with a concomitant decrease in glucose consumption and lactate production in TDS cultures as compared to cultures maintained at 37°C. These results are consistent with previous reports that used CHO cell lines that were grown under similar conditions [3,4,27] and that suggest that TDS increases recombinant protein production by impacting cell cycle arrest [9,27], increasing mRNA stability [3,4,12], and modulating protein secretion pathways [18]. Here, a transcriptome analysis of CHO TF70R

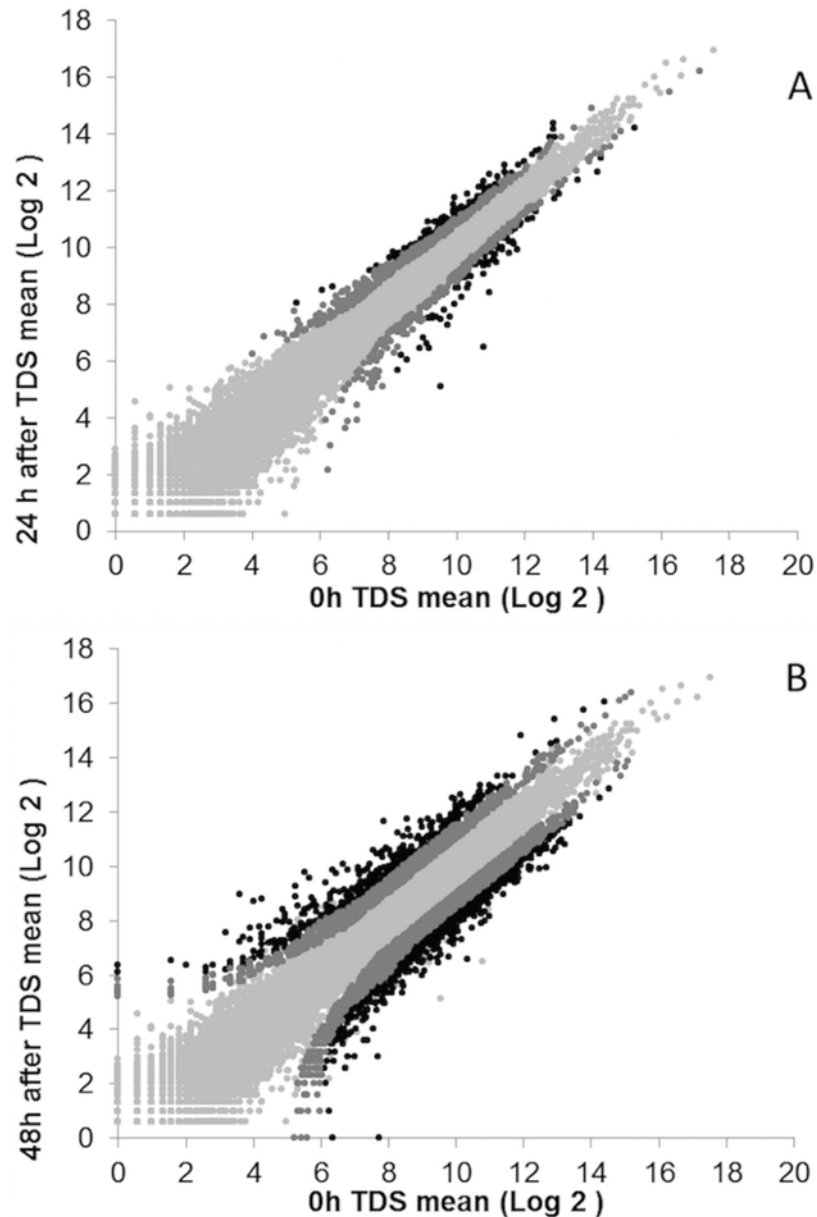


Fig 2. Transcript abundance analysis of 21,789 genes after temperature downshift (TDS). Differential expression determined by Illumina sequencing of duplicated samples collected at 24 h (A) and 48 h (B) after TDS of culture and compared to the control culture at 37°C, sampled at 48 h of culture (bioinformatic analysis in Materials and Methods). Coding DNA sequence data in each condition were analyzed with the non-parametric and data-adaptive algorithm NOISeq R package [29], following TMM normalization. Genes without differential expression are represented by light gray dots. Genes with differential expression (>1.6 fold change) are shown in dark gray with q of 0.6–0.8 (A), and q of 0.9–0.95 (B). Those that are differentially expressed (>1.6 fold change) with $q > 0.8$ (A) and $q > 0.95$ (B) are shown in black dots.

doi:10.1371/journal.pone.0151529.g002

cells was successfully performed, comparing cells grown at 37°C in the exponential phase (48 h of culture) with two time-points after TDS (24 and 48 h). Discussed genes involved in TDS response are summarized in [Table 4](#).

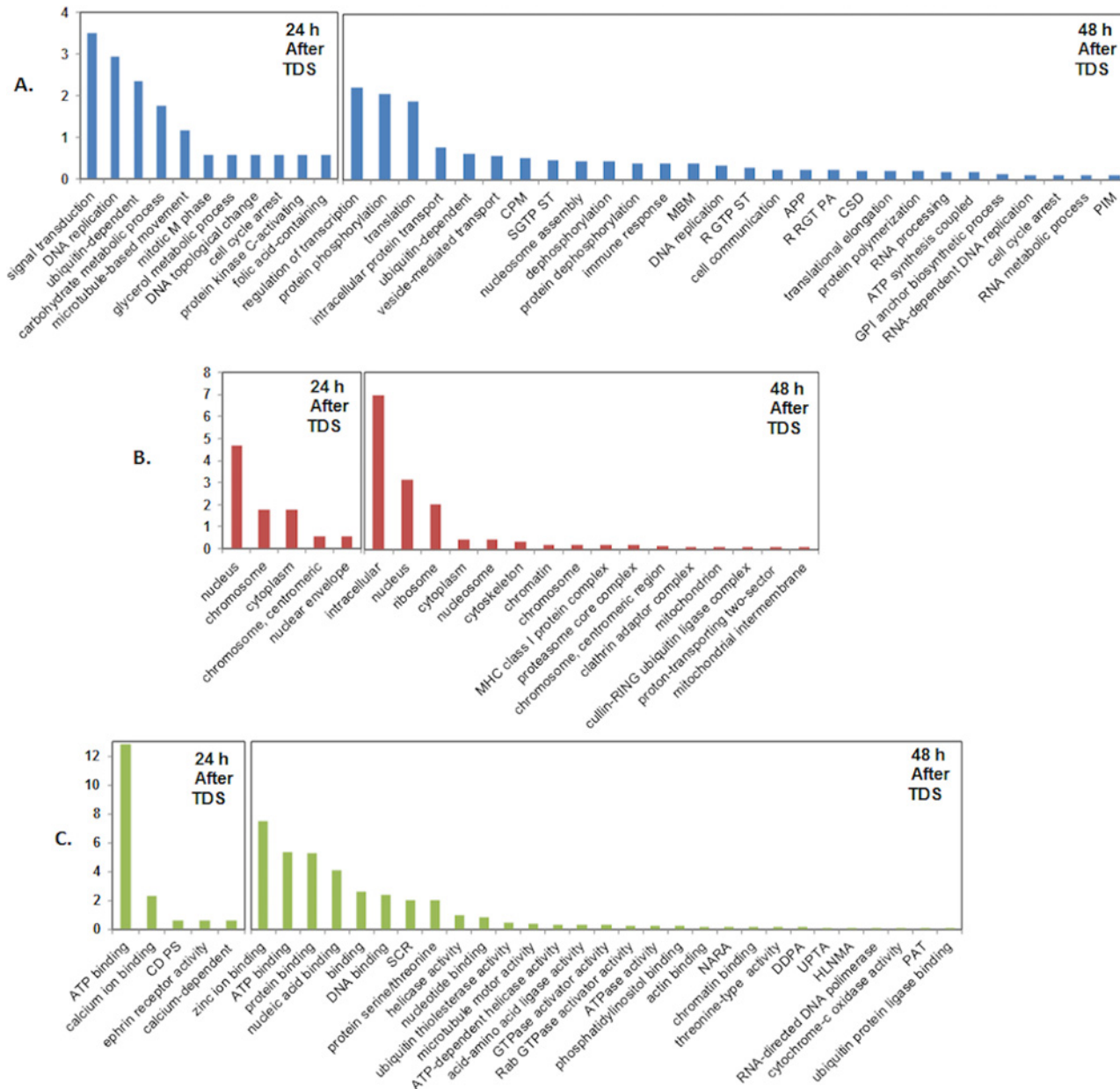


Fig 3. Enriched gene ontology annotation of differentially expressed genes. In total, 171 genes at 24 h after TDS (>1.6 fold change, $q > 0.8$) and 995 genes at 48 h after TDS (>1.6 fold change, $q > 0.95$) were classified in sub-ontologies. Enrichment scores on the y-axis and x-axis bar charts represent the follows: GO type—A, Biological process; B, Cellular component; and C, Molecular function. (CPM) cellular protein modulation, (SGTP ST) small GTPase signal transduction, (MBM) microtubule-based movement, (R GTP ST) regulation of GTPase signal transduction, (APP) antigen process and presentation, (R RGT PA) regulation of Rab GTPase activity, (CSD) chromatin assembly or disassembly, (CD PS) cyclin-dependent protein serin.

doi:10.1371/journal.pone.0151529.g003

Response to TDS and its effect on recombinant transcripts

An increase in RBM3 and CIRP transcripts has been associated with a cold response in different cell types [41–43]. CIRP has also been associated with increases in mRNA stability [44], which probably improves recombinant protein production [5]. In agreement with such reports, we corroborated the overexpression of transcripts coding for RBM3 and CIRP at 24 and 48 h after TDS by NGS (Table 4 and S1 Table) and RT-PCR (Table 3). Another consistent response

Table 3. Comparison of fold-changes in differentially expressed genes determined by NGS and by RT-PCR.

Gene	Fold change NGS 48 h after TDS (q)	Fold change real time PCR 48 h after TDS
<i>Rbm3</i>	13.54 (0.99) ^a	14.01 ± 0.55 ^a
<i>Cirp</i>	7.76 (0.99) ^a	7.38 ± 0.28 ^a
<i>rh-tPA</i>	1.13 (0.34)	1.08 ± 0.08
<i>Sec61</i>	2.27 (0.92) ^a	1.57 ± 0.23 ^a
<i>Ldha</i>	3.15 (0.95) ^a	2.38 ± 0.18 ^a
<i>Gst1</i> (house keeping)	1.12 (0.54)	1.01 ± 0.02
<i>Pdia3</i>	1.44 (0.72)	1.48 ± 0.16 ^a
<i>Neu2</i>	3.78 (0.93) ^a	4.42 ± 0.06 ^a

^aBiphasic culture data with statistically significant differences from that of the control culture (37°C).

doi:10.1371/journal.pone.0151529.t003

to moderate hypothermia is the upregulation of the *vim* gene, and the overexpression of its coded protein (Vimentin) [16,18,45]. Vimentin is a ubiquitous cytoskeleton intermediate filament (IF) [46] and is related to migratory and wound healing processes [47,48]. Here, *vim* was upregulated at 96 h (2.37-fold; q = 0.93), but its function after TDS is still unknown (Table 4). On the other hand, the gene coding for a temperature-activated ion channel (*trpv3*), which is activated at warm temperatures [49], was maintained at basal levels (Table 4). Thus, it is conceivable that this channel could initiate the hypothermia response.

Transcripts expression of recombinant genes encoding for DHFR and rh-tPA was similar in the biphasic and control cultures, for each gene (Table 4). Although the increase in productivity of recombinant proteins has been associated with increases in rh-tPA mRNA abundance and half-life [3,12], we did not observe differential expression of the gene coding for rh-tPA after TDS, either by RT-PCR or in the RNA-seq analysis (Table 3). This suggests that the increase in rh-tPA under TDS might be due to changes in translational events or posttranslational events or due to differences in turnover [3,12,18].

Differentially expressed transcripts related to the cell cycle

Up to 89 and 218 cell-cycle genes were differentially expressed at 24 h and 48 h post TDS, respectively. These genes included those related to control of cell cycle progression, transcription, differentiation, and proliferation, among others (S1 Table). Reports indicate that after TDS, different mammalian cells (i.e., glioblastoma cells, fibroblasts, and CHO-K1 cells) initiate cell cycle arrest through p53 activation by the p21 mechanism [50–52]. In fact, CHO-K1 cells exposed to TDS activate the ATR–p53–p21 signaling pathway [52,53]. TDS did not cause differential expression of the gene coding for p53. However, the gene coding for the signal mediator ATM, which participates in p53 phosphorylation [54] and acts in replicating cells [55], was downregulated (Table 4 and S1 Table), as was the gene coding for ATR (ataxia telangiectasia mutated- and Rad3-related kinase), which is related to p53 phosphorylation (2.67-fold; q > 0.94, Table 4). Various studies have described p53 transcriptional regulation of genes like *mdm2*, *TP53INP1*, *waf1/cip1*, and *Bax* [56,57]. After 24 h of TDS, the gene coding for MDM2, which is known to regulate ubiquitination and degradation of p53 [58], and the gene *TP53INP2*, which codes for the antiproliferative tumor protein p53-inducible nuclear protein 1 homologue [59], were overexpressed (Table 4 and S1 Table). TDS caused the overexpression of *Cdkn1a* (coding for p21) in the two culture timepoints that were studied (Table 4 and S1

Table 4. Comparison of the fold change of highlighted differentially expressed of genes affected by the TDS response. Differentially expressed transcripts (> 1.6 fold) with respect to the control $q > 0.8$ at 24 hour and $q > 0.95$ at 48 hour after TDS are indicated in bold lettering. Gene descriptions and putative functions were obtained from www.genecards.org.

Gene	Gene description	Putative function	Fold change NGS, 24 h after TDS (q)	Fold change NGS, 48 h after TDS (q)
<i>Rbm3</i>	RNA Binding Motif Protein 3	Cold-inducible mRNA binding protein, enhances protein synthesis at mild hypothermic temperatures	5.81 (0.95)	13.54 (0.99)
<i>Cirp</i>	Cold Inducible RNA Binding Protein	Protective role by stabilizing transcripts of genes involved in cell survival.	3.31 (0.89)	7.76 (0.99)
<i>Vim</i>	Vimentin	Intermediate filament protein attached to the nucleus, ER, and mitochondria	1.47 (0.50)	2.37 (0.93)
<i>Trpv3</i>	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily V, Member 3	It is activated by innocuous (warm) temperatures	-1.5 (0.07)	1.00 (0.22)
<i>Dhfr</i>	Dihydrofolate Reductase	Catalyzes an essential reaction for de novo glycine and purine synthesis	1.14 (0.23)	-1.08 (0.40)
<i>rh-tPA</i>	Plasminogen Activator Tissue	Recombinant gene	1.03 (0.09)	1.13 (0.34)
Cell cycle				
<i>Atm</i>	Serine/threonine protein kinase	Important cell cycle checkpoint kinase, regulator of a wide variety of downstream proteins	-2.16 (0.69)	-7.49 (1.0)
<i>Atr</i>	Serine/Threonine-Protein Kinase	Related to ATM, cell cycle checkpoint gene required for cell cycle arrest	-1.72 (0.5)	-2.67 (0.94)
<i>Mdm2</i>	E3 Ubiquitin Protein Ligase	Mediates ubiquitination of p53/TP53, leading to its degradation by the proteasome	2.25 (0.85)	1.65 (0.76)
<i>Tp53inp2</i>	Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 2	Dual regulator of transcription and autophagy	5.56 (0.83)	4.07 (0.95)
<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A	Functions as a regulator of cell cycle progression	3.26 (0.90)	9.15 (0.99)
<i>Ccnd1</i>	Cyclin D1	Regulates the cell-cycle during G(1)/S transition	0.03 (0.10)	1.98 (0.79)
<i>Cdk3</i>	Cyclin-Dependent Kinase 3	Promotes entry into S phase	-1.07 (0.09)	2.66 (0.66)
<i>Cdkn2aP16ink4a</i>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	Inducing cell cycle arrest in G1 and G2 phases	1.51 (0.53)	3.23 (0.95)
<i>Tsyp12Cinap</i>	TSPY-like/SET/nucleosome assembly protein-1	Chromatin remodeling and as an inhibitor of cell-cycle progression	2.13 (0.82)	-1.41 (0.71)
<i>Mybl1,Amyb</i>	V-Myb Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog-Like 1	Strong transcriptional activator; involved in the proliferation and/or differentiation	-2.23 (0.56)	-3.75 (0.95)
<i>Mybl2,Bmyb</i>	V-Myb Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog-Like 2	Transcription factor involved in the regulation of cell survival, proliferation, and differentiation	-2.99 (0.91)	-1.42 (0.72)
<i>Hspa8,Hsc70</i>	Chaperone Heat Shock 70 kDa Protein 8	Increasing cell survival, repressor of transcriptional activation, participates in the ER-associated degradation	-1.85 (0.66)	-1.48 (0.73)
<i>Set</i>	SET Nuclear Proto-Oncogene	Inhibits acetylation of nucleosomes, especially histone H4, by histone acetylases	-1.56 (0.52)	-3.25 (0.95)
<i>Birc6,Kiaa1289</i>	Baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat Containing 6	Anti-apoptotic protein which can regulate cell death by controlling caspases	-1.0 (0.13)	-3.17 (0.96)
<i>Brca2,Fancd1</i>	Breast Cancer 2 Tumor Suppressor	Involved in maintenance of genome stability,	-2.68 (0.74)	-5.75 (0.99)
<i>Gas2,Gas-2</i>	Growth Arrest-Specific 2	Regulation of microfilament dynamic during both cell cycle and apoptosis	-3.65 (0.73)	-3.35 (0.95)
<i>Brca1</i>	Breast Cancer 1, Early Onset; E3 ubiquitin-protein ligase	Plays a role in maintaining genomic stability	-3.03 (0.90)	-4.10 (0.98)
<i>Bard1</i>	BRCA1 Associated RING Domain 1	Interacts with the BRCA1, involved in DNA repair	-3.39 (0.76)	-4.19 (0.98)
<i>Fancm,Kiaa1596</i>	Fanconi Anemia Group M Protein	Key reaction in DNA repair.	-4.25 (0.48)	-4.33 (0.93)
<i>Brip1,Fancj</i>	Interacting Protein C-Terminal Helicase 1	DNA-dependent ATPase and 5 to 3 DNA helicase required for the maintenance of chromosomal stability	-2.19 (0.58)	-5.00 (0.98)
<i>BLM</i>	DNA Helicase, RecQ-Like Type 2	DNA helicase, ATP dependent, involved in DNA replication and repair.	-2.61(0.76)	-2.36(0.96)

(Continued)

Table 4. (Continued)

Gene	Gene description	Putative function	Fold change NGS, 24 h after TDS (q)	Fold change NGS, 48 h after TDS (q)
<i>Rmi1</i>	RecQ Mediated Genome Instability 1	Role in the processing of homologous DNA recombination intermediates	-1.48 (0.41)	-3.65 (0.96)
<i>Rbl2</i>	Retinoblastoma-Like 2, cell cycle regulation interacting with E2F-like transcription factor	Key regulator of entry into cell division. Directly involved in heterochromatin formation by maintaining overall chromatin structure	-1.09 (0.16)	-3.06 (0.95)
<i>Rbl1</i>	Retinoblastoma-Like 1	Involved in cell cycle regulation, interacting with transcription factor E2F-4 and with cyclin E/A-CDK2 complexes	-2.09 (0.75)	-3.642 (0.96)
<i>Rb1</i>	Retinoblastoma 1	Key regulator of entry into cell division, promotes G0-G1 transition	-2.09 (0.75)	-3.87 (0.93)
Transcription regulation function				
<i>Ras111a</i>	RAS-Like, Family 11, Member A small GTPase	Regulator of rDNA transcription; mediated signal transduction	21.65 (0.93)	19.20 (0.99)
<i>Myc</i>	Proto-Oncogene C-Myc	Activates the transcription of growth-related genes	-1.15 (0.24)	3.39 (0.96)
<i>c-Fos</i>	Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog	Transcription factor involved in signal transduction, cell proliferation and differentiation		7.48(0.99)
Cell proliferation promoters				
<i>Cyr61,Ccn1</i>	Cysteine-Rich, Anigogenic Inducer, 61	Promotes cell proliferation, chemotaxis, angiogenesis and cell adhesion	1.77 (0.62)	3.89 (0.95)
<i>IL33</i>	Interleukin 33 chromatin-associated nuclear factor	Acts as a chromatin-associated nuclear factor with transcriptional repressor properties	2.28 (0.58)	23.05 (0.99)
<i>Fhl2</i>	Four And A Half LIM Domains 2	Molecular transmitter linking various signaling pathways to transcriptional regulation	1.58 (0.55)	5.94 (0.98)
Cell death inhibitors				
<i>Bcl2l1,Bclx</i>	Apoptosis Regulator Bcl-X	The longer isoform acts as an apoptotic inhibitor and the shorter form acts as an apoptotic activator.	1.73 (0.48)	1.49 (0.71)
<i>Bcl2l2,Kiaa0271</i>	Apoptosis Regulator BCL-W BCL2-like 2	Promotes cell survival, suppressing death-promoting activity of BAX.	1.03 (0.08)	1.93 (0.77)
<i>Bcl2a1</i>	BCL2-Related Protein A1	Retards apoptosis	2.27 (0.46)	2.13 (0.79)
<i>Bak1,Bak</i>	BCL2-Antagonist/Killer 1	Accelerates programmed cell death by binding to, and antagonizing the anti-apoptotic action of BCL2	1.4 (0.40)	1.78 (0.78)
<i>Bid</i>	BH3 Interacting Domain Death Agonist	Induce apoptosis	1.29 (0.32)	2.20 (0.92)
<i>Pink1</i>	Serine/Threonine-Protein Kinase PINK1	Protect against C2-ceramide-induced CAD cell death through the PI3K/AKT pathway	1.54 (0.49)	1.80 (0.78)
<i>Birc5,Api4</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 5	Inhibitor of apoptosis	1.04 (0.09)	1.77 (0.75)
<i>Grina,Nmdara1</i>	Transmembrane BAX Inhibitor Motif-Containing Protein 3	Glutamate receptor, potential apoptotic regulator	2.32 (0.85)	1.78 (0.79)
Apoptosis activators				
<i>Ppid</i>	Peptidylprolyl Isomerase D	Accelerate the folding of proteins, involved in apoptosis	-3.22 (0.78)	-3.26 (0.95)
<i>Bub1b, Mad3l</i>	Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase B,	Implicated in triggering apoptosis in polyploid cells	-2.34 (0.81)	-1.69 (0.77)
<i>Ifih1</i>	RNA Helicase-DEAD Box Protein 116	Involved in growth inhibition and apoptosis	-1.45 (0.27)	-4.56 (0.98)
Pro-apoptotic activators				
<i>Aen,Isg20l1</i>	Apoptosis Enhancing Nuclease	Exonuclease, mediates p53-induced apoptosis	2.68 (0.86)	6.22 (0.99)
<i>Bax</i>	BCL2-Associated X Protein	Accelerates programmed cell death by binding to, and antagonizing the apoptosis repressor BCL2	1.95 (0.66)	3.18 (0.95)

(Continued)

Table 4. (Continued)

Gene	Gene description	Putative function	Fold change NGS, 24 h after TDS (q)	Fold change NGS, 48 h after TDS (q)
<i>Phlda3</i>	Pleckstrin Homology-Like Domain 3	Contributes to p53/TP53-dependent apoptosis	2.01 (0.74)	6.57 (0.99)
<i>Pdcd4, Ma3</i>	Programmed Cell Death Protein 4	Participate in apoptotic process	2.31 (0.80)	-1.23 (0.60)
<i>Tnfrsf12a, Fgfrp2</i>	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 12A	Positive regulation of apoptotic process	-1.27 (0.36)	5.57 (0.98)
<i>Zc3h12a</i>	Zinc Finger CCCH-Type Containing 12A,	Triggers apoptosis	1.88 (0.56)	4.44 (0.98)
Protein synthesis				
<i>Larp4, Pp13296</i>	La Ribonucleoprotein Domain Family, Member 4	Stimulates mRNA translation	-2.17(0.63)	-3.48 (0.95)
<i>Larp4, D13wsu6</i>	La Ribonucleoprotein Domain Family, Member 4B	Stimulates mRNA translation	-2.24 (0.78)	-7.27 (0.99)
<i>Eif5</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5	Catalyzes the hydrolysis of GTP bound to the 40S ribosomal initiation complex	-1.94 (0.56)	-3.42 (0.95)
<i>Eif4a2</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A2	ATP-dependent RNA helicase which is a subunit of the eIF4F complex involved in cap recognition and is required for mRNA binding to ribosome	-3.49 (0.92)	-3.29 (0.95)
Secretion via ER				
<i>Sec61b</i>	Sec61 Beta Subunit,	beta-subunit protein of the Sec61 complex (transmembrane channel where proteins are translocated across ER membrane)	1.58 (0.54)	2.27 (0.92)
<i>Sec61g</i>	Sec61 Gamma Subunit	gamma—subunit protein of the Sec61 complex (transmembrane channel where proteins are translocated across ER membrane)	1.69 (0.53)	1.96 (0.78)
<i>Bip</i>	Heat Shock 70kD Protein 5	Master regulator chaperone	1.90 (0.68)	-1.08 (0.40)
<i>Uggt1, Uggt</i>	UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase	Re-glycosylates single N-glycans near the misfolded part of the protein, providing quality control for protein folding in the ER	-1.53 (0.53)	-2.97 (0.94)
<i>Mogs, Gcs1</i>	Mannosyl-Oligosaccharide Glucosidase	Exohydrolysis of the non-reducing terminal glucose residues in the mannosyl-oligosaccharide Glc(3)Man(9)GlcNAc(2)	-1.73 (0.60)	-1.47 (0.72)
<i>Calr</i>	Calreticulin	Calcium-binding chaperone that promotes folding, oligomeric assembly and quality control in the endoplasmic reticulum (ER)	1.69 (0.62)	1.61 (0.76)
<i>Canx</i>	Calnexin	Membrane ER chaperone that promotes folding	-1.31 (0.38)	-2.11 (0.92)
<i>Pdia3, Grp58</i>	Protein Disulfide Isomerase 3	Catalyzes the rearrangement of -S-S- bonds in proteins.	1.42 (0.47)	1.44 (0.72)
<i>Man1A2</i>	Alpha-1,2-Mannosidase IB	Involved in the maturation of Asn-linked oligosaccharides, trim alpha-1,2-linked mannose residues from Man(9)GlcNAc(2) to produce Man(5)GlcNAc(2)	-2.38(0.81)	-2.48(0.93)
<i>Ssr3</i>	Translocon-Associated Protein Gamma Subunit	Part of a complex that regulates the retention of ER resident proteins	-1.47 (0.45)	-3.00 (0.95)
<i>Herpud1</i>	Homocysteine-Inducible, ER Stress-Inducible, Ubiquitin-Like Domain Member 1	Involved in ubiquitin-dependent degradation of misfolded endoplasmic reticulum proteins.	2.06 (0.81)	1.32 (0.67)
<i>Pmm1</i>	Phosphomannomutase 1, D-mannose 6-phosphate	Catalyzing the second step in the conversion of fructose-6P to GDP-mannose	2.02 (0.74)	3.42 (0.95)
<i>Porcn, Porc</i>	Protein-Cysteine N-Palmitoyltransferase	Key regulator of the Wnt signaling pathway by mediating the attachment of palmitoleate, a 16-carbon monounsaturated fatty acid	1.61 (0.45)	4.54 (0.97)
<i>Dpm3</i>	Dolichyl-Phosphate Mannosyltransferase Polypeptide 3	Stabilizer subunit of the dolichol-phosphate mannose (DPM) synthase complex	1.42 (0.37)	3.34 (0.95)
<i>Fut1</i>	Fucosyltransferase 1	Participates in glycosphingolipid biosynthesis	-1.00 (0.07)	4.81 (0.96)

(Continued)

Table 4. (Continued)

Gene	Gene description	Putative function	Fold change NGS, 24 h after TDS (q)	Fold change NGS, 48 h after TDS (q)
<i>Neu1</i>	Sialidase 1	Cleaves terminal sialic acid residues from substrates such as glycoproteins and glycolipids	1.94 (0.67)	2.43 (0.93)
<i>Neu2</i>	Sialidase 2	Remove sialic acid residues from glycoproteins and glycolipids.	1.94 (0.67)	3.78 (0.96)
<i>Fuca1</i>	Alpha-L-Fucosidase I	Involved in the degradation of fucose-containing glycoproteins and glycolipids	1.38 (0.44)	2.00 (0.92)
<i>Fktn,Fcmd</i>	Fukutin, Glycosyltransferase	Involved in the biosynthesis of the phosphorylated O-mannosyl trisaccharide	-2.89(0.69)	-3.87 (0.95)
<i>Galnt1</i>	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 1	Catalyze the transfer of N-acetyl-D-galactosamine to serine and threonine residues	-1.43(0.41)	-2.178 (0.93)
<i>Galnt7</i>	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 7	Catalyze the transfer of N-acetyl-D-galactosamine to serine and threonine residues	-1.68 (0.52)	-2.48 (0.93)
<i>Galnt13</i>	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 13	Catalyze the transfer of N-acetyl-D-galactosamine to serine and threonine residues	-3.33 (0.33)	-2.55 (0.71)
<i>Slc35a3</i>	UDP-N-Acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) Transporter	Supply UDP-GlcNAc as substrate for Golgi-resident glycosyltransferases that generate branching of diantennary oligosaccharides.	-1.17 (0.18)	-3.93 (0.95)
Metabolism				
<i>Ldha</i>	Lactate dehydrogenase A	Glycolysis, energy pathway	2.51 (0.82)	3.15 (0.95)
<i>Ldhc</i>	Lactate Dehydrogenase C	Glycolysis, energy pathway	19.66 (0.97)	5.64 (0.98)
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Role in glycolysis and nuclear functions	-1.02 (0.09)	1.00 (0.21)
<i>Hk1</i>	Hexokinase 1	Glycolysis and gluconeogenesis, energy pathway	1.01 (0.09)	1.10 (0.44)
<i>Lct,Lph</i>	Lactase	Lactase activity	-2.08 (0.81)	-1.49 (0.73)
<i>Gls,Gls1</i>	Glutaminase	Catalyzes the hydrolysis of glutamine to glutamate and ammonia	1.52 (0.30)	2.70 (0.91)
<i>Asct2, Slc1a7</i>	Solute Carrier Family 1 (Glutamate Transporter), 7	Transports L-glutamate	-1.12 (0.19)	1.83 (0.79)
<i>Ppcdc,Coac</i>	Phosphopantothenoylcysteine Decarboxylase	Biosynthesis of coenzyme A (CoA) from pantothenic acid (vitamin B5)	3.27 (0.82)	3.73 (0.96)
<i>Pgp</i>	Phosphoglycolate Phosphatase	Phosphoglycolate phosphatase activity	-1.03 (0.10)	3.95 (0.95)
<i>Galk1</i>	Galactokinase 1	Major enzyme for galactose metabolism	-1.10 (0.18)	3.58 (0.96)
<i>Ndufb7</i>	NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 Beta Subcomplex, 7	Accessory subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I)	1.49 (0.44)	4.44 (0.98)
<i>Ndufs7</i>	NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S Protein 7	Core subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I)	-1.07 (0.15)	3.10 (0.95)
<i>Cbr2</i>	Carbonyl Reductase 2	Carbonyl reductase	1.87 (0.41)	4.58 (0.97)
<i>Cbr3</i>	Carbonyl Reductase 3	Carbonyl reductase	1.70 (0.42)	4.23 (0.98)
<i>Gst1</i>	Glutathione S-Transferase Pi 1	Conjugation of reduced glutathione to a exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles	1.00 (0.21)	1.02 (0.54)

doi:10.1371/journal.pone.0151529.t004

Table). p21 is a cyclin-dependent kinase inhibitor that can arrest cell growth through proteins such as CCND1, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk6, and probably HSPA8 [60–62]. The overexpression of *Cdkn1a* is consistent with p21 overexpression in CHO-K1 cells after TDS [53], and the effect of p21 has been associated with an inhibition of cell proliferation and increase in recombinant protein productivity [63]. Furthermore, *Cdkn2a*, which encodes for two distinct proteins (p16INK4a and p14ARF) [64,65] involved in cell cycle arrest [66,67], was overexpressed at 48

h after TDS (Table 4 and S1 Table). Thus, the inhibition of cell proliferation and cell cycle arrest due to TDS might be related to the overexpression of *Cdkn1a* and *Cdkn2a*. Moreover, at 24 h after TDS, the gene coding for TSPYL2, a negative cell cycle regulator that could help in arresting cell growth in combination with p21 [68], was upregulated (Table 4 and S1 Table). Additionally, genes coding for MYBL2 and MYBL1, which are transcription factors that promote cell proliferation [69–71], were repressed (Table 4 and S1 Table). *Mybl2* inhibition diminishes proliferation of different cells [72,73], while MYBL proteins can induce transcriptional activation of genes like those that control apoptosis, such as *Api5*, *Birc3*, *Hspa8*, and *Set* [74,75]. In accordance with the repression of *Mybl2* and *Mybl1*, we observed the repression of *Hspa8*, *Set* (TAF1), and *Birc6* (Table 4 and S1 Table). TDS caused (in the two timepoints analyzed) the repression of genes coding for BRCA2 and growth-arrest-specific 2 (GAS2) (Table 4 and S1 Table). The repression of these genes has been associated with non-dividing cells [76,77] and with an anti-apoptotic response through p53 [78,79]. Genes coding for BRCA1 and BARD1, which participate in inhibiting cell proliferation [80,81], were also repressed at both timepoints studied (S1 Table). Interestingly, genes coding for FANCM, BRCA2, FANCI, BRIP1, BRCA1, BLM, and RMI1, which are overexpressed in disease resulting from genomic instability [82–84], were downregulated after TDS (Fig 4, Table 4 and S1 Table). All these data suggest that TDS promotes cell growth arrest and negatively controls cell proliferation without activating the DNA damage response.

Differentially expressed transcripts involved in transcription

In this category, 21 genes were differentially expressed at 24 h, and 93 genes were differentially expressed at 48 h after TDS (S1 Table). Interestingly, *Rasl11a*, which codes for a GTPase associated with positive regulation of the transcriptional activity of an RNA polymerase I [85], was highly overexpressed at both time points (21.65- and 19.20-fold, respectively). Moreover, genes coding for the transcription factors Myc and c-FOS, which are involved in growth and cell cycle progression [86,87], were overexpressed at 48 h after TDS (Table 4 and S1 Table). Overexpression of c-FOS in OVCAR8 and SKOV3 cells upregulated the expression of genes involved in O-linked and N-linked glycosylation, like *FUCA1*, *Man1a1*, *Ganab*, and *Neu1*, and downregulated *Galnt12* and *Galnt14*, among other genes [88]. In this work, TDS caused similar upregulation of *FUCA1* and *Neu1/2* and downregulation of *Galnt1*, *Galnt7*, and *Galnt13* (all with a $q > 0.7$), which are probably downstream of c-FOS (Table 4 and S1 Table).

Differentially expressed transcripts related to the delay of cell death

In this group, 8 and 16 genes were differentially expressed at 24 h and 48 h, respectively, of culture after TDS. Genes coding for cell proliferation promoters and antagonists of programmed cell death were overexpressed. Moreover, genes coding for proteins related to apoptotic activation were repressed although the overexpression of pro-apoptotic genes.

TDS causes the overexpression of genes coding for cell proliferation promoters such as *Cyr61* (upregulated in both times), alarmin IL33, and *Fhl2* (four and a half LIM domains protein 2). In order to avoid apoptosis, genes coding for potent cell death inhibitors such as Bcl-2-like protein 1 (*Bcl-X*) [89] and Bcl-2-like protein 2 (*Bcl2l2*), which mediate cell survival by suppressing the death-promoting activity of BAX [90], were overexpressed at 48 h post TDS (1.49-fold and 1.93-fold, respectively; $q > 0.7$, Table 4). The mechanism that increases Bcl-xL, which is an isoform of Bcl-X, avoids the translocation of BAX, but has been related to the cold preservation of cardiac tissues [91]. Furthermore, the gene *Bcl2a1*, which codes for Bcl-2-related protein A1 and can retard apoptosis and maintain cell survival by interaction with BAK1, BID, BMF, BCL2L11/BIM, and BAX [92,93], was overexpressed at 48 h after TDS

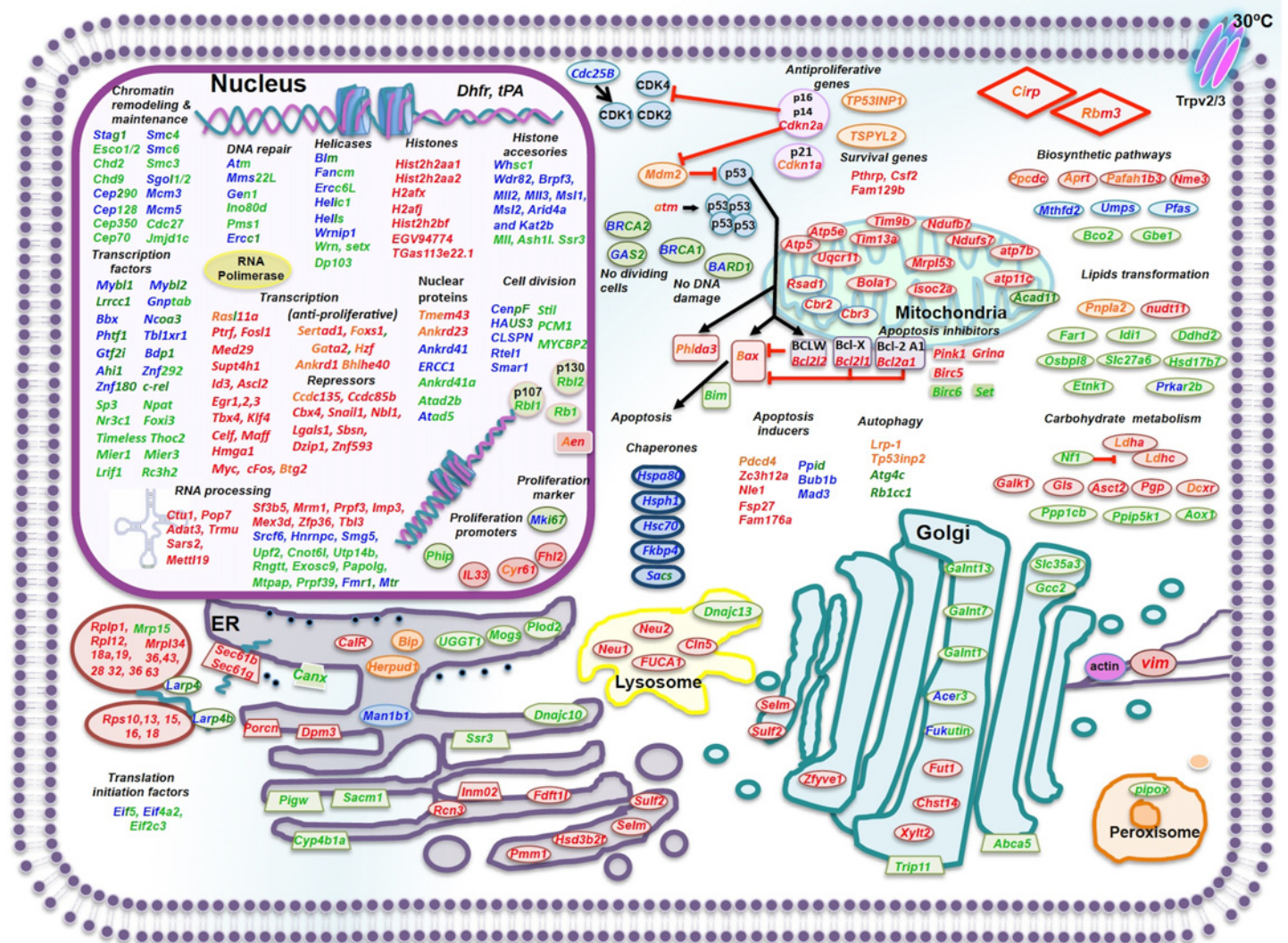


Fig 4. Pictorial representation of transcripts expressed differentially in response to moderate hypothermia after 24 or 48 h of exposition. Differentially expressed genes after 24 h of TDS, up regulated genes are presented in orange; down regulated genes are presented in blue. Differentially expressed genes after 48 h of TDS, up regulated genes are presented in red; down regulated genes are presented in green. Black arrows and red lines represent stimulation and inhibition, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0151529.g004

(2.1-fold; q 0.79, Table 4). Likewise, gene coding for PINK1, which can protect against C2-ceramide-induced CAD cell death through the PI3K/AKT pathway [94], and BIRC5 [95], which can increase cell proliferation and prevent apoptosis, were overexpressed at 48 h post TDS (1.8- and 1.7-fold, respectively; $q > 0.75$, Table 4). In addition, the gene *Grina*, which codes for an apoptotic regulator and controls cell death [96], was overexpressed after 24 h of TDS (Table 4 and S1 Table). Furthermore, genes coding for proteins related to apoptosis activation were downregulated, as was the gene coding for peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D (PPID) (downregulated at both time points), the gene coding for Bub1B (downregulated at 24 h), and *Iih1* (downregulated at 48 h after TDS) (Table 4 and S1 Table).

In contrast, genes coding for pro-apoptotic proteins (*Aen*, *Bax*, and *Phlda3*) were upregulated at both time points analyzed (Table 4 and S1 Table). Moreover, the gene that codes for the programmed cell death protein 4 (*Pdcd4*) was upregulated at 24 h, and the genes coding for

the induction of apoptosis, such as tumor necrosis factor receptor (Tnfrsf12a), ribonuclease, and ZC3H12A, were upregulated at 48 h (Table 4 and S1 Table).

Since anti- and pro-apoptotic genes were upregulated, we suggest a complex interplay in regulatory responses, with the most important signal being the anti-apoptotic response, because the cell culture viability and metabolism were extended.

TDS differentially regulates transcripts associated with protein synthesis and secretion

TDS has been shown to not only increase the productivity of various heterologous proteins, but also to modify their glycosylation patterns [7,32,97]. Hence, we analyzed the effect of TDS on the transcriptome response associated with protein synthesis (ribosome and translation) as well as with protein secretion. A significant upregulation of genes related to ribosomal biogenesis was observed (3 genes 24 h after TDS, and up to 40 genes 48 h after TDS). Most genes encoding for ribosomal proteins belonging to the Rpl, Mrpl, Mrps, and Rps families were upregulated 48 h after TDS (S1 Table). This contrasts with the data reported by Yee *et al.* [18], who observed a downregulation of seven genes, with three from the same family upregulated at 18 h after TDS. This was probably in response to the cells' increased transcription of ribosome-biogenesis genes, showing a protein-synthesis capacity that had adapted to TDS over time (up to 48 h after TDS). Genes coding for proteins related to mRNA translation (Larp4, Larp4b, and initiation factors Eif5 and Eif4a2) were downregulated at both timepoints under investigation (Table 4 and S1 Table).

With respect to the secretion via ER, the genes coding for Sec61 β and Sec61 δ , which are part of the translocation complex [98], were overexpressed (2.26- and 1.96-fold, respectively, 48 h after TDS; $q > 0.78$, Table 4) and presented similar changes after RT-PCR analysis (Table 3). The gene coding for Bip/Hspa5, the master regulator chaperone that assists in translocation, folding, and stabilization of nascent chains [99], was upregulated (1.9-fold at 24 h post TDS; $q = 0.68$, Table 4). Different enzymes remodel proteins in the lumen of the ER and participate in *N*-glycosylation. These enzymes include oligosaccharyltransferase, glucosidases I (GIsI) and II (GIsII), and UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT1), which is also a folding sensor in ER quality control (ERQC) [100,101]. After 24 h of TDS *Mogs*, which codes for Glucosidase I, was downregulated (1.73-fold; $q = 0.60$, Table 4), and after 48 h of TDS, downregulation of the gene coding for UGGT1 (2.97-fold; $q = 0.94$, Table 4) was observed. Once monoglucosylated glycans are formed, they become ligands for the chaperones calnexin and calreticulin, which can interact with oxidoreductases and protein disulfide-isomerase A3 (ERp57/PDIA3) for the rearrangement of disulfide bonds until the nascent protein reaches its native conformation [101]. An interesting finding was that after 48 h, TDS upregulated the expression of the gene coding for calreticulin (1.6-fold; $q = 0.76$, Table 4), while at the same time repressing the gene coding for calnexin (2.11-fold; $q = 0.92$, Table 4). Meanwhile, the gene coding for PDIA3 remained at a constant value (Tables 3 and 4). Proteins that do not correctly fold are recognized by α -mannosidase I, which trims mannoses, and by enhancing α -mannosidase-like 1 (EDEM), marks them for degradation in the proteasome [102]. After 24 h of TDS, the gene *Man1A2* that codes for α -mannosidase I was downregulated (2.38-fold; $q = 0.81$, Table 4). Likewise, the gene *Ssr3*, which codes for translocon-associated protein subunit gamma (TRAPG), was repressed after 48 h of TDS (Table 4 and S1 Table). TRAPG regulates the retention of ER proteins and marks misfolded proteins to be degraded [103]. Remarkably, the gene coding for Herpud1 was overexpressed 24 h after TDS (Table 4 and S1 Table), although Herpud1 has been associated with ERQC [104].

Other genes coding for enzymes that participate in posttranslational modifications were also differentially expressed during TDS. The gene *Pmm1*, which codes for the enzyme localized at ER and is involved in GDP-mannose and dolichol-phosphate-mannose synthesis [105], was overexpressed at both time points analyzed (Table 4 and S1 Table). Genes coding for N-palmitoyltransferase (*Porcn*) and dolichol-phosphate mannosyltransferase 3 (*Dpm3*), both from the ER [106,107], were upregulated after 48 h of TDS (Table 4 and S1 Table). At the same time, an upregulation of the gene *Fut1*, which codes for the Golgi enzyme galactoside 2-L-fucosyltransferase, was observed (Table 4 and S1 Table). Coding genes for enzymes related to the modification of protein glycosylation profiles were upregulated 48 h after TDS, including *Neu1* and *Neu2* (2.43- and 3.78-fold, respectively; $q > 0.93$, Table 4), which code for Sialidases 1 and 2 and participate in the removal of sialic acid residues. Likewise, the gene coding for lysosomal alpha-L-fucosidase (*FUCA1*) was overexpressed at 48 h after TDS (2-fold; $q = 0.92$, Table 4). In contrast, *Fukutin* (*FKTN*), which codes for a glycosyltransferase that is localized in the Golgi, was downregulated at both timepoints (Table 4 and S1 Table). In addition, genes coding for the enzymes N-acetylgalactosaminyltransferase 1, 7, and 13 (GALNT1, 7, and 13), which transfer an N-acetyl-D-galactosamine to peptides localized at the Golgi, were repressed after 48 h of TDS (2.17-, 2.47-, and 2.55-fold, respectively, $q > 0.7$, Table 4). The same downregulation was observed for the gene *Slc35a3* (Table 4 and S1 Table), which codes for UDP-N-acetylglucosamine transporter that is crucial in N-glycan branching [108].

The transcriptome data described here may be related to modifications in rh-tPA glycosylation caused by TDS [27, 32, 109]. An increased site-occupancy of t-PA around 4% and 7% were found after TDS at 31°C [109] and 33°C [32], respectively, compared with cultures at 37°C. It has been suggested that a site-occupancy increase is associated with lipid-linked oligosaccharide pools [32], as well as differences in bi-antennary and glycan profiles of other proteins [7]. Moreover, a modification in high mannose structures of the single chain t-PA was observed at 48 h post TDS, relative to the control at 37°C [27]. Related to this, we observed the upregulation of *Pmm1* and *Dpm3*, which code for proteins involved in synthesis and transport of nucleotide sugars and dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis. Furthermore, variations in glycosylation could be associated with changes in the expression of genes coding for UGGT1, glucosidase I, α -mannosidase I, and TRAPG, which were all downregulated in this work.

Hendrick et al. [27] observed differential recognition of lectin *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) by endogenous glycoproteins produced after TDS, indicating changes in N-acetylneuraminic acid α (2id n In our work, the gene coding for α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal1) did not change, but the genes *Neu1* and *Neu2* (coding for sialidases) were overexpressed, which could be related to differences in sialic acid content.

Altogether, the changes observed suggest that TDS caused a positive effect in ribosomal biogenesis and variation in genes involved in posttranslational modification via ER and Golgi (Fig 4). This could cause changes in the glycosylation patterns of proteins and enhance rh-tPA productivity. Information on all of these gene modifications can be helpful for understanding how the glycosylation pattern of a given recombinant therapeutic protein is affected in a particular host cell line under TDS, an important point to consider during the production of therapeutic glycoproteins.

TDS modifies transcription of genes associated with metabolism

Different studies have demonstrated the relevance of metabolic responses of CHO cells to TDS [7,38,110]. Based on GO term assignment, 77 assembled genes were annotated under “metabolism and energy metabolism.” TDS modified genes related to the glycolytic and glutaminolysis

pathways and energy metabolism. After TDS, *Ldha/Ldhc*, which code for glycolytic enzymes such as the L-lactate dehydrogenase (LDH) A/C chain [111], were upregulated at both time-points (Table 4 and S1 Table). Using RT-PCR analysis, *Ldha* presented similar changes after 48 h (Table 3). During the first 48 h after TDS, the overexpression of such genes may be related to lactate production, similar to the control conditions (Fig 1F). The increase in LDH activity has been observed in cold acclimation of rat skeletal muscle, without changes in hexokinase II and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins levels [112]. In comparison, we observed constant values for the genes *Hk1* and *Gapdh*, which code for those enzymes, respectively. The constant expression of *Gapdh* also was verified by RT-PCR (Table 4). At 24 h post TDS, *Lct*, which codes for lactase (known as β -galactosidase) and participates in conversion of lactose into galactose and glucose, was down-regulated (Table 4 and S1 Table). With respect to glutaminolysis, the gene *Gls*, which codes for glutaminase and catalyzes the conversion of glutamine into glutamate and ammonia as well as *Asct2*, which codes for a glutamine transporter, were overexpressed 48 h after TDS (2.70- and 1.83-fold, respectively $q > 0.79$, Table 4). It is possible that the overexpression of both genes can compensate for the decreased transporter activity after TDS and can explain why q_{gln} remains relatively constant after TDS (Table 2). Other central metabolism genes were affected, including the up-regulation of *Ppcdc* at both timepoints (Table 4 and S1 Table), which codes for a cytoplasmic enzyme that is necessary for acetyl CoA biosynthesis [113]. *Pgp* and *Galk1*, which code for phosphoglycolate phosphatase and galactokinase, respectively, were over-expressed 48 h post TDS (Table 4 and S1 Table).

Interestingly, genes coding for retinoblastoma proteins Rbl2 (p130), Rbl1 (p107) (Table 4), and Rb1 (with q 0.93), which can inhibit cell cycle progression, were repressed after 48 h of the TDS. The loss of function of Rb-1, Rbl1, and Rbl2 through triple knock-outs increase the formation of tricarboxylic acid cycle (TCA) intermediates from glutamine [114], which could be related with TCA cycling, mitochondrial metabolism, and recombinant protein production peaks [115] although, we did not see any differential expression of genes involved in the TCA in the current study.

The differentially expressed transcripts related to energy metabolism in mitochondria showed that all of the genes clustered in this group (ten genes) were up-regulated 48 h after TDS (S1 Table), in agreement with extended cell survival and suggesting high mitochondrial activity (Fig 1). Another four genes (of the five found that had altered expression) involved in NADH metabolism were up-regulated after 48 h of TDS (S1 Table). Like *Ndufb7* and *Ndufs7*, which code for NADH dehydrogenases and are required to transfer electrons from NADH to the respiratory chain [116], and *Cbr2* and *Cbr3*, which code for NADPH carbonyl reductases (Table 4 and S1 Table).

Based on the transcriptomic results, extension of the growth phase in cultures under TDS can be associated with the maintenance of active central metabolism and cellular respiration as well as mitochondrial biogenesis. Altogether, most of the transcriptional changes promote the avoidance of apoptotic cell death, and those changes could be associated with the increase in rh-tPA productivity. Finally, the findings reported in the present study provide an informative transcriptome resource, mainly dealing with genes relevant to extending the culture life combined with the increase of recombinant protein productivity after 24 and 48 h of TDS exposure. In the same sense, we are characterizing the proteomic response and the relationship between glycosylation and secretory machinery in this biological model. The information presented should advance the understanding of the responses involved in cold adaptation, increase the knowledge of recombinant CHO cell biology, and can be useful for establishing improved bioprocesses for optimizing the quality and productivity of biopharmaceutical proteins.

Supporting Information

S1 Fig. Analysis of differential expression. Transcriptome contigs were aligned with Ensembl, Genome CHO and GenBank using BLAST, an annotation was assigned to each contig. Differential expression was completed using NOISeq algorithm for comparison of samples 48 h (control) and 72 h (24 h after TDS, biphasic) single end ($q > 0.8$) and 48 h (control) and 96 h (48 h after TDS, biphasic) paired ends ($q > 0.9$), and then clustering was conducted using the TopGO algorithm. (DOCX)

S1 Table. Gene expression profiles at 24 and 48 h after TDS of CHO cell culture producing rh-tPA. Only protein-coding genes are shown. Eight main groups are presented. Red color indicates low expression levels, and green color indicates high expression levels. The gene names are shown in the middle of the table and the gene accession numbers are presented. Those differentially expressed genes (>1.6 fold change) were enriched by gene ontology annotation at 24 h (171 genes $q \geq 0.8$ and 70 genes $0.6 \geq q < 0.8$) and 48 h (638 genes, $q \geq 0.95$) after TDS and classified in sub-ontologies. (DOC)

Acknowledgments

We thank Dra. Leticia Vega-Alvarado and Dr. Ricardo Grande for their technical assistance during RNA-seq treatment, and Eng. Abel Blancas Cabrera for his technical assistance. Also, we thank Ana Carmen Delgado for reviewing the English version of the manuscript. We would like to thank Editage (www.editage.com) for proofreading of this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ABL ASF MATR NAVC. Performed the experiments: ABL KE ASF NAVC. Analyzed the data: ABL KE ASF OTR CA MATR NAVC. Contributed reagents/materials/analysis tools: ASF OTR CA MATR NAVC. Wrote the paper: ABL KE ASF OTR CA LS JMR MATR NAVC.

References

1. Butler M, Spearman M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2014; 30:107–112. doi: [10.1016/j.copbio.2014.06.010](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.010) PMID: [25005678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25005678/)
2. Wuest DM, Harcum SW, Lee KH. Genomics in mammalian cell culture bioprocessing. *Biotechnol Adv*. 2012; 30(3):629–638. doi: [10.1016/j.biotechadv.2011.10.010](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.010) PMID: [22079893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22079893/)
3. Fox SR, Patel UA, Yap MG, Wang DI. Maximizing interferon-gamma production by Chinese Hamster Ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol Bioeng*. 2004; 85(2):177–184. PMID: [14705000](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14705000/)
4. Yoon SK, Hong JK, Choo SH, Song JY, Park HW, Lee GM. Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. *J Biotechnol*. 2006; 122(4):463–72. PMID: [16253368](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16253368/)
5. Al-Fageeh MB, Smales CM. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J*. 2006; 397(2):247–259. PMID: [16792527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16792527/)
6. Kou TC, Fan L, Zhou Y, Ye ZY, Liu XP, Zhao L, et al. Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature. *J Biosci Bioeng*. 2011; 111(3):365–369. doi: [10.1016/j.jbiosc.2010.11.016](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.11.016) PMID: [21169054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21169054/)
7. Sou SN, Sellick C, Lee K, Mason A, Kyriakopoulos S, Polizzi KM, et al. How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation?. *Biotechnol Bioeng*. 2015; 112(6):1165–1176. doi: [10.1002/bit.25524](https://doi.org/10.1002/bit.25524) PMID: [25545631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25545631/)

8. Wulhfard S, Tissot S, Bouchet S, Cevey J, De Jesus M, Hacker DL, et al. Mild hypothermia improves transient gene expression yields several fold in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog*. 2008; 24(2):458–465. doi: [10.1021/bp070286c](https://doi.org/10.1021/bp070286c) PMID: [18220408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18220408/)
9. Swiderek H, Al-rubeai M. Functional genome-wide analysis of antibody producing NS0 cell line cultivated at different temperatures. *Biotechnol Bioeng*. 2007; 98(3):616–630. PMID: [17421047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17421047/)
10. Vergara M, Becerra S, Berrios J, Osses N, Reyes J, Rodríguez-Moyá M, et al. Differential effect of culture temperature and specific growth rate on CHO cell behavior in chemostat culture. *PLoS One*. 2014; 9(4):e93865. doi: [10.1371/journal.pone.0093865](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093865) PMID: [24699760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24699760/)
11. Ahn WS, Jeon JJ, Jeong YR, Lee SJ, Yoon SK. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2008; 101(6):1234–1244. doi: [10.1002/bit.22006](https://doi.org/10.1002/bit.22006) PMID: [18980186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18980186/)
12. Oguchi S, Saito H, Tsukahara M, Tsumura H. pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology*. 2006; 52(3):199–207. doi: [10.1007/s10616-007-9059-2](https://doi.org/10.1007/s10616-007-9059-2) PMID: [19002878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19002878/)
13. Yoon SK, Song JY, Lee GM. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 2003; 82(3):289–298. PMID: [12599255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12599255/)
14. Gettmann J, Timmermann C, Becker J, Thüte T, Rupp O, Büntemeyer H, et al. Multidimension cultivation analysis by standard and omics methods for optimization of therapeutics production. *BMC Proc*. 2013; 7(Suppl 6):P5.
15. Vishwanathan N, Yongky A, Johnson KC, Fu HY, Jacob NM, Le H, et al. Global insights into the Chinese hamster and CHO cell transcriptomes. *Biotechnol Bioeng*. 2015; 112(5):965–976 doi: [10.1002/bit.25513](https://doi.org/10.1002/bit.25513) PMID: [25450749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25450749/)
16. Baik JY, Lee MS, An SR, Yoon SK, Joo EJ, Kim YH, et al. Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 93(2):361–371. PMID: [16187333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16187333/)
17. Kantardjieff A, Jacob NM, Yee JC, Epstein E, Kok YJ, Philp R, et al. Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. *J Biotechnol*. 2010; 145(2):143–159. doi: [10.1016/j.jbiotec.2009.09.008](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.09.008) PMID: [19770009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19770009/)
18. Yee JC, Gerdtzen ZP, Hu WS. Comparative transcriptome analysis to unveil genes affecting recombinant protein productivity in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*. 2009; 102(1):246–63. doi: [10.1002/bit.22039](https://doi.org/10.1002/bit.22039) PMID: [18726962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18726962/)
19. Becker J, Hackl M, Rupp O, Jakobi T, Schneider J, Szczepanowski R, Bekel T, et al. Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *J Biotechnol*. 2011; 156(3):227–235. doi: [10.1016/j.jbiotec.2011.09.014](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.014) PMID: [21945585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945585/)
20. Sanchez-Flores A, Abreu-Goodger C. A Practical Guide to Sequencing Genomes and Transcriptomes. *Curr Top Med Chem*. 2014; 14(3):398–406. PMID: [24304310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24304310/)
21. Lewis NE, Liu X, Li Y, Nagarajan H, Yerganian G, O'Brien E, et al. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol*. 2013; 31(8):759–765. doi: [10.1038/nbt.2624](https://doi.org/10.1038/nbt.2624) PMID: [23873082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23873082/)
22. Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol*. 2011; 29(8):735–41. doi: [10.1038/nbt.1932](https://doi.org/10.1038/nbt.1932) PMID: [21804562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21804562/)
23. Rupp O, Becker J, Brinkrolf K, Timmermann C, Borth N, Pühler A, et al. Construction of a public CHO cell line transcript database using versatile bioinformatics analysis pipelines. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85568. doi: [10.1371/journal.pone.0085568](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085568) PMID: [24427317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24427317/)
24. Fomina-Yadlin D, Mujacic M, Maggiora K, Quesnell G, Saleem R, McGrew JT. Transcriptome analysis of a CHO cell line expressing a recombinant therapeutic protein treated with inducers of protein expression. *J Biotechnol*. 2015; 212:106–15. doi: [10.1016/j.jbiotec.2015.08.025](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.025) PMID: [26325199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26325199/)
25. Doolan P, Barron N, Kinsella P, Clarke C, Meleady P, O'Sullivan F, et al. Microarray expression profiling identifies genes regulating sustained cell specific productivity (S-Qp) in CHO K1 production cell lines. *Biotechnol J*. 2011; 7(4):516–526.
26. Altamirano C, Becerra S. Specific nutrient supplementation of defined serum-free medium for the improvement of CHO cells growth and t-PA production. *Electron J Biotechnol*. 2006; 9(1).
27. Hendrick V, Winnepenninckx P, Abdelkafi C, Vandeputte O, Cherlet M, Marique T, et al. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology*. 2001; 36(1–3):71–83. doi: [10.1023/A:1014088919546](https://doi.org/10.1023/A:1014088919546) PMID: [19003317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19003317/)

28. Hammond S, Lee KH. RNA interference of cofilin in Chinese hamster ovary cells improves recombinant protein productivity. *Biotechnol Bioeng.* 2012; 109(2):528–535. doi: [10.1002/bit.23322](https://doi.org/10.1002/bit.23322) PMID: [21915848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21915848/)
29. Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* 2011; 21(12):2213–2223. doi: [10.1101/gr.124321.111](https://doi.org/10.1101/gr.124321.111) PMID: [21903743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21903743/)
30. Alexa A, Rahnenfuhrer J (2010). topGO: topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology. R package version 2.22.0. bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html
31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402–408. PMID: [11846609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/)
32. Andersen DC, Bridges T, Gawlitzek M, Hoy C. Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in Plasminogen activator. *Biotechnol Bioeng.* 2000; 70(1):25–31. PMID: [10940860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10940860/)
33. Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M, Bailey JE. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 1999; 63(5):573–582. PMID: [10397813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10397813/)
34. Fox SR, Tan HK, Tan MC, Wong SC, Yap MG, Wang DI. A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon-gamma by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2005; 41(Pt 3):255–264. PMID: [15504103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15504103/)
35. Vergara M, Berrios J, Martínez I, Díaz-Barrera A, Acevedo C, Reyes JG, et al. Endoplasmic reticulum-associated rht-PA processing in CHO cells: influence of mild hypothermia and specific growth rates in batch and chemostat cultures. *PLoS One.* 2015; 10(12):e0144224. doi: [10.1371/journal.pone.0144224](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144224) PMID: [26659083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26659083/)
36. Altamirano C, Illanes A, Casablancas A, Gámez X, Cairó JJ, Gòdia C. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol Prog.* 2001; 17(6):1032–1041. PMID: [11735437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11735437/)
37. Bollati-Fogolin M, Wagner R, Etcheverrigaray M, Kratje R. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J Biotechnol.* 2004; 109(1–2):179–191. PMID: [15063626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15063626/)
38. Marchant RJ, Al-Fageeh MB, Underhill MF, Racher AJ, Smales CM. Metabolic rates, growth phase, and mRNA levels influence cell-specific antibody production levels from in vitro-cultured mammalian cells at sub-physiological temperatures. *Mol Biotechnol.* 2008; 39(1):69–77. doi: [10.1007/s12033-008-9032-0](https://doi.org/10.1007/s12033-008-9032-0) PMID: [18253867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18253867/)
39. Jagya N, Varma SP, Thakral D, Joshi P, Durgapal H, Panda SK. RNA-Seq based transcriptome analysis of Hepatitis E Virus (HEV) and Hepatitis B Virus (HBV) replicon transfected Huh-7 cells. *PLoS One.* 2014; 9(2):e87835. doi: [10.1371/journal.pone.0087835](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087835) PMID: [24505321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24505321/)
40. Richard H, Schulz MH, Sultan M, Nürnberger A, Schrinner S, Balzereit D, et al. Prediction of alternative isoforms from exon expression levels in RNA-Seq experiments. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(10):e112. doi: [10.1093/nar/gkq041](https://doi.org/10.1093/nar/gkq041) PMID: [20150413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20150413/)
41. Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Xue JH, Itoh K, et al. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236(3):804–807. PMID: [9245737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9245737/)
42. Ilmjärvi S, Hundahl CA, Reimets R, Niitsoo M, Kolde R, Vilo J, et al. Estimating differential expression from multiple indicators. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(8):e72. doi: [10.1093/nar/gku158](https://doi.org/10.1093/nar/gku158) PMID: [24586062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24586062/)
43. Neutelings T, Lambert CA, Nusgens BV, Colige AC. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One.* 2013; 8(7):e69687. doi: [10.1371/journal.pone.0069687](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069687) PMID: [23936078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23936078/)
44. Xia ZP, Zheng XM, Zheng H, Liu XJ, Liu GY, Wang XH. Down-regulation of cold-inducible RNA-binding protein activates mitogen-activated protein kinases and impairs spermatogenic function in mouse testes. *Asian J Androl.* 2012; 14(6):884–889. doi: [10.1038/aja.2012.71](https://doi.org/10.1038/aja.2012.71) PMID: [23001445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23001445/)
45. Kumar N, Gammell P, Meleady P, Henry M, Clynes M. Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC Biotechnol.* 2008; 8:42. doi: [10.1186/1472-6750-8-42](https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-42) PMID: [18430238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18430238/)
46. Steinert PM, Roop DR. Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments. *Annu Rev Biochem.* 1988; 57(1):593–625.
47. Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, Waltham MC, Arvanitis A, Minichiello J et al. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Invest.* 2003; 83(3):435–448. PMID: [12649344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12649344/)

48. Gilles C, Polette M, Zahm JM, Tournier JM, Volders L, Foidart JM, et al. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci.* 1999; 112(24):4615–4625.
49. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science.* 2002; 296(5575):2046–2049. PMID: [12016205](#)
50. Matijasevic Z, Snyder JE, Ludlum DB. Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts. *Oncol. Res.* 1998; 10:605–610. PMID: [10367942](#)
51. Ohnishi T, Wang X, Ohnishi K, Takahashi A. p53-dependent induction of WAF1 by cold shock in human glioblastoma cells. *Oncogene.* 1998; 16:1507–1511. PMID: [9525749](#)
52. Roobol A, Carden MJ, Newsam RJ, Smales CM. Biochemical insights into the mechanisms central to the response of mammalian cells to cold-stress and subsequent rewarming. *FEBS J.* 2009; 276:286–302. doi: [10.1111/j.1742-4658.2008.06781.x](#) PMID: [19054067](#)
53. Roobol WB, Roobol J, Carden MJ, Bastide A, Willis AE, Dunn WB, et al. ATR (ataxia telangiectasia mutated- and Rad3-related kinase) is activated by mild hypothermia in mammalian cells and subsequently activates p53. *Biochem J.* 2011; 435(2):499–508. doi: [10.1042/BJ20101303](#) PMID: [21284603](#)
54. Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, et al. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* 1998; 20(4):398–400. PMID: [9843217](#)
55. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(8):616–627. doi: [10.1038/nrm2450](#) PMID: [18594563](#)
56. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(5):402–412. doi: [10.1038/nrm2395](#) PMID: [18431400](#)
57. Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14(5):359–370. doi: [10.1038/nrc3711](#) PMID: [24739573](#)
58. Brooks CL, Gu W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 21(3):307–315. PMID: [16455486](#)
59. Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, et al. TP53INP1s and homeo-domain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem.* 2003; 278(39):37722–37729. PMID: [12851404](#)
60. Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* 2002; 21:2672–81. PMID: [12032080](#)
61. Liu W, Chen Y, Lu G, Sun L, Si J. Down-regulation of HSP70 sensitizes gastric epithelial cells to apoptosis and growth retardation triggered by *H. pylori*. *BMC Gastroenterol.* 2011; 11(1):146.
62. Zhang H, Zhang X, Ji S, Hao C, Mu Y, Sun J, et al. Sohlh2 inhibits ovarian cancer cell proliferation by up-regulation of p21 and down-regulation of cyclin D1. *Carcinogenesis.* 2014; 35(8):1863–1871. doi: [10.1093/carcin/bgu113](#) PMID: [24858206](#)
63. Bi JX, Shuttleworth J, Al-Rubeai M. Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1-arrested CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 2004; 85(7):741–749. PMID: [14991652](#)
64. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 1995; 83(6):993–1000. PMID: [8521522](#)
65. Rutter JL, Goldstein AM, Dávila MR, Tucker MA, Struewing JP. CDKN2A point mutations D153spl (c.457G>T) and IVS2+1G>T result in aberrant splice products affecting both p16INK4a and p14ARF. *Oncogene.* 2003; 22(28):4444–4448. PMID: [12853981](#)
66. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993; 366(6456):704–707. PMID: [8259215](#)
67. Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int.* 2002; 52(5–6):375–383. PMID: [12100520](#)
68. Tao KP, Fong SW, Lu Z, Ching YP, Chan KW, Chan SY. TSPYL2 is important for G1 checkpoint maintenance upon DNA damage. *PLoS One.* 2011; 6(6):1–8.
69. Latham KE, Litvin J, Orth JM, Patel B, Mettus R, Reddy EP. Temporal patterns of A-myb and B-myb gene expression during testis development. *Oncogene.* 1996; 13(6):1161–1168. PMID: [8808690](#)
70. Lam EW, Watson RJ. An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. *EMBO J.* 1993; 12(7):2705. PMID: [8334989](#)
71. Lin D, Fiscella M, O'Connor PM, Jackman J, Chen M, Luo LL, et al. Constitutive expression of B-myb can bypass p53-induced Waf1/Cip1-mediated G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(21):10079–10083. PMID: [7937841](#)

72. Arsura M, Introna M, Passerini F, Mantovani A, Golay J. B-myb antisense oligonucleotides inhibit proliferation of human hematopoietic cell lines. *Blood*. 1992; 79(10):2708–2716. PMID: [1586718](#)
73. Sala A, Calabretta B. Regulation of BALB/c 3T3 fibroblast proliferation by B-myb is accompanied by selective activation of cdc2 and cyclin D1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(21):10415–10419. PMID: [1438227](#)
74. Bhajjee F, Pepper DJ, Pitman KT, Bell D. New developments in the molecular pathogenesis of head and neck tumors: a review of tumor-specific fusion oncogenes in mucoepidermoid carcinoma, adenoid cystic carcinoma, and NUT midline carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2011; 15(1):69–77. doi: [10.1016/j.anndiagpath.2010.12.001](#) PMID: [21238915](#)
75. Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(44):18740–18744. doi: [10.1073/pnas.0909114106](#) PMID: [19841262](#)
76. Misra S, Sharma S, Agarwal A, Khedkar SV, Tripathi MK, Mittal MK, et al. Cell cycle-dependent regulation of the bi-directional overlapping promoter of human BRCA2/ZAR2 genes in breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2010; 9(1):50.
77. Tripathi MK, Misra S, Khedkar SV, Hamilton N, Irvin-Wilson C, Sharan C, et al. Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor protein in human breast cells. *J Biol Chem*. 2005; 280(17):17163–17171. PMID: [15734731](#)
78. Fadloun A, Kobi D, Delacroix L, Dembélé D, Michel I, Lardenois A, et al. Retinoic acid induces TGFbeta-dependent autocrine fibroblast growth. *Oncogene*. 2008; 27(4):477–489. PMID: [17637747](#)
79. Kenyon J, Gerson SL. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(22):7557–65. PMID: [18160407](#)
80. Irminger-Finger I, Soriano JV, Vaudan G, Montesano R, Sappino AP. In vitro repression of Brca1-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*. 1998; 143(5):1329–1339. PMID: [9832560](#)
81. Meza JE, Brzovic PS, King MC, Klevit RE. Mapping the functional domains of BRCA1 interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *J Biol Chem*. 1999; 274(9):5659–5665. PMID: [10026184](#)
82. Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, et al. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(10):3417–3426. PMID: [12724401](#)
83. Schlacher K, Wu H, Jasin M. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*. 2012; 22(1):106–116. doi: [10.1016/j.ccr.2012.05.015](#) PMID: [22789542](#)
84. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Ballif BA, et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell*. 2007; 129(2):289–301. PMID: [17412408](#)
85. Pistoni M, Verrecchia A, Doni M, Guccione E, Amati B. Chromatin association and regulation of rDNA transcription by the Ras-family protein RasL11a. *EMBO J*. 2010; 29(7):1215–1224. doi: [10.1038/emboj.2010.16](#) PMID: [20168301](#)
86. Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev*. 2008; 22(20):2755–2766. doi: [10.1101/gad.1712408](#) PMID: [18923074](#)
87. Durchdewald M, Angel P, Hess J. The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease. *Histol Histopathol*. 2009; 24(11):1451–1461. PMID: [19760594](#)
88. Oliveira-Ferrer L, Rößler K, Hausteiner V, Schröder C, Wicklein D, Maltseva D, et al. c-FOS suppresses ovarian cancer progression by changing adhesion. *Br J Cancer*. 2013; 110(3):753–763. doi: [10.1038/bjc.2013.774](#) PMID: [24322891](#)
89. Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, Ishibashi Y, Ohta S, Morikawa K. Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem*. 1997; 272(44):27886–27892. PMID: [9346936](#)
90. Gibson L, Holmgren SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, et al. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*. 1996; 13(4):665–675. PMID: [8761287](#)
91. Huang J, Nakamura K, Ito Y, Uzuka T, Morikawa M, Hirai S, et al. Bcl-xL Gene Transfer Inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats. *Circulation*. 2005; 112(1):76–83. PMID: [15983241](#)
92. Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Dever-Bertrand J, Bertrand R. Characterization of Bax-sigma, a cell death-inducing isoform of Bax. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 270(3):868–879. PMID: [10772918](#)

93. Zhang X, Weng C, Li Y, Wang X, Jiang C, Li X, et al. Human Bop is a novel BH3-only member of the Bcl-2 protein family. *Protein Cell*. 2012; 3(10):790–801. doi: [10.1007/s13238-012-2069-7](https://doi.org/10.1007/s13238-012-2069-7) PMID: [23055042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23055042/)
94. Sánchez-Mora R, Arboleda H, Arboleda G. PINK1 Overexpression Protects Against C2-ceramide-Induced CAD Cell Death Through the PI3K/AKT Pathway *J Mol Neurosci*. 2012; 47(3):582–594. doi: [10.1007/s12031-011-9687-z](https://doi.org/10.1007/s12031-011-9687-z) PMID: [22212487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22212487/)
95. Beltran E, Fresquet V, Martinez-Useros J, Richter-Larrea JA, Sagardoy A, Sesma I, et al. A cyclin-D1 interaction with BAX underlies its oncogenic role and potential as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(30):12461–12466. doi: [10.1073/pnas.1018941108](https://doi.org/10.1073/pnas.1018941108) PMID: [21746927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21746927/)
96. Rojas-Rivera D, Armisen R, Colombo A, Martínez G, Eguiguren AL, Díaz A, et al. TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis. *Cell Death Differ*. 2012; 19(6):1013–1026. doi: [10.1038/cdd.2011.189](https://doi.org/10.1038/cdd.2011.189) PMID: [22240901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22240901/)
97. Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, et al. Process parameter shifting : Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 94(6):1033–1044. PMID: [16736530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16736530/)
98. Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA. Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*. 1995; 81(4):561–570. PMID: [7758110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7758110/)
99. Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*. 1998; 92(6):747–758. PMID: [9529251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9529251/)
100. Helenius A, Aeby M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73(1):1019–1049.
101. Lederkremer GZ. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr Opin Struct Biol*. 2009; 19(5):515–523. doi: [10.1016/j.sbi.2009.06.004](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.06.004) PMID: [19616933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19616933/)
102. Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*. 2011; 334(6059):1086–1090. doi: [10.1126/science.1209235](https://doi.org/10.1126/science.1209235) PMID: [22116878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22116878/)
103. Nagasawa K, Higashi T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K. Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO Rep*. 2007; 8(5):483–489. PMID: [17380188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17380188/)
104. Schulze A, Standera S, Buerger E, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, et al. The Ubiquitin-domain Protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *J Mol Biol*. 2005; 354(5):1021–1027. PMID: [16289116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16289116/)
105. Silvaggi NR, Zhang C, Lu Z, Dai J, Dunaway-Mariano D, Allen KN. The X-ray crystal structures of human α -phosphomannomutase 1 reveal the structural basis of congenital disorder of glycosylation type 1a. *J Biol Chem*. 2006; 281(21):14918–14926. PMID: [16540464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16540464/)
106. Lefeber DJ, Schönberger J, Morava E, Guillard M, Huyben KM, Verrijp K, et al. Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *Am J Hum Genet*. 2009; 85(1):76–86. doi: [10.1016/j.ajhg.2009.06.006](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.006) PMID: [19576565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19576565/)
107. Maeda Y, Tanaka S, Hino J, Kangawa K, Kinoshita T. Human dolichol-phosphate-mannose synthase consists of three subunits, DPM1, DPM2 and DPM3. *EMBO J*. 2000; 19(11):2475–2482. PMID: [10835346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10835346/)
108. Ishida N, Yoshioka S, Chiba Y, Takeuchi M, Kawakita M. Molecular cloning and functional expression of the human Golgi UDP-N-acetylglucosamine transporter. *J Biochem*. 1999; 126(1):68–77. PMID: [10393322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10393322/)
109. Gawlitzek M, Estacio M, Fürch T, Kiss R. Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2009; 103(6):1164–1175. doi: [10.1002/bit.22348](https://doi.org/10.1002/bit.22348) PMID: [19418565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19418565/)
110. Chuppa S, Tsai YS, Yoon S, Shackelford S, Rozales C, Bhat R, et al. Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*. 1997; 55(2):328–338. PMID: [18636491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18636491/)
111. Odet F, Gabel SA, Williams J, London RE, Goldberg E, Eddy EM. Lactate Dehydrogenase C and energy metabolism in mouse sperm. *Biol Reprod*. 2011; 85(3):556–564. doi: [10.1095/biolreprod.111.091546](https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091546) PMID: [21565994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21565994/)

112. Stancic A, Buzadzic B, Korac A, Otasevic V, Jankovic A, Vucetic M, et al. Regulatory role of PGC-1 α /PPAR signaling in skeletal muscle metabolic recruitment during cold acclimation. *J Exp Biol.* 2013; 216(22):4233–4241.
113. Daugherty M, Polanuyer B, Farrell M, Scholle M, Lykidis A, de Crécy-Lagard V, et al. Complete reconstitution of the human coenzyme A biosynthetic pathway via comparative genomics. *J Biol Chem.* 2002; 277(24):21431–21439. PMID: [11923312](#)
114. Reynolds MR, Lane AN, Robertson B, Kemp S, Liu Y, Hill BG, et al. Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene.* 2014; 33(5):556–66. doi: [10.1038/onc.2012.635](#) PMID: [23353822](#)
115. Templeton N, Dean J, Reddy P, Young JD. Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2013; 110(7):2013–24. doi: [10.1002/bit.24858](#) PMID: [23381838](#)
116. Murray J, Zhang B, Taylor SW, Oglesbee D, Fahy E, Marusich MF, et al. The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification. *J Biol Chem.* 2003; 278(16):13619–22. PMID: [12611891](#)