



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESTUDIO DEL PROTEOMA DE LA VÍA DE SECRECIÓN EN CÉLULAS CHO
PRODUCTORAS DE UN ANTICUERPO ANTI INTERLEUCINA 8 HUMANA

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

PRESENTA:
SAUMEL PÉREZ RODRIGUEZ

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Alejandro Alagón Cano
Instituto de Biotecnología, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE, 2020



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.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz en su laboratorio, perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México. Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en los laboratorios C-132 y C-036, así como en la Unidad de Bioprocesos (a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán). Durante la realización de este proyecto se contó con los apoyos económicos de CONACyT Ciencia Básica 104951-Z, proyecto CONACYT INNOVAPYME-137854, y los proyectos PAPIIT-UNAM IN210419, IN209116, IN 208415, IN-209113, IN28509-3 y 210013-2 otorgados a la Dra. Valdez. También se contó con el apoyo del Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas.

Se contó con apoyo del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca nacional número 396822, y del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Se contó con el soporte del Dr. Bjørn Gunnar Voldbor, Dr. Tune Wulff, The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU), en la obtención de los datos proteómicos.

Se contó con el apoyo de los Dres. Marcela Lizano Soberón y Alejandro Alagón Cano, como miembros del Comité Tutor, que aportaron sus críticas durante la discusión de los resultados para la culminación de la presente tesis. Se extienden estos agradecimientos a la Dra. Claudia Altamirano, perteneciente a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, por su participación en este proyecto, y su revisión, discusión y co-autoría de los resultados de proteómica diferencial obtenidos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Paola Toledo-Ibelles, Inolab Especialistas en Servicio S.A. de C.V., GE Healthcare, Sartorius De México, S.A. De C.V., Nova Biomedicals, repositorio DNASU, Martha Suárez Zúñiga y GeneTex, por el suministro de material biológico, equipos y medios y material de cultivo de células.

A mis tutores por su apoyo, guía y revisión constante del presente proyecto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por toda su ayuda y apoyo durante estos años, sin los cuales el camino hubiera sido mucho más difícil.

A mis amigos de siempre por escucharme, aconsejarme y siempre estar presente.

A mi familia, Emil y Angelo por su amor incondicional.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	i
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	ii
ÍNDICE	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS.....	4
III. OBJETIVOS.....	4
3.1 GENERAL.....	4
3.2 ESPECÍFICOS.....	4
IV. CAPÍTULO I: COMPARACIÓN DEL CULTIVO CELULAR DE LAS LÍNEAS CRL-12444 Y CRL-12445.....	5
4.1 ANTECEDENTES	5
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
4.2.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	5
4.2.2 Medición de metabolitos e iones.....	6
4.2.3 Cuantificación de q_p	6
4.2.4 Purificación del AcM anti IL-8 humana	6
4.2.5 Cuantificación de proteínas	6
4.2.6 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	7
4.2.7 Cepas de E. coli y condiciones de cultivo	7
4.2.8 Actividad biológica de AcM anti IL-8 mediante ensayos de western blot (WB).....	8
4.2.9 Procesamiento de imágenes	8
4.3 RESULTADOS	8
4.4 DISCUSIÓN	11
V. CAPÍTULO II: FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	13
5.1 ANTECEDENTES	13
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.2.1 Homogenización de células CHO.....	14

5.2.2 Centrifugación diferencial	15
5.2.3 Centrifugación isopícnica	15
5.2.4 Cuantificación de sacarosa	15
5.2.5 WB.....	15
5.2.6 ELISA anti golgina-97	16
5.2.7 Procesamiento y cuantificación de imágenes	16
5.2.8 Ensayo enzimático de catalasa	16
5.2.9 Caracterización de los compartimentos subcelulares mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)	17
5.2.10 Análisis estadístico	17
5.3 RESULTADOS	17
5.4 DISCUSIÓN	20
VI. CAPÍTULO III: PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS PROTEÓMICOS.....	23
6.1 ANTECEDENTES	23
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.2.1 Extracción de proteínas celulares	24
6.2.2 Precipitación y recobro de proteínas	24
6.2.3 Procesamiento de imágenes	25
6.2.4 Análisis estadístico	25
6.3 RESULTADOS	25
6.4 DISCUSIÓN	27
VII. CAPÍTULO IV: PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE LA VÍA CLÁSICA DE SECRECIÓN DE CÉLULAS CHO PRODUCTORAS DE UN ANTICUERPO RECOMBINANTE	29
7.1 ANTECEDENTES	29
7.1.1 Síntesis, modificación y transporte de proteínas en la VCS	29
7.1.2 Estudios ómicos diferenciales de células CHO recombinantes	33
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
7.2.1 Fraccionamiento subcelular y precipitación de proteínas	39
7.2.2 Análisis MS/MS	40
7.2.3 Procesamiento, comparación y clasificación de datos proteómicos.....	41
7.3 RESULTADOS	44
7.3.1 Identificación de PDA entre las células CRL-12444 y CRL-12445	44
7.3.2 Clasificación de PDA de acuerdo con los términos GO, vías celulares y enriquecimiento de grupos de genes	44
7.3.3 Comparación de PDA con estudios proteómicos previos de células CHO	48
7.3.4 Identificación de PDA que pertenecen a la VCS	49
7.4 DISCUSIÓN	50
7.4.1 Estrés del RE y UPR.....	51
7.4.2 Homeostasis del RE y AG.....	53
7.4.3 Transporte anterógrado y retrógrado	55
7.4.4 Producción de componentes de la MEC y otras proteínas secretadas	60
7.4.5 Glicosilación	62
7.4.6 Autofagia	62
7.4.7 Degradación proteosomal.....	63

7.4.8 Síntesis y translocación de proteínas al RE	64
VIII. CONCLUSIONES	67
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	68
X. ANEXOS.....	112
Anexo 1. Comparación del crecimiento celular y productividad de células CRL-12444 y CRL-12445.....	112
Anexo 2. SDS-PAGE de compartimentos subcelulares obtenidos mediante centrifugación diferencial.....	113
Anexo 3. Caracterización de compartimentos subcelulares mediante TEM.....	113
Anexo 4. Actividad específica de catalasa en gradientes de sacarosa nuclear y mitocondrial.	114
Anexo 5. Microscopía electrónica de transmisión de gradientes de sacarosa nuclear, mitocondrial y microsomal.	114
Anexo 6. Métodos de precipitación y sus modificaciones	115
Anexo 7. Distribución de proteínas de células CHO en SDS-PAGE.....	116
Anexo 8. Clasificación de las PDA mediante análisis de clasificación funcional de PANTHER.	117

LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Perfiles de glutamina, pH e iones de células CHO.....	10
Fig 2. Purificación y actividad biológica del AcM anti IL-8 humana	11
Fig 3. Enriquecimiento de marcadores proteicos en compartimentos de centrifugación diferencial ...	18
Fig 4. Caracterización de los gradientes nuclear, mitocondrial y microsomal.....	19
Fig 5. Enriquecimiento de organelos en gradientes de sacarosa nuclear, mitocondrial y microsomal	20
Fig 6. Distribución de organelos celulares mediante centrifugación isopícnica	20
Fig 7. Eficiencia de recobro de proteínas de homogenizados de células CHO	26
Fig 8. Fraccionamiento de células CRL-12444 y CRL-12445 por centrifugación diferencial e isopícnica	40
Fig 9. Diagrama de flujo del procesamiento de datos proteómicos	43
Fig 10. Contribución de cada compartimento celular a las PDA.....	44
Fig 11. Clasificación de las PDA mediante PANTHER	46
Fig 12. Clasificación de las PDA mediante DAVID	47
Fig 13. Clasificación de las PDA mediante KEGG	48
Fig 14. Localización de las PDA en organelos de la vía clásica de secreción	50
Fig 15. PDA involucradas en el estrés del RE, y la UPR.....	53
Fig 16. Proteínas con acumulación diferencial involucradas en la síntesis, translocación y tráfico de proteínas en la vía clásica de secreción.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cinéticas de crecimiento de células CRL-12444 y CRL-12445.....	10
Tabla II. Estudios de transcriptómica (T) y proteómica (P) de células CHO donde se comparan poblaciones celulares con diferentes productividades de proteínas recombinantes (PR).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Velocidad específica de crecimiento
2-ME	2-mercaptoetanol
AcM	Anticuerpo monoclonal
AG	Aparato de Golgi
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BSA	Albúmina de suero bovino
BU	Baño de ultrasonido
CD	Congelación-descongelación
CHO	Células de Ovario de Hámster chino
Cs	Cisternas
ERAD	Degradación de proteínas asociada al RE
ERES	Sitios de salida del RE
ERGIC	Compartimento intermedio retículo endoplásmico-Golgi
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FDR	Tasa de descubrimiento falso
GO	Ontología de genes
HDV	Vesículas de alta densidad
HU	Homogenizador ultrasónico
IEF	Tampón de isoelectroenfoque
IL-8	Interleucina 8
IVCD	Integral de células viables
Lac/Glc	Relación molar lactato/glucosa
LDV	Vesículas de baja densidad
M/C	Metanol-cloroformo
MDV	Vesículas de densidad intermedia
MEC	Matriz extracelular
MP	Membrana plasmática
MPT	Modificaciones post-traduccionales

MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
OST	Oligosacaril transferasa
PBS	Tampón fosfato
pcd	Pg/célula/día
PDA	Proteínas con acumulación diferencial
PM	Peso molecular
PR	Proteínas recombinantes
q	Velocidad específica de consumo o producción
qGlc	Velocidad específica de consumo de glucosa
qGlu	Velocidad específica de producción de glutamato
qLac	Velocidad específica de producción de lactato
qNH ₄ ⁺	Velocidad específica de producción de amonio
q _p	Productividad específica
RE	Retículo endoplásmico
RTK	Receptores tirosina cinasa
SRP	Partícula de reconocimiento de la señal
SRPR	Receptor de SRP
TBS	Solución salina tamponada con Tris
t _D	Tiempo de duplicación
TCA	Ácido tricloroacético
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGN	Red del <i>trans</i> -Golgi
TS	Estructuras tubulares
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
VCS	Vía clásica de secreción
WB	Western blot (WB)

RESUMEN

Las células de ovario de hámster chino (CHO) representan el principal hospedero para la producción de proteínas recombinantes (PR) de uso terapéutico. La ingeniería genética de blancos proteicos de la vía clásica de secreción (VCS) ofrece una alternativa para la obtención de clones de células CHO más productivas, por la participación de esta vía en la síntesis, transporte, modificación y secreción de las PR. Dado que la identificación de estos blancos se ha basado en la acumulación diferencial de proteínas entre homogenizados de células con diferente productividad de una misma PR, la cantidad de proteínas de la VCS que se han relacionado hasta el momento con la productividad, es reducida. Por ello, en la presente tesis se empleó la proteómica subcelular para incrementar la identificación de blancos proteicos de la VCS asociados a variaciones en la productividad específica (q_p) de PR. Las fracciones subcelulares enriquecidas en organelos de esta vía se obtuvieron de las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445, productoras de un anticuerpo monoclonal (AcM) anti interleucina 8 (IL-8) humana, mediante centrifugación diferencial e isopícnica. Ambas clones mostraron una diferencia de 26 veces en la q_p del AcM. Como resultado del análisis proteómico comparativo se identificaron 493 proteínas con una acumulación diferencial entre ambas líneas celulares, de las cuales alrededor de un tercio se asignaron a la VCS. La clasificación de estos blancos mostró que el aumento de componentes que participan en la síntesis y translocación de proteínas, autofagia, degradación proteosomal y el transporte vesicular temprano y tardío de la vía de secreción, la disminución de aquellos involucrados en la producción de componentes de la matriz extracelular y otras proteínas secretadas, y el cambio de varios relacionados con el transporte intra-Golgi y el control del calcio del lumen del retículo endoplásmico (RE), se asociaron a un fenotipo de mayor productividad. Por otra parte, el estrés del RE y la respuesta a proteínas mal plegadas fueron los procesos menos representados en las células más productoras. Alrededor del 78% de las proteínas con acumulación diferencial fueron identificadas como nuevos blancos que no han sido reportados previamente. La identificación de proteínas de la VCS asociadas a la q_p , en la presente tesis, provee a la comunidad científica de una lista de blancos potenciales, cuya modulación pudiera incrementar la síntesis, transporte y secreción de PR en estas células de alto valor biotecnológico, y tener un impacto positivo en los bioprocesos actuales.

SUMMARY

Chinese hamster ovary (CHO) cells represent the main host for the production of recombinant proteins (RP) with therapeutic use. Genetic engineering of protein targets from the classical secretion pathway (CSP) offers an alternative for obtaining more productive CHO cell clones, due to the participation of this pathway in the synthesis, transport, modification and secretion of RP. Since the identification of these targets has been based on the differential accumulation of proteins between homogenates of cells with different productivity of the same RP, the number of proteins from the CSP that have been related to productivity so far is low. Therefore, in the present thesis, subcellular proteomics was used to increase the identification of protein targets from the VCS that are associated with variations in the specific productivity (q_p) of RP. Subcellular fractions enriched in organelles of this pathway were obtained from cell lines CRL-12444 and CRL-12445, which secrete an anti-human interleukin 8 (IL-8) monoclonal antibody (mAb), by differential and isopycnic centrifugation. Both clones showed a 26-fold difference in mAb q_p . As a result of the comparative proteomic analysis, 493 proteins with a differential accumulation between both cell lines were identified, of which about a third were assigned to the CSP. The classification of these targets showed that the increase of components that participate in the synthesis and translocation of proteins, autophagy, proteasomal degradation, and vesicular transport of early and late secretion pathway, the decrease of those involved in the production of components of the extracellular matrix and other secreted proteins, and the change of several related to intra-Golgi transport and calcium control in the endoplasmic reticulum (ER) lumen, were associated with a higher productivity phenotype. On the other hand, ER stress and the unfolded protein response were the least represented processes in the higher producing cells. About 78% of proteins with differential accumulation were identified as new targets that have not been previously reported. The identification of proteins from the CSP associated to q_p , in this thesis, provides the scientific community with a list of potential targets, whose modulation could increase the synthesis, transport and secretion of RP in these cells of high biotechnological value, and could have a positive impact on current bioprocesses.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas a través de la tecnología del ADN recombinante es el bioproceso preferido para la obtención de estas biomoléculas, debido a que su purificación a partir de fuentes naturales es costosa y las cantidades recuperadas son bajas (Mahmoud, 2006; Guevara-Hernández *et al.*, 2013). Las proteínas recombinantes (PR), obtenidas a través de esta tecnología, se han empleado para la detección inmunológica, como estándares, y en la caracterización biológica y estructural de nuevas proteínas en el área de investigación. Por otra parte, las aplicaciones industriales y farmacéuticas cubren el uso de enzimas para la degradación de desechos, la producción de alimentos, bebidas y combustibles, y su administración como fármacos (Puetz y Wurm, 2019). La importancia de las PR en el área de la salud se ve reflejada en el número de biofármacos aprobados por las agencias reguladoras en EUA y la Unión Europea, el cual alcanzó la cifra de 155 entre 2014 y 2018. El impacto económico de estas terapias en el mercado se refleja en un total de 651 billones de dólares en ventas acumulativas en este mismo período (Walsh, 2018).

Aunque diferentes hospederos como bacterias y levaduras, entre otros, han sido empleados para la expresión de PR (Palomares *et al.*, 2004; Mahmoud, 2006; Bandaranayake y Almo, 2014), las células de mamíferos han representado un gran avance, debido a que pueden realizar modificaciones post-traduccionales (MPT) de las que dependen las propiedades estructurales y biológicas, vitales en proteínas terapéuticas (Hansson y Stenflo, 2005; Orlova *et al.*, 2012; Hmiel *et al.*, 2015).

Entre los diferentes hospederos para la producción de PR destacan las células de ovario de hámster chino (CHO), en las cuales se han obtenido el 84% de todos los anticuerpos recombinantes aprobados entre 2015 y 2018 (Walsh, 2018). Entre las ventajas del uso de estas células destacan su bioseguridad viral (Nixdorf *et al.*, 1999; Berting *et al.*, 2010; Himmelsbach y Hildt, 2018), un perfil de glicosilación compatible con humanos (Goh y Ng, 2018), el desarrollo de medios de cultivo y suplementos específicos (Reinhart *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2017a; Ritacco *et al.*, 2018; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020a), la disponibilidad de varias sublíneas con diferentes fenotipos (Xu *et al.*, 2017; Lakshmanan *et al.*, 2019; Reinhart *et al.*, 2019), y el desarrollo de vectores de expresión y estrategias de selección para la obtención de clonas de mayor productividad (Ho *et al.*, 2012; Chin *et al.*, 2015).

Dadas las ventajas de estas células, el alto costo de los biofarmacéuticos (Puetz y Wurm, 2019) y el requerimiento de dosis elevadas en algunos tratamientos (Chames *et al.*,

2009; Kim *et al.*, 2011), se han realizado estudios genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos para comprender los mecanismos celulares que gobiernan la producción de PR con la finalidad de incrementar su productividad (Baycin-Hizal *et al.*, 2012; Dietmair *et al.*, 2012; Rupp *et al.*, 2014, 2018). En este contexto, se ha señalado a la vía clásica de secreción (VCS) como un paso limitante para el aumento de la producción de PR (Bolt *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2011), por lo que su estudio en clonas con una productividad diferente de una misma PR permitiría identificar procesos y moléculas específicas que pudieran convertirse en blancos de la ingeniería celular. Por tanto, en la presente tesis se estableció como objetivo la identificación de proteínas de esta vía con una acumulación diferencial entre clonas con diferente productividad específica (q_p) de una misma PR modelo. Como proteína de estudio se seleccionó un anticuerpo humanizado de isotipo IgG1 que reconoce la interleucina 8 (IL-8) humana, secretado por las células CRL-12444 y CRL-12445 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Gonzalez *et al.*, 2000).

Dado que los estudios proteómicos previos de comparación entre clonas de células CHO con diferente productividad de PR han empleado homogenizados celulares como su muestra de estudio (Nissom *et al.*, 2006; Meleady *et al.*, 2008; Carlage *et al.*, 2009; Ho, 2013; Kang *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016; Hausmann *et al.*, 2018), la mayoría de las proteínas identificadas asociadas a cambios en la productividad celular pertenecen a aquellas de mayor abundancia, con una cobertura limitada del resto, entre las que se encuentran las pertenecientes a la VCS. Teniendo en cuenta esta limitante, en el presente estudio se empleó el fraccionamiento subcelular acoplado a espectrometría de masas para realizar un análisis proteómico diferencial de los organelos de la VCS entre ambas líneas celulares. Adicionalmente, se evaluaron tres métodos de precipitación de proteínas [metanol-cloroformo (M/C), acetona y ácido tricloroacético-acetona (TCA-acetona)] para seleccionar el de mayor eficiencia de recuperación de proteínas de células CHO.

La tesis se encuentra dividida en 4 capítulos de acuerdo con el orden experimental y los objetivos propuestos. El capítulo I describe el cultivo celular y su caracterización (Comparación del cultivo celular de las líneas CRL-12444 y CRL-12445), el II (Fraccionamiento subcelular) y el III (Precipitación de proteínas para la preparación de muestras para estudios proteómicos) la optimización del fraccionamiento celular y precipitación de proteínas, respectivamente, y en el IV (Proteómica diferencial de la VCS de

células CHO productoras de un anticuerpo recombinante) se identifican y clasifican las proteínas con una abundancia diferente entre ambas líneas celulares en estudio.

La acumulación diferencial de varias proteínas asociadas a la VCS identificadas en el presente trabajo demostró que los procesos de traducción de proteínas, su translocación al RE, incorporación a vesículas, tráfico intracelular, MPT y catabolismo, junto con el control de la homeostasis y morfología de los organelos de esta vía, la disminución de la secreción de otras proteínas y el control de la autofagia constituyen procesos que probablemente modulen la secreción de PR en las células CHO. Además de los blancos de la VCS, la manipulación de la expresión de proteínas provenientes de otros organelos celulares también podría contribuir al incremento de la productividad a través del metabolismo de ácidos nucleicos, carbono, nitrógeno y energético, señalización celular, organización del citoesqueleto, defensas antioxidantes, entre otros. La modificación de estos procesos en esta y otras líneas celulares de mamíferos comúnmente empleadas en la obtención de estos biofármacos podría incrementar la obtención de PR e impactar positivamente en los bioprocesos de células de mamíferos.

II. HIPÓTESIS

El incremento en la productividad específica de células CHO recombinantes productoras de un anticuerpo monoclonal (AcM) anti IL-8 humana está asociado a una mayor síntesis, transporte y metabolismo de proteínas en la vía clásica de secreción.

III. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Determinar las proteínas pertenecientes a la vía clásica de secreción (Retículo endoplasmático [RE] y Aparato de Golgi [AG]) con una acumulación diferencial entre dos clonas de células CHO cultivadas en suspensión, con diferente productividad específica de un AcM anti IL-8 humana, a partir de la proteómica subcelular.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la cinética de crecimiento y productividad específica de las clonas CRL12444 y CRL12445 secretoras del AcM anti IL-8, en cultivos en suspensión en medio libre de suero.
2. Desarrollar y evaluar un protocolo de fraccionamiento subcelular para la obtención de fracciones enriquecidas en organelos de la vía clásica de secreción de células CHO.
3. Identificar protocolos de precipitación de proteínas con la mayor eficiencia de recuperación para células CHO.
4. Proponer un modelo mediante el cual el aumento de la productividad específica de células CHO se haya asociado a la acumulación diferencial de blancos relacionados con la síntesis, transporte y metabolismo de proteínas en la vía clásica de secreción.

IV. CAPÍTULO I: COMPARACIÓN DEL CULTIVO CELULAR DE LAS LÍNEAS CRL-12444 Y CRL-12445

4.1 ANTECEDENTES

Las células CRL-12444 y CRL-12445 secretan un anticuerpo humanizado de isotipo IgG1 que reconoce la IL-8 humana e inhibe su unión *in vitro* a los neutrófilos, con lo cual disminuye la migración y activación de estas células (Gonzalez *et al.*, 2000). De ambas células, la línea CRL-12445 ha sido empleada como modelo para el estudio del efecto de varios factores en el crecimiento y productividad (Heinrich *et al.*, 2011; Haredy *et al.*, 2013; Klausning *et al.*, 2013; Sánchez-Kopper *et al.*, 2016), la metilación del genoma (Wippermann *et al.*, 2014, 2015, 2017), la glicosilación de proteínas (Krahn *et al.*, 2017) y el cambio del fosfoproteoma (Kaushik *et al.*, 2018). Los parámetros de crecimiento celular, velocidad específica de crecimiento (μ) y densidad celular máxima, para esta línea, varían en un rango de 0.015-0.044 h⁻¹ y 0.6-15.0 x 10⁶ células/mL, respectivamente, en dependencia de los medios, aditivos y condiciones de cultivo. En cuanto a la producción del AcM, su q_p se ha determinado en un rango de 3.6-7.5 pg/célula/día (pcd), mientras su concentración en el sobrenadante ha sido mucho más variable (1-325 mg/L) (Anexo 1).

Por el contrario, la caracterización cinética, metabólica y de productividad de las células CRL-12444 no se ha documentado, lo que pone de manifiesto la necesidad de caracterizar ambas líneas celulares bajo las mismas condiciones de cultivo previo al estudio diferencial de sus proteomas, con el objetivo de conocer su crecimiento, metabolismo y la diferencia relativa de la q_p entre ambas.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares CHO DP-12 clon #1933 CRL-12444 y CHO DP-12 clon #1934 CRL-12445 se obtuvieron de la ATCC y se emplearon para el estudio de proteómica diferencial. Ambas clonas se adaptaron al medio de cultivo CDM4CHO (Hyclone, Logan, UT, EUA), suplementado con 6 mM de glutamina estable (Dipéptido alanil-glutamina, Biowest LLC, Kansas City, MO, EUA), 0.002 mg/mL Humulin N (Eli Lilly, Indianapolis, IN, EUA) y 200 nM de metotrexato (Pfizer, Nueva York, NY, EUA). Las células se sembraron a 0.50 x 10⁶

células/mL en frascos Erlenmeyers de 250 mL, con un volumen de llenado del 20%, a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, en incubadora humidificada (Nuair, Plymouth, MN, EUA). La concentración celular y viabilidad se determinaron mediante conteo cada 24 h en una cámara de Neubauer, usando el método de exclusión por Azul de Tripano (Strober, 2015).

4.2.2 Medición de metabolitos e iones

La concentración de glucosa, lactato, glutamato, amonio, sodio, potasio y calcio en los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron en el analizador bioquímico BioProfile FLEX2 Automated Cell Culture Analyzer (Nova Biomedical, Waltham, MA, EUA). Las velocidades específicas de consumo o producción (q) de estos metabolitos se calcularon en la fase exponencial de crecimiento como la proporción entre su concentración neta y la integral de células viables (IVCD), estimada como el área bajo la curva por el método del trapecioide en el software GraphPad Prism v5.01 (Pan *et al.*, 2017a).

4.2.3 Cuantificación de q_p

La concentración de AcM en el sobrenadante de cultivo se midió mediante Human IgG ELISA Quantitation Set (E80-104, Bethyl Laboratories, Inc., TX, EUA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El sustrato de la enzima peroxidasa, SigmaFast OPD (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se preparó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo con 10% (v/v) HCl y la lectura se realizó a 490 nm. La q_p se calculó en la fase exponencial de crecimiento como la proporción entre la cantidad neta de producto y la IVCD.

4.2.4 Purificación del AcM anti IL-8 humana

El sobrenadante de cultivo se centrifugó a 185 x g durante 5 min, se diluyó dos veces en tampón de equilibrio (150 mM NaCl, 20 mM fosfato de sodio, pH 7.2) y se filtró a través de 0.2 μ m. La purificación del AcM se realizó por afinidad a una columna de Proteína A – Agarosa (MabSelect SuRe, GE Healthcare Bio-Sciences, EUA), donde se eluyó con 0.1 M de citrato de sodio pH 3.0, se neutralizó su pH con 5% (v/v) de 1 M Tris-HCl pH 9.0 y se dializó en tampón fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) a 4°C. La pureza e integridad de los anticuerpos purificados se verificó en geles de SDS-PAGE al 7.5% (condiciones no reductoras) y 12% (condiciones reductoras).

4.2.5 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford en microplacas de 96 pocillos, con el reactivo Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La albúmina de suero bovino (BSA, GE Healthcare Bio-Sciences, EUA) se empleó como estándar en un rango de 0-0.5 mg/mL.

4.2.6 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las muestras se mezclaron con tampón Laemmli a una concentración final de 60 mM Tris-HCl pH 6.6, suplementado con 10% (v/v) glicerol, 70 mM SDS y 0.2 mM azul de bromofenol, con (condiciones reductoras) o sin (condiciones no reductoras) 2.5% (v/v) 2-mercaptoetanol (2-ME). Posteriormente se calentaron a 95°C durante 5 min, excepto aquellas previamente solubilizadas en tampón de isoelectroenfoco (IEF, 7 M urea, 2 M tiourea, 2% [m/v] CHAPS, 40 mM DTT), se centrifugaron a 8,161 x g por 5 min y se aplicaron a geles de SDS-PAGE al 7.5, 12 o 15%. Se seleccionó el reactivo Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) como marcador de peso molecular (PM). La separación de las proteínas se llevó a cabo en un sistema vertical de electroforesis de proteínas SE260 Mighty Small II Deluxe Mini (Hoefer, Holliston, EUA), a una corriente constante de 60 mA, con Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% [m/v] SDS, pH 8.3) como tampón de corrida. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y se destiñeron en una solución de 5% (v/v) metanol y 7.5% (v/v) ácido acético (Hervieu, 1997).

4.2.7 Cepas de *E. coli* y condiciones de cultivo

La IL-8 humana, antígeno del AcM producido por las células CRL-12444 y CRL-12445, se expresó de manera recombinante en *E. coli*. Colonias resistentes a ampicilina (100 µg/mL) de células BL21(DE3) transformadas con el plásmido IL-8-pMCSG7 (DNASU, Arizona State University, Arizona, EUA), se cultivaron en medio LB suplementado, a 37°C, 150 rpm durante 16 h. La expresión de IL-8 se indujo en cultivos frescos con 1 mM IPTG, y tras 4 h post-inducción las células se centrifugaron a 8,161 x g por 10 min, se suspendieron en 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, y se lisaron por ciclos de congelación-descongelación (CD) y sonicación (Soniprep 150, MSE, Heathfield, East Sussex, Reino Unido). El homogenizado resultante se mezcló con tampón IEF, se centrifugó a 16,000 x g durante 25 min, se precipitó con acetona, se solubilizó en tampón IEF y se aplicó a geles de

poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras (Crowell *et al.*, 2013, Haddad *et al.*, 2015, Wu *et al.*, 2009).

4.2.8 Actividad biológica de AcM anti IL-8 mediante ensayos de western blot (WB)

La actividad biológica de los AcM anti IL-8 purificados se verificó por el reconocimiento de IL-8 humana, en homogenizados de *E. coli* recombinante, mediante WB. Los geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF en un equipo Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), a un voltaje constante de 20 V durante 60 min. Las membranas se bloquearon en 3% (m/v) de leche descremada, 0.05% (v/v) Tween-20 en PBS durante 1 h y se incubaron con 5 µg/mL de cada AcM en solución de bloqueo durante 2 h. El anticuerpo secundario, anti IgG humano conjugado a la enzima peroxidasa (1:1200) se incubó durante 1 h y las membranas se revelaron en 0.05% (m/v) 3,3'-diaminobencidina y 0.001% de 30% H₂O₂ en PBS.

4.2.9 Procesamiento de imágenes

Las imágenes de SDS-PAGE y WB se adquirieron en un equipo Gel Doc EZ imager con el software Image Lab, v6.0.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). El análisis cuantitativo de las imágenes se realizó en el software ImageJ v1.52a (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) (Schindelin *et al.*, 2015).

4.3 RESULTADOS

La cinética de crecimiento de las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445 se muestra en la Figura 1A, así como los perfiles de los metabolitos glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio (Fig 1B-F), y de los iones sodio, potasio y calcio (Fig 1G-I). Los parámetros cinéticos y estequiométricos se muestran en la Tabla I.

A pesar de presentar ambas líneas celulares similar perfil de crecimiento, μ y tiempo de duplicación (t_D), las células CRL-12444 mostraron una velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}) y de producción de lactato (q_{Lac}) 30.9% y 65.2% mayor que CRL-12445, respectivamente, lo que se tradujo en una proporción lactato/glucosa (Lac/Glc) 1.39 veces mayor (Tabla I). En estas mismas células también se incrementó la velocidad específica de producción de glutamato (q_{Glu}) y de amonio ($q_{NH_4^+}$) en 4.5 y 2.1 veces, respectivamente (Tabla I), mientras que la glutamina se consumió en su totalidad para el día 6. Por el contrario, una concentración de 2.72 mM de glutamina aún permaneció en el sobrenadante

de las células CRL-12445 para este día de cultivo (Fig 1D). La concentración de glutamina como aminoácido libre en el medio de cultivo es el resultado de la importación del dipéptido alanil-glutamina al interior celular, su escisión por peptidasas, y el consumo intracelular y la exportación al exterior celular de la glutamina (Sánchez-Kopper *et al.*, 2016). Dado que el analizador bioquímico solo permite cuantificar la glutamina como aminoácido libre, su velocidad específica de consumo no pudo calcularse. La concentración de este dipéptido puede determinarse, sin embargo, por derivatización química de aminoácidos acoplada a cromatografía líquida (Imamoto *et al.*, 2013). Los perfiles de iones no mostraron diferencias y la q_p del AcM anti IL-8 humana de las células CRL-12445 fue 26 veces mayor que la de las células CRL-12444 (Tabla I). Esta diferencia en q_p permitió realizar una comparación diferencial del proteoma de la VCS entre ambas células con el objetivo de identificar blancos proteicos pertenecientes a estos organelos que estén asociados a una mayor síntesis, transporte y metabolismo de proteínas.

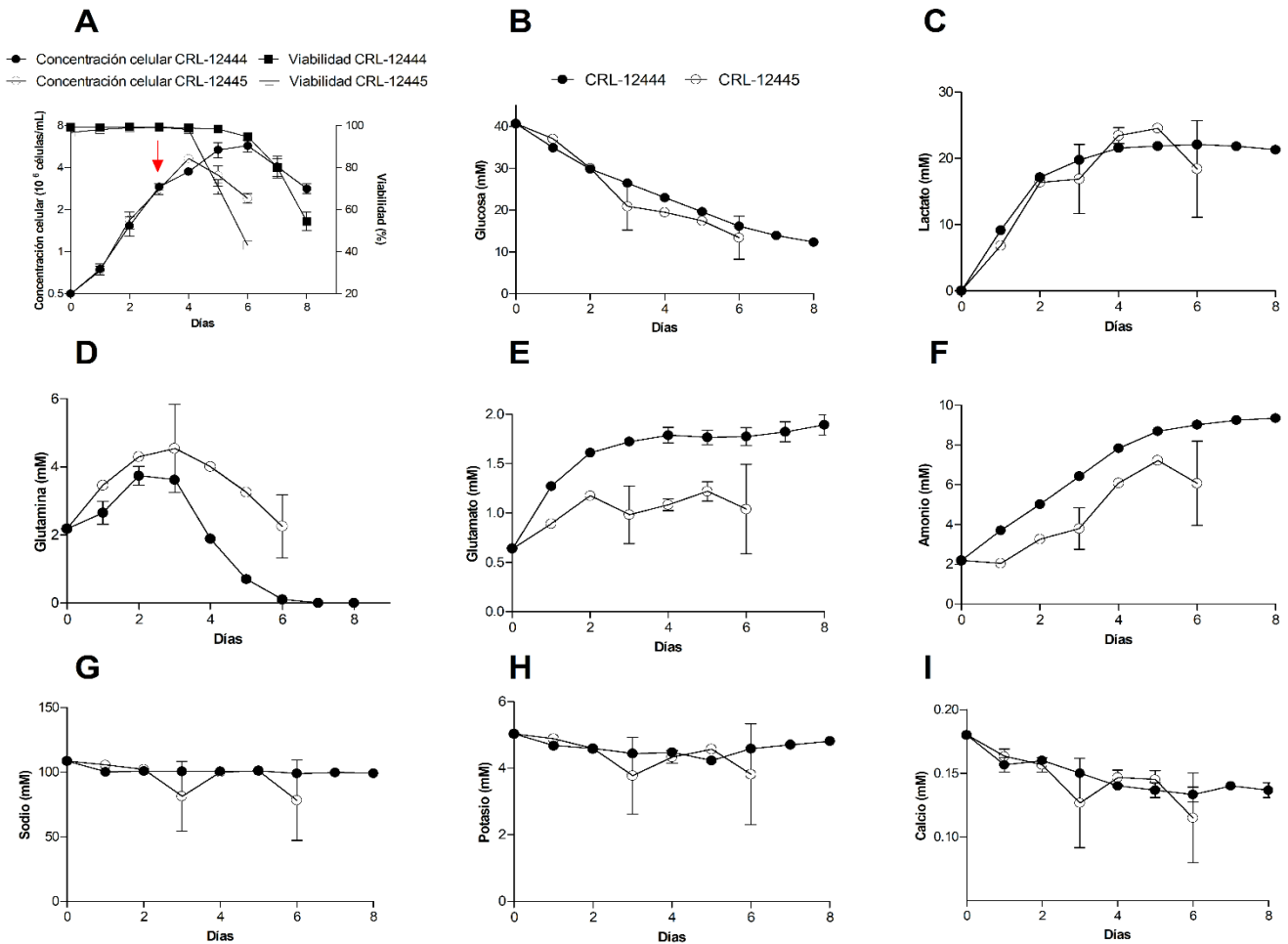


Fig 1. Cinética de crecimiento y perfiles de metabolitos. Se determinó la concentración (círculos) y viabilidad (cuadrados) de las células CRL-12444 (reellenos) y CRL-12445 (vacíos) por el método de exclusión por Azul de tripano en cámara de Neubauer (A). Se midió la concentración de glucosa (B), lactato (C), glutamina (D), glutamato (E), amonio (F), sodio (G), potasio (H) y calcio (I) en el sobrenadante de cultivo de células CRL-12444 (círculos reellenos) y CRL-12445 (círculos vacíos). La desviación estándar se determinó a partir de tres réplicas biológicas.

Tabla I. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cinética de crecimiento de células CRL-12444 y CRL-12445. La concentración de células viables y metabolitos en el sobrenadante se determinó por método de exclusión de Azul de Tripano en cámara de Neubauer y el analizador bioquímico BioProfile FLEX2, respectivamente. La concentración de AcM se determinó por ELISA. La desviación estándar se obtuvo a partir de tres réplicas biológicas. μ : Velocidad específica de crecimiento, t_D : Tiempo de duplicación, q : Velocidad específica de consumo (-) o producción (+), Glc: Glucosa, Lac: Lactato, Glu: Glutamato, q_p : Productividad específica.

Parámetro	CRL-12444	CRL-12445
μ (h^{-1})	0.025 \pm 0.001	0.024 \pm 0.001
t_D (h)	27.8 \pm 1.1	28.5 \pm 0.7
Concentración celular máxima (10^6 células/mL)	5.72 \pm 0.57	4.65 \pm 0.10
q_{Glc} ($\mu\text{mol}/10^6$ células*h)	- 3.56 \pm 0.21	- 2.72 \pm 0.05
q_{Lac} ($\mu\text{mol}/10^6$ células*h)	4.96 \pm 0.34	3.00 \pm 0.15
Proporción Lac/Glc (mol/mol)	1.39 \pm 0.01	1.11 \pm 0.03
q_{Glu} ($\mu\text{mol}/10^6$ células*h)	0.27 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01
$q_{NH_4^+}$ ($\mu\text{mol}/10^6$ células*h)	1.06 \pm 0.05	0.50 \pm 0.03
q_{K^+} ($\mu\text{mol}/10^6$ células*h)	- 0.15 \pm 0.01	- 0.09 \pm 0.02
$q_{Ca^{2+}}$ (nmol/ 10^6 células*h)	- 7.54 \pm 0.48	- 4.27 \pm 0.72
q_p (10^{-3} pg/célula/día)	0.41 \pm 0.05	10.68 \pm 0.65

Además de la q_p también se evaluó la actividad biológica de los AcM purificados mediante el reconocimiento de su antígeno en WB. Como se demostró en condiciones reductoras en SDS-PAGE, el AcM se purificó a homogeneidad pues solamente se observaron las cadenas ligera y pesada (Fig 2A). En condiciones no reductoras se observaron cuatro bandas de proteínas correspondientes a diferentes ensamblajes de las cadenas ligera y pesada de esta proteína (Fig 2B). Los AcM de ambas líneas celulares mostraron un reconocimiento similar de la IL-8 en ensayos de WB (Fig 2D-E), obtenida en homogenizados de *E. coli* recombinante (Fig 2C).

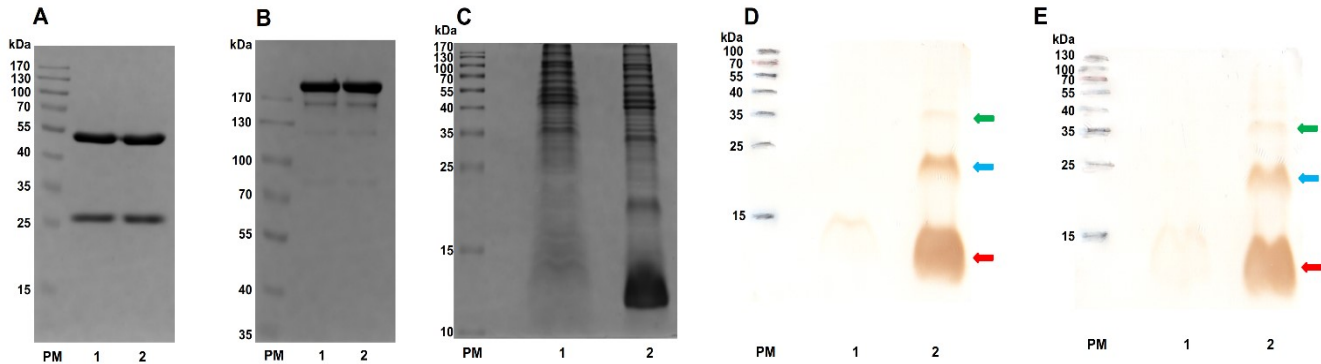


Fig 2. Purificación y actividad biológica del AcM anti IL-8 humana. El AcM, secretado por las células CRL-12444 (Carril 1) o CRL-12445 (Carril 2) y purificado por afinidad a Proteína A, se aplicó a geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (A) y al 7.5% en condiciones no reductoras (B). La expresión de IL-8 humana en *E. coli* se observó en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras (C, carril 2). La actividad biológica del AcM de células CRL-12444 (D, carril 2) y CRL-12445 (E, carril 2) se determinó por reconocimiento de su Ag en WB. Las células de *E. coli* no inducidas se emplearon como control negativo de la expresión (C, carril 1) y de la unión del anticuerpo (D y E, carril 1). Las imágenes son representativas de dos réplicas biológicas. Las flechas roja, azul y verde indican bandas de IL-8 de 10-15, 15-25 y \approx 35 kDa. PM: peso molecular.

4.4 DISCUSIÓN

Las cinéticas de crecimiento de las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445 fueron caracterizadas para proceder a la colecta de muestras durante la fase exponencial de crecimiento, y comparar su metabolismo energético y q_p . A pesar de una diferencia de 26 veces en la q_p , ambas líneas celulares no difirieron en su μ (Tabla I) y actividad biológica del AcM secretado (Fig 2), lo que indica que para estas clonas el crecimiento celular no se relaciona directamente con su productividad, y que las diferencias en la q_p no afectaron la capacidad del AcM de reconocer su antígeno.

Aunque en algunos reportes previos se ha determinado una relación inversa entre μ y q_p (Pan *et al.*, 2017b, 2019; Vergara *et al.*, 2018), otros estudios han caracterizado clonas donde no se ha evidenciado esta correlación (Chusainow *et al.*, 2009; Dreesen y Fussenegger, 2011). La relación negativa entre estos parámetros pudiera ocurrir a $q_p > 40$ pcd, dando lugar a una competencia entre el crecimiento y la producción de proteínas por los recursos celulares (Chusainow *et al.*, 2009). La disminución de la densidad celular máxima y la q_p de las células CRL-12445 con respecto a reportes previos (Anexo 1), probablemente se

produjo como consecuencia de las diferencias entre los medios, aditivos y formato de cultivo empleados.

En cuanto al metabolismo, las células de mayor productividad (CRL-12445) mostraron una eficiencia 28% mayor en la utilización del carbono, representada por la relación Lac/Glc (Tabla I), sugiriendo que la glucosa se canalizó más eficientemente hacia el ciclo de Krebs para la generación de ATP y la producción de proteínas. Congruentemente, se ha demostrado que un menor flujo glucolítico se traduce en un estado metabólico más oxidativo en líneas celulares de mayor productividad (Kim y Lee, 2007; Le *et al.*, 2012; Young, 2013; Konakovsky *et al.*, 2016; Toussaint *et al.*, 2016; Buchsteiner *et al.*, 2018), donde la energía excedente favorece un aumento de la biomasa (Le *et al.*, 2012; Toussaint *et al.*, 2016), viabilidad (Buchsteiner *et al.*, 2018) o, como en el presente caso, de la q_p .

Una menor q_{Glu} y $q_{NH_4^+}$ (Tabla I), y la concentración residual de glutamina a partir del día 4 de cultivo (Fig 1D), sugirieron una reducción del consumo de glutamina en las células CRL-12445. Aunque la glutamina es necesaria para la síntesis de ácidos grasos, nucleótidos, aminoácidos y piruvato, la adicción celular a este aminoácido puede generar un exceso de los metabolitos nocivos amonio y lactato (Jin *et al.*, 2016). Aunque el efecto de estos metabolitos y las concentraciones a las cuales actúan varían para cada clona (Hong *et al.*, 2010, Lao y Toth, 1997, Xing *et al.*, 2008), su disminución favorece el crecimiento y la productividad, y evita la apoptosis y la alteración del patrón de glicosilación (Cruz *et al.*, 2000; Gawlitzek *et al.*, 2000; Yang y Butler, 2000; Xing *et al.*, 2008). Esta caracterización metabólica se complementó con el estudio proteómico para ayudar a dilucidar los procesos moleculares que regulan la producción de PR en estas células.

V. CAPÍTULO II: FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

5.1 ANTECEDENTES

El fraccionamiento subcelular ha sido comúnmente empleado durante el estudio de la morfología, composición y estructura de organelos celulares (Baudhuin y Berthet, 1967; Butler y Judah, 1970; Vance, 1990), la biología celular y molecular (Spatuzza *et al.*, 2004), y más recientemente, de la composición celular a través de las tecnologías ómicas (Yates *et al.*, 2005; Andreyev *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2012).

Entre sus ventajas se pueden mencionar la obtención de fracciones enriquecidas en compartimentos subcelulares para el estudio de procesos celulares *in vitro* (Balch *et al.*, 1984; Lavoie *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1999; Amodio *et al.*, 2009) y de la composición proteica de organelos (Foster *et al.*, 2006; Gilchrist *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2012), la localización y seguimiento intracelular de proteínas (Sun *et al.*, 2006) y el análisis de MPT en la VCS (Erra *et al.*, 1999). La obtención de proteomas de menor complejidad a partir de fracciones enriquecidas en organelos (proteómica subcelular), facilita el procesamiento y análisis de datos, el estudio de su composición en diferentes estados celulares, la asignación de proteínas a compartimentos, la cuantificación de proteínas de baja abundancia y la identificación de un mayor número de especies proteicas (Dreger, 2003; Yates *et al.*, 2005; Drissi *et al.*, 2013; Paulo *et al.*, 2013).

Entre los protocolos de fraccionamiento subcelular, se destacan aquellos basados en la centrifugación diferencial e isopícnica, por su facilidad, robustez, grado de enriquecimiento y rendimiento (Pasquali *et al.*, 1999; Chandramouli y Qian, 2009; Lee *et al.*, 2010; Drissi *et al.*, 2013). Específicamente en cuanto al aislamiento de organelos de la VCS, Erra y cols. (1999) describieron un procedimiento de fraccionamiento en gradiente discontinuo de sacarosa para su aislamiento, lo que permitió la separación de RE, AG y el compartimento intermedio retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC) en base a su densidad relativa. Posteriormente, este mismo método fue adoptado por Amodio y cols. (2009) y Spatuzza y cols. (2004) para estudiar los efectos del estrés del RE y del choque por estrés térmico, respectivamente. Aunque el aislamiento selectivo de ERGIC ha sido reportado a partir de la fusión del RE y AG en células tratadas con Brefeldina A, este método involucra la modificación de procesos y estructuras celulares no deseables en otros diseños experimentales (Breuza *et al.*, 2004). Gilchrist y cols. (2006) reportaron la elaboración de un

mapa proteómico de la VCS a partir de una estrategia combinada de centrifugación diferencial y en gradiente de sacarosa. A pesar de haber logrado un grado de enriquecimiento 4 y 110 veces mayor del RE y AG, respectivamente, su implementación requiere de un protocolo específico para cada uno de estos organelos.

Aunque existe una amplia variedad de técnicas y protocolos disponibles hasta el momento para la obtención de organelos, el desarrollo de un método universal de fraccionamiento no es posible debido a las diferencias en estructura e interacciones entre organelos y en el ordenamiento del citoesqueleto, que conllevan a modificaciones para cada tejido y línea celular en particular (Hesketh y Pryme, 1996; Walker *et al.*, 2020).

En el caso específico de células CHO, se han reportado pocos protocolos de fraccionamiento subcelular, de los cuales la mayoría han sido desarrollados para células con un fenotipo adherente para la obtención de uno o pocos organelos (Balch *et al.*, 1984; Balch y Rothman, 1985; Morand y Kent, 1986; Storrie y Amadden, 1990; Tsukamoto *et al.*, 1990; van Heusden *et al.*, 1990; Cezanne *et al.*, 1992). Además, el alto grado de contaminación cruzada de preparaciones enriquecidas en membrana plasmática (MP), AG, RE, lisosomas (Morand y Kent, 1986) y peroxisomas (Tsukamoto *et al.*, 1990), debido al número insuficiente de etapas de fraccionamiento, impide el uso de ciertos protocolos en aplicaciones como la proteómica.

Por tanto, debido a la falta de protocolos adecuados de fraccionamiento subcelular para el análisis proteómico de células CHO recombinantes cultivadas en suspensión, en el presente capítulo se desarrolló y evaluó un protocolo de fraccionamiento subcelular para las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445. Con base en una combinación de centrifugación diferencial e isopícnica, se obtuvieron fracciones enriquecidas en organelos de la VCS para un posterior análisis comparativo de sus proteomas.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Homogenización de células CHO

Las células se colectaron durante la fase exponencial de crecimiento, con una viabilidad mayor al 95%, se centrifugaron a 185 x g durante 5 min a 4°C, y se lavaron dos veces en PBS frío. El precipitado celular se suspendió en tampón HEPES (1 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 7.4) a 6.6×10^7 células/mL, y se incubó durante 30 min en hielo, con homogenización por inversión cada 10 min. Se añadió 1 mM de PMSF y 10% (v/v) de

SigmaFast Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y las células se rompieron con 25 pases en un homogenizador Dounce. Inmediatamente se restableció la osmolaridad del homogenizado a 0.25 M de sacarosa.

5.2.2 Centrifugación diferencial

Los precipitados subcelulares colectados a 3,000 x g por 10 min, 9,000 x g por 15 min y 100,000 x g por una hora, a partir del homogenizado, se nombraron como nuclear, mitocondrial y microsomal, respectivamente, mientras el sobrenadante del último paso de centrifugación se catalogó como citosol (Graham, 2002a, 2004).

5.2.3 Centrifugación isopícnica

Los precipitados nuclear, mitocondrial y microsomal, solubilizados en 0.25 M de sacarosa, se centrifugaron en los gradientes de sacarosa a 154,693 x g durante 3 h a 4°C (Ultracentrífuga Optima XE, Beckman Coulter, Indianapolis, EUA). Los gradientes para los precipitados nuclear y mitocondrial se adaptaron a 1 mL de 60% y 3 mL de 55, 40 y 30% (m/v) de sacarosa (Graham, 2004). El precipitado microsomal se separó en un nuevo gradiente de 1 mL de 60% y 2.5 mL de 45, 35, 30 y 10% (m/v) de sacarosa.

5.2.4 Cuantificación de sacarosa

La concentración de sacarosa se midió en un refractómetro de mano de 0-32 Brix, con una dilución de las muestras 1:2 en agua MilliQ.

5.2.5 WB

El enriquecimiento de fracciones en RE, citosol, núcleo, mitocondria, MP, *cis*-Golgi y *trans*-Golgi se verificó por detección y cuantificación de Grp78, Gapdh, histona H3, Hsp60, flotilina 1, golgina A5 y golgina-97, respectivamente, en WB, y se corroboró mediante ELISA en el caso de golgina-97.

Para la identificación de Grp78, Gapdh e histona H3, las membranas se bloquearon en 5% (m/v) de leche descremada, 0.05% (v/v) Tween-20 en PBS. Endoplasmic Reticulum Fraction Western Blot Cocktail (Abcam, Cambridge, MA, EUA) se diluyó 1:2000 y el anticuerpo secundario HRP-conjugated Secondary Antibody Cocktail (Abcam, Cambridge, MA, EUA) 1:2500. Para golgina-97, las membranas se bloquearon en 3% de leche descremada, 0.1% (v/v) Tween-20 en tampón TBS (137 mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.6). Los anticuerpos anti golgina-97 (GTX114445, GeneTex, CA, EUA) y el secundario conjugado a la enzima peroxidasa se diluyeron 1:2000. Los anticuerpos anti flotilina 1 (GTX104769,

GeneTex, CA, EUA), Hsp60 (GTX110089, GeneTex, CA, EUA) y golgina A5 (GTX104255, GeneTex, CA, EUA) se diluyeron 1:2000, 1:10 000 y 1:2000, respectivamente.

Las membranas se revelaron con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), y las imágenes se adquirieron en un equipo LI-COR C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner con el software Image Studio (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA) (Bouزيد *et al.*, 2013).

5.2.6 ELISA anti golgina-97

Las placas de ELISA de alta unión (Greiner Bio-One GmbH, Austria) se recubrieron con 4 µg de proteínas en un volumen final de 200 µL en tampón carbonato-bicarbonato de sodio, pH 9.6, durante 16 h a 4°C. Los pocillos se bloquearon con 200 µL de 1% (m/v) BSA, 0.05% Tween-20 en PBS. El anticuerpo anti golgina-97 se diluyó 1:2000 y el anticuerpo secundario 1:1000. El sustrato SigmaFast OPD (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo con 10% (v/v) HCl y la absorbancia se registró a 490 nm. Los homogenizados de *E. coli* y células CHO se utilizaron como los controles negativo y positivo del ensayo, respectivamente.

5.2.7 Procesamiento y cuantificación de imágenes

Las imágenes de los geles de SDS-PAGE se adquirieron en un equipo Gel Doc EZ imager con el software Image Lab v6.0.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). El software ImageJ v1.52a (National Institutes of Health, EUA) se empleó para el análisis de las imágenes de WB.

El enriquecimiento de los compartimentos subcelulares en cada una de las fracciones de la centrifugación diferencial, expresado como el número de cambio, se calculó a partir de la proporción entre las áreas del marcador proteico de cada fracción y el homogenizado celular inicial. El enriquecimiento de los marcadores en los gradientes de sacarosa se calculó como la proporción entre el área del marcador en cada carril y la cantidad de proteínas aplicada en cada uno de ellos.

5.2.8 Ensayo enzimático de catalasa

El ensayo de actividad catalasa, adaptado a partir del reportado por Iwase y cols. (2013), se utilizó para cuantificar el enriquecimiento de los peroxisomas en los gradientes de sacarosa. 20 µL de muestra se mezclaron con 30 µL de 50 mM de tampón fosfato (21 mM KH₂PO₄, 29 mM K₂HPO₄, pH 7.0) y 50 µL de 1% (v/v) Triton X-100, en un tubo de ensayo de

12x75 mm. Posteriormente se añadió 50 μ L de 30% (v/v) de H₂O₂, y la columna de espuma generada se midió a los 5 min de incubación. La actividad específica de la catalasa se calculó como la proporción entre la altura de la columna de espuma (mm) y la cantidad de proteínas en cada muestra (mg).

5.2.9 Caracterización de los compartimentos subcelulares mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los precipitados subcelulares se fijaron en 2.5% (v/v) glutaraldehído y 1% (m/v) de tetra-óxido de osmio. Las muestras de gradientes de sacarosa se diluyeron en PBS y se centrifugaron a 100,000 x g por una hora. Tras la fijación, los precipitados se deshidrataron en soluciones con porcentajes crecientes de etanol y se infiltraron con una mezcla 1:1 (v/v) de resina Epon y acetonitrilo. Se embebieron en resina Epon fresca, preparada de acuerdo con Luft (1961), se cortaron en un ultramicrotomo Reichert-Jung, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-1200 EX II.

5.2.10 Análisis estadístico

La comparación estadística en la distribución de los marcadores proteicos entre las diferentes fracciones subcelulares se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis por rangos y la prueba Post-hoc de Conover con corrección de Bonferroni, en lenguaje R (R Core Team, 2020). Para la significación estadística se seleccionó un valor de $p < 0.05$.

5.3 RESULTADOS

El fraccionamiento subcelular de las células CHO se basó en la homogenización mecánica de estas células y la posterior separación de sus organelos mediante centrifugación diferencial e isopícnica. Como resultado de la centrifugación diferencial, se obtuvieron compartimentos diferentes en cuanto a su composición proteica, con un enriquecimiento notable de proteínas de 15 kDa en el precipitado nuclear. Otras proteínas también presentaron una distribución diferencial entre las muestras en todo el rango de PM observados (Anexo 2).

Aunque sin diferencias significativas en los ensayos de WB ($p \geq 0.05$), se observó que el núcleo (histona H3) y citosol (Gapdh) se enriquecieron en el precipitado nuclear y el citosol, respectivamente. La mitocondria (Hsp60) se concentró fundamentalmente en los precipitados nuclear y mitocondrial, la MP (flotilina 1) y *cis*-Golgi (golgina A5) en los

precipitados mitocondrial y microsomal, y *trans*-Golgi (golgina-97) en el precipitado microsomal y el citosol. El RE (Grp78) se detectó en todos los compartimentos, con una mayor concentración en el precipitado microsomal (Fig 3). Esta distribución de los organelos por WB se corroboró mediante su caracterización morfológica en TEM (Anexo 3).

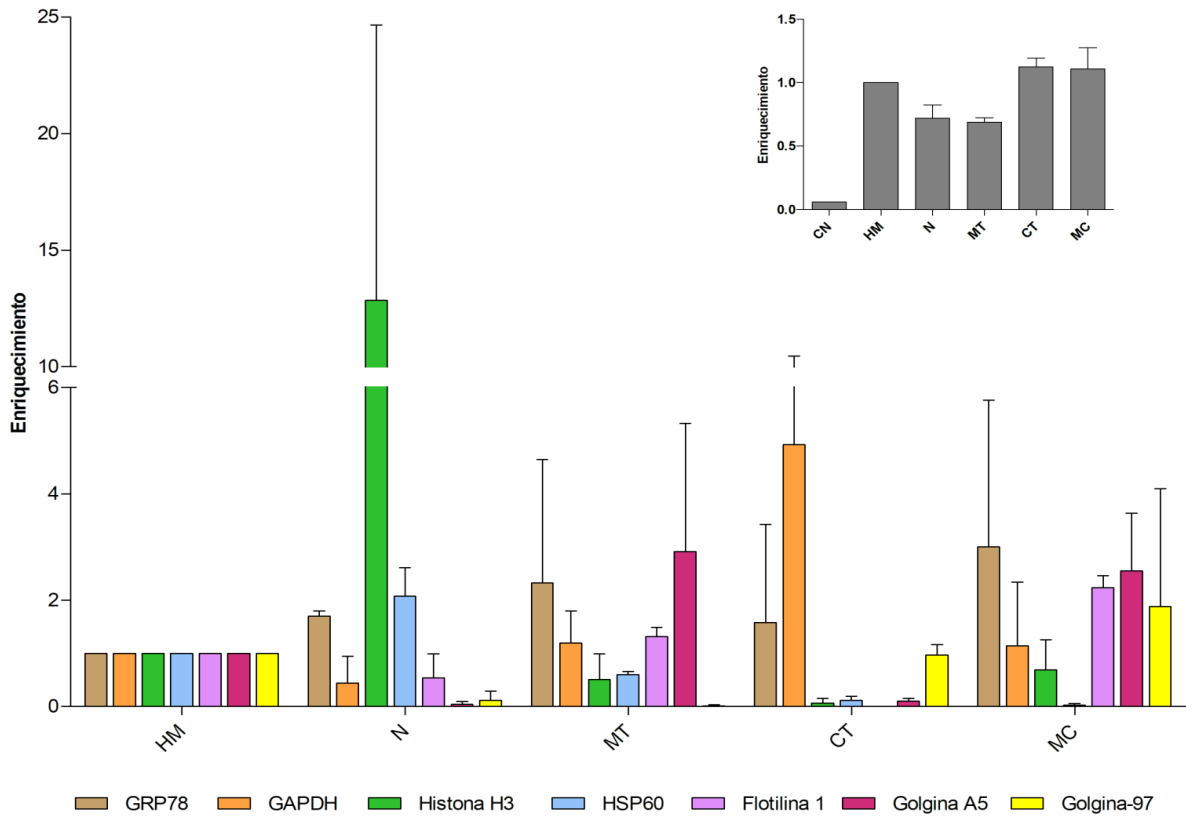


Fig 3. Enriquecimiento de marcadores proteicos en compartimentos de centrifugación diferencial. Grp78, Gapdh, histona H3, Hsp60, flotilina 1, golgina A5 y golgina-97 se seleccionaron como marcadores específicos de RE, citosol, núcleo, mitocondria, MP, *cis*-Golgi y *trans*-Golgi, respectivamente. La distribución de golgina-97 se confirmó mediante ELISA (recuadro interno). HM: homogenado, N, MT, MC: precipitado nuclear, mitocondrial y microsomal, respectivamente, CT: citosol, CN: control negativo (homogenizado de *E. coli*). La desviación estándar se calculó a partir de dos réplicas biológicas (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b).

Posteriormente, estos precipitados con un enriquecimiento inicial por centrifugación diferencial, fueron separados en gradientes discontinuos de sacarosa. En cada uno de ellos se obtuvieron 3 bandas visibles, concentradas y separadas entre sí, las cuales coincidieron con picos de concentración de proteínas (P1-P9, Fig 4A-C) y cambios marcados en la concentración de sacarosa.

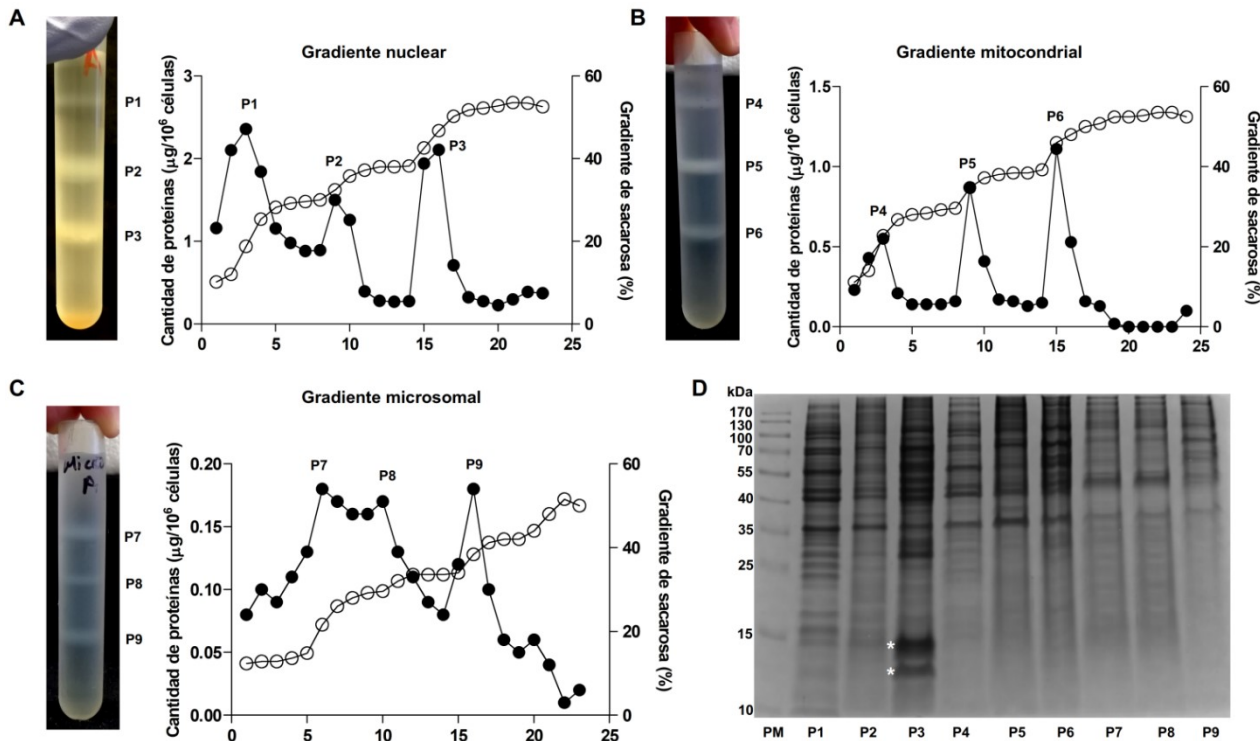


Fig 4. Caracterización de los gradientes nuclear, mitocondrial y microsomal. Los picos de proteínas (P1-P9) de los precipitados nuclear (A) y mitocondrial (B), en un gradiente de 30-60%, y microsomal (C), en un gradiente de 10-60%, se caracterizaron en base a la concentración de proteínas (círculos llenos), sacarosa (círculos vacíos) y composición proteica en SDS-PAGE (D). Los asteriscos indican el enriquecimiento de proteínas de 10-15 kDa. PM: Patrón de peso molecular (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b).

El enriquecimiento de organelos en cada uno de estos picos se determinó mediante WB (Fig 5) y actividad catalasa (Anexo 4). El RE se concentró fundamentalmente en P9 en el gradiente microsomal, núcleo en P3 del gradiente nuclear, congruente con el enriquecimiento de proteínas de 10-15 kDa en SDS-PAGE (P3, Fig 4D), mitocondria en las zonas de mayor densidad de los gradientes nuclear (P3) y mitocondrial (P6) ($p < 0.05$), y MP en las zonas de baja y media densidad de todos los gradientes ($p < 0.05$). *Cis*-Golgi migró hacia las zonas de media y alta densidad de los gradientes mitocondrial (P5, P6) y microsomal (P8, P9), mientras *trans*-Golgi se localizó principalmente en la región de baja densidad microsomal (P7) ($p < 0.05$). La contaminación citosólica se observó fundamentalmente en la zona de menor densidad del gradiente nuclear (P1), y los peroxisomas se detectaron en su mayoría en P3 y P6 (Anexo 4). La caracterización morfológica por TEM avaló los resultados de los ensayos de WB, y permitió identificar a P1 como una fracción enriquecida en RE (Anexo 5). La composición final de las fracciones provenientes de la centrifugación isopícnica se resume en la Fig 6.

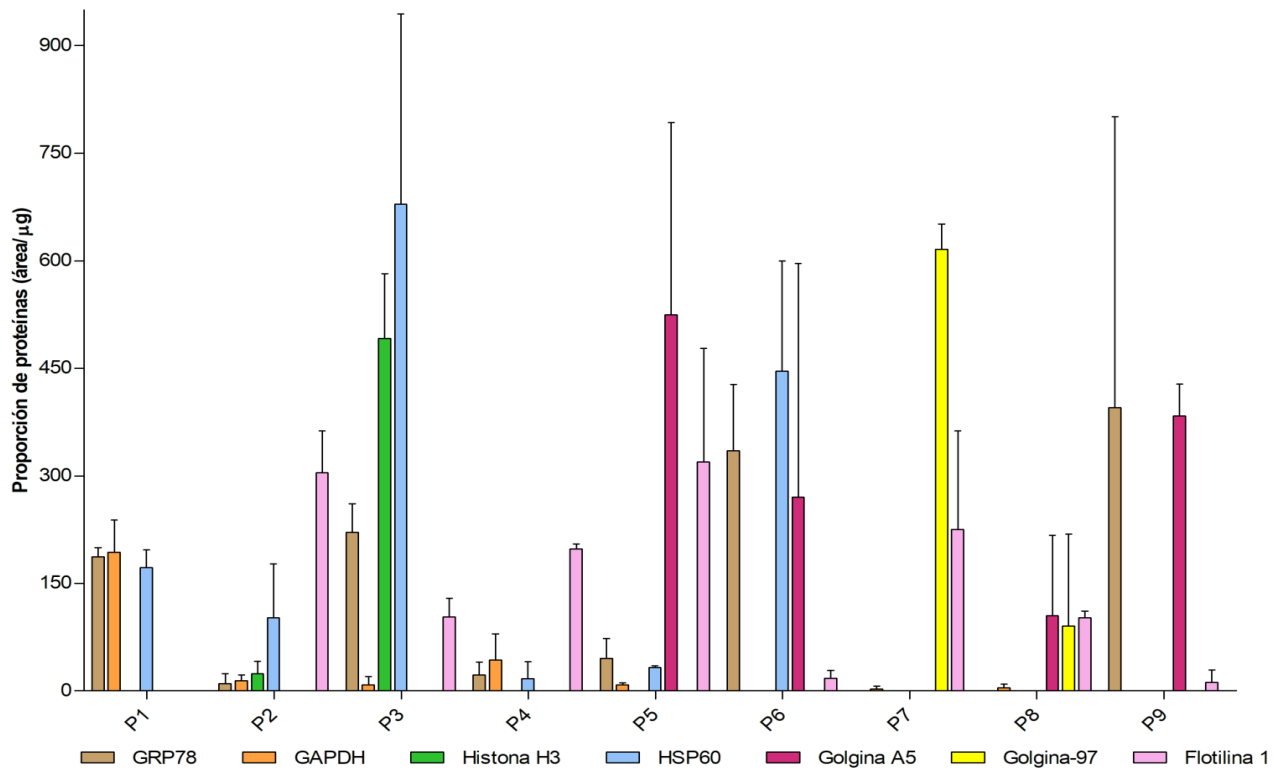


Fig 5. Enriquecimiento de organelos en gradientes de sacarosa nuclear, mitocondrial y microsomal. Grp78, histona H3, Gapdh, Hsp60, flotilina 1, golgina A5 y golgina-97 se cuantificaron mediante WB en los gradientes nuclear (P1-P3), mitocondrial (P4-P6) y microsomal (P7-P9). La desviación estándar se calculó a partir de dos réplicas biológicas (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b).

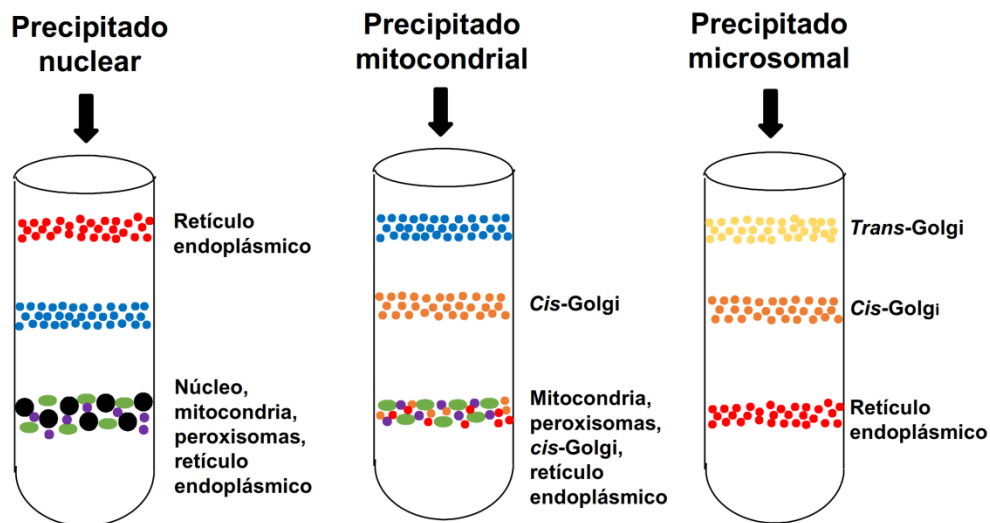


Fig 6. Distribución de organelos celulares mediante centrifugación isopícnica. Las bandas visibles obtenidas tras la separación de los precipitados nuclear (30-60%), mitocondrial (30-60%) y microsomal (10-60%) en gradientes de sacarosa se caracterizaron mediante cuantificación de proteínas y sacarosa, SDS-PAGE, WB y TEM (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b).

5.4 DISCUSIÓN

La VCS desempeña un papel preponderante durante la producción de PR, en muchos casos representando un cuello de botella para el incremento de la productividad (Peng y

Fussenegger, 2009; Hasegawa *et al.*, 2011; Le Fourn *et al.*, 2014). Debido a la baja representación de las proteínas microsomales, alrededor del 16% en hígado de rata (Albro, 1975), el enriquecimiento de proteínas de baja abundancia mediante aislamiento de organelos ha permitido incrementar hasta en un 30% la cobertura del proteoma (Paulo *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estas ventajas de la proteómica subcelular, se desarrolló y caracterizó un método de enriquecimiento de organelos de la VCS, basado en centrifugación diferencial e isopícnica, para una identificación precisa de los elementos de esta vía involucrados en la producción de PR.

Durante la primera etapa de centrifugación diferencial se obtuvieron los precipitados nuclear, mitocondrial y microsomal, y el citosol. La distribución de núcleo, mitocondria, microsomas y proteínas citosólicas en estos compartimentos se encuentra determinada por su densidad relativa y se comportó de acuerdo al esquema propuesto por Michelsen y von Hagen (2009) (Fig 3). Aunque la centrifugación diferencial es adecuada para la obtención de preparaciones enriquecidas en núcleos y mitocondrias (Butler y Judah, 1970; Dimauro *et al.*, 2012; Paulo *et al.*, 2013; Clayton y Shadel, 2014), esta técnica no permite separar entre sí otros organelos como RE, AG y endosomas (Erra *et al.*, 1999; Graham, 2002a; Spatuzza *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2006; Amodio *et al.*, 2009). Por tanto, dado que los precipitados de la fracción nuclear (células intactas, núcleos, mitocondrias, RE, MP), mitocondrial (mitocondrias, RE, MP, *cis*-Golgi) y microsomal (MP, *trans*-Golgi, *cis*-Golgi, RE) se enriquecieron en los organelos especificados tras la centrifugación diferencial, se procedió a una posterior separación de estos en gradientes de sacarosa para obtener fracciones de mayor pureza y menor contaminación.

En estos gradientes, las proteínas nucleares, de membrana y citosólicas se detectaron como contaminantes comunes (Fig 5), en correspondencia con lo reportado (Morand y Kent, 1986; Cezanne *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1997; Pasquali *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2006). La amplia distribución del RE, con una mayor concentración en el precipitado microsomal, está en congruencia con su localización otras células de mamíferos (Andreyev *et al.*, 2010), y pudiera explicarse por la proximidad física y, en muchos casos, los contactos con otros organelos (Bole *et al.*, 1989; Vance, 1990; Huber *et al.*, 2003; English y Voeltz, 2013).

La separación del precipitado microsomal en el gradiente de sacarosa resultó en tres bandas visibles identificadas como *trans*-Golgi, *cis*-Golgi y RE, en orden creciente de densidad (Fig 4C), como ha sido confirmado durante el uso de este y otros gradientes para

células CHO, HeLa, FRT, EpH4, y hepatocitos y enterocitos de ratón (Morand y Kent, 1986; Erra *et al.*, 1999; Pasquali *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2006; Wong y Adeli, 2009). En el gradiente mitocondrial la banda de mayor densidad se compuso principalmente por peroxisomas, *cis*-Golgi, RE y mitocondrias, mientras que, de los marcadores estudiados la banda de densidad media solo resultó positiva para *cis*-Golgi (Fig 6). La distribución de *cis*-Golgi y mitocondrias en fracciones de diferente densidad podría explicarse por la existencia de poblaciones heterogéneas de estos organelos (Lopez-Mediavilla *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 2004) y el contacto cercano entre ellos (Dolman *et al.*, 2005). En el gradiente nuclear, los experimentos de WB (Fig 5) y TEM (Anexo 5) indicaron la presencia de RE liso en la banda de menor densidad, mientras que la banda de mayor densidad se enriqueció sustancialmente en cuerpos nucleares, de acuerdo a lo esperado por sus valores de densidad (Michelsen y von Hagen, 2009).

Un panorama común dentro del fraccionamiento celular, es la falta de réplicas biológicas (Morand y Kent, 1986; Erra *et al.*, 1999; Paulo *et al.*, 2013), cuantificación de marcadores (Butler y Judah, 1970; Morand y Kent, 1986; Cezanne *et al.*, 1992; Erra *et al.*, 1999; Breuza *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2006; Paulo *et al.*, 2013) y estadística comparativa (Foster *et al.*, 2006), o el reporte de directrices para ciertos organelos (Storrie y Amadden, 1990; Graham, 2001, 2002a, 2002b, 2004; Michelsen y von Hagen, 2009; Wong y Adeli, 2009; Clayton y Shadel, 2014). Contrariamente, los protocolos de fraccionamiento caracterizados en este trabajo ofrecen la ventaja de una distribución cuantitativa de los marcadores proteicos y su comparación estadística entre las diferentes fracciones. Adicionalmente, la obtención de fracciones enriquecidas en organelos de la VCS, presentes en bandas visibles, definidas y bien separadas entre sí, permitió la incorporación de estos protocolos al diseño experimental de proteómica diferencial entre las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445, para la identificación de componentes de esta vía asociados a cambios en la productividad de PR.

VI. CAPÍTULO III: PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS PROTEÓMICOS

6.1 ANTECEDENTES

Dentro del diseño experimental de la investigación proteómica, la preparación de muestras constituye un paso crítico para obtener resultados reproducibles, satisfactorios y significativos. Específicamente dentro de este esquema, la precipitación de proteínas constituye un elemento esencial, incorporado a los protocolos de rutina debido a que permite la eliminación de sustancias interferentes como ácidos nucleicos y lípidos, la concentración de proteínas, y la inactivación de proteasas y otras enzimas modificadoras de proteínas (Barritault *et al.*, 1976; Ingham, 1984; Wessel y Flüggé, 1984; Scopes, 1994; Burgess, 2009; Koontz, 2014). Los protocolos de M/C, acetona y TCA-acetona han sido los más frecuentemente empleados para este fin, en muestras tan diversas como semillas de plantas (Capriotti *et al.*, 2015), tejidos animales (Fic *et al.*, 2010; Santa *et al.*, 2016; Benabdelkamel *et al.*, 2018), homogenizados de bacteria (Doucette *et al.*, 2014), plasma humano (Jiang *et al.*, 2004; Nejadi *et al.*, 2014) y sobrenadantes de cultivos de células CHO (Valente *et al.*, 2014).

Varias modificaciones incorporadas a estos métodos han demostrado un incremento en la recuperación final de las proteínas. Crowell y cols. (2013) aplicaron la hipótesis del par iónico a la precipitación con acetona, donde la adición de NaCl neutraliza las cargas eléctricas opuestas en la superficie de las proteínas, resultando en un recobro mayor al 80% para la mayoría de los controles seleccionados en este estudio.

En el caso del método de TCA-acetona, se han evaluado varias modificaciones que favorecen la solubilización de las proteínas precipitadas, tales como la sonicación (Manadas *et al.*, 2006; Fic *et al.*, 2010) y el aumento de pH (Nandakumar *et al.*, 2003). La dificultad de recuperar las proteínas precipitadas con este método se debe a que los iones tricloroacetatos permanecen unidos a las proteínas incluso después de aplicar varios lavados con acetona, lo que impide que estas puedan renaturalizarse e incorporarse a la fase acuosa (Sivaraman *et al.*, 1997; Rajalingam *et al.*, 2009). La solubilización secuencial es otra modificación a este método, la cual emplea agentes desnaturizantes, reductores y detergentes, para eliminar puentes disulfuro, evitar la interacción de parches hidrofóbicos y desnaturizar las proteínas (Jacobs *et al.*, 2001). También se han incorporado pasos de CD para favorecer la disociación

de los complejos multiméricos de proteínas (Nandakumar *et al.*, 2003; Manadas *et al.*, 2006, Qi *et al.*, 2015).

Pese a que cada protocolo de precipitación ofrece diferentes ventajas en dependencia de la naturaleza de la muestra, las condiciones técnicas y las mejoras incorporadas (Jiang *et al.*, 2004; Fic *et al.*, 2010; Nejadi *et al.*, 2014; Capriotti *et al.*, 2015; Santa *et al.*, 2016; Benabdelkamel *et al.*, 2018), estos deben ser comparados para cada muestra con el objetivo de seleccionar el más adecuado en cada caso. Hasta el presente no se ha reportado la comparación de protocolos de precipitación en homogenizados de células CHO, los cuales son considerados una mezcla sumamente compleja de proteínas (Baycin-Hizal *et al.*, 2012). Por tanto, en el presente capítulo se evaluó y seleccionó el método de precipitación de mayor eficiencia de recuperación para los homogenizados de estas células entre los protocolos de M/C, acetona y TCA-acetona, con la incorporación de varias modificaciones, para su aplicación a las fracciones provenientes de la centrifugación isopícnica y previo a su caracterización proteómica.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Extracción de proteínas celulares

Las células se colectaron en fase exponencial de crecimiento, se centrifugaron a 185 x g durante 5 min y se lavaron dos veces en PBS. El precipitado celular se solubilizó en tampón IEF, suplementado con 10% (v/v) de SigmaFast Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El homogenizado se sonicó dos veces durante un minuto a 10 μ m (Soniprep 150, MSE, Heathfield, East Sussex, Reino Unido) y se centrifugó a 16,000 x g por 25 min. El sobrenadante (homogenizado clarificado) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.2.2 Precipitación y recobro de proteínas

El homogenizado clarificado se diluyó en 1 mM EDTA, 1.31 M sacarosa, 10 mM HEPES, pH 7.4, a una concentración final de 0.2 mg/mL, y se precipitaron de acuerdo a las condiciones detalladas en el Anexo 6. Los precipitados se solubilizaron en tampón IEF, excepto en aquellos casos donde se utilizaron agentes de co-solubilización. Todas las condiciones experimentales se evaluaron por duplicado.

La precipitación con M/C se llevó a cabo de acuerdo con Wessel y Flüggé (1984). En el caso de TCA-acetona, se añadió un volumen de TCA al 30% (m/v) a la muestra, se mezcló

y se incubó a -20 °C durante 16 h. El precipitado obtenido tras la centrifugación a 16,000 x g durante 25 min, se lavó tres veces en acetona al 80% (v/v) (Mechin *et al.*, 2007). La precipitación con acetona se llevó a cabo de acuerdo con recomendaciones previas (Crowell *et al.*, 2013). Brevemente, se mezcló la muestra con 100 mM NaCl, se adicionaron cuatro volúmenes de acetona al 80% (v/v), seguido de mezclado e incubación a -20 °C durante 16 h. Este precipitado se centrifugó a 16,000 x g durante 25 min, y se lavó dos veces con cuatro volúmenes de acetona al 80% (v/v). En todos los casos, los precipitados se recuperaron por centrifugación a 16,000 x g durante 25 min, y se secaron durante 5 min en cabina de flujo laminar.

Las siguientes modificaciones se introdujeron en los protocolos de M/C y acetona: 5 ciclos de CD, 10 ciclos de ultrasonido de 10 seg cada uno con 10 seg de descanso en un baño de ultrasonido (BU, 9354001, UL 1K58, Ney Ultrasonic), y 10 ciclos de ultrasonido de 10 seg cada uno con 10 seg de descanso en un homogenizador ultrasónico a 5 µm (HU, Soniprep 150, MSE, Heathfield, East Sussex, UK). Estas modificaciones se aplicaron en presencia o ausencia de pre-solubilización del precipitado en una solución al 10% (v/v) de 0.2 M NaOH, antes de la adición de tampón IEF (Nandakumar *et al.*, 2003). En el caso de TCA-acetona se incorporaron todas las modificaciones introducidas para M/C y acetona, y adicionalmente los ciclos de CD en todas las variantes evaluadas.

6.2.3 Procesamiento de imágenes

La construcción de las gráficas de porcentajes de recobro de los métodos de precipitación se realizó en el software GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). El análisis densitométrico de los geles de SDS-PAGE se realizó en el software ImageJ v1.52a (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

6.2.4 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en lenguaje de programación R (R Core Team, 2020). La prueba de Kruskal-Wallis por rangos y la prueba Post-hoc de Conover con corrección de Bonferroni se emplearon para detectar diferencias significativas entre los porcentajes de recobro de las diferentes variantes de precipitación de los tres métodos evaluados (Pohlert, 2014; Graves *et al.*, 2015).

6.3 RESULTADOS

La selección del método de precipitación más adecuado para homogenizados de células CHO, se realizó a partir de la cuantificación de la cantidad de proteínas presentes en la muestra inicial comparadas con las recuperadas en el tampón de solubilización, durante la precipitación con M/C, acetona y TCA-acetona (Fig 7). De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis por rangos y la prueba Post-hoc de Conover con corrección de Bonferroni, se encontraron diferencias significativas entre las diferentes variantes de precipitación ($p < 0.05$) para M/C (Fig 7A) y TCA-acetona (Fig 7C). En el caso del uso de acetona todas las condiciones mostraron el mismo recobro (Fig 7B).

Los ciclos de CD y pre-tratamiento con NaOH en M/C no mejoraron significativamente los valores del protocolo estándar, mientras que los ciclos de BU y HU incrementaron estos en 42% y 28%, respectivamente, en ausencia de NaOH (Fig 7A, $p < 0.05$). Contrario a estos resultados, el tratamiento de los precipitados de TCA-acetona con NaOH incrementó el recobro en 41, 25, 40 y 47% para las variantes estándar, CD, CD+BU y CD+HU, respectivamente, mientras que el resto de las modificaciones no surtieron ningún efecto adicional en presencia de esta base (Fig 7C).

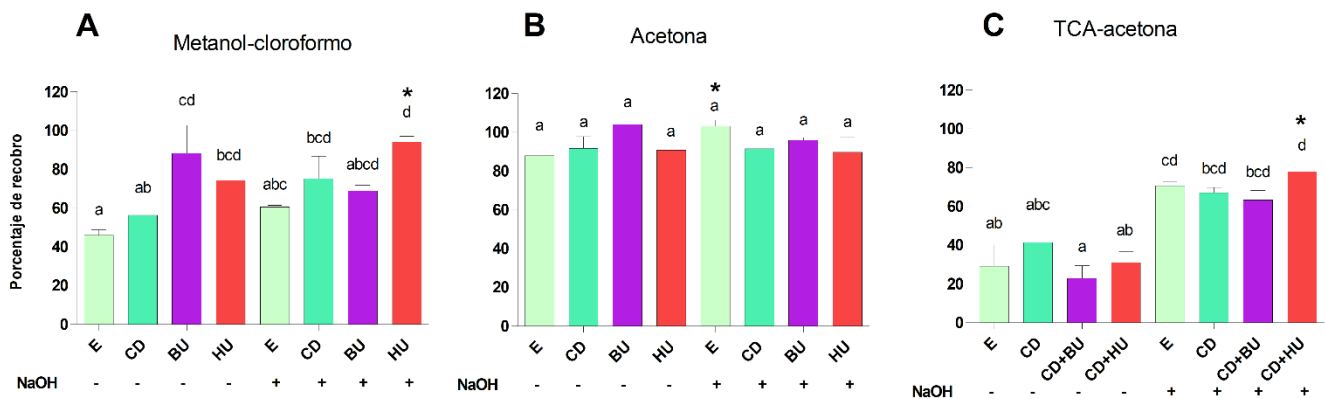


Fig 7. Eficiencia de recobro de proteínas de homogenizados de células CHO. Lisados de células CRL-12444 se precipitaron mediante metanol-cloroformo (M/C) (A), acetona (B) y ácido tricloroacético (TCA)-acetona (C), usando un protocolo estándar (E), o con las siguientes modificaciones: ciclos de congelación/descongelación (CD), incubación en baño de ultrasonido (BU) o ciclos de homogenizador ultrasónico (HU). El paso de pre-solubilización con NaOH se aplicó a los protocolos estándar y sus variantes. Las barras de error representan la desviación estándar de dos muestras biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del mismo panel ($p < 0.05$), de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis por rangos y la prueba Post-hoc de Conover con corrección de Bonferroni. La variante de mayor recobro seleccionada para cada método de precipitación se encuentra indicada por un asterisco (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020c).

La variante de mayor recuperación y menor desviación estándar para cada método fueron HU (M/C), E (Acetona) y CD+HU (TCA-acetona), todas las cuales incorporaron el pre-tratamiento del precipitado con NaOH (Fig 7, asterisco). Estas variantes fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), donde el mayor recobro se obtuvo con

acetona (103.12 ± 5.74 %), seguido por M/C (94.22 ± 4.86 %) y TCA-acetona (77.91 ± 8.79 %). El análisis cualitativo de las proteínas recuperadas en SDS-PAGE no mostró diferencias notables entre los patrones de proteínas obtenidos para cada una de estas variantes y el homogenizado (Anexo 7). En consonancia con los resultados del porcentaje de recobro, varias bandas de proteínas del método TCA-acetona presentaron menor intensidad que el resto de las muestras (Anexo 7, carril 4).

6.4 DISCUSIÓN

Los métodos de precipitación son frecuentemente incorporados al inicio de la preparación de muestras, por su eficiencia en el aislamiento y concentración de proteínas (Schumacher *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 2004; Warder *et al.*, 2009). Otras ventajas incluyen la inactivación de proteasas y la eliminación de sustancias interferentes con geles bidimensionales y espectrometría de masas (Retz y Steele, 1977; Wessel y Flügge, 1984; Shaw y Riederer, 2003; Mechin *et al.*, 2007).

Sin embargo, la adopción de un protocolo universal de precipitación no es factible debido a la gran diversidad de proteínas presentes en cada proteoma, y a las diferencias en sus propiedades físico-químicas y la composición de cada muestra biológica. Incluso, esta selección puede resultar más compleja cuando se consideran las modificaciones que puede sufrir cada uno de estos protocolos, y que influyen significativamente en el recobro y composición de las proteínas precipitadas (Jacobs *et al.*, 2001; Nandakumar *et al.*, 2003; Manadas *et al.*, 2006; Crowell *et al.*, 2013; Doucette *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2015). En el caso de proteínas provenientes de homogenizados de células CHO no se ha realizado hasta el momento la comparación de la eficiencia de recobro a partir de precipitados obtenidos por diferentes métodos de precipitación. Por estas razones, se compararon los métodos de precipitación M/C, acetona y TCA-acetona con el objetivo de seleccionar el más adecuado para la recuperación de proteínas de estas células y su posterior análisis mediante MS/MS.

La precipitación con el protocolo estándar de acetona mostró una recuperación significativamente superior al de M/C y TCA-acetona para homogenizados de células CHO (Fig 7), similar a lo reportado para proteínas ribosomales (98-100%) (Barritault *et al.*, 1976), de cerebro de rata (70%) (Fic *et al.*, 2010) y de *E. coli* (88-100%) (Doucette *et al.*, 2014). Este método también ha demostrado su superioridad con respecto al de TCA-acetona y una eficacia similar al M/C para tejidos animales y homogenizados de bacteria (Fic *et al.*, 2010;

Doucette *et al.*, 2014; Santa *et al.*, 2016; Benabdelkamel *et al.*, 2018). La adición de NaCl de acuerdo con recomendaciones previas que hipotetizan un efecto de par iónico (Crowell *et al.*, 2013; Valente *et al.*, 2014), pudiera ser la causa del alto rendimiento de este método (>87%, Fig 7). En el caso de gradientes de sacarosa, la sacarosa del propio gradiente podría actuar como un catalizador de la precipitación por acetona (Cheng *et al.*, 2016).

La incorporación de ciclos de CD (Qi *et al.*, 2015), sonicación (Manadas *et al.*, 2006; Fic *et al.*, 2010) y pre-solubilización con NaOH (Nandakumar *et al.*, 2003) a los protocolos de precipitación ha favorecido el rendimiento, reproducibilidad y especificidad de los resultados proteómicos. Su incorporación a la precipitación con acetona no aumentó significativamente el porcentaje de recobro, mientras que la sonicación tuvo un efecto positivo en el método de M/C. A diferencia de M/C y acetona, la adición de NaOH a los precipitados de TCA-acetona aumentó el recobro en un máximo de 2.78 veces. Este efecto se debe a que el incremento del pH causado por el NaOH favorece la disociación del ión tricloacetato de las proteínas y, por ende, su solubilización (Sivaraman *et al.*, 1997; Rajalingam *et al.*, 2009).

La comparación de métodos de precipitación para proteínas provenientes de células CHO solo se ha llevado a cabo para aquellas que se secretan en el sobrenadante de cultivo (Valente *et al.*, 2014), donde, el recobro con acetona ($\approx 80\%$), M/C ($\approx 85-90\%$) o etanol ($\approx 80\%$) fue significativamente mayor que el obtenido con TCA ($\approx 40\%$). Similar a estas proteínas secretadas al medio de cultivo, aquellas provenientes de homogenizados celulares se recuperaron más eficientemente con acetona, y en menor medida con M/C, con respecto a TCA-acetona. Tomando en consideración todos los resultados, se seleccionó el protocolo estándar de acetona como el método más adecuado para la precipitación de los organelos obtenidos por centrifugación isopícnica, debido a su mayor eficiencia en la recuperación de proteínas y la obtención de precipitados relativamente fáciles de solubilizar, en comparación con los métodos de M/C y TCA-acetona, lo que lo recomienda como una técnica estándar previo al análisis proteómico.

VII. CAPÍTULO IV: PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE LA VÍA CLÁSICA DE SECRECIÓN DE CÉLULAS CHO PRODUCTORAS DE UN ANTICUERPO RECOMBINANTE

7.1 ANTECEDENTES

7.1.1 Síntesis, modificación y transporte de proteínas en la VCS

La VCS en eucariontes constituye un grupo de organelos que trabajan coordinadamente para la síntesis, modificación y transporte de proteínas hacia el medio extracelular, la MP y otros organelos. Está conformada por el RE, ERGIC, AG y el conjunto de vesículas asociadas a estos organelos, los cuales a su vez se subdividen en regiones o dominios con actividades específicas (Lodish *et al.*, 2000). Esta vía también participa activamente en el mantenimiento de la homeostasis celular (Ron y Walter, 2007; Hetz y Papa, 2018), la biogénesis de organelos (Agrawal y Subramani, 2016), metabolismo de lípidos (Jacquemyn *et al.*, 2017), regulación del calcio intracelular (Carreras-Sureda *et al.*, 2018), apoptosis (Hetz y Papa, 2018), señalización celular (Farhan y Rabouille, 2011) y autofagia (Kabir *et al.*, 2018), entre otros procesos.

El RE es el punto de entrada a la vía, pues los ribosomas que se encuentran adosados a este traducen las proteínas que serán transportadas al lumen. Este proceso es co-traducciona y comienza por el reconocimiento de secuencias con un núcleo hidrofóbico, en el extremo N-terminal de la proteína que se está sintetizando, por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP). Esta partícula es un complejo de SRP-ARN y seis proteínas (SRP9, 14, 19, 54, 69, 72), con diferentes funciones dentro del proceso de translocación (Siegel y Walter, 1988; Brown *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 2017). Una vez que el péptido señal es reconocido, se forma un complejo trimérico ARNm-ribosoma-SRP y se pausa la traducción mediante el dominio *Alu* de SRP. Posteriormente, el dominio S de SRP es reconocido por la subunidad α del receptor de SRP (SRPR) (Wild *et al.*, 2019). La subunidad β de SRPR es una proteína transmembrana cuya función es mantener a este receptor en la membrana del RE. A continuación, el complejo ARNm-ribosoma se traslada a un translocón Sec61 disponible, donde prosigue la traducción y la proteína naciente es incorporada al lumen o membrana del RE. La actividad GTPasa de SRP y su receptor asegura la disociación de estos y permite que queden libres para otro evento de translocación (Rapiejko y Gilmore, 1997; Mandon *et al.*, 2003; Shan *et al.*, 2009).

La entrada al lumen del RE es favorecida por la unión de GRP78, una chaperona con actividad ATPasa que, junto a otras proteínas residentes en el RE, interactúa con la proteína cliente para que esta adquiera su conformación nativa (Gething, 1999), a la vez que el péptido señal es eliminado por la peptidasa señal (Walker y Lively, 2013). Algunas de las proteínas reportadas como necesarias para el plegamiento en el RE son DNAJB11, DNAJC3, GRP94, prolil-isomerasas (FKBP13, 23, 65), PDIA1 y ERP57, entre otras (Gidalevitz *et al.*, 2013). En este compartimento también se forman los enlaces disulfuro correctos y comienza la N-glicosilación mediante el reconocimiento de la secuencia Asn-X-Ser/Thr por el complejo de la oligosacaril transferasa (OST) (Cherepanova *et al.*, 2016). La acción de glucosidasas y manosidasas en el RE permite la exportación de proteínas ricas en manosa hacia el AG, donde una serie de enzimas, localizadas en diferentes regiones de este organelo, eliminan manosas y añaden de forma secuencial residuos de fucosa, galactosa y ácidos siálicos, resultando en una familia de moléculas de la misma proteína con diferentes grados de glicosilación. Si la proteína es O-glicosilada, en el AG se le añaden cadenas cortas de glicanos en residuos de Ser y Thr (Roth, 2002).

En el caso de los AcM, la N-glicosilación ocurre en la Asn297, con un efecto importante sobre las funciones efectoras de su región Fc (Cymer *et al.*, 2018). Los cambios en la N-glicosilación también han demostrado modificar la interacción de los AcM con los receptores FcRn (involucrados en su farmacocinética), su estabilidad térmica y su estado de agregación (Wada *et al.*, 2019). El AcM anti hIL-8 producido en células CHO CRL-12445 es rico en fucosa (82%) y galactosa (GI=0.30), con un predominio de las glicofomas F(6)A2G0, F(6)A2G1 y F(6)A2G2 (Krahn *et al.*, 2017). Este tipo de glicosilación es característica de los AcM producidos en células CHO.

Además de la glicosilación, existe un conjunto de otras MPT que ocurren en el AG y que pueden afectar la estabilidad y función de las proteínas secretadas. Entre estas podemos mencionar la acetilación y sulfatación de los glicanos, sulfatación de tirosinas, fosforilación, metilación de lisinas, cortes proteolíticos (Potelle *et al.*, 2015) y gamma-carboxilación (Bolt *et al.*, 2007).

Una vez glicosiladas en el RE, las proteínas permanecen en el ciclo de calnexina/calreticulina hasta que adquieran la conformación correcta y sean transportadas al AG. En este ciclo participan, además de estas lectinas, glucosidasas, óxido-reductasas, prolil-isomerasas, UGGT y manosidasas (Cherepanova *et al.*, 2016). En íntima relación con estos procesos de glicosilación y plegamiento de proteínas en el RE, se encuentra la

degradación de proteínas asociada al RE (ERAD), un mecanismo a través del cual las moléculas proteicas que no alcanzan su plegamiento nativo son retrotranslocadas al citosol y degradadas por el proteosoma (Fregno y Molinari, 2019). Aunque ERAD se presenta en diferentes formas en dependencia del daño y la proteína en cuestión, el mecanismo sigue el mismo orden de eventos. Tanto la secuencia proteica como los glicanos de estas moléculas son reconocidas, en cooperación con chaperonas, por las lectinas OS9 y XTP3, y EDEM, las que forman parte de complejos multiméricos de membrana denominados retrotranslocones (Tepedelen, 2019). Posteriormente, las proteínas son translocadas al citosol, ubiquitinadas (por complejos E3 ligasas), extraídas de la membrana (por AAA ATPasas) y reconocidas por el proteosoma para su degradación (Sun y Brodsky, 2019). Se han descrito además otros miembros involucrados en el reconocimiento del daño, la formación y estabilidad del retrotranslocón, E2 ubiquitina-ligasas y cofactores, como derlinas, SEL1, HERP y UBE2G1 (Ruggiano *et al.*, 2014).

A pesar de estos mecanismos de plegamiento, modificación y degradación de proteínas, la acumulación de intermediarios en el RE puede causar un estrés debido a la formación de agregados moleculares que perturban la homeostasis, llegando a activar la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Otras causas de estrés del RE son la falta de nutrientes, hipoxia y pérdida de la regulación del calcio (Hetz y Papa, 2018). La UPR se puede activar a través de las vías IRE1 α , ATF6 y PERK, proteínas transmembrana del RE cuyos dominios luminales son capaces de detectar el aumento de intermediarios no plegados y cambiar sus actividades enzimáticas o localización. PERK es una cinasa que fosforila al factor eIF2 α reduciendo la traducción global de proteínas, e incrementando la abundancia del factor de transcripción ATF4, con lo cual se reduce la carga del RE, aumenta la proteólisis, autofagia, respuesta antioxidante y capacidad de plegamiento de este organelo. En caso de un estrés prolongado esta vía puede conllevar a la apoptosis. IRE1 α es un endorribonucleasa que procesa el ARNm de XBP-1 y, de esta forma, genera un factor de transcripción estable (Ron y Walter, 2007; Walter y Ron, 2011). ATF6 por su parte, es transportado al AG y procesado por proteasas para generar el factor de transcripción ATF6f (Adachi *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2018). Tanto XBP-1 como ATF6f incrementan la expresión de genes de ERAD, chaperonas, tráfico vesicular, síntesis de lípidos y translocación de proteínas, entre otros. La UPR se encuentra regulada a varios niveles e integra la homeostasis del RE con la activación de varios programas adaptativos para restablecer la proteostasis de la VCS (Hetz y Papa, 2018).

El tráfico de proteínas a lo largo de la vía de secreción ocurre a través de vesículas, dando lugar a varios modelos que explican el transporte entre RE y AG, intra-Golgi y de la red del *trans*-Golgi (TGN) hacia otros compartimentos. En el transporte intra-Golgi, las proteínas secretadas pueden ser incorporadas a vesículas en una dirección antero-posterior (Modelo de transporte vesicular) y/o las cisternas donde se encuentren pueden madurar de *cis* a *trans*-Golgi por el tráfico retrógrado de vesículas que cambian las proteínas residentes (Modelo de maduración de cisternas) (Elsner *et al.*, 2003). No obstante, en cualquier caso, el transporte de vesículas constituye la base sobre la cual las proteínas son llevadas a su destino final, se generan nuevos organelos y se define la identidad de estos.

Los eventos generales del tráfico vesicular son el reclutamiento de la cubierta, formación de la vesícula, escisión, pérdida parcial de la cubierta, transporte por elementos del citoesqueleto, reconocimiento y anclaje, y fusión con la membrana aceptora (Bonifacino y Glick, 2004). La formación de las vesículas ocurre en membranas especializadas, con una composición particular de lípidos y proteínas que reclutan a las proteínas de la cubierta e inician la formación de la vesícula. Las proteínas de cubierta son complejos proteicos que favorecen la formación de la vesícula mediante la deformación de la membrana y reclutan a cargos, receptores cargos y otras proteínas necesarias para que ocurran los pasos siguientes del tráfico vesicular. Entre estas cubiertas podemos mencionar a la clatrina (post-Golgi y vía endocítica), coátomero (intra-Golgi y de Golgi a RE) y COPII (de RE hacia ERGIC y *cis*-Golgi), las cuales participan en vías específicas de transporte (Beck *et al.*, 2009; Hsu y Yang, 2009; Arakel y Schwappach, 2018).

Un papel crucial en este contexto lo juegan las GTPasas monómericas, y las proteínas que controlan su activación (factores GAP y GEF). Estas GTPasas se incorporan a las membranas en presencia de un factor GEF que favorece el intercambio de GDP por GTP, lo cual cambia su conformación y expone un motivo lipídico que les permite su inserción en la membrana. Los factores GAP, por el contrario, estimulan la actividad GTPasa y, por tanto, el regreso a la conformación anterior. Estas GTPasas interactúan con numerosas proteínas llamadas efectores, controlando su localización y actividad. Entre estos efectores podemos mencionar las proteínas adaptadoras (median el reclutamiento de la cubierta y receptores cargos, y deformación de membranas) (Park y Guo, 2014), las proteínas de cubierta, receptores cargo, proteínas de andamiaje, factores de reconocimiento y anclaje, proteínas SNAREs, enzimas modificadoras de lípidos, proteínas motoras, entre muchas otras (Bhuin y Roy, 2014; Wandinger-Ness y Zerial, 2014). Entre estas GTPasas se encuentran Sar1p

(COPII), Arf (COPI, vesículas de clatrina, compartimentos post-Golgi) y Rabs. Estas últimas además de regular el tráfico vesicular definen la identidad de las membranas (Zerial y McBride, 2001).

El reconocimiento y anclaje de las vesículas por su correspondiente membrana aceptora ocurre a través de proteínas de membrana con una región citoplasmática extensa que permite la interacción a largas distancias (EEA1, golginas), y de complejos supramoleculares como p115, TMF1, COG, TRAPP y el exocisto (Wang *et al.*, 2017a). Tras establecerse esta proximidad de membranas, ocurre la fusión por la formación de un complejo entre v- y t-SNAREs. Estas proteínas SNAREs, ancladas a las membranas por su extremo C-terminal, son específicas de la vesícula (v-) y la membrana aceptora (t-) y, junto a otros factores que regulan su función e interacciones, como las proteínas SM (Carr y Rizo, 2010), median la especificidad de la fusión, constituyendo el nivel de regulación final de la fidelidad del transporte vesicular (Hong, 2005). El desensamblaje de los complejos SNARE en la membrana aceptora tras su fusión, para el reciclaje de las SNAREs individuales, ocurre mediante la actividad ATPasa de NSF, reclutada por α -SNAP (Bonifacino y Glick, 2004).

7.1.2 Estudios ómicos diferenciales de células CHO recombinantes

El papel relevante de las células CHO en el ámbito biotecnológico ha impulsado una investigación profunda de su biología a través de la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica (Baycin-Hizal *et al.*, 2012; Dietmair *et al.*, 2012; Rupp *et al.*, 2014, 2018). Dentro de estos estudios, la transcriptómica y la proteómica han permitido descubrir nuevos blancos proteicos cuya modulación pudiera incrementar la productividad y calidad de las PR producidas por estas células. Estos blancos han sido identificados en bajas temperaturas de cultivo (Bedoya-López *et al.*, 2016), adición de butirato de sodio (Baik y Lee, 2010), medio de cultivo hiperosmótico (Kim *et al.*, 2012), clones con fenotipos diferentes de degradación de PR (Henry *et al.*, 2018), modificación genética de clones (Doolan *et al.*, 2008; Meleady *et al.*, 2008), y clones con diferente estabilidad en la producción de PR (Meleady *et al.*, 2011) y q_p (Nissom *et al.*, 2006; Carlage *et al.*, 2009; Ho, 2013; Kang *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016; Hausmann *et al.*, 2018). En este último caso, se han comparado células CHO que secretan, con diferente q_p , proteínas de fusión (Nissom *et al.*, 2006; Carlage *et al.*, 2009), AcM (Ho, 2013; Kang *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2015; Hausmann *et al.*, 2018), y fragmentos de anticuerpos (Sommeregger *et al.*, 2016) (Tabla II).

Tabla II. Estudios de transcriptómica (T) y proteómica (P) de células CHO donde se comparan poblaciones celulares con diferentes productividades de proteínas recombinantes (PR). Los genes se encuentran escritos en cursiva e inicial mayúscula, y las proteínas en

	EIF3, RPL30, RPS6, RPS7) Plegamiento de proteínas (HSPA5, CCT4, CCT7) Proliferación celular (NAP1L1) Ciclo celular (RACK1, S100A6, RAN) Glicólisis (ENO1, G3PDH) Citoesqueleto (CAP1) Metabolismo de carbohidratos (PSAT1) Mecanismos antioxidantes (TRX)	HIST1H2AF) Transcripción (HNRNPA2B1) Citoesqueleto (FLNA, VIM, MYL12B, MYH9) Metabolismo de LDL (ANXA2) Tráfico vesicular (MYH9) Proliferación celular (LGALS1, CLIC1) Señalización celular (OSTF1) Regulación del proteosoma (PSME1) Síntesis de esteroides (PTGES3)	expresan una proteína de fusión humanizada vs células que coexpresan además BCL-xL		cols. (2009)
CHOK1 y CHO DUKX	Proteólisis (<i>Bap1, Ctsl, Nedd4</i>) Síntesis de proteínas (<i>Elf3s1, Elf5a, Rpl3</i>) Plegamiento de proteínas (<i>Cct6a, Hspa8, Dnaja1, Ppid, Pdia4, Canx</i>) Transporte vesicular (<i>Nsf, Kns2, Lman2, Rab6a, Rtn3</i>) Glicosilación (<i>Dpm1, Slc35a1</i>) Transcripción (<i>App, Pparb</i>) Señalización celular (<i>App, Hras, Mapk1, F2R, Hmgb1</i>) Metabolismo de lípidos (<i>Cd36, Npc1</i>) Corte y empalme de ARNm (<i>Hnrpk</i>) Metabolismo de nucleósidos (<i>Hprt1</i>) Organización de la cromatina (<i>Hmgb1</i>) Reparación del ADN (<i>Hmgb1</i>) Citoesqueleto (<i>Vim</i>) Metabolismo de LDL (<i>Anxa2</i>) Proliferación celular (<i>Cdc20</i>) Catabolismo de proteínas (<i>Psm4</i>)		Muestras de cultivos en fase estacionaria de hipotermia moderada	T	Clarke y cols. (2011)
CHO-BRI	Plegamiento de proteínas (TRAP1, GRP75) Citoesqueleto (LMNA) Metabolismo de carbohidratos (ALDH, CS, GPD2) Metabolismo de lípidos (ACOT2, HSD17B10, GPD2) Metabolismo de aminoácidos (AST, HIBADH, DLD) Proliferación celular (PHB) Fosforilación oxidativa (NDUFV1, NDUFS3) Síntesis de proteínas (RPLP0) Metabolismo de un carbono (MTHFD1L) Tráfico vesicular (PDCD6) Transporte de péptidos (ABCD3)	Plegamiento de proteínas (GRP94, HSPD1, HSP90AA1, PDIA6) Citoesqueleto (ACTB, VIM, LMNB1, CHP) Metabolismo de carbohidratos (ACO2) Proliferación celular (PCNA) Organización del ADN (HIST1H2AB) Síntesis de ATP (ATP5B) Síntesis de colágeno (SERPINH1, PLOD3) Transcripción (POLR2E)	Células productoras de un AcM camélido quimérico de cadena pesada vs la línea parental	P	Ho (2013)
CHO	Señalización mediada por Ca ²⁺ (<i>Tmem20</i>) Transducción de señales, proliferación, transcripción, estabilidad del ARNm y traducción (<i>Khdrbs1</i>) Catabolismo de ácidos grasos (<i>Acaa2</i>) Transcripción (<i>Nanos3</i>) Ciclo celular (<i>Nanos3</i>) Señalización celular (<i>Prex1</i>) Protección del ADN (DDB1) Traducción (SRPR, CCDC72) Tráfico vesicular (AP3D1, AP2B2, HOOK3) Catabolismo de ácidos grasos (ACAA2) Reorganización del citoesqueleto (TMOD3) Señalización celular (MAPK1)	Señalización mediada por Ca ²⁺ (<i>Rcan, Itpr1</i>) Señalización celular (<i>Lck</i>) Catabolismo de proteínas (<i>Rhbdf2</i>) Síntesis de aminoácidos (<i>Pycr2</i>) Defensas antioxidantes (<i>Pycr2</i>) Transcripción (<i>Atf3</i>) Plegamiento de proteínas (CCT1, CCT3, CCT4, CCT7, CCT8) Transporte núcleo-citoplasma (TNPO1) Metabolismo de un carbono (MTHFD2) Traducción (EIF4A3)	Células que expresan diferentes AcM con diferentes títulos	T P	Kang y cols. (2014)
CHOK1SV	Señalización mediada por insulina (<i>Pik3cd, Pik3cg, Ins2</i>) Otros genes de señalización de mTOR (<i>Pld1, Rragc, Telo2, Rps6, Prkab1</i>)		Células que expresan IgG4 a diferentes q _p	Microarreglo qRT-PCR enfocado a genes múridos de mTOR	Edros y cols. (2014)
CHOZN GS-/-	Mecanismos antioxidantes (GSS, GSTT2, TXNRD1, PRDX1, G6PDX, GCLM, GSTP2, CAT, IDH1) Organización del citoesqueleto (MYL6, TLN1, ACTA1, CAPZA2,	Proliferación celular (MCM7, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, PCNA, PHB) Metabolismo del ADN (SSRP1, RAD23B, NASP, RPA1, NONO, UBE2N, SFPQ, RUVBL1, PARP1, TRIP13) Síntesis de compuestos nitrogenados	Clonas procedentes del mismo evento de transfección que producen	P	Orellana y cols. (2015)

	<p>CAPZA1, ACTN1, ARPC4, CSRP1, MYH9, PFN1, CFL1, RHOA, CNN2, CAP1, ACTR3, PFN1, ARPC2, CAPG, DSTN, TUBA3A, TUBB6, TUBG1, SEPT2)</p> <p>Transporte intracelular (MYL6, COPA, YWHAZ, KIF5B, CLTC, MYH9, CDC42, AP2A2, COPG2, YWHAG, YWHAH, COPB1, RAB1, EHD1, RAB10, SAR1A)</p>	<p>(BCAT1, HSP90AA1, HPRT, CTPS, CAD, PRPSAP1, GMPS, PFAS, GART, MTHFD1, TYMS, GOT1, ADK, ADSL, EN0PH1, PSAT1, PAICS, PRPS2, IMPDH2)</p> <p>Traducción (EIF2S3X, BF5, GARS, EPRS, BF5A, QARS, VARS, KARS, EIF4G1, WARS, BF3B, GSPT1, BF2S1, RPL9, BF2S2, BF4A1, KHSRP, LARS, RPL11, FARSA, RPS11, KPNA2)</p> <p>Corte y empalme del ARN (SNRPA1, STRAP, EFTUD2, SYNCRIP, YBX1, SF3A3, HNRNPA3, NONO, SF3B1, DDX39, HNRNPK, TARDBP, PRPF8, PRMT5, SFPQ, DHX15, KHSRP, HNRNPC, PABPC1, NRPF, SNRPE)</p> <p>Transporte núcleo-citoplasma (NUP155, CSE1L, IP04, NPM1, IP05, NOP58, NUTF2, KPNA4, KPNA3, MYBBP1A, KPNB1, KPNA2, TNP01)</p> <p>Catabolismo de proteínas (RAD23B, SKP1A, PSMA8, UBE2N, PSMB4, PSMC6, PSMD14, HSP90B1, PSMB7, PSMA6, PSMB1, OTUB1, PSMC3, UBE2K, PSMC2, PSMB2, CACYBP, PSMC1, UCHL5, CAND1)</p> <p>Síntesis de aminoácidos (BCAT1, MTHFD1, GOT1, EN0PH1, PSAT1)</p>	diferentes cantidades de un AcM		
CHO-DUKX	<p>Transporte vesicular (VAPA, RAB1, SEC22B, MYH10)</p> <p>Proliferación celular (LGALS1, ANXA11)</p> <p>Proteólisis (CTSB, SERPINB1A)</p> <p>Citoprotección (MYOF)</p> <p>Organización del citoesqueleto (CAPG, LIMA1, PLEC, VIM, GSN, DSTN, CORO1B, ARPC1B, TMEM43, SEPT11, LASP1, MYH9, MTAP1B, CTTN, MYH10, CNPY2)</p> <p>Síntesis de colesterol y ácidos grasos (CYB5R1, HSD17B12, HSD17B7)</p> <p>Catabolismo de lípidos (NAGA, PSAP)</p> <p>Transducción de señales (GNG12, ARHGAP1, PPP2R2A, REEP5, NUCB2)</p> <p>Traducción (IARS2)</p> <p>Plegamiento de proteínas (PPIB, CRELD2)</p> <p>Autofagia (MTAP1B)</p> <p>Muerte celular (CIAPIN1)</p> <p>Regulación del pH intracelular (ATP6V1B2, ATP6V1G1)</p> <p>Metabolismo de lípidos (PDXDC1)</p> <p>Metabolismo de carbohidratos (PDXDC1, GPD1L, PCX)</p> <p>Señalización por calcio (CALM)</p> <p>Transcripción (HTATSF1)</p>	<p>Proteólisis citosólica (ECM29)</p> <p>Proliferación celular (NASP, PRPS1)</p> <p>Citoprotección (HMOX1)</p> <p>Catabolismo de lípidos (LPL)</p> <p>Citoesqueleto (TMPO)</p> <p>Organización de la cromatina (HMG5)</p> <p>Transporte núcleo – citoplasma (XPO5)</p> <p>Plegamiento de proteínas (CIAPIN1)</p> <p>Señalización celular (ICAM1, PPM1G, PA2G4)</p> <p>Traducción (PA2G4)</p>	Células que expresan una proteína scFv-Fc con diferentes q _p	P	Sommeregger y cols. (2016)
CHO DG44	<p><i>Antes de la selección con MTX:</i></p> <p>Catabolismo de ácidos grasos (3,2-<i>trans</i>-enoyl-CoA isomerasa, mitocondrial)</p> <p>Traducción de proteínas (Factor de elongación 2)</p> <p>Respuesta a estrés oxidativo (SOD mitocondrial)</p> <p>Glicosilación (UDP-N-acetilhexosamina pirofosforilasa)</p> <p>Metabolismo de TH4 (serina hidroximetiltransferasa)</p> <p><i>Después de la selección con MTX:</i></p> <p>Catabolismo de ácidos grasos (3,2-<i>trans</i>-enoyl-CoA isomerasa, mitocondrial)</p> <p>Traducción de proteínas (Factor de elongación 2, factor de elongación 1 gamma)</p> <p>Catabolismo proteosomal de</p>	<p><i>Antes de la selección con MTX:</i></p> <p>Transducción de señales (subunidad alfa 2 de la proteína de unión a nucleótidos de guanina)</p> <p><i>Después de la selección con MTX:</i></p> <p>Respuesta a estrés oxidativo (SOD mitocondrial)</p> <p>Transcripción (proteína 14-3-3 theta)</p> <p>Remodelación de la cromatina (proteína tipo actina 6A)</p> <p>Reparación del ADN (proteína tipo actina 6A)</p> <p>Ciclo de Krebs (fumarato hidratasa mitocondrial)</p> <p>Plegamiento de proteínas (chaperona MESD de plegamiento de LDLR, PDI A3, serpina H1)</p> <p>Metabolismo de TH4 (serina hidroximetiltransferasa)</p>	Clonas con una producción diferente del AcM H10 que reconoce al antígeno CEA	P	Hausmann y cols. (2018)

	proteínas (subunidad tipo beta del proteosoma) Glicólisis (alfa enolasa) Sistema de control de calidad de proteínas (HSPA8) Citoesqueleto (vimentina)				
--	--	--	--	--	--

Diferentes estudios ómicos sugieren que ante una mayor síntesis de PR las células CHO activan mecanismos de transporte de vesículas y protección del ADN, y modifican su metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, para incrementar la secreción hacia el medio extracelular, tener mayor disponibilidad de energía y evitar daños por especies reactivas de oxígeno (EROS) (Tabla II) (Carlage *et al.*, 2009; Clarke *et al.*, 2011; Doolan *et al.*, 2008; Hausmann *et al.*, 2018; Ho 2013; Kang *et al.*, 2014; Meleady *et al.*, 2008; Nissom *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016).

El aumento en la productividad parece estar mediado, en parte, por una mayor transcripción, acceso al ADN (remodelación de la cromatina) y traducción, acoplado a un catabolismo activo de proteínas (Clarke *et al.*, 2011, Hausmann *et al.*, 2018; Meleady *et al.*, 2018; Sommeregger *et al.*, 2016). Un incremento en la q_p también ha conllevado a un reordenamiento del tráfico intracelular, donde destaca el incremento de proteínas adaptadoras (AP2, AP3), las relacionadas con la formación de vesículas y reclutamiento de cargos (PDCD6), fusión de membranas (factores de reconocimiento y anclaje, NSF, SNAREs), motores moleculares (quinesina, miosina), estructurales de vesículas (COPA, COPG2, COPB1) y GTPasas pequeñas (Rabs, Sar1a, Arfs), sugiriendo un incremento en los procesos de formación, transporte, reconocimiento y fusión de vesículas (Doolan *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2011; Ho 2013; Kang *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016).

Un fenómeno recurrente es la presencia de diferentes conjuntos de chaperonas en dependencia del nivel de productividad, lo que podría explicarse por el hecho de que cada proteína requeriría de un conjunto particular de chaperonas para evitar un plegamiento incorrecto en el RE que podría conllevar a la activación de respuestas de estrés (Carlage *et al.*, 2009, Clarke *et al.*, 2011, Doolan *et al.*, 2008, Hausmann *et al.*, 2018, Ho 2013, Meleady *et al.*, 2008, Nissom *et al.*, 2006). En general se ha observado que estas células disminuyen varias proteínas que participan en la proliferación celular ante un aumento de la q_p , lo que pudiera derivar en un re-direccionamiento de los recursos hacia la producción de proteínas. Sin embargo, estos blancos relacionados con la proliferación deben ser evaluados antes de su modificación, pues otros estudios no han evidenciado correlación alguna entre q_p y la

velocidad de crecimiento (Wurm y Jordan, 2003; Chusainow *et al.*, 2009). También se ha reportado la inhibición de la apoptosis, lo que prolonga la viabilidad celular e incrementa el título de la PR.

En cuanto al citoesqueleto, este se reordena, con una tendencia a disminuir la cantidad de vimentina a medida que se produce más PR, aunque la relación de esta proteína con la productividad no ha podido ser explicada aún con claridad. La vimentina se encuentra asociada a núcleo, mitocondria, microtúbulos y filamentos de actina unidos a motores moleculares (Menko *et al.*, 2014). Funcionalmente se le ha involucrado en la señalización celular, adhesión, regulación de la transcripción y organización del ADN (Ivaska *et al.*, 2007; Dave y Bayless, 2014; Kidd *et al.*, 2014). En algunos estudios se ha descrito un cambio significativo en la abundancia relativa de una gran cantidad de proteínas reguladoras del citoesqueleto, lo cual pudiera derivar en una reestructuración profunda de los filamentos y microtúbulos que favoreciera, entre otros procesos, el tráfico de vesículas (Meleady *et al.*, 2008; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016).

La influencia de los procesos de señalización celular en la productividad de células CHO no ha sido abordada hasta el momento. En este sentido, sobresale la regulación del calcio intracelular y las respuestas dependientes de este catión (Doolan *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2014; Sommeregger *et al.*, 2016), las respuestas dependientes de anexinas (Nissom *et al.*, 2006), MAP cinasas (Clarke *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2014), Ras (Clarke *et al.*, 2011), insulina (Edros *et al.*, 2014), proteínas G, GTPasas de la familia Rho, fosfatasa y receptores nucleares (Sommeregger *et al.*, 2016), entre otros. El cambio en varias vías de señalización celular en un conjunto de estudios de proteómica diferencial apunta a que estos procesos juegan un papel importante en la regulación, directa o indirecta, de la productividad celular en células CHO, indicando que se hace necesario un estudio más profundo de estas vías en un contexto de producción de PR.

Por lo general, estos reportes proteómicos utilizan homogenizados celulares, sin ningún procedimiento de fraccionamiento previo, como muestra de estudio, donde se encuentra representada la mayoría de las proteínas celulares. Ese tipo de análisis no es representativo de todo el proteoma, debido a que la abundancia relativa entre proteínas puede diferir hasta en 7-8 órdenes de magnitud, donde proteínas estructurales y ubicuas pueden enmascarar la detección de otras menos abundantes (Stasyk y Huber, 2004), como las pertenecientes a la VCS. Esta limitación representa una desventaja en el estudio de esta

vía, la cual juega un papel activo en procesos como el metabolismo de lípidos y proteínas (Vance, 1990; Bolt *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 2011; Rahimpour *et al.*, 2013; Tannous *et al.*, 2015), la biogénesis de organelos (Joshi *et al.*, 2017), ciclo celular (Bourougaa *et al.*, 2010) y la apoptosis (Fribley *et al.*, 2009).

Una estrategia para eliminar este sesgo es el empleo del fraccionamiento celular previo al análisis proteómico, lo que permite identificar un mayor número de proteínas y estudiar procesos celulares específicos (Michelsen y von Hagen, 2009; Wong y Adeli, 2009). Su incorporación a la investigación proteómica ha incrementado hasta un 30% el número de proteínas identificadas mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con respecto al homogenizado no fraccionado (Paulo *et al.*, 2013).

Dados estos antecedentes, se realizó la identificación de proteínas de la VCS con una acumulación diferencial entre dos clonas de células CHO con una diferencia de 26 veces en su q_p , empleando como muestra de estudio las fracciones subcelulares enriquecidas en diferentes organelos obtenidas en gradientes de sacarosa. Estas proteínas asociadas a cambios en la productividad probablemente participen en procesos claves durante la expresión y secreción de PR, y su modulación podría impactar significativamente en la obtención de clonas de mayor productividad y mejor desempeño durante el cultivo celular. Adicionalmente se identificaron blancos pertenecientes a otros compartimentos celulares y asociados a un fenotipo de mayor productividad, que pudieran ser incorporados a futuras estrategias de ingeniería celular con un impacto positivo en el título y calidad de las PR obtenidas en estas células.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Fraccionamiento subcelular y precipitación de proteínas

Las células CHO, colectadas durante la fase exponencial de crecimiento, se procesaron, homogenizaron y fraccionaron de acuerdo con los métodos reportados en el Capítulo II (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b). Las proteínas de cada fracción se precipitaron con acetona siguiendo el protocolo implementado y descrito en el Capítulo III (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020c). Los homogenizados celulares se obtuvieron a partir dos réplicas biológicas para cada línea celular, cada una consistente en un grupo de 9 frascos Erlenmeyer colectados a las 72 h de cultivo durante la fase exponencial de crecimiento. Los compartimentos resultantes se muestran en la Fig 8.

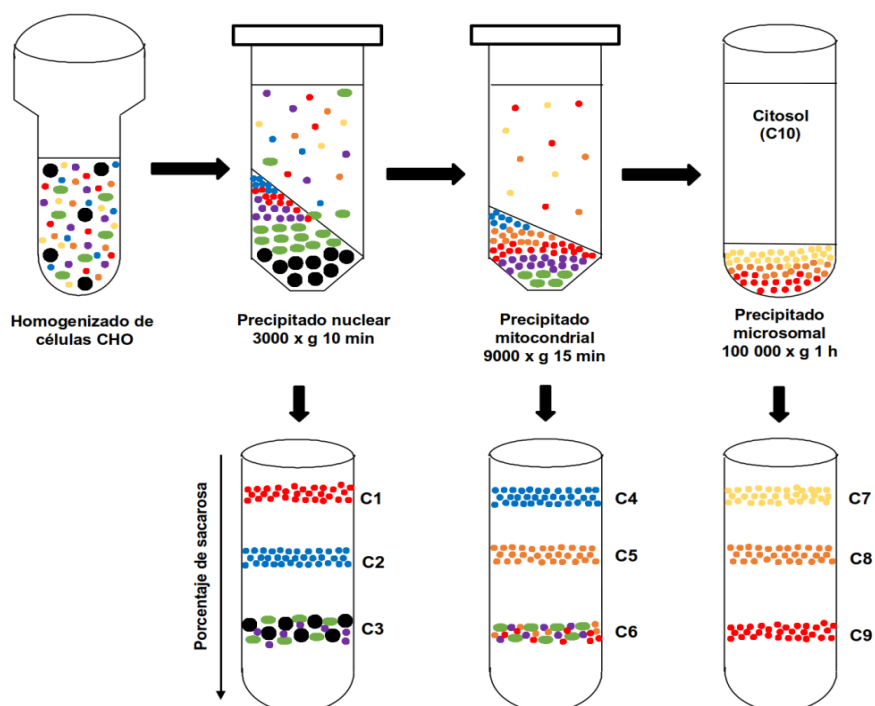


Fig 8. Fraccionamiento de células CRL-12444 y CRL-12445 por centrifugación diferencial e isopícnica. Las células se rompieron mecánicamente y sus componentes se separaron por centrifugación diferencial. Los precipitados de esta separación se aplicaron en gradientes de sacarosa, a partir de los cuales se obtuvieron 9 bandas de componentes celulares, cuyas proteínas, junto al citosol, se identificaron y cuantificaron por LC-MS/MS. C1-C10: compartimentos subcelulares 1-10.

7.2.2 Análisis MS/MS

Se solubilizaron 200 µg de proteínas en 50 µL de tampón de guanidinio (6M cloruro de guanidinio, 5 mM Tris [2-carboxietil] fosfina, 10 mM cloroacetamida, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5), se incubaron a 99°C por 10 min, de los cuales se tomaron 100 µg y se digirieron con tripsina durante 12 h. La digestión se detuvo con 0.5% (v/v) TFA, y se purificaron 20 µg de péptidos de acuerdo con Rappsilber y cols. (2007).

Estos péptidos se separaron en un sistema de flujo capilar UltiMate 3000 RSLCnano system (capLC Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), acoplado a una columna C18 de 15 cm (50 µm x 150 mm, 2 µm Acclaim PepMap C18 column) a un flujo de 1.2 µL/min, en un gradiente escalonado de 3-45% de acetonitrilo durante 120 min. Los péptidos separados se inyectaron en un espectrómetro de masas Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), operado en modo de adquisición dependiente de datos Top 12. El espectro MS1 se colectó a una resolución de 60,000, blanco AGC 3.0×10^6 , con un tiempo máximo de inyección de 30 ms. A partir de este se colectaron 12 espectros MS2 a una resolución de 15,000, en un tiempo máximo de inyección de 30 ms.

La energía de colisión HCD se estableció al 28% y la exclusión dinámica a 25 seg. Durante el análisis de los espectros en el software MaxQuant, la carbamidometilación y oxidación de las metioninas se establecieron como modificaciones fijas y variables, respectivamente, con posibilidad de pérdida de un corte proteolítico y una tasa de descubrimiento falso (FDR) del 1%. La lista de péptidos identificados se asignó a sus proteínas correspondientes mediante la búsqueda en el proteoma de referencia de células CHO (UP000001075), y en una lista de contaminantes comunes conocidos. Se estableció una tolerancia de 20 ppm para los espectros MS1 y MS2.

7.2.3 Procesamiento, comparación y clasificación de datos proteómicos

El flujo del procesamiento de datos y de la identificación y clasificación de proteínas con acumulación diferencial entre las líneas celulares CRL-12444 y CRL12445, se muestra en la Fig 9. La limpieza de datos se efectuó por eliminación de los contaminantes y de los grupos proteicos identificados en la base de datos inversa o por MPT. Los grupos proteicos resultantes se redujeron a un único miembro para su posterior procesamiento. Todos los análisis se hicieron individualmente para cada compartimento subcelular (C1-C10) en lenguaje de programación R (R Core Team, 2020). Los datos se normalizaron con el paquete Normalyzer v1.1.1 (Chawade *et al.*, 2014), y se seleccionaron los dos mejores métodos entre los 11 evaluados. Los datos ausentes se estimaron con el método QRILC debido a que estos presentaron una ubicación preferente hacia los menores valores de la distribución (Lazar, 2015).

La comparación de la abundancia de proteínas entre ambas líneas celulares, por cada compartimento, se llevó a cabo con los softwares SAM (Roxas y Li, 2008) y ROTS (Suomi *et al.*, 2017). SAM asigna a cada gen i un estadístico d_i en base al cambio en la expresión de dicho gen relativo a su desviación estándar (Pursiheimo *et al.*, 2015). ROTS, por su parte, maximiza la reproducibilidad de la posición de los genes en una lista, ordenada de acuerdo al cambio en su expresión, a partir de la permutación selectiva de los datos. El estadístico empleado en ROTS (d_α) es optimizado de acuerdo a ciertos parámetros (α_1 , α_2) entre una familia de pruebas estadísticas t (Suomi *et al.*, 2017). En ambos algoritmos el FDR se estima por un procedimiento de permutaciones. El punto de corte para la detección de proteínas con acumulación diferencial (PDA) en el análisis de SAM fue de un cambio en su concentración de al menos dos veces y un $FDR \leq 0.05$, mientras que en ROTS se estableció $B=1000$ (número de permutaciones), $K=2000$ (número de genes en la parte superior de la lista) y

FDR \leq 0.05. Debido a la escasa información de las funciones de las proteínas de hámster chino, las PDA se alinearon contra el proteoma de referencia de *Mus musculus* (UP000000589), usando el software BLAST+ v2.2.24, para asignarles su homólogo más cercano y llevar a cabo los análisis funcionales subsiguientes. Las PDA se mapearon y clasificaron por BlastKOALA de KEGG (Kanehisa *et al.*, 2016), PANTHER v14.0 (Mi *et al.*, 2019) y DAVID v6.8 (Huang *et al.*, 2009).

La identificación de grupos de genes con una acumulación diferencial se realizó con el software javaGSEA (Subramanian *et al.*, 2005). Los términos de Ontología de Genes (GO) de *Mus musculus* se obtuvieron de grupos de genes previamente clasificados en la base de datos GO2MSIG (Powell, 2014). Las variables “collapse dataset to gene symbols” y “metric for ranking genes” se establecieron como “false” y “diff of classes”, respectivamente. El valor de corte para significación estadística fue un FDR $<$ 0.25.

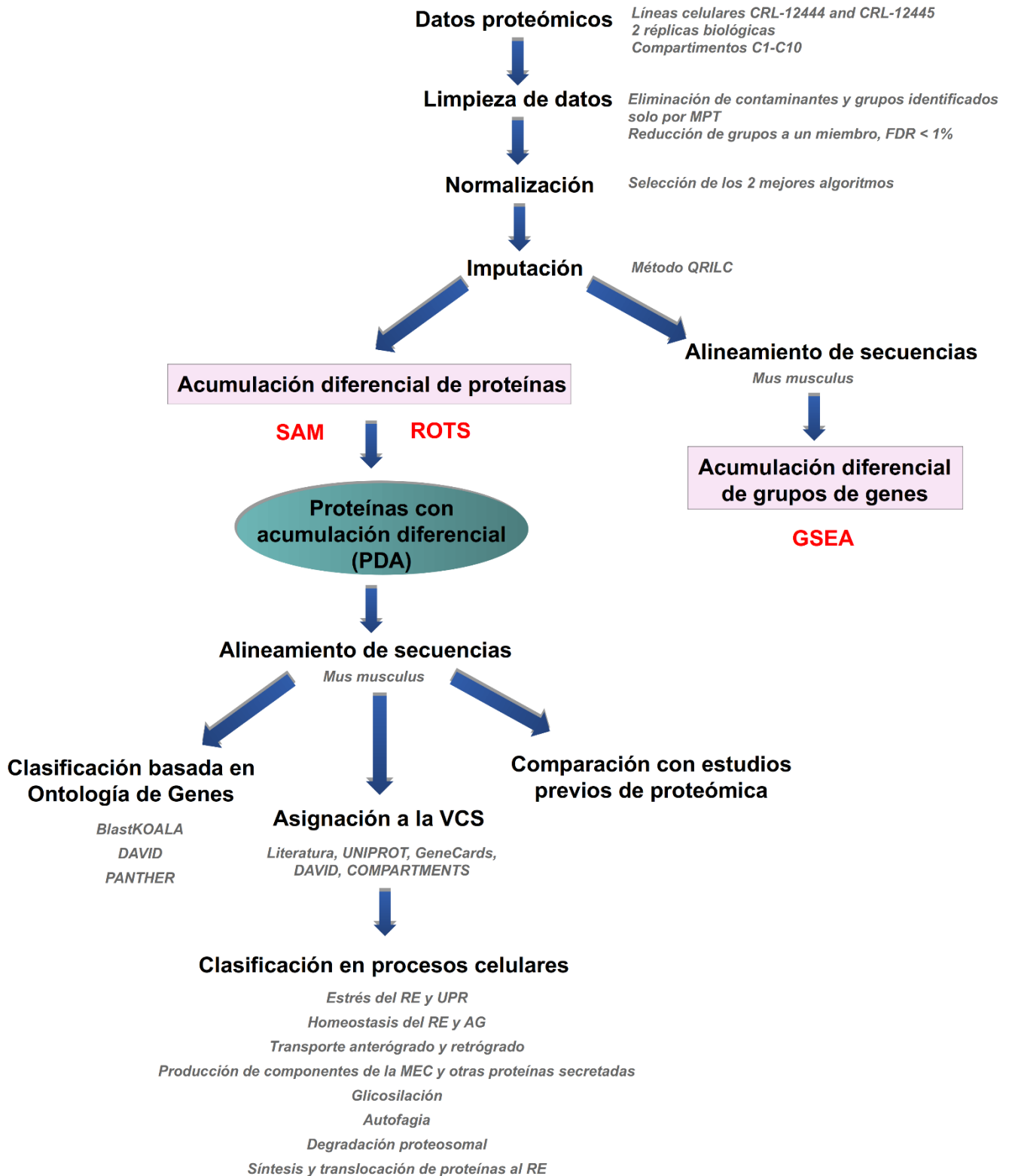


Fig 9. Diagrama de flujo del procesamiento de datos proteómicos. Este procesamiento comprendió la limpieza, normalización e imputación de datos previo a la identificación de proteínas y grupos de genes con acumulación diferencial entre las líneas celulares CRL-12444 y CRL-12445. Las proteínas con acumulación diferencial (PDA) se clasificaron de acuerdo a la ontología de genes, se compararon con estudios previos de proteómica y aquellas de la vía clásica de secreción (VCS) se agruparon en procesos celulares. MPT: modificaciones post-traduccionales, RE: retículo endoplásmico, UPR; respuesta a proteínas mal plegadas, AG: Aparato de Golgi, MEC: Matriz extracelular.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Identificación de PDA entre las células CRL-12444 y CRL-12445

Se identificaron 4952 proteínas de células CHO, de las cuales 493 se clasificaron como diferencialmente acumuladas entre ambas líneas celulares por los algoritmos SAM y ROTS. En las células de mayor productividad (CRL-12445), el algoritmo SAM identificó 125 proteínas aumentadas y 285 disminuidas, mientras ROTS reportó 66 aumentadas y 71 disminuidas. Un grupo de 21 aumentadas y 25 disminuidas se detectaron a la vez por ambos algoritmos (denominadas proteínas comunes con acumulación diferencial). Adicionalmente a estos resultados globales, se analizó la contribución de cada compartimento de los gradientes de sacarosa a las PDA (Fig 10). La mayoría de las PDA provinieron de las fracciones C3-C5 y C7, las cuales se encuentran enriquecidas principalmente en AG, núcleo, mitocondria, peroxisomas y RE, mostrando una sobrerrepresentación de la VCS en las proteínas con una abundancia diferente entre ambas líneas celulares. Las PDA aumentadas estuvieron principalmente en C4, una fracción no identificada aún, y en *trans*-Golgi, mientras las disminuidas procedieron en su mayoría de *cis*-Golgi.

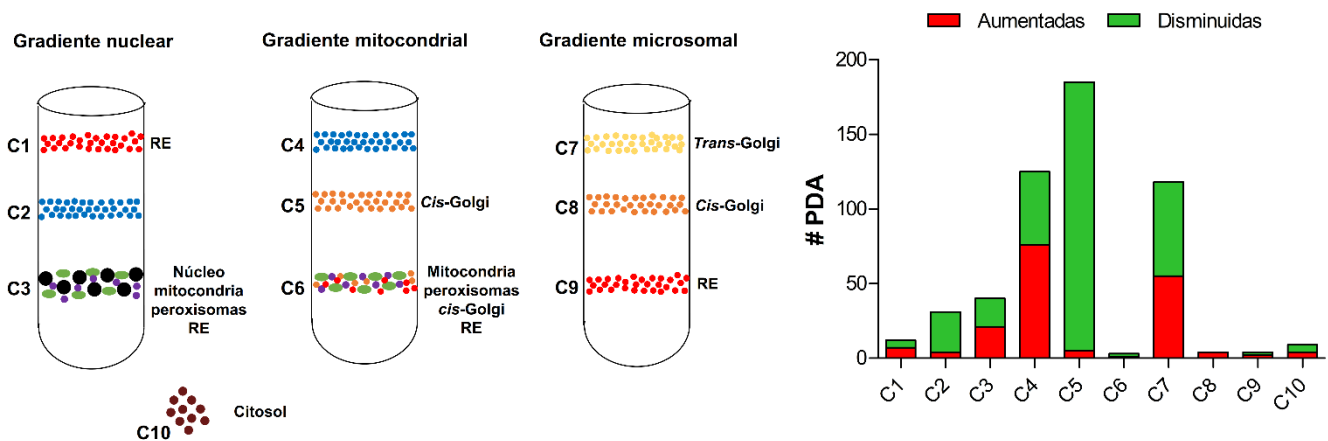


Fig 10. Contribución de cada compartimento celular a las PDA. (A) Compartimentos subcelulares (C1-C10) obtenidos por centrifugación diferencial e isopícnica de homogenizados de células CHO. (B) Número de PDA identificadas por cada compartimento por los algoritmos SAM y ROTS, que estuvieron aumentadas o disminuidas en las células CRL-12445 con respecto a CRL-12444. PDA: proteínas con acumulación diferencial.

7.3.2 Clasificación de PDA de acuerdo con los términos GO, vías celulares y enriquecimiento de grupos de genes

Las proteínas que mostraron una acumulación diferencial entre las líneas celulares CRL-12445 (mayor q_p) y CRL-12444 (menor q_p), de acuerdo con los algoritmos SAM y ROTS, se clasificaron en categorías de procesos biológicos, componentes celulares,

funciones moleculares, vías celulares y clases de proteínas. Esta clasificación, mediante PANTHER, DAVID y KEGG, se realizó con el objetivo de identificar procesos celulares y moleculares asociados a los cambios en la q_p donde participan estas PDA. Además de la identificación de proteínas individuales, también se empleó el software GSEA para hallar grupos de genes que presenten una acumulación diferente entre ambas líneas celulares en estudio. Estos grupos de genes participan en procesos biológicos comunes o comparten una misma localización celular o función molecular, lo que permite la detección de cambios modestos pero coordinados de estos grupos y, por tanto, en procesos donde la identificación de proteínas individuales no muestra ningún resultado (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005).

En general se observó que de las proteínas comunes con acumulación diferencial clasificadas por PANTHER, las aumentadas (Fig 11A, C, E, G, I) y disminuidas (Fig 11B, D, F, H, J) se agruparon en las categorías de metabolismo, organización o biogénesis de componentes celulares, localización y otros procesos celulares (Fig 11A, B), los cuales pertenecieron a componentes de células, complejos que contienen proteínas y organelos (Fig 11C, D). Las proteínas de membrana y enzimas del ciclo de Krebs aumentaron su abundancia mientras aquellas pertenecientes a complejos supramoleculares, región extracelular, biosíntesis de prolina, moléculas de señalización y proteínas de unión a calcio disminuyeron (Fig 11H, J). Otras categorías con una regulación diferente entre ambas poblaciones celulares se muestran en el Anexo 8.

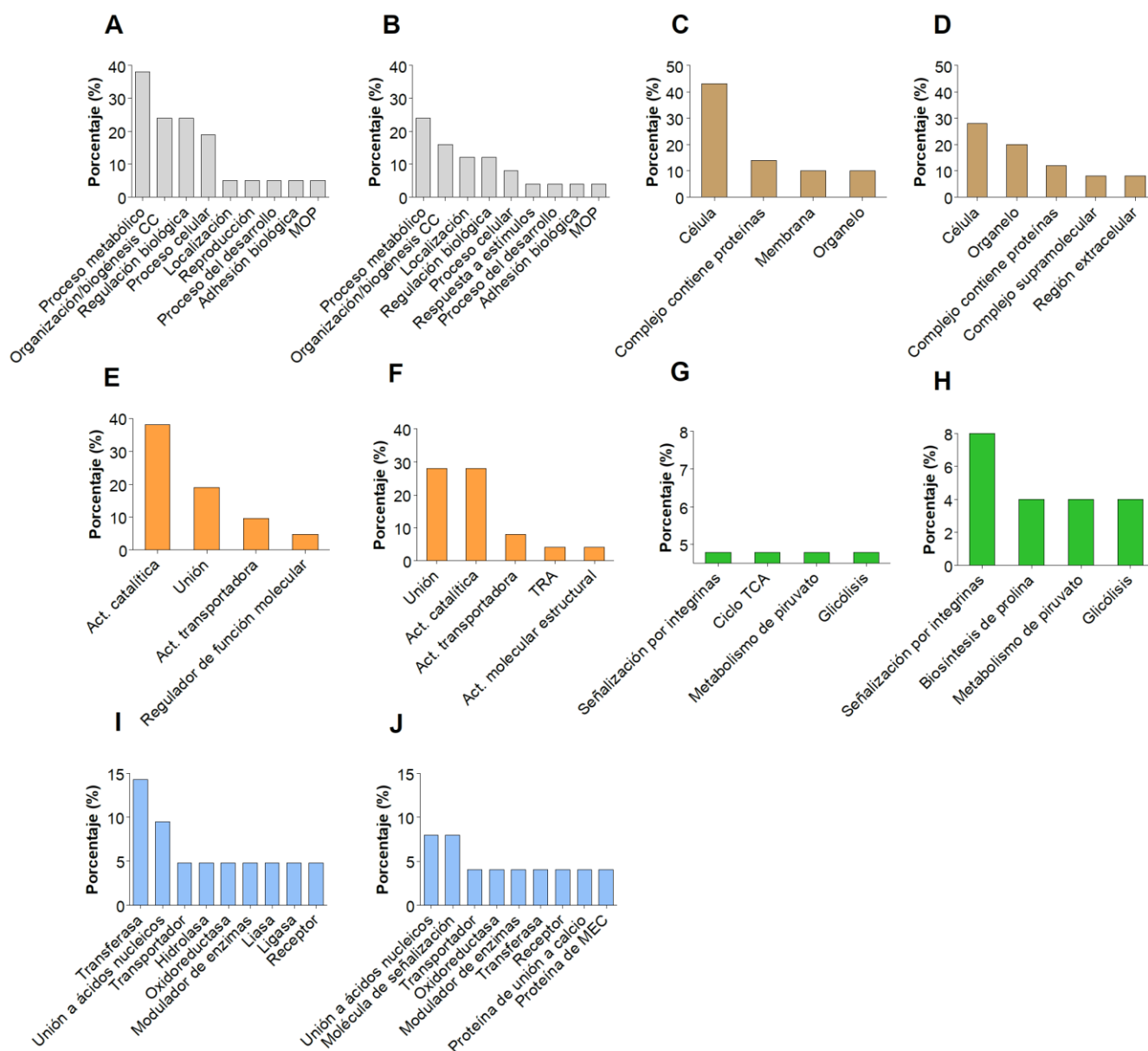


Fig 11. Clasificación de las PDA mediante PANTHER. Las proteínas comunes con acumulación diferencial (identificadas por SAM y ROTS a la vez) aumentadas (A, C, E, G, I) y disminuidas (B, D, F, H, J), se clasificaron usando el análisis de clasificación funcional basado en las categorías de procesos biológicos (A, B), componentes celulares (C, D), función molecular (E, F), vías (G, H) y clases de proteínas (I, J). Act.: actividad, CC: componente celular, MEC: matriz extracelular, MOP: proceso de organismos multicelulares, TRA: actividad reguladora de la transcripción, TCA: ácido tricarbóxico.

La clasificación de estas proteínas comunes con acumulación diferencial mediante DAVID señaló que en ambas células se modificaron otros procesos como la adhesión celular, organización de la matriz extracelular (MEC), metabolismo del NAD, biogénesis de vesículas y la unión a la GTPasa Rac (Fig 12). Tomando en cuenta todas las PDA, las categorías de transporte, secreción, endocitosis, almacenamiento de lípidos, polimerización de la actina,

síntesis de ribosa fosfato y ácido ascórbico, proteosoma, autofagosoma, lisosomas y endosomas, se vieron favorecidas en las células de mayor productividad, mientras el transporte de calcio, corte y empalme de ARN y los peroxisomas estuvieron poco representados.

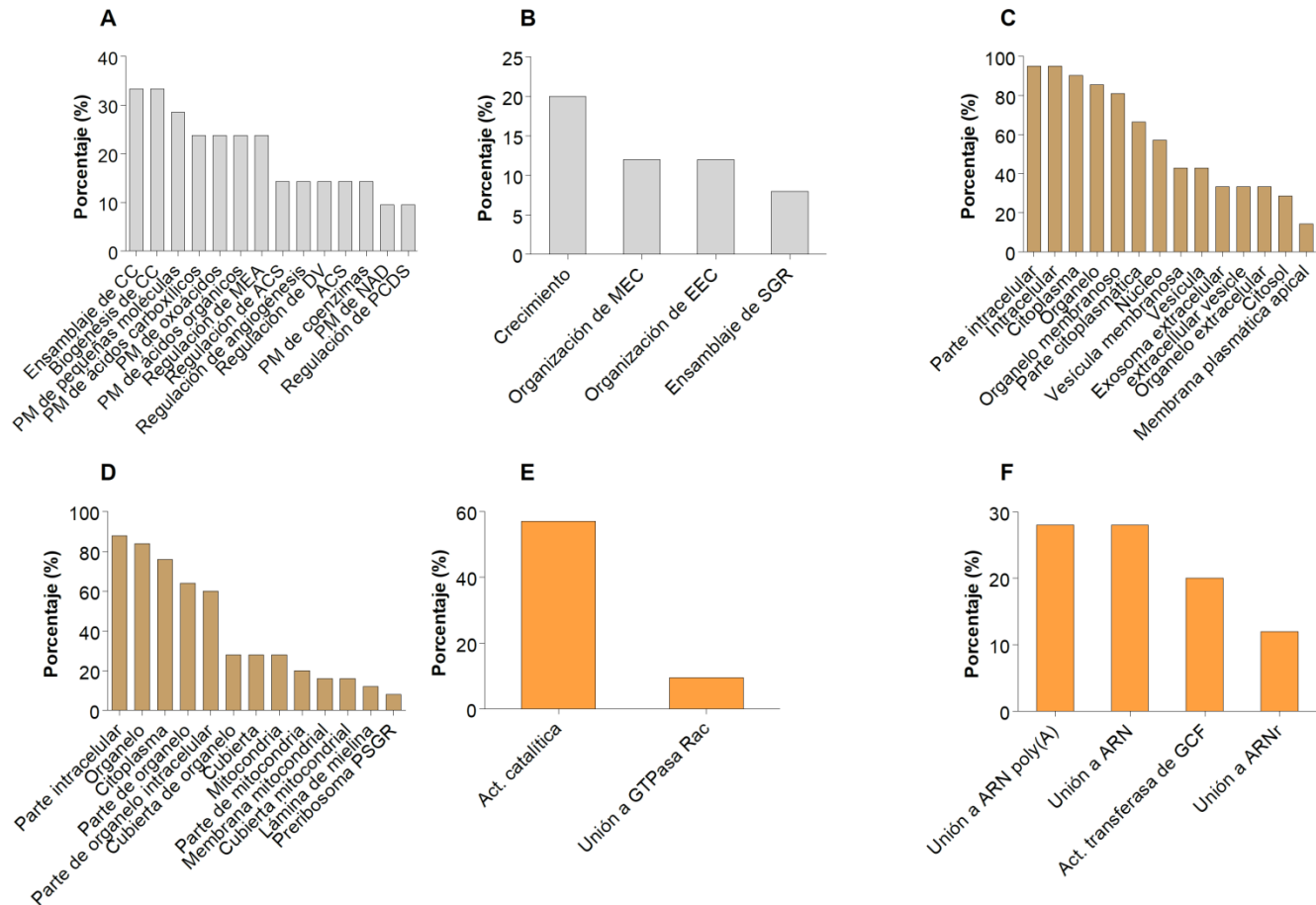


Fig 12. Clasificación de las PDA mediante DAVID. Las proteínas comunes con acumulación diferencial, aumentadas (A, C, E) y disminuidas (B, D, F), se clasificaron en base a procesos biológicos (A, B), componente celular (C, D) y función molecular (E, F). ACS: adhesión célula-sustrato, ARNr: ARN ribosomal, CC: componentes celulares, DV: desarrollo de la vasculatura, EEC: estructura extracelular, GCF: grupos que contienen fósforo, MEA: morfogénesis de estructura anatómica, MEC: matriz extracelular, PCDS: propagación celular dependiente del sustrato, PM: proceso metabólico, PSGR: precursor de la subunidad mayor del ribosoma, SGR: subunidad mayor del ribosoma.

La clasificación en cuanto a vías celulares a través de KEGG mostró diferencias en carbohidratos, cofactores y vitaminas, lípidos, aminoácidos, nucleótidos, metabolismo energético y procesamiento de la información genética y ambiental (Fig 13). La vía de las pentosas fosfato, aminoacil-ARNt, degradación del ARN, transportador ABC, citoesqueleto de actina y metabolismo del colesterol se asociaron positivamente a una mayor producción del AcM, en tanto que la fosforilación oxidativa, degradación de ácidos grasos, metabolismo de

nucleótidos, transcripción, ribosomas, plegamiento de proteínas en el RE y adhesión celular se relacionaron negativamente con este parámetro.

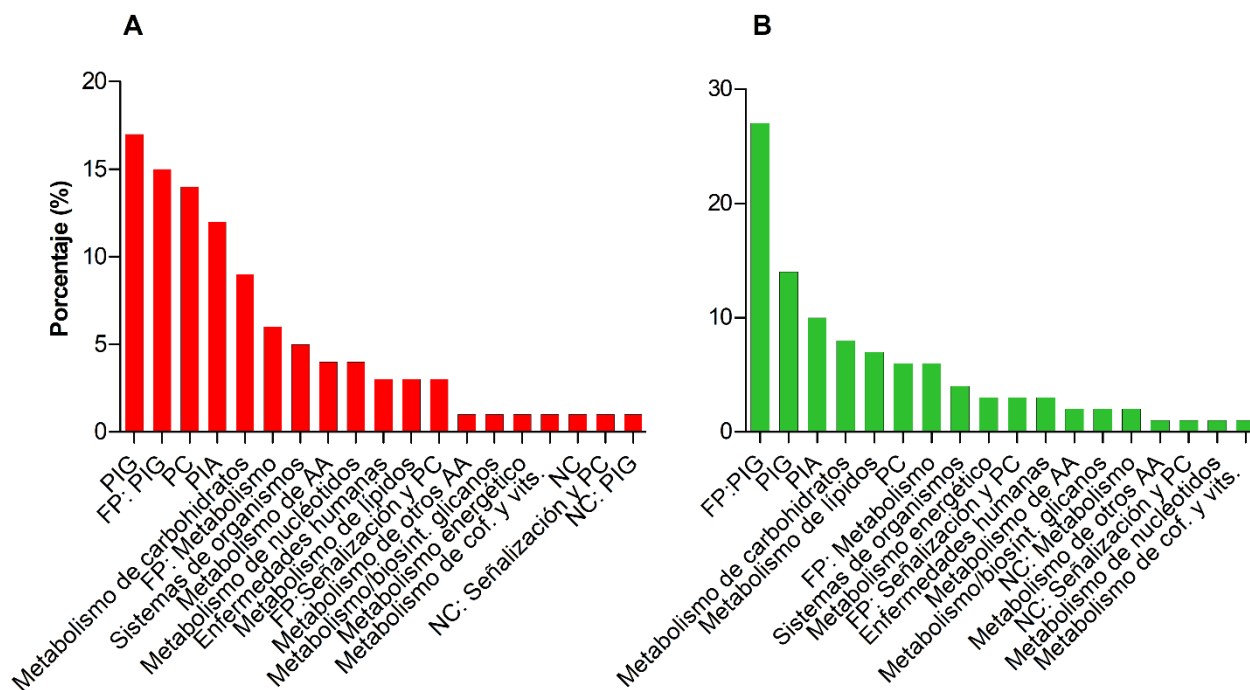


Fig 13. Clasificación de las PDA mediante KEGG. Las proteínas aumentadas (A) y disminuidas (B) se mapearon a vías celulares usando la interfaz “Annotate sequence” de BlastKoala. AA: aminoácidos, biosint.: biosíntesis, FP: familia de proteínas, NC: no clasificado, PC: procesos celulares, PIA: procesamiento de la información ambiental, PIG: procesamiento de la información genético.

Los grupos de genes correspondientes al metabolismo y transporte de aminoácidos, crecimiento celular y proliferación, reparación del ADN, endocitosis, organización de la MEC, glicosilación, vesículas de Golgi y transporte mediado por vesículas, metabolismo de purinas y respuesta a EROS, se identificaron como enriquecidos en las células de mayor productividad, de acuerdo con el análisis de GSEA. Por el contrario, el procesamiento y corte y empalme del ARN, biogénesis de ribosomas y respuesta al estrés del RE se encontraron disminuidos en estas mismas células.

7.3.3 Comparación de PDA con estudios proteómicos previos de células CHO

Todas las PDA se compararon con aquellas reportadas por otros estudios de proteómica diferencial de células CHO, donde la q_p fue el criterio utilizado para comparar diferentes líneas celulares (Nissom *et al.*, 2006; Carlage *et al.*, 2009; Ho, 2013; Kang *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016; Hausmann *et al.*, 2018). De todas las PDA solamente el 33% de las aumentadas y el 17% de las disminuidas fueron identificadas

en estudios previos, lo que indica que el 67% de las PDA aumentadas en el presente trabajo constituyen nuevos blancos que pudieran incrementar la expresión de PR. En el caso de las PDA disminuidas, este porcentaje de nuevos blancos se incrementó a un 83%. En el caso de las PDA aumentadas, el 20% mostró mayor acumulación en células de mayor productividad en todos los estudios previos, mientras un 13% no tuvieron esta misma tendencia en todos los estudios. De las PDA disminuidas, el 6% también tuvo menor abundancia en todos los reportes anteriores, mientras un 11% no mostró la misma tendencia en todos los estudios.

Esta comparación con reportes de proteómica diferencial de células completas demostró que la estrategia de fraccionamiento subcelular previa a la proteómica (proteómica subcelular) incrementa el número de blancos identificados con una acumulación diferencial entre las muestras en estudio. Por ello, la proteómica subcelular puede constituir una alternativa más eficiente que la proteómica clásica para el estudio de procesos celulares asociados a cambios en la productividad de PR en células CHO.

7.3.4 Identificación de PDA que pertenecen a la VCS

Las PDA se asignaron a organelos de la VCS de acuerdo con la búsqueda manual en la literatura, las plataformas de Uniprot, DAVID y GeneCards, y en la base de datos COMPARTMENT (Binder *et al.*, 2014). Alrededor de la tercera parte de todas las PDA (20% aumentadas y 39% disminuidas) se encuentran en la VCS, de las cuales el 68% aumentadas y 87% disminuidas no se reportaron en estudios proteómicos previos (Nissom *et al.*, 2006; Carlage *et al.*, 2009; Ho, 2013; Kang *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016; Hausmann *et al.*, 2018), lo que sugiere que la pobre representación de estos organelos en reportes anteriores se debe al uso de homogenizados celulares totales. Estas proteínas se ubicaron preferentemente en el RE (74% aumentadas y 67% disminuidas) y AG (59% aumentadas y 54% disminuidas), de las cuales el 23% se obtuvo del gradiente microsomal. En la Figura 14 se muestran en rojo las proteínas aumentadas en la línea CRL-12445 con respecto a la línea CRL-12444, y en verde las disminuidas.

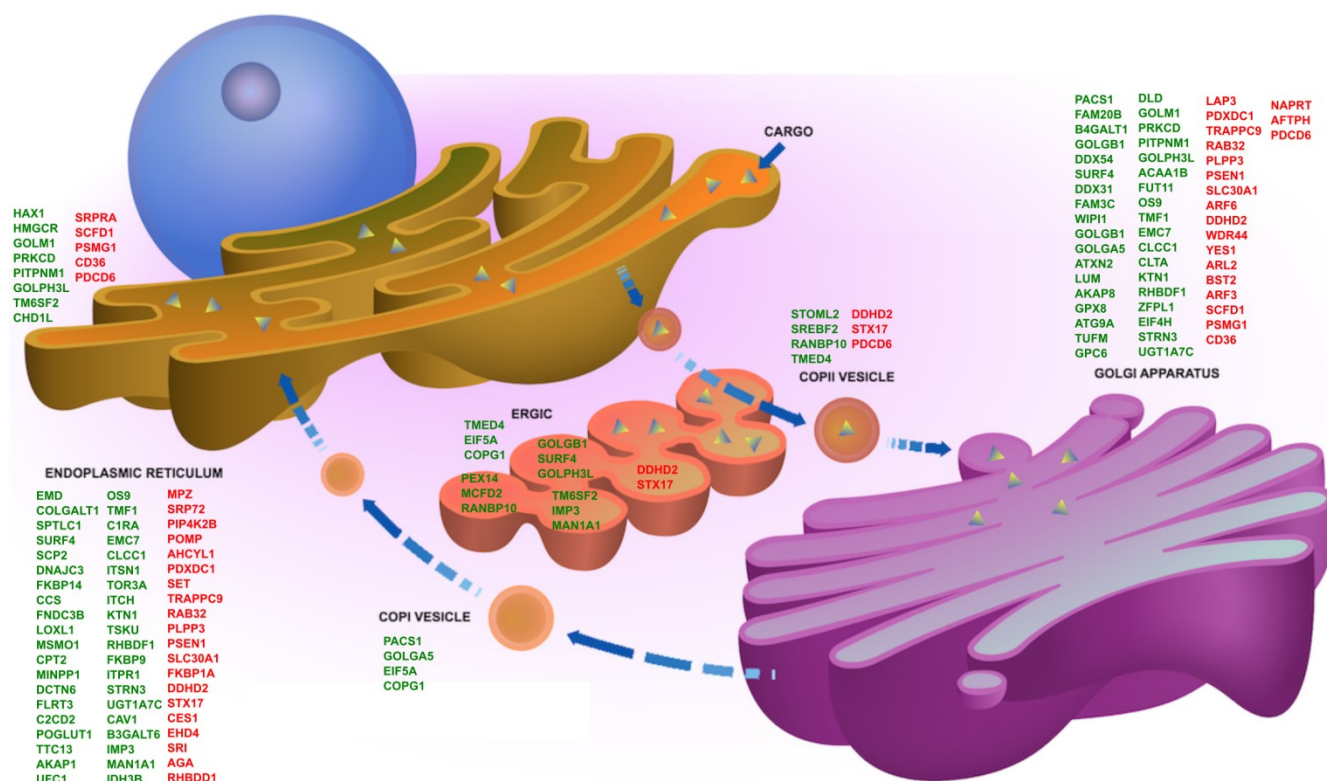


Fig 14. Localización de las PDA en organelos de la vía clásica de secreción. Las proteínas aumentadas (rojo) y disminuidas (verde) se ubicaron en organelos y estructuras de esta vía usando las herramientas de ontología génica de Uniprot y DAVID, y su búsqueda en la literatura y las bases de datos GeneCards y COMPARTMENTS. COPI/II: vesícula con complejo proteico de cubierta I/II, ERGIC: compartimento intermedio RE-AG. Imagen adaptada de la base de datos Reactome.

7.4 DISCUSIÓN

Dada la importancia biotecnológica de las células CHO, múltiples estudios ómicos se han llevado a cabo para elucidar varios aspectos de su biología celular, entre los que se destacan aquellos donde se han comparado líneas celulares con diferentes productividades de una misma PR, para identificar blancos proteicos asociados a la productividad y que puedan ser utilizados para incrementar la obtención de PR (Nissom *et al.*, 2006; Carlage *et al.*, 2009; Ho, 2013; Kang *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016; Hausmann *et al.*, 2018). Estos estudios adolecen, sin embargo, de la falta de identificación de proteínas de baja abundancia, como las de señalización celular y las pertenecientes a la vía de secreción. Tomando en cuenta estas deficiencias, las ventajas del fraccionamiento celular y la importancia de la VCS para la producción de PR, se propuso como objetivo del presente estudio la identificación de blancos proteicos, pertenecientes a esta vía, con una acumulación diferencial entre dos clones de células CHO con diferente q_p de un AcM. El reporte de estas proteínas pudiera permitir, a través de la modificación de su expresión, la obtención de nuevas clonas de células CHO de mayor productividad. Los cambios en el nivel

de abundancia detectados a partir de los datos proteómicos deberán ser confirmados por otras técnicas como WB, actividad enzimática o ELISA.

De todas las proteínas comunes con acumulación diferencial, pertenecientes a la VCS y relacionadas con la producción y secreción de proteínas, se identificaron 21 disminuidas y 13 aumentadas, que se clasificaron en las siguientes categorías: estrés del RE y UPR, homeostasis del RE y AG, transporte anterógrado y retrógrado, producción de componentes de la MEC y otras proteínas secretadas, glicosilación, autofagia, degradación proteosomal, y síntesis y translocación de proteínas al RE.

7.4.1 Estrés del RE y UPR

En esta categoría se agruparon 10 proteínas disminuidas relacionadas con el estrés del RE y UPR (CLCC1, DNAJC3, EMC7, OS9, MINPP1, TMED4, UFC1, PRKCD, PITPNM1, SURF4, Fig 15). CLCC1 es un canal permeable a iones cloruro, localizado en las membranas del RE y AG, con muy baja o nula expresión en células CHO (Nagasawa *et al.*, 2001), cuya pérdida incrementa la sensibilidad a estrés del RE inducido por agentes químicos y desencadena la UPR con acumulación de agregados proteicos. Su disminución en las células de mayor productividad, CRL-12445, pudiera deberse a la ausencia de estrés y UPR, y una mayor capacidad de plegamiento en esta línea celular. Esta misma hipótesis pudiera explicar la menor acumulación de DNAJC3, ECM7, OS9 y UFC1 en estas mismas células. La activación de la UPR incrementa la cantidad de DNAJC3 en el lumen del RE a través de IRE1 (Lee *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2012) o ATF6 (van Huizen *et al.*, 2003), en el cual DNAJC3 funciona como una co-chaperona de un complejo trimérico con HSP40 y HSC70 (Melville *et al.*, 1999), e inhibe directamente la activación de PERK (Yan *et al.*, 2002). Otra chaperona inducida por la UPR es ECM7, la cual es una subunidad del complejo ECM, que se localiza en el RE y participa en las uniones RE-mitocondria, el plegamiento de proteínas transmembrana (Luo *et al.*, 2002; Jonikas *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2013; Satoh *et al.*, 2015; Wideman, 2015) y la eliminación de proteínas incorrectamente plegadas por interacción con componentes de ERAD (Christianson *et al.*, 2011). OS9, localizada en el lumen del RE, también contribuye con esta función de eliminación de proteínas por su unión a sustratos y componentes de ERAD (Bernasconi *et al.*, 2008; Christianson *et al.*, 2008; Alcock y Swanton, 2009; Tang *et al.*, 2014; Seaayfan *et al.*, 2016; van der Goot *et al.*, 2018). OS9 aumenta su expresión tras la UPR (Bernasconi *et al.*, 2008; Alcock y Swanton, 2009), y en la mayoría de los casos favorece la degradación de sustratos glicosilados y la retención

de los no glicosilados (Bernasconi *et al.*, 2008; Christianson *et al.*, 2008; Alcock y Swanton, 2009; Seaayfan *et al.*, 2016; van der Goot *et al.*, 2018). También se ha implicado a este blanco en la estabilidad del complejo de ERAD SEL1/HRD1 (van der Goot *et al.*, 2018) y de complejos con las chaperonas BiP y GRP94 (Christianson *et al.*, 2008).

UFC1 es una enzima tipo E2 del complejo UBA5/UFM1/UFC1/UFL1, el cual media la ufmilación de varios blancos, aunque la función biológica de esta MPT es poco conocida (Komatsu *et al.*, 2004; Homrich *et al.*, 2014; Yoo *et al.*, 2014; Nahorski *et al.*, 2018). La activación de IRE1 por estrés del RE incrementa la cantidad de varios componentes del complejo de ufmilación, incluyendo a UFC1, y, en congruencia, el bloqueo de la ufmilación conlleva al estrés del RE mediado por IRE1 (Zhang *et al.*, 2012). En el caso de PRKCD, esta proteína cinasa es reclutada tras su activación a las membranas del RE y AG, y fibras de estrés en adhesiones focales (Barry y Critchley, 1994; Greene *et al.*, 2010; Lengfeld *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2017), donde es requerida para un desarrollo pleno de la UPR (Greene *et al.*, 2010; Larroque-Cardoso *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2017).

MINPP1 y TMED4, también localizadas en el RE, aumentan su concentración como resultado de estrés del RE y se encuentran involucradas en el mantenimiento de un apoptosoma funcional (Hwang *et al.*, 2008; Kilaparty *et al.*, 2016). PITPNM1 forma parte del complejo fosforilado PYK2/PITPNM1 que se forma como consecuencia del estrés RE (Lev *et al.*, 1999), y SURF4 inicia o mantiene la UPR al evitar la entrada de calcio a la célula y, con ello, el mantenimiento de las concentraciones de este catión en el RE (Fujii *et al.*, 2012).

La disminución de estas proteínas (CLCC1, DNAJC3, EMC7, OS9, MINPP1, TMED4, UFC1, PRKCD, PITPNM1, SURF4) en células CRL-12445 apoya la hipótesis de que la capacidad máxima de plegamiento de proteínas no ha sido alcanzada y que no se ha desarrollado estrés del RE ni UPR en estas células; además de que se mantienen las concentraciones de calcio en el lumen del RE y disminuye la apoptosis. En consonancia con estos resultados no se ha detectado la activación de respuestas de estrés en estudios ómicos previos. Aunque la transcriptómica diferencial ha sugerido la activación de la UPR por el aumento de transcritos de *Grp78*, *Mbpts*, *Eif2 α* y de ERAD (Doolan *et al.*, 2008), en el estudio proteómico de estas células CHO productoras de rhBMP-2 se observó, por el contrario, una disminución de GRP78 y la ausencia de cambio en el resto de estas proteínas (Meleady *et al.*, 2008). Una menor (Nissom *et al.*, 2006) o mayor (Carlage *et al.*, 2009) acumulación de GRP78 ha sido descrita en otros antecedentes, sin un cambio en otras

proteínas involucradas en el estrés del RE y las respuestas derivadas de este. No obstante, la activación de la UPR en células de alta productividad puede ocurrir en ciertas clonas, como ha sido demostrado por Hasegawa y cols. (2011) en células CHO productoras de una IgG con una q_p de 35 pcd. En este estudio, el incremento en la fosforilación de PERK y EIF2 α , en la expresión de chaperonas controladas por esta respuesta, y en el procesamiento y translocación nuclear de *Xbp1* y ATF6 α , mostraron una activación constitutiva de los tres efectores de la UPR.

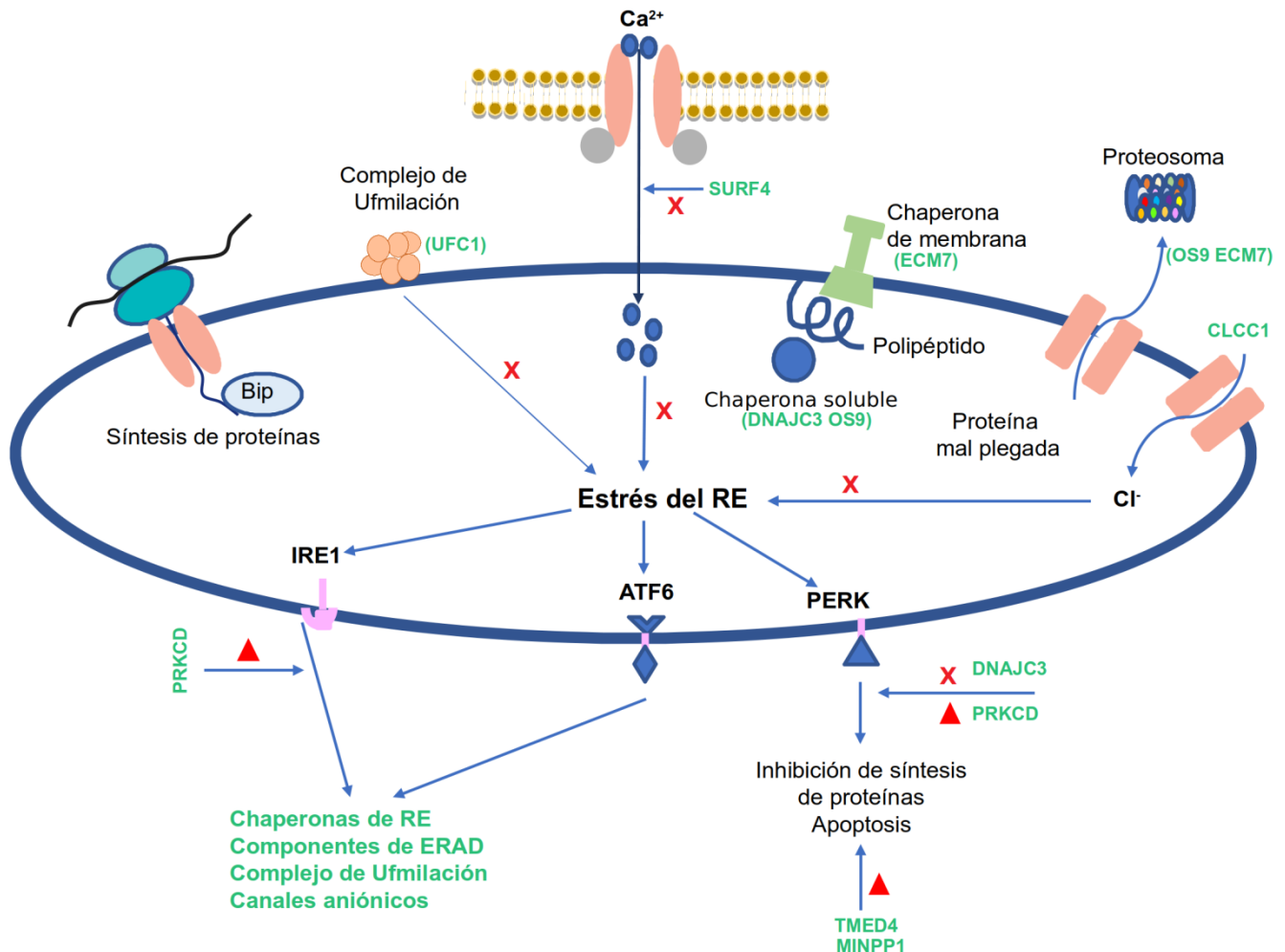


Fig 15. PDA involucradas en el estrés del RE y la UPR. Las proteínas disminuidas se marcan en verde. Una cruz o un triángulo indican la inhibición o activación de ciertos procesos, respectivamente. ERAD: degradación asociada al RE, RE: retículo endoplásmico.

7.4.2 Homeostasis del RE y AG

En cuanto a la homeostasis del RE y AG, se incluyeron tres proteínas disminuidas (TMF1, GOLPH3L y GOLGA5) y cinco aumentadas (DDHD2, RHBDD1, SCFD1, STX17, FKBP1A). TMF1 es una proteína del AG que interactúa con Rab1a, Rab2a y Rab6 (Fridmann-Sirkis *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2013), y cuya disminución cambia el grado de

compactación de las cisternas del AG (Fridmann-Sirkis *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2007). GOLPH3L se ubica en la región *trans* del AG, y su sobreexpresión induce la compactación de este organelo, mientras su pérdida muestra efectos contrarios (Ng *et al.*, 2013). GOLGA5 es una proteína de membrana del AG y ERGIC (Diao *et al.*, 2003; Satoh *et al.*, 2003; Saraste, 2016), cuyos niveles de expresión afectan dramáticamente la morfología del AG (Diao *et al.*, 2003; Satoh *et al.*, 2003; Sohda *et al.*, 2010), probablemente como un efecto colateral de sus funciones en el transporte de vesículas (Diao *et al.*, 2003; Malsam *et al.*, 2005; Sohda *et al.*, 2010).

En cuanto a los blancos aumentados, SCFD1 mantiene la estructura del AG por su interacción con el complejo COG y su papel activo en el tráfico de vesículas (Laufman *et al.*, 2009). STX17 también mantiene esta estructura por su participación en el tráfico temprano de la vía de secreción, pues su eliminación causa ruptura de ERGIC, fragmentación del AG y cambios en la localización de las vesículas COPI (Muppirala *et al.*, 2011). La función de DDHD2 no está completamente dilucidada, pues su supresión no afecta la estructura del AG (Sato *et al.*, 2010), y su sobreexpresión puede causar dispersión de este organelo y agregación del RE (Nakajima *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2012), o ningún cambio morfológico (Morikawa *et al.*, 2009).

Los cambios en la acumulación de TMF1, GOLPH3L, GOLGA5, SCFD1, STX17 y DDHD2 indican que, aunque se mantiene la estructura necesaria para un correcto funcionamiento de la VCS, probablemente existan cambios estructurales en estos organelos entre ambas líneas celulares, lo cual debe ser comprobado mediante técnicas microscópicas.

RHBDD1 participa en la eliminación de proteínas transmembrana mal plegadas, en asociación con Gp78 y p97, lo que explica el hecho de que la activación de UPR incremente su concentración, mientras su eliminación detona la UPR (Fleig *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2012; Paschkowsky *et al.*, 2016, 2018). El aumento de RHBDD1 en las células de mayor productividad puede deberse a que un incremento en la expresión de proteínas de membrana, detectado por GO en estas células, requiere de un mayor número de proteínas involucradas en la eliminación de aquellas incorrectamente plegadas. FKBP1A, por su parte, es una foldasa de localización citosólica (Siekierka *et al.*, 1990; Nigam *et al.*, 1993; Scholz *et al.*, 1996) que participa en la estabilización de los receptores de calcio RyR y IP3R, al unirse a estos y disminuir la frecuencia de su apertura (Gaburjakova *et al.*, 2001; Van Acker *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2012; Vervliet *et al.*, 2015). En consecuencia, el aumento de FKBP1A

ayuda a mantener las concentraciones de calcio necesarias en el RE para funciones tales como el tráfico de proteínas y evitar la apoptosis, aunque es importante mencionar que en dos estudios previos su abundancia ha disminuido con el aumento de la q_p (Orellana *et al.*, 2015, Sommeregger *et al.*, 2016).

7.4.3 Transporte anterógrado y retrógrado

Este grupo comprendió 6 proteínas disminuidas (ZFPL1, GOLGB1, GOLGA5, PACS-1, TMF1, COG1) y 8 aumentadas (ARF3, DDHD2, PDCD6, RAB32, RHBDD1, SCFD1, TRAPPC9, STX17, Fig 16).

De las proteínas disminuidas, ZFPL1 participa en el transporte de proteínas de membrana celular desde ERGIC hacia *cis*-Golgi, como factor de reconocimiento y anclaje en conjunto con GM130 y GRASP65 (Chiu *et al.*, 2008). GOLGB1, conocida como giantina, también actúa en el reconocimiento y anclaje de vesículas, junto con p115 y GM130 (Sonnichsen *et al.*, 1998), durante el transporte de ciertos cargos como enzimas de glicosilación (Bhat *et al.*, 2017; Stevenson *et al.*, 2017), componentes de la MEC (McCaughey *et al.*, 2016; Stevenson *et al.*, 2017; Katayama *et al.*, 2018) y proteínas de MP (Alvarez *et al.*, 2001).

GOLGA5, considerado un factor de anclaje y reconocimiento (Malsam *et al.*, 2005; Sohda *et al.*, 2010) y un efector de la GTPasa Rab1 (Diao *et al.*, 2003; Satoh *et al.*, 2003; Saraste, 2016), participa en el transporte retrógrado intra-Golgi (Malsam *et al.*, 2005; Sohda *et al.*, 2010) y, parcialmente, en el transporte anterógrado de proteínas de membrana celular (Diao *et al.*, 2003; Malsam *et al.*, 2005). Dado que el transporte de algunas proteínas residentes en el AG está mediado por esta golgina y que su disminución fragmenta el AG producto de un menor tráfico de vesículas COPI (Sohda *et al.*, 2010), es posible que su menor abundancia no sea lo suficientemente profunda para afectar la estructura y función del AG en las células CRL-12445, o que estas hayan desarrollado mecanismos compensatorios que permitan mantener completamente operativa la vía de secreción.

TMF1 es también otro factor de anclaje y reconocimiento disminuido que, a través de la unión a GTPasas Rab, participa en el transporte retrógrado intra-Golgi (Miller *et al.*, 2013) y de endosomas a *trans*-Golgi (Yamane *et al.*, 2007), aunque los cargos transportados y sus funciones biológicas son todavía desconocidos. PACS-1 es una proteína citosólica asociada a las membranas de *trans*-Golgi (Wan *et al.*, 1998), que a través de su unión al dominio

citoplasmático de cargos como furina, CI-MPR, y AP-1, permite el transporte retrógrado de estos desde los endosomas al *trans*-Golgi (Wan *et al.*, 1998; Crump *et al.*, 2001). Esta proteína también participa en el transporte de cargos desde la MP hacia el *trans*-Golgi como un mecanismo de regulación de estos en la superficie celular (Piguet *et al.*, 2000; Crump *et al.*, 2001; Kottgen *et al.*, 2005).

Las vesículas COP1 participan en varias rutas de transporte, que incluyen desde el AG hacia el RE, de ERGIC a AG, intra-Golgi y el de algunos receptores tirosina cinasa (RTK) desde el AG hacia el RE en su transporte retrógrado hacia el núcleo, la maduración de los endosomas tempranos y el reciclaje hacia la MP (Duden, 2003; Wang *et al.*, 2010; Popoff *et al.*, 2011a). Dada esta variedad de funciones no es sorprendente que las vesículas COPI sean heterogéneas en cuanto a la composición de las unidades del coatómero γ y ζ , de forma tal que en la célula coexisten poblaciones de coatómeros con subunidades $\gamma 1$ (COPG1), $\gamma 2$, $\zeta 1$ y $\zeta 2$, en diferentes proporciones y localizaciones (Futatsumori *et al.*, 2000; Wegmann *et al.*, 2004; Moelleken *et al.*, 2007). Por tanto, la disminución de COPG1 en células CRL-12445 podría afectar la señalización de determinados RTK o el transporte de ciertos cargos o, dado que $\gamma 1$ y $\gamma 2$ pueden ser funcionalmente redundantes y $\gamma 2$ se incorpora más fácilmente a las vesículas COPI, su función podría no ser necesaria para la secreción del AcM. Teniendo en cuenta que una mayor abundancia de esta proteína ha sido reportada por Orellana y cols. (2015) en células de mayor productividad, la función de las diferentes isoformas de las proteínas del coatómero durante la producción de AcM deberá ser estudiada con mayor profundidad.

Entre las proteínas aumentadas se encuentra ARF3, la cual se localiza en el AG (Kuai *et al.*, 2000; Manolea *et al.*, 2010; Kondo *et al.*, 2012), endosomas (Kondo *et al.*, 2012) y cuerpos de Flemming (Hanai *et al.*, 2016). Este factor de ADP-ribosilación favorece la biogénesis de vesículas COPI *in vitro* (Popoff *et al.*, 2011b), recluta coatómeros a las membranas del AG *in vivo* (Kuai *et al.*, 2000), y participa en varias rutas de transporte como RE→endolisosomas, endosomas→MP, ERGIC→*cis*-Golgi, y *cis*-Golgi→RE (Volpicelli-Daley *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2012). Su efecto positivo en el tráfico de vesículas también ha sido asociado con un aumento en la productividad de PR por Orellana y cols. (2015). Las funciones de DDHD2 en el transporte de proteínas son contradictorias; mientras se ha reportado que es requerida para el transporte anterógrado de proteínas de membrana desde

el AG hacia la MP, sin efectos en el transporte retrógrado del AG al RE (Sato *et al.*, 2010), en otro caso se documentó exactamente lo contrario (Morikawa *et al.*, 2009).

PDCD6 es una proteína de unión a calcio que se localiza en el núcleo y el citosol, y es reclutada a los sitios de salida del RE (ERES) junto con SEC31A de una manera mutuamente dependiente (Yamasaki *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2007, 2010; la Cour *et al.*, 2013; Helm *et al.*, 2014), para la formación de las vesículas COPII en el transporte anterógrado. La unión de PDCD6 a SEC31A en estos sitios incrementa la afinidad de SEC31A por SEC23 y facilita el reclutamiento de las proteínas de la cubierta externa de la vesícula (la Cour *et al.*, 2013). Esta interacción de PDCD6 con SEC31A también disminuye el tiempo de formación de la vesícula para favorecer la entrada de cargos y otras proteínas necesarias a esta nueva estructura en formación (Kanadome *et al.*, 2017). PDCD6 puede funcionar además como un receptor cargo para ciertos sustratos (Kanadome *et al.*, 2017) y reclutar a los sitios ERES a otras proteínas requeridas para la formación y tráfico de las vesículas COPII (Yamasaki *et al.*, 2006; Takahara *et al.*, 2017). Su función en el transporte de proteínas del RE hacia el AG ha sido demostrada por su requerimiento para el transporte de VSVG, y la secreción de SEAP y colágeno I (Helm *et al.*, 2014; Takahara *et al.*, 2017), y su aumento en células de mayor productividad también ha sido reportada por Ho (2013) en un estudio proteómico previo. Aunque la doble disminución de PDCD6 y Requierm en células CHO productoras de IFN- γ demostró incrementar el título de esta PR, este aumento se produjo por cambios sustanciales en la concentración celular y no de la q_p (Lim *et al.*, 2010); de esta forma la eliminación de PDCD6 se relaciona en este reporte con su actividad inhibitoria de la proliferación celular (Yoon *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017a; Wang *et al.*, 2017b). Dado que PDCD6 también puede actuar como estimulador de la proliferación en otros modelos celulares (Qin *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2019) y que favorece la secreción de proteínas, su aumento en células CHO debe ser evaluada para cada clona y PR en cuestión.

RAB32, localizada en el citosol, mitocondria, RE, AG y endosomas, participa en múltiples procesos celulares (Alto *et al.*, 2002; Hirota y Tanaka, 2009; Bui *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Waschbusch *et al.*, 2014, 2019; Li *et al.*, 2016). Específicamente en la vía de secreción, RAB32 media la localización de la cinasa LRRK2 a vesículas de transporte y endosomas de reciclaje (Waschbusch *et al.*, 2014), el tráfico desde los endosomas hacia *trans*-Golgi y el transporte de CI-MPR a endosomas desde el *trans*-Golgi (Waschbusch *et al.*, 2019). El aumento de RAB32 pudiera mantener el tráfico vesicular tardío de la vía de

secreción, entre *trans*-Golgi, endosomas, lisosomas y MP, ante una disminución de PACS-1, y con ello contribuir favorablemente con procesos como la autofagia.

Las restantes tres proteínas aumentadas, STX17, TRAPPC9 y SCFD1, participan en el tráfico entre el RE y el AG. TRAPPC9 es una subunidad no esencial del complejo TRAPP en células de mamíferos, localizada en ERGIC, AG, vesículas COPI y sitios ERES (Kim *et al.*, 2016). Coincidente con su localización preferente en las membranas del AG, se ha propuesto que esta proteína permite el desensamblaje de SEC23/24 en la cubierta interna de las vesículas COPII, por interacción con p150^{Glued}, y de esta forma media el reconocimiento, anclaje y fusión de estas vesículas en el AG (Zong *et al.*, 2012).

STX17 es una proteína SNARE, localizada en RE, ERGIC, AG, mitocondria, autofagosomas y autolisosomas, que participa en el tráfico de proteínas entre RE y AG, y en el desarrollo de la autofagia (Itakura *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014; Vats y Manjithaya, 2019; Xian *et al.*, 2019). Su menor expresión a través del uso de siRNA ha demostrado disminuir la secreción general de proteínas (Gordon *et al.*, 2010).

SCFD1 pertenece a la familia de proteínas SM, se localiza en vesículas alrededor del AG y recicla entre los compartimentos de RE y AG (Dascher y Balch, 1996; Bando *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Esta proteína estimula la formación de los complejos SNARE (Kosodo *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Demircioglu *et al.*, 2014), asegura la fidelidad de los eventos de fusión (Peng y Gallwitz, 2002), evita el desensamblaje prematuro de los complejos en *trans* (Lobingier *et al.*, 2014), y facilita junto a SEC18 el desensamblaje de los complejos en *cis* (Kosodo *et al.*, 2003). Su presencia es requerida para la secreción de varias proteínas (Gordon *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2017), además en la correcta localización de proteínas lisosomales y de MP (Dascher y Balch, 1996; Li *et al.*, 2005; Renna *et al.*, 2011). También participa en el transporte retrógrado del AG al RE (Li *et al.*, 2005; Laufman *et al.*, 2009). Su sobreexpresión ha incrementado el título, rendimiento y q_p de varias PR como α -amilasa, insulina, proteína de fusión a IL-2, SEAP, SAMY, VEGF y AcM en *Saccharomyces cerevisiae* (Hou *et al.*, 2012), *Pichia pastoris* (Guan *et al.*, 2016), y células HEK293 y CHO (Peng y Fussenegger, 2009), lo que valida este blanco para el incremento de la producción de PR en células CHO.

El tráfico vesicular ha sido una categoría descrita por varios autores como modificada en células de mayor productividad (Clarke *et al.*, 2011; Doolan *et al.*, 2008; Ho 2013; Kang *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2015; Sommeregger *et al.*, 2016), donde sobresale el aumento de

proteínas involucradas en la formación de vesículas (proteínas adaptadoras, subunidades del coátomero y de la clatrina, RTN3, SEC13, PDCD6, SAR1A), reclutamiento de cargos (receptores cargos), transporte (quinesinas, miosinas) y fusión a las membranas aceptoras (NSF, VAPA, SEC22B). Aunque estos blancos no se solapan en su mayoría con los reportados en la presente tesis, sí existe una correspondencia con el incremento de ciertos tipos de transporte intracelular, sugiriendo que una mayor q_p se correlaciona con un aumento de este proceso, a través del cambio en la expresión de diferentes efectores en diferentes líneas celulares.

La ventaja del uso de proteómica subcelular para la detección de proteínas de baja abundancia se pone de manifiesto cuando se comparan los resultados de tráfico vesicular de la presente tesis con los reportados por Doolan y cols. (2008) y Meleady y cols. (2008). Estos dos estudios comparan células que expresan rhBMP-2 contra células que co-expresan además la enzima PACEsol, involucrada en el procesamiento de BMP-2 y con baja expresión en células CHO. Mientras que Doolan y cols. (2008) reportan mediante transcriptómica un cambio en la acumulación de transcritos que intervienen en la formación de vesículas, reclutamiento de cargos, transporte, reconocimiento y anclaje, fusión a membranas y GTPasas pequeñas, el estudio proteómico diferencial de células completas de Meleady y cols. (2008) no encontró dichas diferencias. Aunque no existe una correlación entre la abundancia del ARNm y las proteínas, la ausencia de cambio de los 13 transcritos de tráfico vesicular en el estudio proteómico indica una menor capacidad de los estudios de células completas en detectar este tipo de proteínas. Por el contrario, 14 blancos pertenecientes a esta categoría fueron identificados en la presente tesis con una acumulación diferencial entre dos líneas de células CHO productoras de un AcM, a partir de una estrategia de proteómica subcelular.

Como resultado general del cambio en la acumulación de proteínas involucradas en el tráfico vesicular se puede concluir que en las células de mayor productividad se incrementó el tráfico temprano entre el RE y el AG, y entre *trans*-Golgi y los compartimentos posteriores, aumentó el tráfico anterógrado de vesículas COPII y disminuyó el de proteínas de la MEC y ciertas proteínas de MP, cambió la localización de enzimas de la glicosilación y se reorganizó el tráfico intra-Golgi.

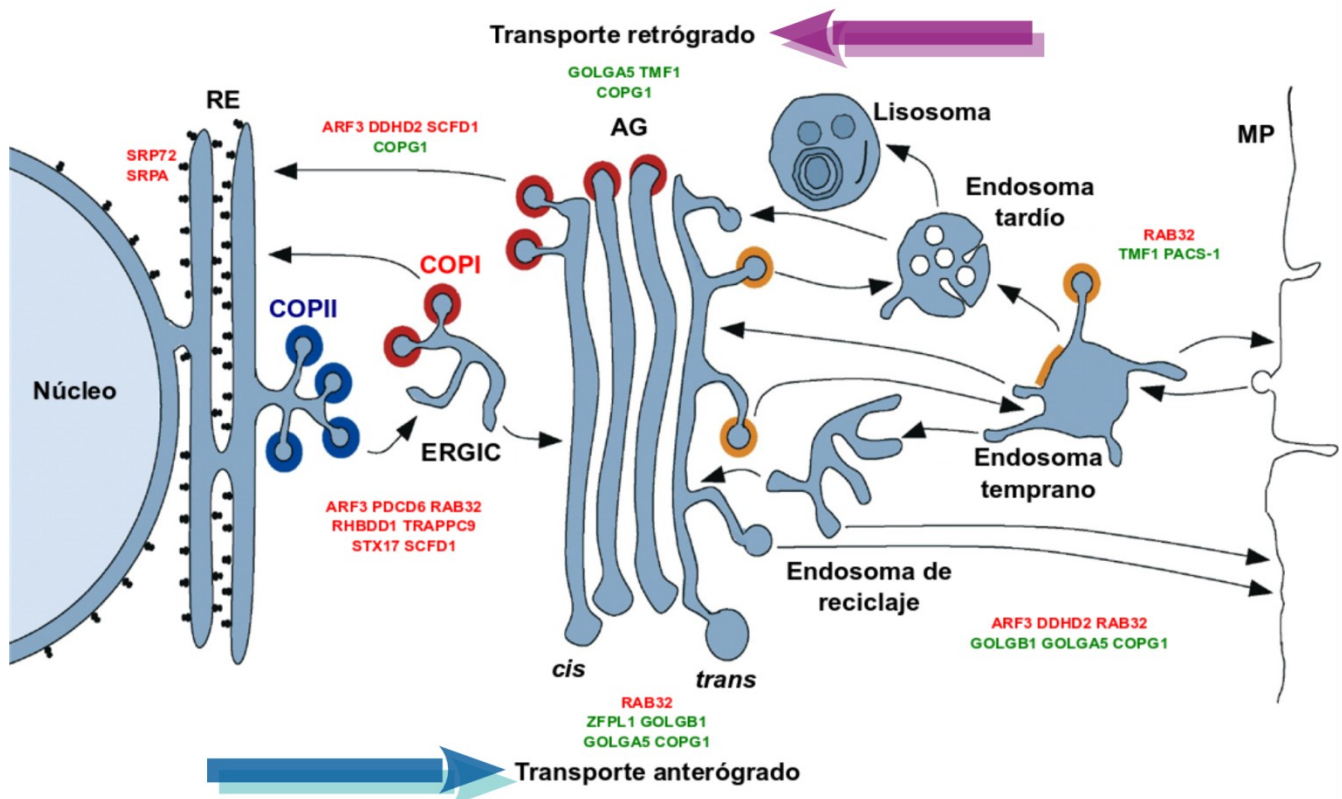


Fig 16. Proteínas con acumulación diferencial involucradas en la síntesis, translocación y tráfico de proteínas en la vía clásica de secreción. Se muestran las proteínas aumentadas (rojo) y disminuidas (verde) identificadas. Las flechas indican la dirección del transporte. AG: Aparato de Golgi, ERES: sitio de salida del RE, MP: membrana plasmática, RE: retículo endoplásmico. Imagen adaptada de Bonifacino, J.S. y Glick, B.J. (2004) *Cell* 116 (2): 153-166.

7.4.4 Producción de componentes de la MEC y otras proteínas secretadas

Esta categoría incluyó 9 proteínas disminuidas en las células de mayor productividad (GOLGB1, SURF4, MINPP1, TMED4, FKBP14, GOLM1, PRKCD, MCFD2, PITPNM1), las cuales participan en la secreción de componentes de la MEC, proteínas solubles y partículas. GOLGB1 participa en la secreción de proteoglicanos y proteínas involucradas en su síntesis, colágenos, proteínas de la MEC y glicosaminoglicanos (McCaughey *et al.*, 2016; Stevenson *et al.*, 2017; Katayama *et al.*, 2018). Además, ha sido colocada con dimeclina, otra proteína involucrada en la síntesis de colágeno (Denais *et al.*, 2011), mientras PRKCD favorece la transcripción, transporte y secreción de colágenos (Jimenez *et al.*, 2001; Lengfeld *et al.*, 2012). FKBP14 por su parte se une al colágeno en su estado hidroxilado, y participa en su plegamiento por su actividad prolil-isomerasa (Ishikawa y Bachinger, 2014; Ishikawa *et al.*, 2017); su disminución en las células más productoras concuerda con los resultados reportados por Orellana y cols. (2015) y Sommeregger y cols. (2016). PITPNM1 mantiene niveles adecuados de diacilglicerol en el AG, lo que favorece la fisión de vesículas y el

transporte de glicosaminoglicanos desde el *trans*-Golgi hacia la MP (Litvak *et al.*, 2005; Peretti *et al.*, 2008). MINPP1 se encuentra involucrada en la proliferación (Hidaka *et al.*, 2003) o maduración (Romano *et al.*, 1998; Caffrey *et al.*, 1999) de condrocitos e íntimamente ligada a la producción de la MEC durante el desarrollo de estas células. Otra proteína disminuida fue GOLM1, un oncogen (Ye *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2019) que facilita la secreción de metaloproteinasas MMP-1, 2, 9 y 13 (Ye *et al.*, 2016; Aruna y Li, 2018; Li *et al.*, 2018; Gai *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Se une además a la clusterina en el AG, a la cual permanece unida incluso en el medio extracelular, lo que sugiere que GOLM1 juega un papel importante en la secreción de esta chaperona (Liu *et al.*, 2019).

Las tres proteínas restantes, TMED4, MCFD2 y SURF4, participan exclusivamente en la secreción de cargos solubles. La alta expresión de TMED4 en las células melanotrópicas de la glándula pituitaria intermedia de *Xenopus laevis* sugieren un papel activo de esta proteína en la secreción de la hormona POMC (Rotter *et al.*, 2002). MCFD2 forma parte de un receptor cargo, junto a LMAN1, para el transporte anterógrado de los factores de coagulación FV y FVIII, desde el ER hacia ERGIC, y probablemente también funciona como un receptor para el tráfico de alfa1-antitripsina (Zhang *et al.*, 2003, 2006; Mohanty *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2018). A diferencia de estos receptores cargo, SURF4 ha sido implicado en la secreción de un amplio rango de cargos, que incluyen glicoproteínas (Emmer *et al.*, 2018), LPP (Saegusa *et al.*, 2018), proteínas de la MEC del esmalte, hormonas y proteasas (Yin *et al.*, 2018). Debido a que la secuencia N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras del AcM anti IL-8 del presente estudio es incompatible con la secuencia ER-ESCAPE necesaria para el transporte mediado por este receptor cargo (Gonzalez *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2018), es muy poco probable que SURF4 participe en el tráfico de esta PR.

La disminución de todas las proteínas de esta categoría en las células de mayor productividad, CRL-12445, sugiere que existe una menor producción de proteínas no esenciales como las de la MEC, hormonas, proteasas y otras glicoproteínas secretadas, lo que podría representar un ahorro de recursos celulares que se emplearían en la producción de PR e incrementan por tanto la q_p . Esta categoría no se encuentra representada en los antecedentes proteómicos, donde solo Ho (2013) y Hausmann y cols. (2018) han identificado una menor abundancia de dos proteínas implicadas en la producción de colágeno.

7.4.5 Glicosilación

Varias proteínas involucradas en la glicosilación se identificaron como disminuidas en las células CRL-12445 (GOLGB1, ZFPL1, GOLGA5 y TMF1). GOLGB1 participa en el tráfico de varias glicosidasas de la N-glicosilación (B4GALT1, MGAT1, ST6GAL1) dado que su disminución conlleva a una menor concentración de estas enzimas, su localización incorrecta y un cambio de la glicosilación hacia un patrón enriquecido en manosas (Bhat *et al.*, 2017; Stevenson *et al.*, 2017). El patrón de O-glicosilación también pudo haberse afectado debido a que TMF1 mantiene a la enzima GalNAc-T2 en el AG (Yamane *et al.*, 2007), y a que la disminución de ZFPL1 disminuye la N-acetilglicosamina en este tipo de enlaces (Xie *et al.*, 2017). Una disminución de GOLGA5 ha demostrado, por su parte, afectar la localización de manosidasa II y la glicosilación de proteínas de MP y lisosomas (Sohda *et al.*, 2010).

La disminución de estas proteínas sugiere un cambio en el patrón de glicosilación de las células más productoras, en detrimento de los O- y N-glicanos complejos, lo cual debe corroborarse mediante el análisis de la microheterogeneidad de la glicosilación del AcM. Este análisis de glicosilación puede realizarse mediante HILIC-UPLC, donde los oligosacáridos liberados por la enzima PNGasa F son marcados fluorescentemente, separados por cromatografía líquida, asignados a una masa en unidades de glucosa e identificados por comparación con bases de datos. Esta identificación es comúnmente corroborada por digestión con exoglicosidasas. La espectrometría de masas también puede ser empleada para este fin (Zhang *et al.*, 2016). El cambio en la acumulación de algunos transcritos (Doolan *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2011) o secuencias proteicas (Meleady *et al.*, 2008; Hausmann *et al.*, 2018) de enzimas que participan en la glicosilación de la VCS recomienda el análisis de las MPT de las PR durante los estudios ómicos diferenciales.

7.4.6 Autofagia

La autofagia pudiera estar activada en células CRL-12445 debido a la disminución de PRKCD y ZFPL1, y el aumento de RAB32, SCFD1 y STX17. La pérdida de PRKCD y ZFPL1 activa la autofagia en células tubulares proximales de rata (Zhang *et al.*, 2017b; Zhang *et al.*, 2017c) y líneas celulares de cáncer gástrico humano (Xie *et al.*, 2017), respectivamente. RAB32, SCFD1 y STX17 son, por el contrario, promotores de este proceso. La sobreexpresión de RAB32 incrementa el número de autofagosomas mientras su pérdida conlleva a un número pequeño de autofagosomas, bloqueo de la autofagia y acumulación de estructuras tipo agregosomas con proteínas insolubles poliubiquitinadas (Hirota y Tanaka, 2009; Wang *et*

al., 2012). SCFD1 participa en la autofagia a través del tráfico de proteínas lisosomales desde el RE hacia el AG. Aunque su disminución induce la formación de autofagosomas como consecuencia del estrés del RE y la UPR, la autofagia no ocurre debido a la falta de enzimas lisosomales en este contexto (Renna *et al.*, 2011). STX17 es reclutada a los autofagosomas ante un estímulo autofágico, donde se une a otras SNAREs (Itakura *et al.*, 2012; Uematsu *et al.*, 2017; Saleeb *et al.*, 2019), y media el reclutamiento de complejos proteicos requeridos para la maduración o fusión de estas estructuras (Jiang *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2017). También participa directamente en los eventos de fusión de los autofagosomas a los lisosomas junto a otros componentes de los complejos SNARE en *trans* (Itakura *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014; Uematsu *et al.*, 2017; Vats y Manjithaya, 2019). El cambio en la abundancia de moduladores o efectores de la autofagia solo ha sido reportado por Sommeregger y cols. (2016), con un aumento de MTAP1B, un posible cofactor positivo en la formación de vesículas autofágicas.

La autofagia se ha descrito como un mecanismo de supervivencia de las células eucariotas para protegerse de condiciones estresantes mediante la obtención de energía y componentes básicos de biomoléculas, y la eliminación de organelos dañados (Kim *et al.*, 2013). En el caso de las células CHO, este proceso puede activarse por agotamiento de nutrientes, estrés hiperosmótico y adición de butirato de sodio (Jardon *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013), condiciones ausentes en las células muestreadas en este estudio. Además del impacto positivo de la autofagia en la viabilidad y longevidad de los cultivos (Lee *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018), su inducción química por 3-MA (Jardon *et al.*, 2012; Nasserri *et al.*, 2014; Baek *et al.*, 2016) o rapamicina (Zhang *et al.*, 2018) en células CHO se ha asociado con un aumento de la q_p o el título de la PR. Ante este panorama, se recomienda la realización de un estudio profundo para dilucidar la relación entre la autofagia basal y la q_p en células CHO recombinantes durante su fase exponencial de crecimiento.

7.4.7 Degradación proteosomal

La degradación proteosomal en células CRL-12445 se haya probablemente incrementada debido a una mayor acumulación de las chaperonas PSMG1 y POMP, que participan coordinadamente en el ensamblaje y maduración de los proteosomas (Hirano *et al.*, 2005, 2006; Chondrogianni y Gonos, 2007; Fricke *et al.*, 2007; Dahlqvist *et al.*, 2012; Goldberg *et al.*, 2015; Zieba *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018). PSMG1 actúa en los pasos iniciales de formación del proteosoma y, en asociación con PAC-2, participa en el ensamblaje

del anillo alfa, al cual permanece unido para evitar la translocación nuclear prematura de los intermediarios y favorecer un plegamiento adecuado (Hirano *et al.*, 2005, 2006; Wu *et al.*, 2018). En un próximo paso, este anillo es reclutado al RE por acción de PAC3/4 y POMP, PAC3/4 se disocia de este complejo y POMP recluta a las subunidades beta restantes necesarias para la formación de los hemi-proteosomas (Hirano *et al.*, 2006; Fricke *et al.*, 2007; Dahlqvist *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2018). Dado que ambas chaperonas, PSMG1 y POMP, son degradadas por el proteosoma 20S durante su maduración, se requiere que sus concentraciones aumenten en la célula para mantener o incrementar la actividad proteosomal (Hirano *et al.*, 2006; Fricke *et al.*, 2007). El mantenimiento del proteosoma por estas chaperonas ha demostrado ser esencial para la proliferación celular, señalización, defensas antioxidantes, homeostasis del RE y evitar la apoptosis (Chondrogianni y Gonos, 2007; Goldberg *et al.*, 2015; Zieba *et al.*, 2017).

Adicionalmente a la validación de la acumulación diferencial de estas proteínas mediante WB, se recomienda medir la actividad proteosomal para verificar si un incremento en estas chaperonas se traduce en un aumento de la actividad proteolítica. Un método común para medir esta actividad es el uso de péptidos marcados con moléculas fluorescentes, en homogenizados celulares o fracciones subcelulares enriquecidas en proteosomas. Estos péptidos son específicos por las tres actividades del proteosoma (tipo quimiotripsina, tipo tripsina e hidrólisis post-glutamato), cuya actividad proteolítica aumenta drásticamente la fluorescencia (Liggett *et al.*, 2010).

El incremento de proteínas involucradas en la degradación proteosomal puede ser una característica de células de mayor productividad solo para ciertas clonas, pues mientras que Nissom y cols. (2006) y Hausmann y cols. (2018) han reportado el incremento de proteínas de subunidades α , β y reguladoras del proteosoma, Orellana y cols. (2015) mostraron la disminución de 11 subunidades de este complejo macromolecular y de otras proteínas relacionadas con el reconocimiento de sus blancos.

7.4.8 Síntesis y translocación de proteínas al RE

Una mayor acumulación de SRP72 y SRPRA en las células de mayor productividad indica que la síntesis y translocación de proteínas al RE se encuentra aumentada en esta línea celular, lo que contribuye a la mayor producción y secreción del AcM (Fig 16). SRP72 es un miembro de SRP, un complejo ribonucleoproteico que se une al ARNm-ribosoma, media su transporte hacia el translocón en las membranas del RE y favorece la eliminación

proteolítica del péptido señal a través de su actividad de arresto de la traducción (Siegel y Walter, 1988; Brown *et al.*, 1994; Grosshans *et al.*, 2001; Shan *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2017; Wild *et al.*, 2019). SRP72 es requerida además para la exportación nuclear, estabilidad y función de SRP (Siegel y Walter, 1988; Brown *et al.*, 1994; Grosshans *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2017).

SRPRA, una proteína periférica de membrana con actividad GTPasa, es la subunidad alfa de SRPR (Ogg *et al.*, 1992; Rapiejko y Gilmore, 1997; Shan *et al.*, 2009). Esta subunidad se une a SRP y a los ribosomas formando un complejo trimérico que permite la localización de las estructuras SRP-ribosomas en las membranas del RE (Rapiejko y Gilmore, 1997; Mandon *et al.*, 2003; Wild *et al.*, 2019). Inmediatamente después de esta unión, una molécula de GTP se incorpora al complejo trimérico y el ARNm-ribosoma se transfiere al translocón Sec61 para la subsecuente translocación del péptido nascente hacia el lumen del RE. Finalmente, la actividad GTPasa de SRP y su receptor asegura la disociación de este complejo para futuros procesos de unión, transporte y translocación (Ogg *et al.*, 1992; Rapiejko y Gilmore, 1997; Mandon *et al.*, 2003). Una función esencial de esta subunidad es el desplazamiento de Sec62 de las interacciones Sec61-Sec62, lo que favorece la formación de complejos Sec61-ribosomas y, por tanto, a la vía de SRP para la translocación de proteínas. De esta forma, SRPRA inhibe la translocación de proteínas mediada por Sec62 y permite que Sec61 se encuentre disponible para la translocación de los péptidos nascentes de SRP (Jadhav *et al.*, 2015). Su mayor abundancia en células de mayor productividad también ha sido identificada por Kang y cols. (2014).

El efecto positivo de la sobreexpresión de componentes de la vía de SRP en la producción de PR ha sido demostrado por Le Fourn y cols. (2014). En este reporte, la sobreexpresión de SRP14, una subunidad de la partícula SRP, incrementó la q_p de células CHOK1 productoras de Trastuzumab en 7 veces y de Infliximab en un 30%, dado que este componente favorece el arresto co-traducciona, la eliminación del péptido señal y el correcto procesamiento de la cadena polipeptídica. El incremento de otras proteínas de la vía de SRP, como SRP9, SRP54, el receptor de SRP y el translocón Sec61, incrementó sustancialmente la q_p de clonas productoras de Infliximab, de manera independiente o combinadas entre ellas. Las combinaciones del translocón y el receptor de SRP, o de la partícula SRP y su receptor, mostraron el mayor incremento en la q_p de Infliximab (de 30 pcd a 60 pcd), lo que demostró que la vía de SRP puede constituir un cuello de botella importante durante la

expresión de ciertas PR, y que el incremento en la expresión de sus componentes facilita el correcto procesamiento de estas proteínas, evita una respuesta de estrés del RE y aumenta la productividad.

La traducción de proteínas es una categoría ampliamente representada en los antecedentes previos de proteómica diferencial. Aunque en estos estudios las proteínas ribosomales se han encontrado aumentadas (Meleady *et al.*, 2008; Carlage *et al.*, 2009; Ho 2013) o disminuidas (Nissom *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2015), la sobrerrepresentación de factores de iniciación y elongación, tRNA-aminoacil sintetetasas y de la vía de SRP (Nissom *et al.*, 2006; Meleady *et al.*, 2008; Carlage *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2014; Sommeregger *et al.*, 2016; Hausmann *et al.*, 2018), indica que una mayor abundancia de proteínas de la maquinaria de traducción pudiera ser uno de los factores que contribuyen a un fenotipo de mayor productividad. Una excepción a esta observación es la comparación descrita por Orellana y cols. (2015), donde se describe una disminución de muchas proteínas involucradas en este proceso, lo cual pudiera ser contrarrestado por el aumento en el transporte de vesículas, defensas antioxidantes y reorganización del citoesqueleto.

VIII. CONCLUSIONES

Dado que la proteómica se ha empleado con frecuencia para desentrañar mecanismos moleculares implicados en la secreción de PR, en la presente tesis se realizó un análisis proteómico diferencial de dos líneas de células CHO productoras de un AcM, con una diferencia de 26 veces en su q_p , con el objetivo de identificar blancos proteicos de la VCS relacionados con la síntesis, transporte y metabolismo de proteínas que se asocien a la producción de PR. Para ello se empleó el fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial e isopícnica, en conjunto con la precipitación de proteínas por acetona, lo cual permitió la obtención de fracciones enriquecidas en RE y AG, para su estudio proteómico posterior. La comparación metabólica evidenció que a una mayor q_p se asoció un consumo más eficiente de glucosa y glutamina, menor producción de metabolitos dañinos y un metabolismo más oxidativo, características que pudieran ser empleadas como marcadores de alta productividad durante los procesos de obtención, caracterización y selección de clonas. Como resultado del análisis proteómico, aproximadamente el 80% de todas las proteínas con acumulación diferencial se reconocieron como nuevos blancos, de las cuales un tercio se asignó a la VCS, lo que demostró una mayor capacidad de identificación de proteínas de baja abundancia a partir de fracciones subcelulares con respecto a estudios de células completas. Esta comparación proteómica indicó que un incremento de las proteínas involucradas en la síntesis y translocación de proteínas, autofagia, degradación proteosomal y tráfico vesicular, y una disminución de aquellas que participan en la producción de la MEC y otras proteínas secretadas, son posibles estrategias para incrementar la producción de PR. Por otra parte, un aumento en el estrés del RE, UPR y ERAD se asociaron a una menor productividad, indicando que las clonas que muestren estas características no deben ser seleccionadas. La restructuración del transporte en el AG, el cambio en la morfología de la VCS y las MPT de las PR necesitan de un estudio más profundo para su validación y comprensión. La estrategia de proteómica subcelular aplicada en el presente trabajo permitió identificar 386 nuevos blancos proteicos con respecto a estudios proteómicos previos de células enteras, que facilitan la comprensión de los mecanismos moleculares asociados a la producción de PR y permiten el diseño de nuevas sublíneas con fenotipos especializados para la producción de proteínas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. y Mori, K. (2008) 'ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum.', *Cell structure and function* 33(1), p. 75–89. doi: 10.1247/csf.07044.
- Agrawal, G. y Subramani, S. (2016) 'De novo peroxisome biogenesis: Evolving concepts and conundrums.', *Biochimica et biophysica acta* 1863(5), p. 892–901. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.014.
- Albro, P. W. (1975) 'Determination of protein in preparations of microsomes.', *Analytical Biochemistry* 64(2), p. 485–493. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90458-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90458-3).
- Alcock, F. y Swanton, E. (2009) 'Mammalian OS-9 is upregulated in response to endoplasmic reticulum stress and facilitates ubiquitination of misfolded glycoproteins.', *Journal of molecular biology* 385(4), p. 1032–1042. doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.045.
- Alto, N. M., Soderling, J. y Scott, J. D. (2002) 'Rab32 is an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics.', *The Journal of cell biology* 158(4), p. 659–668. doi: 10.1083/jcb.200204081.
- Alvarez, C., Garcia-Mata, R., Hauri, H. P. y Sztul, E. (2001) 'The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic.', *The Journal of biological chemistry* 276(4), p. 2693–2700. doi: 10.1074/jbc.M007957200.
- Amodio, G., Renna, M., Paladino, S., Venturi, C., Tacchetti, C., Moltedo, O., Franceschelli, S., Mallardo, M., Bonatti, S. y Remondelli, P. (2009) 'Endoplasmic reticulum stress reduces the export from the ER and alters the architecture of post-ER compartments.', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41(12), p. 2511–2521. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.006.
- Andreyev, A. Y., Subramaniam, S., Ryan, A., Dennis, E. A., Shen, Z., Raetz, C. R. H., Fahy, E., Briggs, S. y Guan, Z. (2010) 'Application of Proteomic Marker Ensembles to Subcellular Organelle Identification.', *Molecular & Cellular Proteomics* 9(2), p. 388–402. doi: 10.1074/mcp.m900432-mcp200.
- Arakel, E. C. y Schwappach, B. (2018) 'Formation of COPI-coated vesicles at a glance.', *Journal of cell science* 131(5), p. jcs209890. doi: 10.1242/jcs.209890.

- Aruna y Li, L. M. (2018) 'Overexpression of Golgi membrane protein 1 promotes non-small-cell carcinoma aggressiveness by regulating the matrix metalloproteinase 13.', *American journal of cancer research* 8(3), p. 551–565.
- Baek, E., Kim, C. L., Kim, M. G., Lee, J. S. y Lee, G. M. (2016) 'Chemical Inhibition of Autophagy: Examining Its Potential to Increase the Specific Productivity of Recombinant CHO Cell Lines.', *Biotechnology and Bioengineering* 113(9), p. 1953-1961. doi: 10.1002/bit.25962.
- Baik, J. Y. y Lee, G. M. (2010) 'A DIGE approach for the assessment of differential expression of the CHO proteome under sodium butyrate addition: Effect of Bcl-xL overexpression.', *Biotechnology and Bioengineering* 105(2), p. 358–367. doi: 10.1002/bit.22534.
- Balch, W. E. y Rothman, J. E. (1985) 'Characterization of protein transport between successive compartments of the Golgi apparatus: Asymmetric properties of donor and acceptor activities in a cell-free system.', *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240(1), p. 413–425. doi: 10.1016/0003-9861(85)90046-3.
- Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A. y Rothman, J. E. (1984) 'Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine.', *Cell* 39(Pt 1), p. 405–416. doi: 10.1016/0092-8674(84)90019-9.
- Bandaranayake, A. D. y Almo, S. C. (2014) 'Recent advances in mammalian protein production.', *FEBS Letters* 588(2), p. 253–260. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.035.
- Bando, Y., Katayama, T., Taniguchi, M., Ishibashi, T., Matsuo, N., Ogawa, S. y Tohyama, M. (2005) 'RA410/Sly1 suppresses MPP+ and 6-hydroxydopamine-induced cell death in SH-SY5Y cells.', *Neurobiology of disease* 18(1), p. 143–151. doi: 10.1016/j.nbd.2004.09.008.
- Barritault, D., Expert-Bezancon, A., Guérin, M. y Hayes, D. (1976) 'The Use of Acetone Precipitation in the Isolation of Ribosomal Proteins.', *European Journal of Biochemistry* 63(1), p. 131–135. doi: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb10215.x.
- Barry, S. T. y Critchley, D. R. (1994) 'The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions.', *Journal of cell science* 107 (Pt 7), p. 2033–2045.

- Baudhuin, P. y Berthet, J. (1967) 'Electron microscopic examination of subcellular fractions. II. Quantitative analysis of the mitochondrial population isolated from rat liver.', *The Journal of Cell Biology* 35(3), p. 631–648. doi: 10.1083/jcb.35.3.631.
- Baycin-Hizal, D., Tabb, D. L., Chaerkady, R., Chen, L., Lewis, N. E., Nagarajan, H., Sarkaria, V., Kumar, A., Wolozny, D., Colao, J., Jacobson, E., Tian, Y., O'Meally, R. N., Krag, S. S., Cole, R. N., Palsson, B. O., Zhang, H. y Betenbaugh, M. (2012) 'Proteomic analysis of chinese hamster ovary cells.', *Journal of Proteome Research* 11(11), p. 5265–5276. doi: 10.1021/pr300476w.
- Beck, R., Rawet, M., Wieland, F. T. y Cassel, D. (2009) 'The COPI system: Molecular mechanisms and function.', *FEBS Letters*, 583(17), p. 2701–2709. doi: 10.1016/j.febslet.2009.07.032.
- Becker, M. M. M., Lapouge, K., Segnitz, B., Wild, K. y Sinning, I. (2017) 'Structures of human SRP72 complexes provide insights into SRP RNA remodeling and ribosome interaction.', *Nucleic acids research* 45(1), p. 470–481. doi: 10.1093/nar/gkw1124.
- Bedoya-López, A., Estrada, K., Sanchez-Flores, A., Ramírez, O. T., Altamirano, C., Segovia, L., Miranda-Ríos, J., Trujillo-Roldán, M. A. y Valdez-Cruz, N. A. (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), p. e0151529. doi: 10.1371/journal.pone.0151529.
- Benabdelkamel, H., Masood, A., Alanazi, I. O. y Alfadda, A. A. (2018) 'Comparison of protein precipitation methods from adipose tissue using difference gel electrophoresis.', *Electrophoresis* 39(14) p. 1745–1753. doi: 10.1002/elps.201800124.
- Bernasconi, R., Pertel, T., Luban, J. y Molinari, M. (2008) 'A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal.', *The Journal of biological chemistry* 283(24), p. 16446–16454. doi: 10.1074/jbc.M802272200.
- Berting, A., Farcet, M. R. y Kreil, T. R. (2010) 'Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing.', *Biotechnology and Bioengineering* 106(4), p. 598–607. doi: 10.1002/bit.22723.
- Bhat, G., Hothpet, V-R., Lin, M-F. y Cheng, P-W. (2017) 'Shifted Golgi targeting of glycosyltransferases and alpha-mannosidase IA from giantin to GM130-GRASP65 results in

formation of high mannose N-glycans in aggressive prostate cancer cells.', *Biochimica et biophysica acta* 1861(11 Pt A), p. 2891–2901. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.08.006.

Bhuin, T. y Roy, J. K. (2014) 'Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport.', *Experimental cell research* 328(1), p. 1–19. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.027.

Binder, J. X., Pletscher-Frankild, S., Tsafou, K., Stolte, C., O'Donoghue, S. I., Schneider, R. y Jensen, L. J. (2014) 'COMPARTMENTS: Unification and visualization of protein subcellular localization evidence.', *Database* 2014, p. bau012. doi: 10.1093/database/bau012.

Bole, D. G., Dowin, R., Doriaux, M. y Jamieson, J. D. (1989) 'Immunocytochemical localization of BiP to the rough endoplasmic reticulum: evidence for protein sorting by selective retention.', *The journal of histochemistry and cytochemistry* 37(12), p. 1817–1823. doi: 10.1177/37.12.2685110.

Bolt, G., Kristensen, C. y Steenstrup, T. D. (2008) 'More than one intracellular processing bottleneck delays the secretion of coagulation factor VII.', *Thrombosis and Haemostasis* 100, p. 204–210. doi: 10.1160/th08-05-0281.

Bolt, G., Steenstrup, T. D. y Kristensen, C. (2007) 'All post-translational modifications except propeptide cleavage are required for optimal secretion of coagulation factor VII.', *Thrombosis and Haemostasis* 98(5), p. 988–997. doi: 10.1160/TH07-05-0332.

Bonifacino, J. S. y Glick, B. S. (2004) 'The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion.', *Cell* 116(2), p. 153–166. doi: 10.1016/S0092-8674(03)01079-1.

Bourougaa, K., Naski, N., Boularan, C., Mlynarczyk, C., Candeias, M. M., Marullo, S. y Fåhraeus, R. (2010) 'Endoplasmic Reticulum Stress Induces G2 Cell-Cycle Arrest via mRNA Translation of the p53 Isoform p53/47.', *Molecular Cell* 38(1), p. 78–88. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.041.

Bouzid, A., Lesiak, C., Konz, D. W., Franzen, D. L., Biggs, W. y Anderson, J. P. (2013) 'Chemiluminescence compact imaging scanner'. USA. Available at: <https://patents.justia.com/patent/8486644>.

Breuzza, L., Halbeisen, R., Jenö, P., Otte, S., Barlowe, C., Hong, W. y Hauri, H. P. (2004) 'Proteomics of endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) membranes from brefeldin A-treated HepG2 cells identifies ERGIC-32, a new cycling protein that interacts with human Erv46.', *Journal of Biological Chemistry* 279(45), p. 47242–47253. doi: 10.1074/jbc.M406644200.

- Brown, J. D., Hann, B. C., Medzihradzky, K. F., Niwa, M., Burlingame, A. L. y Walter P. (1994) 'Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression.', *The EMBO journal* 13(18), p. 4390–4400.
- Buchsteiner, M., Quek, L. E., Gray, P. y Nielsen, L. K. (2018) 'Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect.', *Biotechnology and Bioengineering* 115(9), p. 2315–2327. doi: 10.1002/bit.26724.
- Bui, M., Gilady, S. Y., Fitzsimmons, R. E. B., Benson, M. D., Lynes, E. M., Gesson, K., Alto, N. M., Strack, S., Scott, J. D. y Simmen, T. (2010) 'Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties.', *The Journal of biological chemistry* 285(41), p. 31590–31602. doi: 10.1074/jbc.M110.101584.
- Burgess, R. R. (2009) 'Protein precipitation techniques', in Burgess, R. and Deutscher, M. (eds) *Guide to Protein Purification, Second Edition*. Academic Press, p. 331–342. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63020-2.
- Butler, W. H. y Judah, J. D. (1970) 'Preparation of isolated rat liver mitochondria for electron microscopy.', *The Journal of cell biology* 44(2), p. 278–289. doi: 10.1083/jcb.44.2.278.
- Caffrey, J. J., Hidaka, K., Matsuda, M., Hirata, M. y Shears, S. B. (1999) 'The human and rat forms of multiple inositol polyphosphate phosphatase: functional homology with a histidine acid phosphatase up-regulated during endochondral ossification.', *FEBS letters* 442(1), p. 99–104. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01636-6.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Stampachiacchiere, S., Ventura, S., Zenezini Chiozzi, R. y Laganà, A. (2015) 'Characterization of quinoa seed proteome combining different protein precipitation techniques: Improvement of knowledge of nonmodel plant proteomics.', *Journal of Separation Science* 38(6), p. 1017–1025. doi: 10.1002/jssc.201401319.
- Carlage, T., Hincapie, M., Zang, L., Lyubarskaya, Y., Madden, H., Mhatre, R. y Hancock, W. S. (2009) 'Proteomic profiling of a high-producing Chinese hamster ovary cell culture.', *Analytical Chemistry* 81(17), p. 7357–7362. doi: 10.1021/ac900792z.
- Carr, C. M. y Rizo, J. (2010) 'At the junction of SNARE and SM protein function.', *Current opinion in cell biology* 22(4), p. 488–495. doi: 10.1016/j.ceb.2010.04.006.

- Carreras-Sureda, A., Pihán, P. y Hetz, C. (2018) 'Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses.', *Cell calcium* 70, p. 24–31. doi: 10.1016/j.ceca.2017.08.004.
- Cezanne, L., Navarro, L. y Tocanne, J. F. (1992) 'Isolation of the plasma membrane and organelles from Chinese hamster ovary cells.', *BBA - Biomembranes* 1112(2), p. 205–214. doi: 10.1016/0005-2736(92)90393-Z.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. y Baty, D. (2009) 'Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future.', *British journal of pharmacology* 157(2), p. 220–233. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x.
- Chandramouli, K. y Qian, P.-Y. (2009) 'Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity.', *Human Genomics and Proteomics* 2009, p. 239204. doi: 10.4061/2009/239204.
- Chawade, A., Alexandersson, E. y Levander, F. (2014) 'Normalyzer: A tool for rapid evaluation of normalization methods for omics data sets.', *Journal of Proteome Research* 13(6), p. 3114–3120. doi: 10.1021/pr401264n.
- Cheng, X., Ma, X., Ding, X., Li, L., Jiang, X., Shen, Z., Chen, S., Liu, W., Gong, W. y Sun, Q. (2017) 'Pacer Mediates the Function of Class III PI3K and HOPS Complexes in Autophagosome Maturation by Engaging Stx17.', *Molecular cell* 65(6), p. 1029-1043.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.010.
- Cheng, Y., Wei, H., Sun, R., Tian, Z. y Zheng, X. (2016) 'Rapid method for protein quantitation by Bradford assay after elimination of the interference of polysorbate 80.', *Analytical Biochemistry* 494, p. 37–39. doi: 10.1016/j.ab.2015.10.013.
- Cherepanova, N., Shrimal, S. y Gilmore, R. (2016) 'N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum.', *Current opinion in cell biology* 41, p. 57–65. doi: 10.1016/j.ceb.2016.03.021.
- Chin, C. L., Chin, H. K., Chin, C. S. H., Lai, E. T. y Ng, S. K. (2015) 'Engineering selection stringency on expression vector for the production of recombinant human alpha1-antitrypsin using Chinese Hamster ovary cells.', *BMC biotechnology* 15, p. 44. doi: 10.1186/s12896-015-0145-9.

- Chiu, C-F., Ghanekar, Y., Frost, L., Diao, A., Morrison, D., McKenzie, E. y Lowe, M. (2008) 'ZFPL1, a novel ring finger protein required for cis-Golgi integrity and efficient ER-to-Golgi transport.', *The EMBO journal* 27(7), p. 934–947. doi: 10.1038/emboj.2008.40.
- Chondrogianni, N. y Gonos, E. S. (2007) 'Overexpression of hUMP1/POMP proteasome accessory protein enhances proteasome-mediated antioxidant defence.', *Experimental gerontology* 42(9), p. 899–903. doi: 10.1016/j.exger.2007.01.012.
- Christianson, J. C., Olzmann, J. A., Shaler, T. A., Sowa, M. E., Bennett, E. J., Richter, C. M., Tyler, R. E., Greenblatt, E. J., Harper, J. W. y Kopito, R. R. (2011) 'Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy.', *Nature cell biology* 14(1), p. 93–105. doi: 10.1038/ncb2383.
- Christianson, J. C., Shaler, T. A., Tyler, R. E. y Kopito, R. R. (2008) 'OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD.', *Nature cell biology* 10(3), p. 272–282. doi: 10.1038/ncb1689.
- Chusainow, J., Yang, Y. S., Yeo, J. H. M., Ton, P. C., Asvadi, P., Wong, N. S. C. y Yap, M. G. S. (2009) 'A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer?.', *Biotechnology and Bioengineering* 102(4), p. 1182–1196. doi: 10.1002/bit.22158.
- Clarke, C., Doolan, P., Barron, N., Meleady, P., O'Sullivan, F., Gammell, P., Melville, M., Leonard, M. y Clynes, M. (2011) 'Predicting cell-specific productivity from CHO gene expression.', *Journal of biotechnology* 151(2), p. 159–165. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.11.016.
- Clayton, D. A. y Shadel, G. S. (2014) 'Isolation of mitochondria from cells and tissues.', *Cold Spring Harbor protocols* 2014(10), p. pdb.top074542. doi: 10.1101/pdb.top074542.
- Crowell, A. M. J., Wall, M. J. y Doucette, A. A. (2013) 'Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation.', *Analytica Chimica Acta* 796, p. 48–54. doi: 10.1016/j.aca.2013.08.005.
- Crump, C. M., Xiang, Y., Thomas, L., Gu, F., Austin, C., Tooze, S. A. y Thomas, G. (2001) 'PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic.', *The EMBO journal* 20(9), p. 2191–2201. doi: 10.1093/emboj/20.9.2191.
- Cruz, H. J., Freitas, C. M., Alves, P. M., Moreira, J. L. y Carrondo, M. J. T. (2000) 'Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells.', *Enzyme and Microbial Technology* 27(1–2), p. 43–52. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00151-4.

Cymer, F., Beck, H., Rohde, A. y Reusch, D. (2018) 'Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation - Structure, function and therapeutic potential.', *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization* 52, p. 1–11. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.11.001.

Dahlqvist, J., Torma, H., Badhai, J. y Dahl, N. (2012) 'siRNA silencing of proteasome maturation protein (POMP) activates the unfolded protein response and constitutes a model for KLiCK genodermatosis.', *PLoS One* 7(1), p. e29471. doi: 10.1371/journal.pone.0029471.

Dascher, C. y Balch, W. E. (1996) 'Mammalian Sly1 regulates syntaxin 5 function in endoplasmic reticulum to Golgi transport.', *The Journal of biological chemistry* 271(27), p. 15866–15869. doi: 10.1074/jbc.271.27.15866.

Dave, J. M. y Bayless, K. J. (2014) 'Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting.', *Microcirculation* 21(4), p. 333–344. doi: 10.1111/micc.12111.

Demircioglu, F. E., Burkhardt, P. y Fasshauer, D. (2014) 'The SM protein Sly1 accelerates assembly of the ER-Golgi SNARE complex.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(38), p. 13828–13833. doi: 10.1073/pnas.1408254111.

Denais, C., Dent, C. L., Southgate, L., Hoyle, J., Dafou, D., Trembath, R. C. y Machado, R. D. (2011) 'Dymeclin, the gene underlying Dyggve-Melchior-Clausen syndrome, encodes a protein integral to extracellular matrix and Golgi organization and is associated with protein secretion pathways critical in bone development.', *Human mutation* 32(2), p. 231–239. doi: 10.1002/humu.21413.

Diao, A., Rahman, D., Pappin, D. J. C., Lucocq, J. y Lowe, M. (2003) 'The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation.', *The Journal of cell biology* 160(2), p. 201–212. doi: 10.1083/jcb.200207045.

Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L-E., Timmins, N. E., Chrysanthopoulos, P., Jacob, S. S., Gray, P. y Nielsen, L. K. (2012) 'Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics.', *Biotechnology and bioengineering* 109(6), p. 1404–1414. doi: 10.1002/bit.24496.

Dimauro, I., Pearson, T., Caporossi, D. y Jackson, M. J. (2012) 'A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue.', *BMC Research Notes* 5, p. 513. doi: 10.1186/1756-0500-5-513.

- Ding, X., Deng, G., Liu, J., Liu, B., Yuan, F., Yang, X. y Chen, Q. (2019) 'GOLM1 silencing inhibits the proliferation and motility of human glioblastoma cells via the Wnt/beta-catenin signaling pathway.', *Brain research* 1717, p. 117–126. doi: 10.1016/j.brainres.2019.03.035.
- Dolman, N. J., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Voronina, S. G., Petersen, O. H. y Tepikin, A. V. (2005) 'Stable Golgi-mitochondria complexes and formation of Golgi Ca²⁺ gradients in pancreatic acinar cells.', *Journal of Biological Chemistry* 280(16), p. 15794–15799. doi: 10.1074/jbc.M412694200.
- Dominguez, M., Fazel, A., Dahan, S., Lovell, J., Hermo, L., Claude, A., Melançon, P. y Bergeron, J. J. M. (1999) 'Fusogenic domains of Golgi membranes are sequestered into specialized regions of the stack that can be released by mechanical fragmentation.', *Journal of Cell Biology* 145(4), p. 673–688. doi: 10.1083/jcb.145.4.673.
- Doolan, P., Melville, M., Gammell, P., Sinacore, M., Meleady, P., McCarthy, K., Francullo, L., Leonard, M., Charlebois, T. y Clynes, M. (2008) 'Transcriptional profiling of gene expression changes in a PACE-transfected CHO DUKX cell line secreting high levels of rhBMP-2.', *Molecular Biotechnology* 39(3), p. 187–199. doi: 10.1007/s12033-008-9039-6.
- Doucette, A. A., Vieira, D. B., Orton, D. J. y Wall, M. J. (2014) 'Resolubilization of precipitated intact membrane proteins with cold formic acid for analysis by mass spectrometry.', *Journal of Proteome Research* 13(12), p. 6001–6012. doi: 10.1021/pr500864a.
- Dreesen, I. A. J. y Fussenegger, M. (2011) 'Ectopic expression of human mTOR increases viability, robustness, cell size, proliferation, and antibody production of chinese hamster ovary cells.', *Biotechnology and Bioengineering* 108(4), p. 853–866. doi: 10.1002/bit.22990.
- Dreger, M. (2003) 'Proteome analysis at the level of subcellular structures.', *European Journal of Biochemistry* 270(4), p. 589–599. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03426.x.
- Drissi, R., Dubois, M. L. y Boisvert, F. M. (2013) 'Proteomics methods for subcellular proteome analysis.', *FEBS Journal* 280(22), p. 5626–5634. doi: 10.1111/febs.12502.
- Duden, R. (2003) 'ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review).', *Molecular membrane biology* 20(3), p. 197–207. doi: 10.1080/0968768031000122548.
- Edros, R., McDonnell, S. y Al-Rubeai, M. (2014) 'The relationship between mTOR signalling pathway and recombinant antibody productivity in CHO cell lines.', *BMC biotechnology* 14, p. 15. doi: 10.1186/1472-6750-14-15.

- Elsner, M., Hashimoto, H. y Nilsson, T. (2003) 'Cisternal maturation and vesicle transport: join the band wagon! (Review).', *Molecular Membrane Biology* 20(3), p. 221–229. doi: 10.1080/0968768031000114024.
- Emmer, B. T., Hesketh, G. G., Kotnik, E., Tang, V. T., Lascuna, P. J., Xiang, J., Gingras, A-C., Chen, X-W. y Ginsburg, D. (2018) 'The cargo receptor SURF4 promotes the efficient cellular secretion of PCSK9.', *eLife* 7, p. e38839. doi: 10.7554/eLife.38839.
- English, A. R. y Voeltz, G. K. (2013) 'Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles.', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(4), p. a013227. doi: 10.1101/cshperspect.a013227.
- Erra, M. C., Iodice, L., Lotti, L. V. y Bonatti, S. (1999) 'Cell fractionation analysis of human CD8 glycoprotein transport between endoplasmic reticulum, intermediate compartment and Golgi complex in tissue cultured cells.', *Cell biology international* 23(8), p. 571–577. doi: 10.1006/cbir.1999.0420.
- Farhan, H. y Rabouille, C. (2011) 'Signalling to and from the secretory pathway', *Journal of Cell Science* 124(Pt2), p. 171–180. doi: 10.1242/jcs.076455.
- Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A. y Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010) 'Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis.', *Electrophoresis* 31(21), p. 3573–3579. doi: 10.1002/elps.201000197.
- Fleig, L., Bergbold, N., Sahasrabudhe, P., Geiger, B., Kaltak, L. y Lemberg, M. K. (2012) 'Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins.', *Molecular cell* 47(4), p. 558–569. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.008.
- Foster, L. J., de Hoog, C. L., Zhang, Y. Y., Zhang, Y. Y., Xie, X., Mootha, V. K. y Mann, M. (2006) 'A Mammalian Organelle Map by Protein Correlation Profiling.', *Cell* 125(1), p. 187–199. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.022.
- Fregno, I. y Molinari, M. (2019) 'Proteasomal and lysosomal clearance of faulty secretory proteins: ER-associated degradation (ERAD) and ER-to-lysosome-associated degradation (ERLAD) pathways.', *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 54(2), p. 153–163. doi: 10.1080/10409238.2019.1610351.
- Fribley, A., Zhang, K. y Kaufman, R. J. (2009) 'Regulation of apoptosis by the unfolded protein response.', *Methods in molecular biology* 559, p. 191–204. doi: 10.1007/978-1-60327-017-5_14.

- Fricke, B., Heink, S., Steffen, J., Kloetzel, P-M. y Kruger, E. (2007) 'The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum.', *EMBO reports* 8(12), p. 1170–1175. doi: 10.1038/sj.embor.7401091.
- Fridmann-Sirkis, Y., Siniossoglou, S. y Pelham, H. R. B. (2004) 'TMF is a golgin that binds Rab6 and influences Golgi morphology.', *BMC cell biology* 5, p. 18. doi: 10.1186/1471-2121-5-18.
- Fujii, Y., Shiota, M., Ohkawa, Y., Baba, A., Wanibuchi, H., Kinashi, T., Kurosaki, T. y Baba, Y. (2012) 'Surf4 modulates STIM1-dependent calcium entry.', *Biochemical and biophysical research communications* 422(4), p. 615–620. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.037.
- Futatsumori, M., Kasai, K., Takatsu, H., Shin, H. W. y Nakayama, K. (2000) 'Identification and characterization of novel isoforms of COP I subunits.', *Journal of biochemistry* 128(5), p. 793–801. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022817.
- Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Reiken, S., Huang, F., Marx, S. O., Rosemlit, N. y Marks, A. R. (2001) 'FKBP12 binding modulates ryanodine receptor channel gating.', *The Journal of biological chemistry* 276(20), p. 16931–16935. doi: 10.1074/jbc.M100856200.
- Gai, X., Tang, B., Liu, F., Wu, Y., Wang, F., Jing, Y., Huang, F., Jin, D., Wang, L. y Zhang, H. (2019) 'mTOR/miR-145-regulated exosomal GOLM1 promotes hepatocellular carcinoma through augmented GSK-3beta/MMPs.', *Journal of genetics and genomics* 46(5), p. 235–245. doi: 10.1016/j.jgg.2019.03.013.
- Gao, D., Bambang, I. F., Putti, T. C., Lee, Y. K., Richardson, D. R. y Zhang, D. (2012) 'ERp29 induces breast cancer cell growth arrest and survival through modulation of activation of p38 and upregulation of ER stress protein p58IPK.', *Laboratory investigation* 92(2), p. 200–213. doi: 10.1038/labinvest.2011.163.
- Gawlitzeck, M., Ryll, T., Lofgren, J. y Sliwkowski, M. B. (2000) 'Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: Degradative versus biosynthetic mechanisms.', *Biotechnology and Bioengineering* 68(6), p. 637–646. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000620)68:6<637::AID-BIT6>3.0.CO;2-C.
- Gething, M.-J. (1999) 'Role and regulation of the ER chaperone BiP.', *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10(5), p. 465–472. doi: 10.1006/scdb.1999.0318.

- Gidalevitz, T., Stevens, F. y Argon, Y. (2013) 'Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones.', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833(11), p. 2410–2424. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.007.
- Gilchrist, A., Au, C. E., Hiding, J., Bell, A. W., Fernandez-Rodriguez, J., Lesimple, S., Nagaya, H., Roy, L., Gosline, S. J. C., Hallett, M., Paiement, J., Kearney, R. E., Nilsson, T. y Bergeron, J. J. M. (2006) 'Quantitative Proteomics Analysis of the Secretory Pathway.', *Cell* 127(6), p. 1265–1281. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.036.
- Goh, J. B. y Ng, S. K. (2018) 'Impact of host cell line choice on glycan profile.', *Critical Reviews in Biotechnology* 38(6), p. 851–867. doi: 10.1080/07388551.2017.1416577.
- Goldberg, A. L., Zhao, J. y Collins, G. A. (2015) 'Blocking Cancer Growth with Less POMP or Proteasomes.', *Molecular cell* 59(2), p. 143–145. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.005.
- Gonzalez, T. N., Leong, S. R. y Presta, L. G. (2000) 'Nucleic acids encoding humanized anti-IL-8 monoclonal antibodies.', United States. Available at: <https://patents.google.com/patent/US6025158A/en>.
- Gordon, D. E., Bond, L. M., Sahlender, D. A. y Peden, A. A. (2010) 'A targeted siRNA screen to identify SNAREs required for constitutive secretion in mammalian cells.', *Traffic* 11(9), p. 1191–1204. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01087.x.
- Graham, J. M. (2001) 'Isolation of Golgi membranes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation.', *Current protocols in cell biology* 10(1), p. 3.9.1-3.9.24. doi: 10.1002/0471143030.cb0309s10.
- Graham, J. M. (2002a) 'Preparation of crude subcellular fractions by differential centrifugation.', *TheScientificWorldJournal* 2, p. 1638–1642. doi: 10.1100/tsw.2002.851.
- Graham, J. M. (2002b) 'Fractionation of Golgi, endoplasmic reticulum, and plasma membrane from cultured cells in a preformed continuous iodixanol gradient.', *TheScientificWorldJournal* 2, p. 1435–1439. doi: 10.1100/tsw.2002.286.
- Graham, J. M. (2004) 'Isolation of Mitochondria from a Homogenate using a Sucrose Density Gradient.', *eLS*, p. 1–7. doi: 10.1038/npg.els.0003807.
- Graves, S., Piepho, H.-P. and with help from Sundar Dorai-Raj, L. S. (2015) 'multcompView: Visualizations of Paired Comparisons'. Available at: <https://cran.r-project.org/package=multcompView>.

Greene, M. W., Burrington, C. M., Ruhoff, M. S., Johnson, A. K., Chongkraitanakul, T. y Kangwanpornisiri, A. (2010) 'PKC δ is activated in a dietary model of steatohepatitis and regulates endoplasmic reticulum stress and cell death.', *The Journal of biological chemistry* 285(53), p. 42115–42129. doi: 10.1074/jbc.M110.168575.

Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E. y Simos, G. (2001) 'Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export.', *The Journal of cell biology* 153(4), p. 745–762. doi: 10.1083/jcb.153.4.745.

Guan, B., Chen, F., Su, S., Duan, Z., Chen, Y., Li, H. y Jin, J. (2016) 'Effects of co-overexpression of secretion helper factors on the secretion of a HSA fusion protein (IL2-HSA) in *Pichia pastoris*.', *Yeast* 33(11), p. 587–600. doi: 10.1002/yea.3183.

Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L. y Sotelo-Mundo, R. (2013) 'Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial.', *Biotecnia* XV(3), p. 9. doi: 10.18633/bt.v15i3.152.

Haddad, L., Babaeipour, V. y Mofid, M. R. (2015) 'The effect of cell disruption techniques and chaotropic agents on the downstream purification process of mecasermin produced as inclusion body in *E. coli*.', *Research in pharmaceutical sciences* 10(6), p. 553–561.

Hanai, A., Ohgi, M., Yagi, C., Ueda, T., Shin, H-W. y Nakayama, K. (2016) 'Class I Arfs (Arf1 and Arf3) and Arf6 are localized to the Flemming body and play important roles in cytokinesis.', *Journal of biochemistry* 159(2), p. 201–208. doi: 10.1093/jb/mvv088.

Hansson, K. y Stenflo, J. (2005) 'Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation.', *Journal of thrombosis and haemostasis* 3(12), p. 2633–2648. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01478.x.

Hao, R., Adoligbe, C., Jiang, B., Zhao, X., Gui, L., Qu, K., Wu, S. y Zan, L. (2015) 'An optimized trichloroacetic acid/acetone precipitation method for two-dimensional gel electrophoresis analysis of Qinchuan cattle longissimus dorsi muscle containing high proportion of marbling.', *PLoS One* 10(4), p. e0124723. doi: 10.1371/journal.pone.0124723.

Haredy, A. M., Nishizawa, A., Honda, K., Ohya, T., Ohtake, H. y Omasa, T. (2013) 'Improved antibody production in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression.', *Cytotechnology* 65(6), p. 993–1002. doi: 10.1007/s10616-013-9631-x.

Hasegawa, H., Wendling, J., He, F., Trilisky, E., Stevenson, R., Franey, H., Kinderman, F., Li, G., Piedmonte, D. M., Osslund, T., Shen, M. y Ketchum, R. R. (2011) 'In vivo crystallization of human IgG in the endoplasmic reticulum of engineered chinese hamster ovary (CHO) cells.', *Journal of Biological Chemistry* 286(22), p. 19917–19931. doi: 10.1074/jbc.M110.204362.

Hausmann, R., Chudobová, I., Spiegel, H. y Schillberg, S. (2018) 'Proteomic analysis of CHO cell lines producing high and low quantities of a recombinant antibody before and after selection with methotrexate.', *Journal of Biotechnology* 265, p. 65–69. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.11.008.

Heinrich, C., Wolf, T., Kropp, C., Northoff, S. y Noll, T. (2011) 'Growth characterization of CHO DP-12 cell lines with different high passage histories.', *BMC Proceedings* 5(Suppl 8), p. P29. doi: 10.1186/1753-6561-5-S8-P29.

Helm, J. R., Bentley, M., Thorsen, K. D., Wang, T., Foltz, L., Oorschot, V., Klumperman, J. y Hay, J. C. (2014) 'Apoptosis-linked gene-2 (ALG-2)/Sec31 interactions regulate endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport: a potential effector pathway for luminal calcium.', *The Journal of biological chemistry* 289(34), p. 23609–23628. doi: 10.1074/jbc.M114.561829.

Henry, M., Gallagher, C., Kelly, R. M., Frye, C. C., Osborne, M. D., Brady, C. P., Barron, N., Clynes, M. y Meleady, P. (2018) 'Clonal variation in productivity and proteolytic clipping of an Fc-fusion protein in CHO cells: Proteomic analysis suggests a role for defective protein folding and the UPR.', *Journal of Biotechnology* 281, p. 21–30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.05.018.

Hervieu, G. (1997) 'A quick and safe method for destaining Coomassie-Blue-stained protein gels.', *Technical Tips Online* 2(1), p. 94–96. doi: 10.1016/s1366-2120(08)70048-5.

Hesketh, J. E. y Pryme, I. F. (eds) (1996) *Cytoskeleton in Specialized Tissues and in Pathological States*. 1st edn. Elsevier Science. Available at: <https://www.elsevier.com/books/cytoskeleton-in-specialized-tissues-and-in-pathological-states/hesketh/978-1-55938-689-0>.

Hetz, C. y Papa, F. R. (2018) 'The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control.', *Molecular Cell* 69(2), p. 169–181. doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.

Hidaka, K., Kanematsu, T., Caffrey, J. J., Takeuchi, H., Shears, S. B. y Hirata, M. (2003) 'The importance to chondrocyte differentiation of changes in expression of the multiple inositol

polyphosphate phosphatase.', *Experimental cell research* 290(2), p. 254–264. doi: 10.1016/s0014-4827(03)00337-9.

Himmelsbach, K. y Hildt, E. (2018) 'Identification of various cell culture models for the study of Zika virus.', *World Journal of Virology* 7(1), p. 10–20. doi: 10.5501/wjv.v7.i1.10.

Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S-I., Hendil, K. B., Niwa, S-I., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K. y Murata, S. (2006) 'Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes.', *Molecular cell* 24(6), p. 977–984. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.015.

Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K. y Murata, S. (2005) 'A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes.', *Nature* 437(7063), p. 1381–1385. doi: 10.1038/nature04106.

Hirota, Y. y Tanaka, Y. (2009) 'A small GTPase, human Rab32, is required for the formation of autophagic vacuoles under basal conditions.', *Cellular and molecular life sciences* 66(17), p. 2913–2932. doi: 10.1007/s00018-009-0080-9.

Hmiel, L. K., Brorson, K. A. y Boyne, M. T. 2nd (2015) 'Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity.', *Analytical and bioanalytical chemistry* 407(1), p. 79–94. doi: 10.1007/s00216-014-8108-x.

Ho, R. (2013) *Proteomic Analysis of Chinese Hamster Ovary Cells Producing Glycosylated Monoclonal Antibodies*. MSc Thesis. University of Waterloo. Available at: <http://hdl.handle.net/10012/7622>.

Ho, S. C. L., Bardor, M., Feng, H., Mariati, Tong, Y. W., Song, Z., Yap, M. G. S. y Yang Y. (2012) 'IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines.', *Journal of Biotechnology* 157(1), p. 130–139. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.09.023.

Homrich, M., Wobst, H., Laurini, C., Sabrowski, J., Schmitz, B. y Diestel, S. (2014) 'Cytoplasmic domain of NCAM140 interacts with ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme-1 (Ufc1).', *Experimental cell research* 324(2), p. 192–199. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.003.

Hong, J. K., Cho, S. M. y Yoon, S. K. (2010) 'Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells.', *Applied microbiology and biotechnology* 88(4), p. 869–876. doi: 10.1007/s00253-010-2790-1.

- Hong, W. (2005) 'SNAREs and traffic.', *Biochimica et biophysica acta* 1744(3), p. 493–517. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.03.014.
- Hou, J., Tyo, K., Liu, Z., Petranovic, D. y Nielsen, J. (2012) 'Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Metabolic engineering* 14(2), p. 120–127. doi: 10.1016/j.ymben.2012.01.002.
- Hou, N., Yang, Y., Scott, I. C. y Lou, X. (2017) 'The Sec domain protein Scfd1 facilitates trafficking of ECM components during chondrogenesis.', *Developmental biology* 421(1), p. 8–15. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.11.010.
- Hsu, V. W. y Yang, J.-S. (2009) 'Mechanisms of COPI vesicle formation.', *FEBS Letters* 583(23), p. 3758–3763. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.056.
- Hu, S., Zang, R., Wang, Y., Liang, Y., Mu, J., Zhang, Y. y Ma, J. (2019) 'Highly expressed microRNA-124 inhibits migration and promotes apoptosis of esophageal cancer cells by degrading PDCD6.', *Journal of the Balkan Union of Oncology* 24(2), p. 805–812.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. y Lempicki, R. A. (2009) 'Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.', *Nature protocols* 4(1), p. 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- Huang, H. M., Fowler, C., Zhang, H. y Gibson, G. E. (2004) 'Mitochondrial Heterogeneity Within and between Different Cell Types.', *Neurochemical Research* 29(3), p. 651–658. doi: 10.1023/B:NERE.0000014835.34495.9c.
- Huber, L. A., Pfaller, K. y Vietor, I. (2003) 'Organelle proteomics: Implications for subcellular fractionation in proteomics.', *Circulation Research* 92(9), p. 962–968. doi: 10.1161/01.RES.0000071748.48338.25.
- Hwang, S. O., Boswell, S. A., Seo, J.-S. y Lee, S. W. (2008) 'Novel oxidative stress-responsive gene ERS25 functions as a regulator of the heat-shock and cell death response.', *The Journal of biological chemistry* 283(19), p. 13063–13069. doi: 10.1074/jbc.M709656200.
- Imamoto, Y., Tanaka, H., Takahashi, K., Konno, Y. y Suzawa, T. (2013) 'Advantages of AlaGln as an Additive to Cell Culture Medium: Use with Anti CD20 Chimeric Antibody-Producing POTELLIGENT™ CHO Cell Lines.', *Cytotechnology* 65(1), p. 135-143. doi:10.1007/s10616-012-9468-8.

Ingham, K. C. (1984) 'Protein Precipitation with Polyethylene Glycol', in Jakoby, W. B. (ed.) *Part C: Enzyme Purification and Related Techniques*. Academic Press, p. 351–356. doi: 10.1016/S0076-6879(84)04101-X.

Inoue, H., Baba, T., Sato, S., Ohtsuki, R., Takemori, A., Watanabe, T., Tagaya, M. y Tani, K. (2012) 'Roles of SAM and DDHD domains in mammalian intracellular phospholipase A1 KIAA0725p.', *Biochimica et biophysica acta* 1823(4), p. 930–939. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.002.

Ishikawa, Y. y Bachinger, H. P. (2014) 'A substrate preference for the rough endoplasmic reticulum resident protein FKBP22 during collagen biosynthesis.', *The Journal of biological chemistry* 289(26), p. 18189–18201. doi: 10.1074/jbc.M114.561944.

Ishikawa, Y., Mizuno, K. y Bachinger, H. P. (2017) 'Ziploc-ing the structure 2.0: Endoplasmic reticulum-resident peptidyl prolyl isomerases show different activities toward hydroxyproline.', *The Journal of biological chemistry* 292(22), p. 9273–9282. doi: 10.1074/jbc.M116.772657.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C. y Mizushima, N. (2012) 'The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes.', *Cell* 151(6), p. 1256–1269. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.001.

Ivaska, J., Pallari, H-M., Nevo, J., Eriksson, J. E. (2007) 'Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling.', *Experimental cell research* 313(10), p. 2050–2062. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.040.

Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K. I., Hironaka, I., Kamata, Y., Takada, K. y Mizunoe, Y. A. (2013) 'A simple assay for measuring catalase activity: A visual approach', *Scientific Reports* 3, p. 3081. doi: 10.1038/srep03081.

Jacobs, D.I., Rijssen, MS van., Heijden R, van der. y Verpoorte, R. (2001) 'Sequential solubilization of proteins precipitated with trichloroacetic acid in acetone from cultured *Catharanthus roseus* cells yields 52% more spots after two-dimensional electrophoresis.', *Proteomics* 1(11), p. 1345–1350. doi: 10.1002/1615-9861(200111)1:11<1345::AID-PROT1345>3.0.CO;2-F.

Jacquemyn, J., Cascalho, A. y Goodchild, R. E. (2017) 'The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis.', *EMBO reports* 18(11), p. 1905–1921. doi: 10.15252/embr.201643426.

- Jadhav, B., McKenna, M., Johnson, N., High, S., Sinning, I. y Pool, M. R. (2015) 'Mammalian SRP receptor switches the Sec61 translocase from Sec62 to SRP-dependent translocation.', *Nature communications* 6, p. 10133. doi: 10.1038/ncomms10133.
- Jardon, M. A., Satttha, B., Braasch, K., Leung, A. O., Côté, H. C. F., Butler, M., Gorski, S. M. y Piret, J. M. (2012) 'Inhibition of Glutamine Dependent Autophagy Increases t-PA Production in CHO Cell Fed Batch Processes.', *Biotechnology and Bioengineering* 109(5), p. 1228-1238. doi: 10.1002/bit.24393.
- Jiang, L., He, L. y Fountoulakis, M. (2004) 'Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis.', *Journal of Chromatography A* 1023(2), p. 317–320. doi: 10.1016/j.chroma.2003.10.029.
- Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T. y Mizushima, N. (2014) 'The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17.', *Molecular biology of the cell* 25(8), p. 1327–1337. doi: 10.1091/mbc.E13-08-0447.
- Jimenez, S. A., Gaidarova, S., Saitta, B., Sandorfi, N., Herrich, D. J., Rosenbloom, J. C., Kucich, U., Abrams, W. R. y Rosenbloom, J. (2001) 'Role of protein kinase C-delta in the regulation of collagen gene expression in scleroderma fibroblasts.', *The Journal of clinical investigation* 108(9), p. 1395–1403. doi: 10.1172/JCI12347.
- Jin, L., Alesi, G. N. y Kang, S. (2016) 'Glutaminolysis as a target for cancer therapy.', *Oncogene* 35(28), p. 3619–3625. doi: 10.1038/onc.2015.447.
- Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J. S. y Schuldiner, M. (2009) 'Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum.', *Science* 323(5922), p. 1693–1697. doi: 10.1126/science.1167983.
- Joshi, A. S., Zhang, H. y Prinz, W. A. (2017) 'Organelle biogenesis in the endoplasmic reticulum.', *Nature cell biology* 19(8), p. 876–882. doi: 10.1038/ncb3579.
- Kabir, M. F., Kim, H.-R. y Chae, H.-J. (2018) 'Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy.', in Català, A. (ed.) *Endoplasmic Reticulum*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.81381.
- Kanadome, T., Shibata, H., Kuwata, K., Takahara, T. y Maki, M. (2017) 'The calcium-binding protein ALG-2 promotes endoplasmic reticulum exit site localization and polymerization of Trk-fused gene (TFG) protein.', *The FEBS journal* p. 56–76. doi: 10.1111/febs.13949.

- Kanehisa, M., Sato, Y. y Morishima, K. (2016) 'BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences.', *Journal of Molecular Biology* 428(4), p. 726–731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006.
- Kang, S., Ren, D., Xiao, G., Daris, K., Buck, L., Enyenihi, A. A., Zubarev, R., Bondarenko, P. V. y Deshpande, R. (2014) 'Cell line profiling to improve monoclonal antibody production.', *Biotechnology and Bioengineering* 111(4), p. 748–760. doi: 10.1002/bit.25141.
- Katayama, K., Kuriki, M., Kamiya, T., Tochigi, Y., Suzuki, H. (2018) 'Giantin is required for coordinated production of aggrecan, link protein and type XI collagen during chondrogenesis.', *Biochemical and biophysical research communications* 499(3), p. 459–465. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.163.
- Kaushik, P., Henry, M., Clynes, M. y Meleady, P. (2018) 'The Expression Pattern of the Phosphoproteome Is Significantly Changed During the Growth Phases of Recombinant CHO Cell Culture.', *Biotechnology Journal* 13(10), p. e1700221. doi: 10.1002/biot.201700221.
- Kidd, M. E., Shumaker, D. K. y Ridge, K. M. (2014) 'The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer.', *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50(1), p. 1–6. doi: 10.1165/rcmb.2013-0314TR.
- Kilaparty, S. P., Agarwal, R., Singh, P., Kannan, K. y Ali, N. (2016) 'Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis accompanies enhanced expression of multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 (Minpp1): a possible role for Minpp1 in cellular stress response.', *Cell stress & chaperones* 21(4), p. 593–608. doi: 10.1007/s12192-016-0684-6.
- Kim, J. H., Kim, Y. H., Kim, M. R. y Kim, S-C. (2011) 'Clinical efficacy of different doses of rituximab in the treatment of pemphigus: a retrospective study of 27 patients.', *The British journal of dermatology* 165(3), p. 646–651. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10411.x.
- Kim, J. J., Lipatova, Z. y Segev, N. (2016) 'TRAPP Complexes in Secretion and Autophagy.', *Frontiers in cell and developmental biology* 4, p. 20. doi: 10.3389/fcell.2016.00020.
- Kim, J. Y., Kim, Y. G. y Lee, G. M. (2012) 'Differential in-gel electrophoresis (DIGE) analysis of CHO cells under hyperosmotic pressure: Osmoprotective effect of glycine betaine addition.', *Biotechnology and Bioengineering* 109(6), p. 1395–1403. doi: 10.1002/bit.24442.
- Kim, S. H. y Lee, G. M. (2007) 'Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44).', *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, p. 659–665. doi: 10.1007/s00253-007-1041-6.

- Kim, Y. J., Baek, E., Lee, J. S. y Lee, G. M. (2013) 'Autophagy and Its Implication in Chinese Hamster Ovary Cell Culture', *Biotechnology Letters* 35(11), p. 1753-1763. doi: 10.1007/s10529-1254-013-1276-5.
- Klausing, S., Krämer, O. y Noll, T. (2013) 'Enhancing cell growth and antibody production in CHO cells by siRNA knockdown of novel target genes.', *BMC Proceedings* 7(Suppl 6), p. P92. doi: 10.1186/1753-6561-7-S6-P92.
- Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T. y Tanaka, K. (2004) 'A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier.', *The EMBO journal* 23(9), p. 1977–1986. doi: 10.1038/sj.emboj.7600205.
- Konakovsky, V., Clemens, C., Müller, M., Bechmann, J., Berger, M., Schlatter, S. y Herwig, C. (2016) 'Metabolic Control in Mammalian Fed-Batch Cell Cultures for Reduced Lactic Acid Accumulation and Improved Process Robustness.', *Bioengineering* 3(1), p. 5. doi: 10.3390/bioengineering3010005.
- Kondo, Y., Hanai, A., Nakai, W., Katoh, Y., Nakayama, K. y Shin, H-W. (2012) 'ARF1 and ARF3 are required for the integrity of recycling endosomes and the recycling pathway.', *Cell structure and function* 37(2), p. 141–154. doi: 10.1247/csf.12015.
- Koontz, L. (2014) 'Chapter One – TCA Precipitation', in Lorsch, J. (ed.) *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*. Academic Press, p. 3–10. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00001-X.
- Kosodo, Y., Noda, Y., Adachi, H. y Yoda, K. (2002) 'Binding of Sly1 to Sed5 enhances formation of the yeast early Golgi SNARE complex.', *Journal of cell science* 115(Pt 18), p. 3683–3691. doi: 10.1242/jcs.00027.
- Kosodo, Y., Noda, Y., Adachi, H. y Yoda, K. (2003) 'Cooperation of Sly1/SM-family protein and sec18/NSF of *Saccharomyces cerevisiae* in disassembly of cis-SNARE membrane-protein complexes.', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67(2), p. 448–450. doi: 10.1271/bbb.67.448.
- Köttgen, M., Benzing, T., Simmen, T., Tauber, R., Buchholz, B., Feliciangeli, S., Huber, T. B., Schermer, B., Kramer-Zucker, A., Höpker, K., Simmen, K. C., Tschucke, C. C., Sandford, R., Kim, E., Thomas, G. y Walz, G. (2005) 'Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation.', *The EMBO journal* 24(4), p. 705–716. doi: 10.1038/sj.emboj.7600566.

- Krahn, N., Spearman, M., Meier, M., Dorion-Thibaudeau, J., McDougall, M., Patel, T. R., De Crescenzo, G., Durocher, Y., Stetefeld, J. y Butler, M. (2017) 'Inhibition of glycosylation on a camelid antibody uniquely affects its FcγRI binding activity.', *European journal of pharmaceutical sciences* 96, p. 428–439. doi: 10.1016/j.ejps.2016.09.040.
- Kuai, J., Boman, A. L., Arnold, R. S., Zhu, X. y Kahn, R. A. (2000) 'Effects of activated ADP-ribosylation factors on Golgi morphology require neither activation of phospholipase D1 nor recruitment of coatamer.', *The Journal of biological chemistry* 275(6), p. 4022–4032. doi: 10.1074/jbc.275.6.4022.
- la Cour, J. M., Schindler, A. J., Berchtold, M. W. y Schekman, R. (2013) 'ALG-2 attenuates COPII budding in vitro and stabilizes the Sec23/Sec31A complex.', *PLoS One* 8(9), p. e75309. doi: 10.1371/journal.pone.0075309.
- Lai, S., Li, Y., Kuang, Y., Cui, H., Yang, Y., Sun, W., Liu, K., Chen, D., Yan, Q. y Wen, L. (2017) 'PKCδ silencing alleviates saturated fatty acid induced ER stress by enhancing SERCA activity.', *Bioscience reports* 37(6), p. BSR20170869. doi: 10.1042/BSR20170869.
- Lakshmanan, M., Kok, Y. J., Lee, A. P., Kyriakopoulos, S., Lim, H. L., Teo, G., Poh, S. L., Tang, W. Q., Hong, J., Tan, A. H-M., Bi, X., Ho, Y. S., Zhang, P., Ng, S. K. y Lee, D-Y. (2019) 'Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits.', *Biotechnology and bioengineering* 116(9), p. 2117–2129. doi: 10.1002/bit.27014.
- Lao, M. S. y Toth, D. (1997) 'Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture.', *Biotechnology progress* 13(5), p. 688–691. doi: 10.1021/bp9602360.
- Larroque-Cardoso, P., Swiader, A., Ingueneau, C., Nègre-Salvayre, A., Elbaz, M., Reyland, M. E., Salvayre, R. y Vindis, C. (2013) 'Role of protein kinase C δ in ER stress and apoptosis induced by oxidized LDL in human vascular smooth muscle cells', *Cell Death & Disease* 4, p. e520. doi: 10.1038/cddis.2013.47.
- Laufman, O., Kedan, A., Hong, W., Lev, S. (2009) 'Direct interaction between the COG complex and the SM protein, Sly1, is required for Golgi SNARE pairing.', *The EMBO journal* 28(14), p. 2006–2017. doi: 10.1038/emboj.2009.168.
- Lavoie, C., Lanoix, J., Kan, F. W. y Paiement, J. (1996) 'Cell-free assembly of rough and smooth endoplasmic reticulum.', *Journal of Cell Science* 109(Pt 6), p. 1415–1425.

- Lazar, C. (2015) 'imputeLCMD: A collection of methods for left-censored missing data imputation'. Available at: <https://cran.r-project.org/package=imputeLCMD>.
- Le Fourn, V., Girod, P. A., Buceta, M., Regamey, A. y Mermod, N. (2014) 'CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion.', *Metabolic Engineering* 21, p. 91–102. doi: 10.1016/j.ymben.2012.12.003.
- Le, H., Kabbur, S., Pollastrini, L., Sun, Z., Mills, K., Johnson, K., Karypis, G. y Hu, W-S. (2012) 'Multivariate analysis of cell culture bioprocess data--lactate consumption as process indicator.', *Journal of biotechnology* 162(2–3), p. 210–223. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.021.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N. y Glimcher, L. H. (2003) 'XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response.', *Molecular and cellular biology* 23(21), p. 7448–7459. doi: 10.1128/mcb.23.21.7448-7459.2003.
- Lee, J. S., Ha, T. K., Park, J. H. y Lee, G. M. (2013) 'Anti-Cell Death Engineering of CHO Cells: Co-Overexpression of Bcl-2 for Apoptosis Inhibition, Beclin-1 for Autophagy Induction.', *Biotechnology and Bioengineering* 110 (8), p. 2195-2207. doi: 10.1002/bit.24879.
- Lee, Y. H., Tan, H. T. y Chung, M. C. M. (2010) 'Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics.', *Proteomics* 10(22), p. 3935–3956. doi: 10.1002/pmic.201000289.
- Lengfeld, J., Wang, Q., Zohlman, A., Salvarezza, S., Morgan, S., Ren, J., Kato, K., Rodriguez-Boulan, E. y Liu, B. (2012) 'Protein kinase C delta regulates the release of collagen type I from vascular smooth muscle cells via regulation of Cdc42.', *Molecular biology of the cell* 23(10), p. 1955–1963. doi: 10.1091/mbc.E11-06-0531.
- Lev, S., Hernandez, J., Martinez, R., Chen, A., Plowman, G. y Schlessinger, J. (1999) 'Identification of a novel family of targets of PYK2 related to Drosophila retinal degeneration B (rdgB) protein.', *Molecular and cellular biology* 19(3), p. 2278–2288. doi: 10.1128/mcb.19.3.2278.
- Li, Q., Wang, J., Wan, Y. y Chen, D. (2016) 'Depletion of Rab32 decreases intracellular lipid accumulation and induces lipolysis through enhancing ATGL expression in hepatocytes.', *Biochemical and biophysical research communications* 471(4), p. 492–496. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.047.
- Li, R. M., Nai, M. M., Duan, S. J., Li, S. X., Yin, B. N., An, F., Zhai, Y. Q., Liu, J., Chu, Y. R., Yu, Y. y Song, W. Y. (2018) 'Down-expression of GOLM1 enhances the chemo-sensitivity of

cervical cancer to methotrexate through modulation of the MMP13/EMT axis.', *American journal of cancer research* 8(6), p. 964–980.

Li, Y., Gallwitz, D. y Peng, R. (2005) 'Structure-based functional analysis reveals a role for the SM protein Sly1p in retrograde transport to the endoplasmic reticulum.', *Molecular biology of the cell* 16(9), p. 3951–3962. doi: 10.1091/mbc.e05-02-0114.

Liggett, A., Crawford, L. J., Walker, B., Morris, T. C. M., e Irvine, A. E. (2010) 'Methods for measuring proteasome activity: current limitations and future developments.', *Leukemia Research* 34(11), p. 1403–9. doi: 10.1016/j.leukres.2010.07.003.

Lim, Y., Mantalaris, A., Yap, M. G. S. y Wong, D. C. F. (2010) 'Simultaneous targeting of Requiem & Alg-2 in Chinese hamster ovary cells for improved recombinant protein production.', *Molecular biotechnology* 46(3), p. 301–307. doi: 10.1007/s12033-010-9304-3.

Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H. y Lev, S. (2005) 'Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function.', *Nature cell biology* 7(3), p. 225–234. doi: 10.1038/ncb1221.

Liu, Y., Zhang, X., Zhou, S., Shi, J., Xu, Y., He, J., Lin, F., Wei, A., Zhou, L. y Chen, Z. (2019) 'Knockdown of Golgi phosphoprotein 73 blocks the trafficking of matrix metalloproteinase-2 in hepatocellular carcinoma cells and inhibits cell invasion.', *Journal of cellular and molecular medicine* 23(4), p. 2399–2409. doi: 10.1111/jcmm.14055.

Lobingier, B. T., Nickerson, D. P., Lo, S-Y. y Merz, A. J. (2014) 'SM proteins Sly1 and Vps33 co-assemble with Sec17 and SNARE complexes to oppose SNARE disassembly by Sec18.', *eLife* 3, p. e02272. doi: 10.7554/eLife.02272.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. (2000) 'Overview of the Secretory Pathway', in *Molecular Cell Biology*. 4th edn. New York: W. H. Freeman. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21471/>.

Lopez-Mediavilla, C., Orfao, A., Gonzalez, M. y Medina, J. M. (1989) 'Identification by flow cytometry of two distinct rhodamine-123-stained mitochondrial populations in rat liver.', *FEBS Letters* 254(1–2), p. 115–120. doi: 10.1016/0014-5793(89)81020-8.

Luft, J. H. (1961) 'Improvements in epoxy resin embedding methods.', *The Journal of Cell Biology* 9, p. 409–414. doi: 10.1083/jcb.9.2.409.

- Luo, W., Gong, X. y Chang, A. (2002) 'An ER membrane protein, Sop4, facilitates ER export of the yeast plasma membrane [H⁺] ATPase, Pma1.', *Traffic* 3(10), p. 730–739. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.31005.x.
- Mahmoud, K. (2007) 'Recombinant Protein Production: Strategic Technology and a Vital Research Tool.', *Research Journal of Cell and Molecular Biology* 1(1), p. 9–22.
- Malsam, J., Satoh, A., Pelletier, L. y Warren, G. (2005) 'Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles.', *Science* 307(5712), p. 1095–1098. doi: 10.1126/science.1108061.
- Manadas, B. J., Vougas, K., Fountoulakis, M. y Duarte, C. B. (2006) 'Sample sonication after trichloroacetic acid precipitation increases protein recovery from cultured hippocampal neurons, and improves resolution and reproducibility in two-dimensional gel electrophoresis.', *Electrophoresis* 27(9), p. 1825–1831. doi: 10.1002/elps.200500757.
- Mandon, E. C., Jiang, Y. y Gilmore, R. (2003) 'Dual recognition of the ribosome and the signal recognition particle by the SRP receptor during protein targeting to the endoplasmic reticulum.', *The Journal of cell biology* 162(4), p. 575–585. doi: 10.1083/jcb.200303143.
- Manolea, F., Chun, J., Chen, D. W., Clarke, I., Summerfeldt, N., Dacks, J. B. y Melancon, P. (2010) 'Arf3 is activated uniquely at the trans-Golgi network by brefeldin A-inhibited guanine nucleotide exchange factors.', *Molecular biology of the cell* 21(11), p. 1836–1849. doi: 10.1091/mbc.e10-01-0016.
- McCaughey, J., Miller, V. J., Stevenson, N. L., Brown, A. K., Budnik, A., Heesom, K. J., Alibhai, D. y Stephens, D. J. (2016) 'TFG Promotes Organization of Transitional ER and Efficient Collagen Secretion.', *Cell reports* 15(8), p. 1648–1659. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.062.
- Mechin, V., Damerval, C. y Zivy, M. (2007) 'Total protein extraction with TCA-acetone.', *Methods in molecular biology* 355, p. 1–8. doi: 10.1385/1-59745-227-0:1.
- Meleady, P., Doolan, P., Henry, M., Barron, N., Keenan, J., O'Sullivan, F., Clarke, C., Gammell, P., Melville, M. W., Leonard, M. y 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 Biotechnology* 11, p. 78. doi: 10.1186/1472-6750-11-78.
- Meleady, P., Henry, M., Gammell, P., Doolan, P., Sinacore, M., Melville, M., Francullo, L., Leonard, M., Charlebois, T. y Clynes, M. (2008) 'Proteomic profiling of CHO cells with

enhanced rhBMP-2 productivity following co-expression of PACEsol.', *Proteomics* 8, p. 2611–2624. doi: 10.1002/pmic.200700854.

Melville, M. W., Tan, S. L., Wambach, M., Song, J., Morimoto, R. I. y Katze, M. G. (1999) 'The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity.', *The Journal of biological chemistry* 274(6), p. 3797–3803. doi: 10.1074/jbc.274.6.3797.

Menko, A. S., Bleaken, B. M., Libowitz, A. A., Zhang, L., Stepp, M. A. y Walker, J. L. (2014) 'A central role for vimentin in regulating repair function during healing of the lens epithelium.', *Molecular biology of the cell* 25(6), p. 776–790. doi: 10.1091/mbc.E12-12-0900.

Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Ebert, D., Mills, C., Guo, X. y Thomas, P. D. (2019) 'Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0).', *Nature Protocols* 14(3), p. 703–721. doi: 10.1038/s41596-019-0128-8.

Michelsen, U. y von Hagen, J. (2009) 'Isolation of Subcellular Organelles and Structures.', in Burgess, R. R. and Deutscher, M. P. (eds) *Guide to Protein Purification, Second Edition*. Academic Press, p. 305–328. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63019-6.

Miller, V. J., Sharma, P., Kudlyk, T. A., Frost, L., Rofe, A. P., Watson, I. J., Duden, R., Lowe, M., Lupashin, V. V. y Ungar, D. (2013) 'Molecular insights into vesicle tethering at the Golgi by the conserved oligomeric Golgi (COG) complex and the golgin TATA element modulatory factor (TMF).', *The Journal of biological chemistry* 288(6), p. 4229–4240. doi: 10.1074/jbc.M112.426767.

Moelleken, J., Malsam, J., Betts, M. J., Movafeghi, A., Reckmann, I., Meissner, I., Hellwig, A., Russell, R. B., Söllner, T., Brügger, B. y Wieland, F. T. (2007) 'Differential localization of coatamer complex isoforms within the Golgi apparatus.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(11), p. 4425–4430. doi: 10.1073/pnas.0611360104.

Mohanty, D., Ghosh, K., Shetty, S., Spreafico, M., Garagiola, I. y Peyvandi, F. (2005) 'Mutations in the MCFD2 gene and a novel mutation in the LMAN1 gene in Indian families with combined deficiency of factor V and VIII.', *American journal of hematology* 79(4), p. 262–266. doi: 10.1002/ajh.20397.

Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson,

N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D. y Groop, L. C. (2003) 'PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.', *Nature Genetics* 34(3), p. 267–273. doi: 10.1038/ng1180.

Morand, J. N. y Kent, C. (1986) 'A one-step technique for the subcellular fractionation of total cell homogenates.', *Analytical biochemistry* 159(1), p. 157–162. doi: 10.1016/0003-2697(86)90321-0.

Morikawa, R. K., Aoki, J., Kano, F., Murata, M., Yamamoto, A., Tsujimoto, M. y Arai, H. (2009) 'Intracellular phospholipase A1gamma (iPLA1gamma) is a novel factor involved in coat protein complex I- and Rab6-independent retrograde transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex.', *The Journal of biological chemistry* 284(39), p. 26620–26630. doi: 10.1074/jbc.M109.038869.

Muppirala, M., Gupta, V. y Swarup, G. (2011) 'Syntaxin 17 cycles between the ER and ERGIC and is required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi.', *Biology of the cell* 103(7), p. 333–350. doi: 10.1042/BC20110006.

Nagasawa, M., Kanzaki, M., Iino, Y., Morishita, Y. y Kojima, I. (2001) 'Identification of a novel chloride channel expressed in the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and nucleus.', *The Journal of biological chemistry* 276(23), p. 20413–20418. doi: 10.1074/jbc.M100366200.

Nahorski, M. S., Maddirevula, S., Ishimura, R., Alsahli, S., Brady, A. F., Begemann, A., Mizushima, T., Guzmán-Vega, F. J., Obata, M., Ichimura, Y., Alsaif, H. S., Anazi, S., Ibrahim, N., Abdulwahab, F., Hashem, M., Monies, D., Abouelhoda, M., Meyer, B. F., Alfadhel, M., Eyaid, W., Zweier, M., Steindl, K., Rauch, A., Arold, S. T., Woods, C. G., Komatsu, M. y Alkuraya, F. S. (2018) 'Biallelic UFM1 and UFC1 mutations expand the essential role of ufmylation in brain development.', *Brain* 141(7), p. 1934–1945. doi: 10.1093/brain/awy135.

Nakajima, K., Sonoda, H., Mizoguchi, T., Aoki, J., Arai, H., Nagahama, M., Tagaya, M. y Tani, K. (2002) 'A novel phospholipase A1 with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein, p125.', *The Journal of biological chemistry* 277(13), p. 11329–11335. doi: 10.1074/jbc.M111092200.

Nandakumar, M. P., Shen, J., Raman, B. y Marten, M. R. (2003) 'Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis.', *Journal of Proteome Research* 2(1), p. 89–93. doi: 10.1021/pr025541x.

- Nasseri, S. S., Ghaffari, N., Braasch, K., Jardon, M. A., Butler, M., Kennard, M., Gopaluni, B. y Piret, J. M. (2014) 'Increased CHO Cell Fed-Batch Monoclonal Antibody Production Using the Autophagy Inhibitor 3-MA or Gradually Increasing Osmolality.', *Biochemical Engineering Journal* 91, p. 37-45. doi: 10.1016/j.bej.2014.06.027.
- Nejadi, N., Masti, S. M. y Tavirani, M. R. (2014) 'Comparison of three routine protein precipitation methods: acetone, TCA/acetone wash and TCA/acetone.', *Journal of Paramedical Sciences* 5(4), p. 58-60. doi: 10.22037/jps.v5i4.7699.
- Ng, M. M., Dippold, H. C., Buschman, M. D., Noakes, C. J. y Field, S. J. (2013) 'GOLPH3L antagonizes GOLPH3 to determine Golgi morphology.', *Molecular biology of the cell* 24(6), p. 796–808. doi: 10.1091/mbc.E12-07-0525.
- Nigam, S. K., Jin, Y. J., Jin, M. J., Bush, K. T., Bierer, B. E. y Burakoff, S. J. (1993) 'Localization of the FK506-binding protein, FKBP-13, to the lumen of the endoplasmic reticulum.', *The Biochemical journal* 294 (Pt 2), p. 511–515. doi: 10.1042/bj2940511.
- Nissom, P. M., Sanny, A., Kok, Y. J., Hiang, Y. T., Chuah, S. H., Shing, T. K., Lee, Y. Y., Wong, K. T. M., Hu, W. S., Sim, M. Y. G. y Philp, R. (2006) 'Transcriptome and proteome profiling to understanding the biology of high productivity CHO cells.', *Molecular Biotechnology* 34(2), p. 125–140. doi: 10.1385/MB:34:2:125.
- Nixdorf, R., Schmidt, J., Karger, A. y Mettenleiter, T. C. (1999) 'Infection of Chinese hamster ovary cells by pseudorabies virus.', *Journal of virology* 73(10), p. 8019–8026. doi: 10.1128/JVI.73.10.8019-8026.1999.
- Ogg, S. C., Poritz, M. A. y Walter, P. (1992) 'Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Molecular biology of the cell* 3(8), p. 895–911. doi: 10.1091/mbc.3.8.895.
- Orellana, C. A., Marcellin, E., Schulz, B. L., Nouwens, A. S., Gray, P. P. y Nielsen, L. K. (2015) 'High-antibody-producing chinese hamster ovary cells up-regulate intracellular protein transport and glutathione synthesis.', *Journal of Proteome Research* 14, p. 609–618. doi: 10.1021/pr501027c.
- Orlova, N. A., Kovnir, S. V., Vorobiev II y Gabibov, A. G. (2012) 'Coagulation Factor IX for Hemophilia B Therapy.', *Acta naturae* 4(2), p. 62–73.

- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. y Ramirez, O. T. (2004) 'Production of recombinant proteins: challenges and solutions.', *Methods in molecular biology* 267, p. 15–52. doi: 10.1385/1-59259-774-2:015.
- Pan, X., Alsayyari, A. A., Dalm, C., Hageman, J. A., Wijffels, R. H. y Martens, D. E. (2019) 'Transcriptome Analysis of CHO Cell Size Increase During a Fed-Batch Process.', *Biotechnology Journal* 14(3), p. e1800156. doi: 10.1002/biot.201800156.
- Pan, X., Streefland, M., Dalm, C., Wijffels, R. H. y Martens, D. E. (2017a) 'Selection of chemically defined media for CHO cell fed-batch culture processes.', *Cytotechnology* 69(1), p. 39–56. doi: 10.1007/s10616-016-0036-5.
- Pan, X., Dalm, C., Wijffels, R. H. y Martens, D. E. (2017b) 'Metabolic characterization of a CHO cell size increase phase in fed-batch cultures.', *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(22), p. 8101–8113. doi: 10.1007/s00253-017-8531-y.
- Park, S. Y. y Guo, X. (2014) 'Adaptor protein complexes and intracellular transport.', *Bioscience reports* 34(4), p. e00123. doi: 10.1042/BSR20140069.
- Paschkowsky, S., Hamze, M., Oestereich, F. y Munter, L. M. (2016) 'Alternative Processing of the Amyloid Precursor Protein Family by Rhomboid Protease RHBDL4.', *The Journal of biological chemistry* 291(42), p. 21903–21912. doi: 10.1074/jbc.M116.753582.
- Paschkowsky, S., Recinto, S. J., Young, J. C., Bondar, A. N. y Munter, L. M. (2018) 'Membrane cholesterol as regulator of human rhomboid protease RHBDL4.', *Journal of Biological Chemistry* 293(40), p. 15556 –15568. doi: 10.1074/jbc.RA118.002640.
- Pasquali, C., Fialka, I. y Huber, L. A. (1999) 'Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles.', *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722(1–2), p. 89–102. doi: 10.1016/S0378-4347(98)00314-4.
- Paulo, J. A., Gaun, A., Kadiyala, V., Ghoulidi, A., Banks, P. A., Conwell, D. L. y Steen, H. (2013) 'Subcellular fractionation enhances proteome coverage of pancreatic duct cells.', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1834(4), p. 791–797. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.011.
- Peng, F., Zhan, X., Li, M-Y., Fang, F., Li, G., Li, C., Zhang, P-F. y Chen, Z. (2012) 'Proteomic and Bioinformatics Analyses of Mouse Liver Microsomes.', *International Journal of Proteomics* 2012, p. 832569. doi: 10.1155/2012/832569.

- Peng, R. W. y Fussenegger, M. (2009) 'Molecular engineering of exocytic vesicle traffic enhances the productivity of chinese hamster ovary cells.', *Biotechnology and Bioengineering* 102(4), p. 1170–1181. doi: 10.1002/bit.22141.
- Peng, R. W., Guetg, C., Tigges, M. y Fussenegger, M. (2010) 'The vesicle-trafficking protein munc18b increases the secretory capacity of mammalian cells.', *Metabolic Engineering* 12, p. 18–25. doi: 10.1016/j.ymben.2009.08.007.
- Peng, R. y Gallwitz, D. (2002) 'Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes.', *The Journal of cell biology* 157(4), p. 645–655. doi: 10.1083/jcb.200202006.
- Peretti, D., Dahan, N., Shimoni, E., Hirschberg, K. y Lev, S. (2008) 'Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport.', *Molecular biology of the cell* 19(9), p. 3871–3884. doi: 10.1091/mbc.e08-05-0498.
- Pérez-Rodríguez, S., Ramírez-Lira, M-J., Trujillo-Roldán, M. A. y Valdez-Cruz, N. A. (2020a) 'Nutrient supplementation strategy improves cell concentration and longevity, monoclonal antibody production and lactate metabolism of Chinese hamster ovary cells.', *Bioengineered* 11(1), p. 463–471. doi: 10.1080/21655979.2020.1744266.
- Pérez-Rodríguez, S., Ramírez-Lira, M-J., Wulff, T., Voldbor, B. G., Ramírez, O. T., Trujillo-Roldán, M. A. y Valdez-Cruz, N. A. (2020b) 'Enrichment of microsomes from Chinese hamster ovary cells by subcellular fractionation for its use in proteomic analysis.', *PLoS One* 15(8), p. e0237930. doi: 10.1371/journal.pone.0237930.
- Pérez-Rodríguez, S., Ramírez, O. T., Trujillo-Roldán, M. A. y Valdez-Cruz, N. A. (2020c) 'Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis of Chinese hamster ovary cell homogenates.', *Electronic Journal of Biotechnology* 48, p. 86-94. doi: 10.1016/j.ejbt.2020.09.006.
- Piguet, V., Wan, L., Borel, C., Mangasarian, A., Demareux, N., Thomas, G. y Trono, D. (2000) 'HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes.', *Nature cell biology* 2(3), p. 163–167. doi: 10.1038/35004038.
- Pohlert, T. (2014) 'The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR)'. Available at: <https://cran.r-project.org/package=PMCMR>.

- Popoff, V., Adolf, F., Brugger, B. y Wieland, F. (2011a) 'COPI budding within the Golgi stack.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(11), p. a005231. doi: 10.1101/cshperspect.a005231.
- Popoff, V., Langer, J. D., Reckmann, I., Hellwig, A., Kahn, R. A., Brügger, B. y Wieland, F. T. (2011b) 'Several ADP-ribosylation factor (Arf) isoforms support COPI vesicle formation.', *The Journal of biological chemistry* 286(41), p. 35634–35642. doi: 10.1074/jbc.M111.261800.
- Potelle, S., Klein, A. y Foulquier, F. (2015) 'Golgi post-translational modifications and associated diseases.', *Journal of inherited metabolic disease* 38(4), p. 741–751. doi: 10.1007/s10545-015-9851-7.
- Powell, J. A. C. (2014) 'GO2MSIG, an automated GO based multi-species gene set generator for gene set enrichment analysis.', *BMC Bioinformatics*, 15, p. 146. doi: 10.1186/1471-2105-15-146.
- Puetz, J. y Wurm, F. (2019) 'Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing.', *Processes* 7, p. 476. doi: 10.3390/pr7080476.
- Pursiheimo, A., Vehmas, A. P., Afzal, S., Suomi, T., Chand, T., Strauss, L., Poutanen, M., Rokka, A., Corthals, G. L. y Elo, L. L. (2015) 'Optimization of Statistical Methods Impact on Quantitative Proteomics Data.', *Journal of proteome research* 14(10), p. 4118–4126. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00183.
- Qi, X., Sun, Y. y Xiong, S. (2015) 'A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form.', *Microbial Cell Factories* 14, p. 24. doi: 10.1186/s12934-015-0208-6.
- Qin, J., Li, D., Zhou, Y., Xie, S., Du, X., Hao, Z., Liu, R., Liu, X., Liu, M. y Zhou, J. (2017) 'Apoptosis-linked gene 2 promotes breast cancer growth and metastasis by regulating the cytoskeleton.', *Oncotarget* 8(2), p. 2745–2757. doi: 10.18632/oncotarget.13740.
- R Core Team (2020). 'R: A language and environment for statistical computing.', *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org/>.
- Rahimpour, A., Vaziri, B., Moazzami, R., Nematollahi, L., Barkhordari, F., Kokabee, L., Adeli, A. y Mahboudi, F. (2013) 'Engineering the cellular protein secretory pathway for enhancement of recombinant tissue plasminogen activator expression in Chinese hamster ovary cells: effects of CERT and XBP1s genes.', *Journal of microbiology and biotechnology* 23(8), p. 1116–1122. doi: 10.4014/jmb.1302.02035.

- Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J. J. y Kumar, T. K. S. (2009) 'Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate.', *Protein science* 18(5), p. 980–993. doi: 10.1002/pro.108.
- Rapiejko, P. J. y Gilmore, R. (1997) 'Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum.', *Cell* 89(5), p. 703–713. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80253-6.
- Rappsilber, J., Mann, M. y Ishihama, Y. (2007) 'Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips.', *Nature Protocols* 2(8), p. 1896–1906. doi: 10.1038/nprot.2007.261.
- Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C. y Kunert, R. (2015) 'Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production.', *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(11), p. 4645–4657. doi: 10.1007/s00253-015-6514-4.
- Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., Sommeregger, W., Gili, A., Gasselhuber, B., Castan, A., Mayrhofer, P., Grunwald-Gruber, C. y Kunert, R. (2019) 'Bioprocessing of Recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO Expression Hosts Favor Either mAb Production or Biomass Synthesis.', *Biotechnology journal* 14(3), p. e1700686. doi: 10.1002/biot.201700686.
- Renna, M., Schaffner, C., Winslow, A. R., Menzies, F. M., Peden, A. A., Floto, R. A. y Rubinsztein, D. C. (2011) 'Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex.', *Journal of cell science* 124(Pt 3), p. 469–482. doi: 10.1242/jcs.076489.
- Retz, K. C. y Steele, W. J. (1977) 'Acid precipitation of protein in the presence of triton X-100 and deoxycholate.', *Analytical biochemistry* 79(1–2), p. 457–461. doi: 10.1016/0003-2697(77)90421-3.
- Richard, M., Boulin, T., Robert, V. J. P., Richmond, J. E. y Bessereau, J-L. (2013) 'Biosynthesis of ionotropic acetylcholine receptors requires the evolutionarily conserved ER membrane complex.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(11), p. E1055-63. doi: 10.1073/pnas.1216154110.
- Ritacco, F. V, Wu, Y. y Khetan, A. (2018) 'Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies.', *Biotechnology progress* 34(6), p. 1407–1426. doi: 10.1002/btpr.2706.

- Romano, P. R., Wang, J., O'Keefe, R. J., Puzas, J. E., Rosier, R. N. y Reynolds, P. R. (1998) 'HiPER1, a phosphatase of the endoplasmic reticulum with a role in chondrocyte maturation.', *Journal of cell science* 111 (Pt 6), p. 803–813.
- Ron, D. y Walter, P. (2007) 'Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response.', *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(7), p. 519–529. doi: 10.1038/nrm2199.
- Roth, J. (2002) 'Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions.', *Chemical reviews* 102(2), p. 285–303. doi: 10.1021/cr000423j.
- Rotter, J., Kuiper, R. P., Bouw, G. y Martens, G. J. M. (2002) 'Cell-type-specific and selectively induced expression of members of the p24 family of putative cargo receptors.', *Journal of cell science* 115(Pt 5), p. 1049–1058.
- Roxas, B. A. P. y Li, Q. (2008) 'Significance analysis of microarray for relative quantitation of LC/MS data in proteomics.', *BMC Bioinformatics* 9, p. 187. doi: 10.1186/1471-2105-9-187.
- Ruggiano, A., Foresti, O. y Carvalho, P. (2014) 'ER-associated degradation: Protein quality control and beyond.', *The Journal of Cell Biology* 204(6), p. 869–879. doi: 10.1083/jcb.201312042.
- Rupp, O., Becker, J., Brinkrolf, K., Timmermann, C., Borth, N., Pühler, A., Noll, T. y Goesmann, A. (2014) 'Construction of a Public CHO Cell Line Transcript Database Using Versatile Bioinformatics Analysis Pipelines.', *PLoS One* 9(1), p. e85568. doi: 10.1371/journal.pone.0085568.
- Rupp, O., MacDonald, M. L., Li, S., Dhiman, H., Polson, S., Griep, S., Heffner, K., Hernandez, I., Brinkrolf, K., Jadhav, V., Samoudi, M., Hao, H., Kingham, B., Goesmann, A., Betenbaugh, M. J., Lewis, N. E., Borth, N. y Lee, K. H. (2018) 'A reference genome of the Chinese hamster based on a hybrid assembly strategy.', *Biotechnology and Bioengineering* 115(8), p. 2087–2100. doi: 10.1002/bit.26722.
- Saegusa, K., Sato, M., Morooka, N., Hara, T. y Sato, K. (2018) 'SFT-4/Surf4 control ER export of soluble cargo proteins and participate in ER exit site organization', *The Journal of Cell Biology* 217(6), p. 2073–2085. doi: 10.1083/jcb.201708115.
- Saleeb, R. S., Kavanagh, D. M., Dun, A. R., Dalgarno, P. A. y Duncan, R. R. (2019) 'A VPS33A-binding motif on syntaxin 17 controls autophagy completion in mammalian cells.', *The Journal of biological chemistry* 294(11), p. 4188–4201. doi: 10.1074/jbc.RA118.005947.

- Sánchez-Kopper, A., Becker, M., Pfizenmaier, J., Kessler, C., Karau, A. y Takors, R. (2016) 'Tracking dipeptides at work-uptake and intracellular fate in CHO culture.', *AMB Express* 6, p. 48. doi: 10.1186/s13568-016-0221-0.
- Santa, C., Anjo, S. I. y Manadas, B. (2016) 'Protein precipitation of diluted samples in SDS-containing buffer with acetone leads to higher protein recovery and reproducibility in comparison with TCA/acetone approach.', *Proteomics* 16(13), p. 1847–1851. doi: 10.1002/pmic.201600024.
- Saraste, J. (2016) 'Spatial and Functional Aspects of ER-Golgi Rabs and Tethers.', *Frontiers in cell and developmental biology* 4, p. 28. doi: 10.3389/fcell.2016.00028.
- Sato, S., Inoue, H., Kogure, T., Tagaya, M. y Tani, K. (2010) 'Golgi-localized KIAA0725p regulates membrane trafficking from the Golgi apparatus to the plasma membrane in mammalian cells.', *FEBS letters* 584(21), p. 4389–4395. doi: 10.1016/j.febslet.2010.09.047.
- Satoh, A., Wang, Y., Malsam, J., Beard, M. B. y Warren, G. (2003) 'Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure', *Traffic* 4(3), p. 153–161. doi:10.1034/j.1600-0854.2003.00103.x.
- Satoh, T., Ohba, A., Liu, Z., Inagaki, T. y Satoh, A. K. (2015) 'dPob/EMC is essential for biosynthesis of rhodopsin and other multi-pass membrane proteins in Drosophila photoreceptors.', *eLife* 4, p. e06306. doi: 10.7554/eLife.06306.
- Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. y Eliceiri, K. W. (2015) 'The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis.', *Molecular reproduction and development* 82(7–8), p. 518–529. doi: 10.1002/mrd.22489.
- Scholz, C., Zarnt, T., Kern, G., Lang, K., Burtscher, H., Fischer, G. y Schmid, F. X. (1996) 'Autocatalytic folding of the folding catalyst FKBP12.', *The Journal of biological chemistry* 271(22), p. 12703–12707. doi: 10.1074/jbc.271.22.12703.
- Schumacher, U., Mausolf, A., Barth, J., Welsch, U. y Petermann, W. (1992) 'Recovery of proteins from the broncho-alveolar lavage fluid proposal for a standardization.', *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry* 30(1), p. 11–14. doi: 10.1515/cclm.1992.30.1.11.
- Scopes, R. K. (1994) 'Separation by Precipitation', in Cantor, C. R. (ed.) *Protein Purification: Principles and Practice, Third Edition*. Springer, p. 71–101. doi: 10.1007/978-1-4757-2333-5.

- Seaayfan, E., Defontaine, N., Demaretz, S., Zaarour, N. y Laghmani, K. (2016) 'OS9 Protein Interacts with Na-K-2Cl Co-transporter (NKCC2) and Targets Its Immature Form for the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Pathway.', *The Journal of biological chemistry* 291(9), p. 4487–4502. doi: 10.1074/jbc.M115.702514.
- Shan, S., Schmid, S. L. y Zhang, X. (2009) 'Signal recognition particle (SRP) and SRP receptor: a new paradigm for multistate regulatory GTPases.', *Biochemistry* 48(29), p. 6696–6704. doi: 10.1021/bi9006989.
- Shaw, M. M. y Riederer, B. M. (2003) 'Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis.', *Proteomics* 3(8), p. 1408–1417. doi: 10.1002/pmic.200300471.
- Shibata, H., Inuzuka, T., Yoshida, H., Sugiura, H., Wada, I. y Maki, M. (2010) 'The ALG-2 binding site in Sec31A influences the retention kinetics of Sec31A at the endoplasmic reticulum exit sites as revealed by live-cell time-lapse imaging.', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74(9), p. 1819–1826. doi: 10.1271/bbb.100215.
- Shibata, H., Suzuki, H., Yoshida, H. y Maki, M. (2007) 'ALG-2 directly binds Sec31A and localizes at endoplasmic reticulum exit sites in a Ca²⁺-dependent manner.', *Biochemical and biophysical research communications* 353(3), p. 756–763. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.101.
- Siegel, V. y Walter, P. (1988) 'Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: analysis of biochemical mutants of SRP.', *Cell* 52(1), p. 39–49. doi: 10.1016/0092-8674(88)90529-6.
- Siekierka, J. J., Wiederrecht, G., Greulich, H., Boulton, D., Hung, S. H., Cryan, J., Hodges, P. J. y Sigal, N. H. (1990) 'The cytosolic-binding protein for the immunosuppressant FK-506 is both a ubiquitous and highly conserved peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.', *The Journal of biological chemistry* 265(34), p. 21011–21015.
- Sivaraman, T., Kumar, T. K. S., Jayaraman, G. y Yu, C. (1997) 'The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation.', *Journal of Protein Chemistry* 16(4), p. 291–297. doi: 10.1023/A:1026357009886.
- Sohda, M., Misumi, Y., Yamamoto, A., Nakamura, N., Ogata, S., Sakisaka, S., Hirose, S., Ikehara, Y. y Oda, K. (2010) 'Interaction of Golgin-84 with the COG complex mediates the intra-Golgi retrograde transport.', *Traffic* 11(12), p. 1552–1566. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01123.x.

- Sommeregger, W., Mayrhofer, P., Steinfellner, W., Reinhart, D., Henry, M., Clynes, M., Meleady, P. y Kunert, R. (2016) 'Proteomic differences in recombinant CHO cells producing two similar antibody fragments.', *Biotechnology and Bioengineering* 113(9), p. 1902–1912. doi: 10.1002/bit.25957.
- Sonnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jamsa, E., Dirac-Svejstrup, B. y Warren, G. (1998) 'A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes.', *The Journal of cell biology* 140(5), p. 1013–1021. doi: 10.1083/jcb.140.5.1013.
- Spatuzza, C., Renna, M., Faraonio, R., Cardinali, G., Martire, G., Bonatti, S. y Remondelli, P. (2004) 'Heat shock induces preferential translation of ERGIC-53 and affects its recycling pathway.', *Journal of Biological Chemistry* 279(41), p. 42535–42544. doi: 10.1074/jbc.M401860200.
- Stasyk, T. y Huber, L. A. (2004) 'Zooming in: Fractionation strategies in proteomics.', *Proteomics* 4(12), p. 3704–3716. doi: 10.1002/pmic.200401048.
- Stevenson, N. L., Bergen, D. J. M., Skinner, R. E. H., Kague, E., Martin-Silverstone, E., Robson Brown, K. A., Hammond, C. L. y Stephens, D. J. (2017) 'Giantin-knockout models reveal a feedback loop between Golgi function and glycosyltransferase expression', *Journal of Cell Science* 130(24), p. 4132–4143. doi: 10.1242/jcs.212308.
- Storrie, B. y Amadden, E. (1990) 'Isolation of subcellular organelles.', in Deutscher, M. P. (ed.) *Guide to Protein Purification* p. 203–225. doi: 10.1016/0076-6879(90)82018-W.
- Strober, W. (2015) 'Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability.', *Current protocols in immunology* 111, p. A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S. y Mesirov, J. P. (2005) 'Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(43), p. 15545–15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- Sun, F-C., Wei, S., Li, C-W., Chang, Y-S., Chao, C-C. y Lai, Y-K. (2006) 'Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response.', *The Biochemical journal* 396(1), p. 31–39. doi: 10.1042/BJ20051916.
- Sun, Z. y Brodsky, J. L. (2019) 'Protein quality control in the secretory pathway.', *The Journal of cell biology* 218(10), p. 3171–3187. doi: 10.1083/jcb.201906047.

- Suomi, T., Seyednasrollah, F., Jaakkola, M. K., Faux, T. y Elo, L. L. (2017) 'ROTS: An R package for reproducibility-optimized statistical testing.', *PLoS Computational Biology* 13(5), p. e1005562. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005562.
- Takahara, T., Inoue, K., Arai, Y., Kuwata, K., Shibata, H. y Maki, M. (2017) 'The calcium-binding protein ALG-2 regulates protein secretion and trafficking via interactions with MISSL and MAP1B proteins.', *The Journal of biological chemistry* 292(41), p. 17057–17072. doi: 10.1074/jbc.M117.800201.
- Tam, A. B., Roberts, L. S., Chandra, V., Rivera, I. G., Nomura, D. K., Forbes, D. J. y Niwa, M. (2018) 'The UPR Activator ATF6 Responds to Proteotoxic and Lipotoxic Stress by Distinct Mechanisms.', *Developmental cell* 46(3), p. 327-343.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2018.04.023.
- Tang, H-Y., Huang, C-H., Zhuang, Y-H., Christianson, J. C. y Chen, X. (2014) 'EDEM2 and OS-9 are required for ER-associated degradation of non-glycosylated sonic hedgehog.', *PLoS One* 9(6), p. e92164. doi: 10.1371/journal.pone.0092164.
- Tannous, A., Pisoni, G. B., Hebert, D. N. y Molinari, M. (2015) 'N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER.', *Seminars in cell & developmental biology* 41, p. 79–89. doi: 10.1016/j.semcd.2014.12.001.
- Tepedelen, B. E. (2019) 'Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD)', in Català, P. B. K. E.-A. (ed.). Rijeka: IntechOpen, p. Ch. 3. doi: 10.5772/intechopen.82043.
- Toussaint, C., Henry, O. y Durocher, Y. (2016) 'Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures.', *Journal of Biotechnology* 217, p. 122–131. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.010.
- Tsukamoto, T., Yokota, S. y Fujiki, Y. (1990) 'Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell mutants defective in assembly of peroxisomes.', *Journal of Cell Biology* 110(3), p. 651–660. doi: 10.1083/jcb.110.3.651.
- Uematsu, M., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Yamamoto, H. y Mizushima, N. (2017) 'Accumulation of undegraded autophagosomes by expression of dominant-negative STX17 (syntaxin 17) mutants.', *Autophagy* 13(8), p. 1452–1464. doi: 10.1080/15548627.2017.1327940.
- Valente, K. N., Schaefer, A. K., Kempton, H. R., Lenhoff, A. M. y Lee, K. H. (2014) 'Recovery of Chinese hamster ovary host cell proteins for proteomic analysis.', *Biotechnology Journal* 9(1), p. 87–99. doi: 10.1002/biot.201300190.

- Van Acker, K., Bultynck, G., Rossi, D., Sorrentino, V., Boens, N., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J. B. y Callewaert, G. (2004) 'The 12 kDa FK506-binding protein, FKBP12, modulates the Ca(2+)-flux properties of the type-3 ryanodine receptor.', *Journal of cell science* 117(Pt 7), p. 1129–1137. doi: 10.1242/jcs.00948.
- van der Goot, A. T., Pearce, M. M. P., Leto, D. E., Shaler, T. A. y Kopito, R. R. (2018) 'Redundant and Antagonistic Roles of XTP3B and OS9 in Decoding Glycan and Non-glycan Degrons in ER-Associated Degradation.', *Molecular cell* 70(3), p. 516-530.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.03.026.
- van Heusden, G. P., Bos, K., Raetz, C. R. y Wirtz, K. W. (1990) 'Chinese hamster ovary cells deficient in peroxisomes lack the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2).', *The Journal of biological chemistry* 265(7), p. 4105–4110.
- van Huizen, R., Martindale, J. L., Gorospe, M. y Holbrook, N. J. (2003) 'P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling.', *The Journal of biological chemistry* 278(18), p. 15558–15564. doi: 10.1074/jbc.M212074200.
- Vance, J. E. (1990) 'Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria.', *The Journal of biological chemistry* 265(13), p. 7248–7256.
- Vats, S. y Manjithaya, R. (2019) 'A reversible autophagy inhibitor blocks autophagosome-lysosome fusion by preventing Stx17 loading onto autophagosomes.', *Molecular biology of the cell* 30(17), p. 2283–2295. doi: 10.1091/mbc.E18-08-0482.
- Vergara, M., Torres, M., Müller, A., Avello, V., Acevedo, C., Berrios, J., Reyes, J. G., Valdez-Cruz, N. A. y Altamirano, C. (2018) 'High glucose and low specific cell growth but not mild hypothermia improve specific r-protein productivity in chemostat culture of CHO cells.', *PLoS One* 13(8), p. e0202098. doi: 10.1371/journal.pone.0202098.
- Vervliet, T., Parys, J. B. y Bultynck, G. (2015) 'Bcl-2 and FKBP12 bind to IP3 and ryanodine receptors at overlapping sites: the complexity of protein-protein interactions for channel regulation.', *Biochemical Society transactions* 43(3), p. 396–404. doi: 10.1042/BST20140298.
- Volpicelli-Daley, L. A., Li, Y., Zhang, C-J. y Kahn, R. A. (2005) 'Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic.', *Molecular biology of the cell* 16(10), p. 4495–4508. doi: 10.1091/mbc.e04-12-1042.

- Wada, R., Matsui, M. y Kawasaki, N. (2019) 'Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms.', *mAbs* 11(2), p. 350–372. doi: 10.1080/19420862.2018.1551044.
- Walker, M., Rizzuto, P., Godin, M. y Pelling, A. E. (2020) 'Structural and mechanical remodeling of the cytoskeleton maintains tensional homeostasis in 3D microtissues under acute dynamic stretch.', *Scientific Reports* 10(1), p. 7696. doi: 10.1038/s41598-020-64725-7.
- Walker, S. J. y Lively, M. O. (2013) 'Chapter 778 - Signal Peptidase (Eukaryote)', in Rawlings, N. D. y Salvesen, G. B. T.-H. of P. E. (Third E. (eds). Academic Press, p. 3512–3517. doi: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00778-X.
- Walsh, G. (2018) 'Biopharmaceutical benchmarks 2018.', *Nature Biotechnology* 36, p. 1136–1145. doi: 10.1038/nbt.4305.
- Walter, P. y Ron, D. (2011) 'The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation.', *Science* 334(6059), p. 1081–1086. doi: 10.1126/science.1209038.
- Wan, C., Fu, J., Wang, Y., Miao, S., Song, W. y Wang, L. (2012) 'Exosome-related multi-pass transmembrane protein TSAP6 is a target of rhomboid protease RHBDD1-induced proteolysis.', *PLoS One* 7(5), p. e37452. doi: 10.1371/journal.pone.0037452.
- Wan, L., Molloy, S. S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S. L. y Thomas, G. (1998) 'PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization.', *Cell* 94(2), p. 205–216. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81420-8.
- Wandinger-Ness, A. y Zerial, M. (2014) 'Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6(11), p. a022616. doi: 10.1101/cshperspect.a022616.
- Wang, C., Liu, Z. y Huang, X. (2012) 'Rab32 is important for autophagy and lipid storage in *Drosophila*.', *PLoS One* 7(2), p. e32086. doi: 10.1371/journal.pone.0032086.
- Wang, T., Li, L. y Hong, W. (2017a) 'SNARE proteins in membrane trafficking.', *Traffic* 18(12), p. 767–775. doi: 10.1111/tra.12524.
- Wang, X., Zuo, D., Yuan, Y., Yang, X., Hong, Z. y Zhang, R. (2017b) 'MicroRNA-183 promotes cell proliferation via regulating programmed cell death 6 in pediatric acute myeloid leukemia.', *Journal of cancer research and clinical oncology* 143(1), p. 169–180. doi: 10.1007/s00432-016-2277-2.

- Wang, Y-N., Wang, H., Yamaguchi, H., Lee, H-J., Lee, H-H. y Hung, M-C. (2010) 'COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport.', *Biochemical and biophysical research communications* 399(4), p. 498–504. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.096.
- Warder, S. E., Tucker, L. A., Strelitzer, T. J., McKeegan, E. M., Meuth, J. L., Jung, P. M., Saraf, A., Singh, B., Lai-Zhang, J., Gagne, G. y Rogers. J. C. (2009) 'Reducing agent-mediated precipitation of high-abundance plasma proteins.', *Analytical Biochemistry* 387(2), p. 184–193. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.013.
- Waschbusch, D., Hubel, N., Ossendorf, E., Lobbestael, E., Baekelandt, V., Lindsay, A. J., McCaffrey, M. W., Khan, A. R. y Barnekow, A. (2019) 'Rab32 interacts with SNX6 and affects retromer-dependent Golgi trafficking.', *PLoS One* 14(1), p. e0208889. doi: 10.1371/journal.pone.0208889.
- Waschbusch, D., Michels, H., Strassheim, S., Ossendorf, E., Kessler, D., Gloeckner, C. J. y Barnekow, A. (2014) 'LRRK2 transport is regulated by its novel interacting partner Rab32.', *PLoS One* 9(10), p. e111632. doi: 10.1371/journal.pone.0111632.
- Wegmann, D., Hess, P., Baier, C., Wieland, F. T. y Reinhard, C. (2004) 'Novel isotopic gamma/zeta subunits reveal three coatomer complexes in mammals.', *Molecular and cellular biology* 24(3), p. 1070–1080. doi: 10.1128/mcb.24.3.1070-1080.2004.
- Wen, H., Kang, S., Song, Y., Song, Y., Yang, H-J., Kim, M-H. y Park, S. (2012) 'Characterization of the binding sites for the interactions between FKBP12 and intracellular calcium release channels.', *Archives of biochemistry and biophysics* 517(1), p. 37–42. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.004.
- Wessel, D. y Flügge, U. I. (1984) 'A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.', *Analytical Biochemistry* 138(1), p. 141–143. doi: 10.1016/0003-2697(84)90782-6.
- Wideman, J. G. (2015) 'The ubiquitous and ancient ER membrane protein complex (EMC): tether or not?.', *F1000Research* 4, p. 624. doi: 10.12688/f1000research.6944.2.
- Wild, K., Juaire, K. D., Soni, K., Shanmuganathan, V., Hendricks, A., Segnitz, B., Beckmann, R. y Sinning, I. (2019) 'Reconstitution of the human SRP system and quantitative and systematic analysis of its ribosome interactions.', *Nucleic Acids Research* 47(6), p. 3184–3196. doi: 10.1093/nar/gky1324.

- Wippermann, A., Klausing, S., Rupp, O., Albaum, S. P., Büntemeyer, H., Noll, T. y Hoffrogge, R. (2014) 'Establishment of a CpG island microarray for analyses of genome-wide DNA methylation in Chinese hamster ovary cells.', *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(2), p. 579–589. doi: 10.1007/s00253-013-5282-2.
- Wippermann, A., Rupp, O., Brinkrolf, K., Hoffrogge, R. y Noll, T. (2015) 'The DNA methylation landscape of Chinese hamster ovary (CHO) DP-12 cells.', *Journal of biotechnology* 199, p. 38–46. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.02.014.
- Wippermann, A., Rupp, O., Brinkrolf, K., Hoffrogge, R. y Noll, T. (2017) 'Integrative analysis of DNA methylation and gene expression in butyrate-treated CHO cells.', *Journal of Biotechnology* 257, p. 150–161. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.020.
- Wong, D. M. y Adeli, K. (2009) 'Microsomal proteomics.', *Methods in molecular biology* 519, p. 273–289. doi: 10.1007/978-1-59745-281-6_17.
- Wu, W., Sahara, K., Hirayama, S., Zhao, X., Watanabe, A., Hamazaki, J., Yashiroda, H. y Murata, S. (2018) 'PAC1-PAC2 proteasome assembly chaperone retains the core alpha4-alpha7 assembly intermediates in the cytoplasm.', *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 23(10), p. 839–848. doi: 10.1111/gtc.12631.
- Wu, Y., Zhou, J., Zhang, X., Zheng, X., Jiang, X., Shi, L., Yin, W. y Wang, J. (2009) 'Optimized sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis of soluble proteins from chicken bursa of Fabricius.', *Proteome science* 7, p. 38. doi: 10.1186/1477-5956-7-38.
- Wurm, F. M. y Jordan, M. (2003) 'Gene transfer and gene amplification in mammalian cells.', in *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells* 38, p. 309–335. doi: 10.1016/S0167-7306(03)38019-6.
- Xian, H., Yang, Q., Xiao, L., Shen, H-M. y Liou, Y-C. (2019) 'STX17 dynamically regulated by Fis1 induces mitophagy via hierarchical macroautophagic mechanism', *Nature Communications* 10(1), p. 2059. doi: 10.1038/s41467-019-10096-1.
- Xie, Y-Z., Ma, W-L., Meng, J-M. y Ren, X-Q. (2017) 'Knockdown of ZFPL1 results in increased autophagy and autophagy-related cell death in NCIN87 and BGC823 human gastric carcinoma cell lines.', *Molecular medicine reports* 15(5), p. 2633–2642. doi: 10.3892/mmr.2017.6300.

- Xing, Z., Li, Z., Chow, V. y Lee, S. S. (2008) 'Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods.', *Biotechnology progress* 24(3), p. 675–683. doi: 10.1021/bp070466m.
- Xu, N., Ma, C., Ou, J., Sun, W. W., Zhou, L., Hu, H. y Liu, X. M. (2017) 'Comparative proteomic analysis of three Chinese hamster ovary (CHO) host cells.', *Biochemical Engineering Journal* 124, p. 122–129. doi: 10.1016/j.bej.2017.05.007.
- Yamaguchi, T., Dulubova, I., Min, S-W., Chen, X., Rizo, J. y Sudhof, T. C. (2002) 'Sly1 binds to Golgi and ER syntaxins via a conserved N-terminal peptide motif.', *Developmental cell* 2(3), p. 295–305. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00125-9.
- Yamane, J., Kubo, A., Nakayama, K., Yuba-Kubo, A., Katsuno, T., Tsukita, S. y Tsukita, S. (2007) 'Functional involvement of TMF/ARA160 in Rab6-dependent retrograde membrane traffic.', *Experimental cell research* 313(16), p. 3472–3485. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.010.
- Yamasaki, A., Tani, K., Yamamoto, A., Kitamura, N. y Komada, M. (2006) 'The Ca²⁺-binding protein ALG-2 is recruited to endoplasmic reticulum exit sites by Sec31A and stabilizes the localization of Sec31A.', *Molecular biology of the cell* 17(11), p. 4876–4887. doi: 10.1091/mbc.e06-05-0444.
- Yan, G., Ru, Y., Wu, K., Yan, F., Wang, Q., Wang, J., Pan, T., Zhang, M., Han, H., Li, X. y Zou, L. (2018) 'GOLM1 promotes prostate cancer progression through activating PI3K-AKT-mTOR signaling.', *The Prostate* 78(3), p. 166–177. doi: 10.1002/pros.23461.
- Yan, W., Frank, C. L., Korth, M. J., Sopher, B. L., Novoa, I., Ron, D. y Katze, M. G. (2002) 'Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25), p. 15920–15925. doi: 10.1073/pnas.252341799.
- Yang, M. y Butler, M. (2000) 'Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation.', *Biotechnology and bioengineering* 68(4), p. 370–380. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(20000520)68:4<370::aid-bit2>3.0.co;2-k.
- Yang, M., Ellenberg, J., Bonifacino, J. S. y Weissman, A. M. (1997) 'The transmembrane domain of a carboxyl-terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum.', *Journal of Biological Chemistry* 272(3), p. 1970–1975. doi: 10.1074/jbc.272.3.1970.

- Yates, J. R., Gilchrist, A., Howell, K. E. y Bergeron, J. J. M. (2005) 'Proteomics of organelles and large cellular structures.', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6(9), p. 702–714. doi: 10.1038/nrm1711.
- Ye, Q-H., Zhu, W-W., Zhang, J-B., Qin, Y., Lu, M., Lin, G-L., Guo, L., Zhang, B., Lin, Z-H., Roessler, S., Forgues, M., Jia, H-L., Lu, L., Zhang, X-F., Lian, B-F., Xie, L., Dong, Q-Z., Tang, Z-Y., Wang, X. W. y Qin, L-X. (2016) 'GOLM1 Modulates EGFR/RTK Cell-Surface Recycling to Drive Hepatocellular Carcinoma Metastasis.', *Cancer cell* 30(3), p. 444–458. doi: 10.1016/j.ccell.2016.07.017.
- Yin, Y., Garcia, M. R., Novak, A. J., Saunders, A. M., Ank, R. S., Nam, A. S. y Fisher, L. W. (2018) 'Surf4 (Erv29p) binds amino-terminal tripeptide motifs of soluble cargo proteins with different affinities, enabling prioritization of their exit from the endoplasmic reticulum.', *PLoS biology* 16(8), p. e2005140. doi: 10.1371/journal.pbio.2005140.
- Yoo, H. M., Kang, S. H., Kim, J. Y., Lee, J. E., Seong, M. W., Lee, S. W., Ka, S. H., Sou, Y-S., Komatsu, M., Tanaka, K., Lee, S. T., Noh, D. Y., Baek, S. H., Jeon, Y. J. y Chung, C. H. (2014) 'Modification of ASC1 by UFM1 is crucial for ERalpha transactivation and breast cancer development.', *Molecular cell* 56(2), p. 261–274. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.007.
- Yoon, J. H., Choi, Y. J., Kim, S. G., Nam, S. W., Lee, J. Y. y Park, W. S. (2012) 'Programmed cell death 6 (PDCD6) as a prognostic marker for gastric cancers.', *Tumour biology* 33(2), p. 485–494. doi: 10.1007/s13277-011-0280-4.
- Young, J. D. (2013) 'Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures.', *Current opinion in biotechnology* 24(6), p. 1108–1115. doi: 10.1016/j.copbio.2013.04.016.
- Yuan, L., Li, S., Zhou, Q., Wang, D., Zou, D., Shu, J. y Huang, Y. (2017) 'MiR-124 inhibits invasion and induces apoptosis of ovarian cancer cells by targeting programmed cell death 6.', *Oncology letters* 14(6), p. 7311–7317. doi: 10.3892/ol.2017.7157.
- Zerial, M. y McBride, H. (2001) 'Rab proteins as membrane organizers.', *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(2), p. 107–117. doi: 10.1038/35052055.
- Zhang, B., Cunningham, M. A., Nichols, W. C., Bernat, J. A., Seligsohn, U., Pipe, S. W., McVey, J. H., Schulte-Overberg, U., de Bosch, N. B., Ruiz-Saez, A., White, G. C., Tuddenham, E. G. D., Kaufman, R. J. y Ginsburg, D. (2003) 'Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex.', *Nature genetics* 34(2), p. 220–225. doi: 10.1038/ng1153.

- Zhang, B., Kaufman, R. J. y Ginsburg, D. (2005) 'LMAN1 and MCFD2 form a cargo receptor complex and interact with coagulation factor VIII in the early secretory pathway.', *The Journal of biological chemistry* 280(27), p. 25881–25886. doi: 10.1074/jbc.M502160200.
- Zhang, B., McGee, B., Yamaoka, J. S., Guglielmone, H., Downes, K. A., Minoldo, S., Jarchum, G., Peyvandi, F., de Bosch, N. B., Ruiz-Saez, A., Chatelain, B., Olpinski, M., Bockenstedt, P., Sperl, W., Kaufman, R. J., Nichols, W. C., Tuddenham, E. G. D. y Ginsburg, D. (2006) 'Combined deficiency of factor V and factor VIII is due to mutations in either LMAN1 or MCFD2.', *Blood* 107(5), p. 1903–1907. doi: 10.1182/blood-2005-09-3620.
- Zhang, D., Wang, F., Pang, Y., Zhao, E., Zhu, S., Chen, F. y Cui, H. (2017a) 'ALG2 regulates glioblastoma cell proliferation, migration and tumorigenicity.', *Biochemical and biophysical research communications* 486(2), p. 300–306. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.032.
- Zhang, D., Pan, J., Xiang, X., Liu, Y., Dong, G., Livingston, M. J., Chen, J-K., Yin, X-M. y Dong, Z. (2017b) 'Protein Kinase C Delta Suppresses Autophagy to Induce Kidney Cell Apoptosis in Cisplatin Nephrotoxicity.', *Journal of the American Society of Nephrology* 28(4), p. 1131–1144. doi: 10.1681/ASN.2016030337.
- Zhang, D., Xu, X. y Dong, Z. (2017c) 'PRKCD/PKCdelta contributes to nephrotoxicity during cisplatin chemotherapy by suppressing autophagy.', *Autophagy* 13(3), p. 631–632. doi: 10.1080/15548627.2016.1269990.
- Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liau, B., Zhao, S., Chen, C., Yang, Y., Song, Z., Wormald, M. R., Yu, C. y Rudd, P. M. (2016) 'Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs', *Drug Discovery Today*, 21(5), p. 740–765. doi: 10.1016/j.drudis.2016.01.006.
- Zhang, R., Zhu, Z., Shen, W., Li, X., Dhoomun, D. K. y Tian, Y. (2019) 'Golgi Membrane Protein 1 (GOLM1) Promotes Growth and Metastasis of Breast Cancer Cells via Regulating Matrix Metalloproteinase-13 (MMP13).', *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 25, p. 847–855. doi: 10.12659/MSM.911667.
- Zhang, X.; Han, L.; Zong, H.; Ding, K.; Yuan, Y.; Bai, J.; Zhou, Y.; Zhang, B. y Zhu, J. (2018) 'Enhanced Production of Anti-PD1 Antibody in CHO Cells through Transient Co-Transfection with Anti-Apoptotic Genes Bcl-x (L) and Mcl-1.', *Bioprocess and Biosystems Engineering* 41(5), p. 633-640. doi: 10.1007/s00449-018-1898-z.
- Zhang, Y., Zhang, M., Wu, J., Lei, G. y Li, H. (2012) 'Transcriptional regulation of the Ufm1 conjugation system in response to disturbance of the endoplasmic reticulum homeostasis and

inhibition of vesicle trafficking.', *PLoS One* 7(11), p. e48587. doi: 10.1371/journal.pone.0048587.

Zheng, C., Liu, H-H., Yuan, S., Zhou, J. y Zhang, B. (2010) 'Molecular basis of LMAN1 in coordinating LMAN1-MCFD2 cargo receptor formation and ER-to-Golgi transport of FV/FVIII.', *Blood* 116(25), p. 5698–5706. doi: 10.1182/blood-2010-04-278325.

Zhu, M., Zheng, C., Wei, W., Everett, L., Ginsburg, D. y Zhang, B. (2018) 'Analysis of MCFD2- and LMAN1-deficient mice demonstrates distinct functions in vivo.', *Blood advances* 2(9), p. 1014–1021. doi: 10.1182/bloodadvances.2018018317.

Zieba, B. A., Henry, L., Lacroix, M., Jemaa, M., Lavabre-Bertrand, T., Meunier, L., Coux, O. y Stoebner, P-E. (2017) 'The proteasome maturation protein POMP increases proteasome assembly and activity in psoriatic lesional skin.', *Journal of dermatological science* 88(1), p. 10–19. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.04.009.

Zong, M., Satoh, A., Yu, M. K., Siu, K. Y., Ng, W. Y., Chan, H. C., Tanner, J. A. y Yu, S. (2012) 'TRAPPC9 mediates the interaction between p150 and COPII vesicles at the target membrane.', *PLoS One* 7(1), p. e29995. doi: 10.1371/journal.pone.0029995.

X. ANEXOS

Anexo 1. Comparación del crecimiento celular y productividad de células CRL-12444 y CRL-12445, reportadas y las obtenidas en el este estudio.

Autor	Línea celular	Medio de cultivo y aditivos	Condiciones de cultivo	Título (mg/L) y Método ^a	q_p (pg/célula*día) ^b	Densidad celular máxima (10 ⁶ células/mL) ^a	μ (h ⁻¹) ^c
Heinrich <i>et al.</i> 2011	CRL-12445	TC42/PowerCHO-2, 200 nM MTX ^d	Lote, 37°C, 5% CO ₂ , 50% volumen de llenado (frasco agitado 250 mL), 125-185 rpm	125.0-175.0 Proteína A-HPLC	3.7-5.0	10.0	0.015-0.017
Heinrich <i>et al.</i> 2011	CRL-12445	TC42/PowerCHO-2, 200 nM MTX, IGF-1 ^e , HT ^f	Lote, 37°C, 40% OD ^g , pH 7.1, biorreactor	175.0-250.0 Proteína A-HPLC	5.0-7.0	12.0-15.0	0.019-0.025
Hareddy <i>et al.</i> 2013	CRL-12445	DMEM, SFB ^h 10%, 200 nM MTX	Lote, 37°C, 5% CO ₂ , placa de 6 pozos	1.0 ELISA	3.6	0.57	0.026
Klausing <i>et al.</i> 2013	CRL-12445	TCx2D feed	Lote alimentado, 37°C, 5% CO ₂ , frasco agitado 125 mL, 185 rpm	175.0 Proteína A-HPLC	4.8	9.0	0.022
Wippermann <i>et al.</i> 2014	CRL-12445	CHOMACS-CD, 200 nM MTX, 6 mM Gln ⁱ , 0.1 mg/L IGF-1	Lote, 37°C, 5% CO ₂ , 28 % volumen de llenado (frasco agitado 250 mL), 185 rpm	220.0 Proteína A-HPLC	7.5	11.0	0.028
Wippermann <i>et al.</i> 2015	CRL-12445	CHOMACS-CD, 200 nM MTX, 6 mM Gln, 0.1 mg/L IGF-1	Lote, 37°C, 5% CO ₂ , frasco agitado 250 mL), 185 rpm	ND ^j	6.1	12.5	0.025
Sánchez-Kopper <i>et al.</i> 2016	CRL-12445	TC42, 200 nM MTX, 4 mM AQ ^k	Lote, 36.5 °C, 8 % CO ₂ , 32% volumen de llenado (frasco agitado 125 mL), 140 rpm	170.0 ELISA	5.7	14.0	0.044
Krahn <i>et al.</i> 2017	CRL-12445	Biogro CHO, 0.5 g/L EL ^l	Lote, 37°C, 10% CO ₂ , 32 % volumen de llenado (frasco agitado 250 mL), 120 rpm	12.0 ELISA	ND	3.6	ND
Wippermann <i>et al.</i> 2017	CRL-12445	CHOMACS-CD, 200 nM MTX, 6 mM Gln, 0.1 mg/L IGF-1	Lote, 37°C, 5% CO ₂ , 28 % volumen de llenado (frasco agitado 250 mL), 185 rpm	325.0 Proteína A-HPLC	6.3	12.5	0.033
Kaushik <i>et al.</i> 2018	CRL-12445	CHO-S SFM II	Lote, 37°C, 5% CO ₂ , 50 mL volumen de llenado, 170 rpm	ND	ND	3.7-3.8	0.034
Presente estudio	CRL-12445	CDM4CHO, 200 nM MTX, 6 mM AQ, 2 µg/mL insulín	Lote, 37°C, 5% CO ₂ , 20 % volumen de llenado (frasco agitado 250 mL), 60 rpm	262.5 x 10 ⁻³ ELISA, Proteína A, Ensayo de Bradford	31.8 x 10 ⁻³	4.7	0.026
Presente estudio	CRL-12444	CDM4CHO, 200 nM MTX, 6 mM AQ, 2 µg/mL insulín	Lote, 37°C, 5% CO ₂ , 20 % volumen de llenado (frasco agitado 250 mL), 60 rpm	10.1 x 10 ⁻³ ELISA, Proteína A, Ensayo de Bradford	1.3 x 10 ⁻³	5.7	0.031

^a Los títulos de AcM se obtuvieron del texto o se estimaron a partir de la información gráfica. Método se refiere a la metodología experimental empleada para estimar la concentración del AcM en el sobrenadante de cultivo.

^b La productividad específica (q_p) se obtuvo del texto o se estimó a partir de la información gráfica durante la fase exponencial de crecimiento. Cuando los valores de q_p se mostraron cada 24 h, se obtuvo el promedio de todos los valores durante la fase exponencial de crecimiento.

^c La velocidad específica de crecimiento (μ) se obtuvo del texto o se estimó a partir de la información gráfica durante la fase exponencial de crecimiento.

^d Metotrexato (MTX)

^e Factor de crecimiento 1 tipo insulina (IGF-1)

^f Suplemento hipoxantina y timidina (HT)

^g Oxígeno disuelto (OD)

^h Suero fetal bovino (SFB)

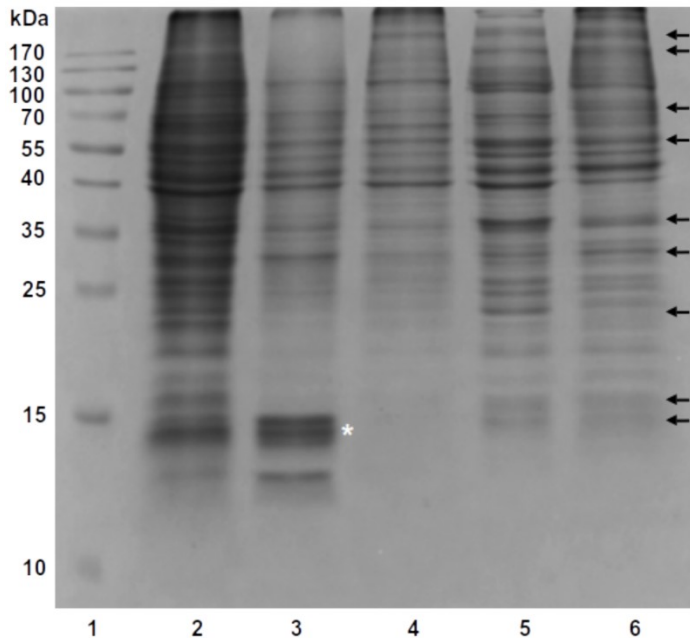
ⁱ Glutamina (Gln)

^j No disponible (ND)

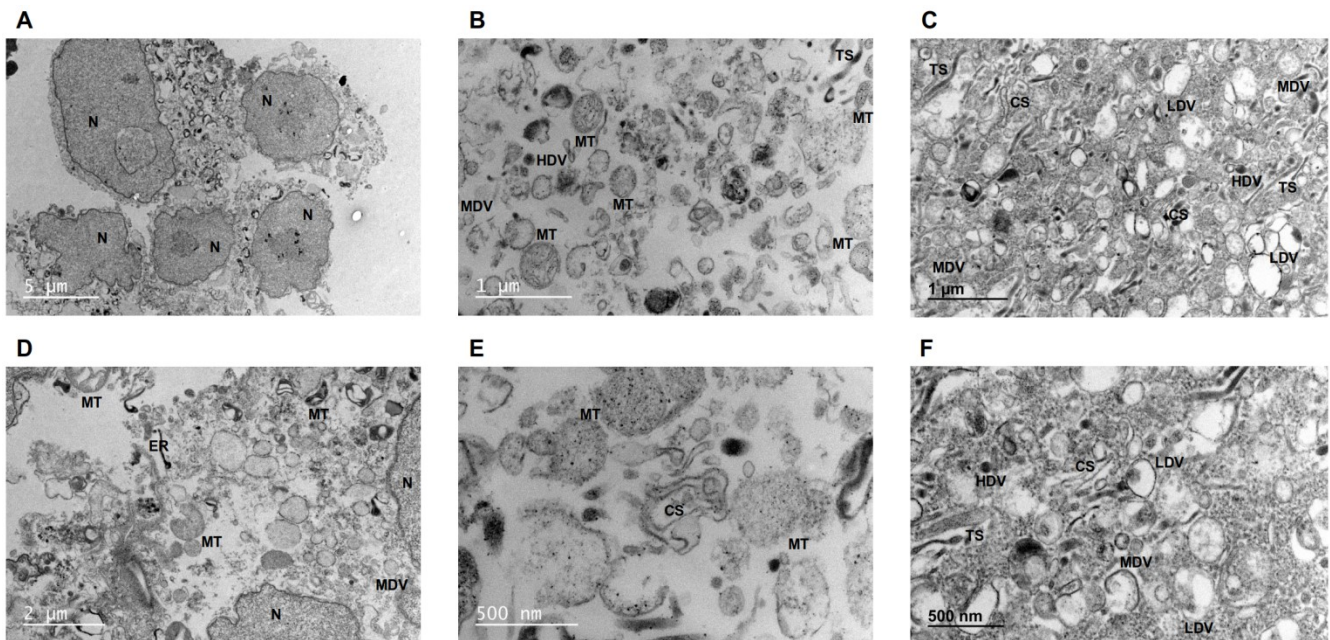
^k Dipéptido Alanina-glutamina (AQ)

^l Extracto de levadura (EL)

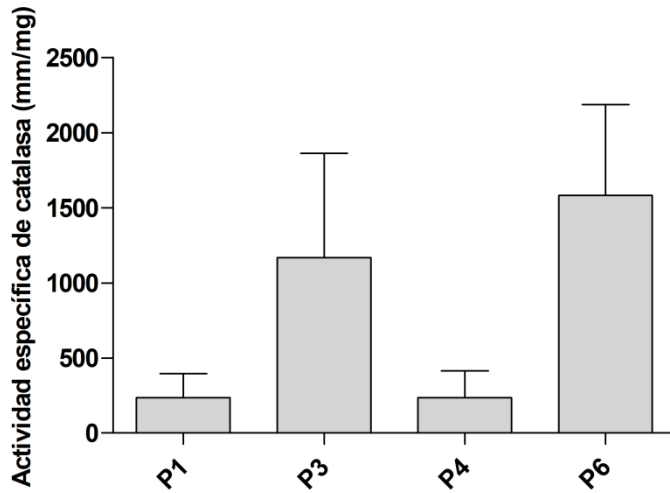
Anexo 2. SDS-PAGE de compartimentos subcelulares obtenidos mediante centrifugación diferencial. El asterisco indica el enriquecimiento de proteínas con un PM de aproximadamente 15 kDa. Las flechas indican bandas de proteínas con una distribución diferente entre las muestras. Carriles: PM: Peso molecular, HM: Homogenizado, N, MT y MC: Precipitados nuclear, mitocondrial y microsomal, respectivamente, CT: Citosol. La imagen es representativa de dos muestras biológicas (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b).



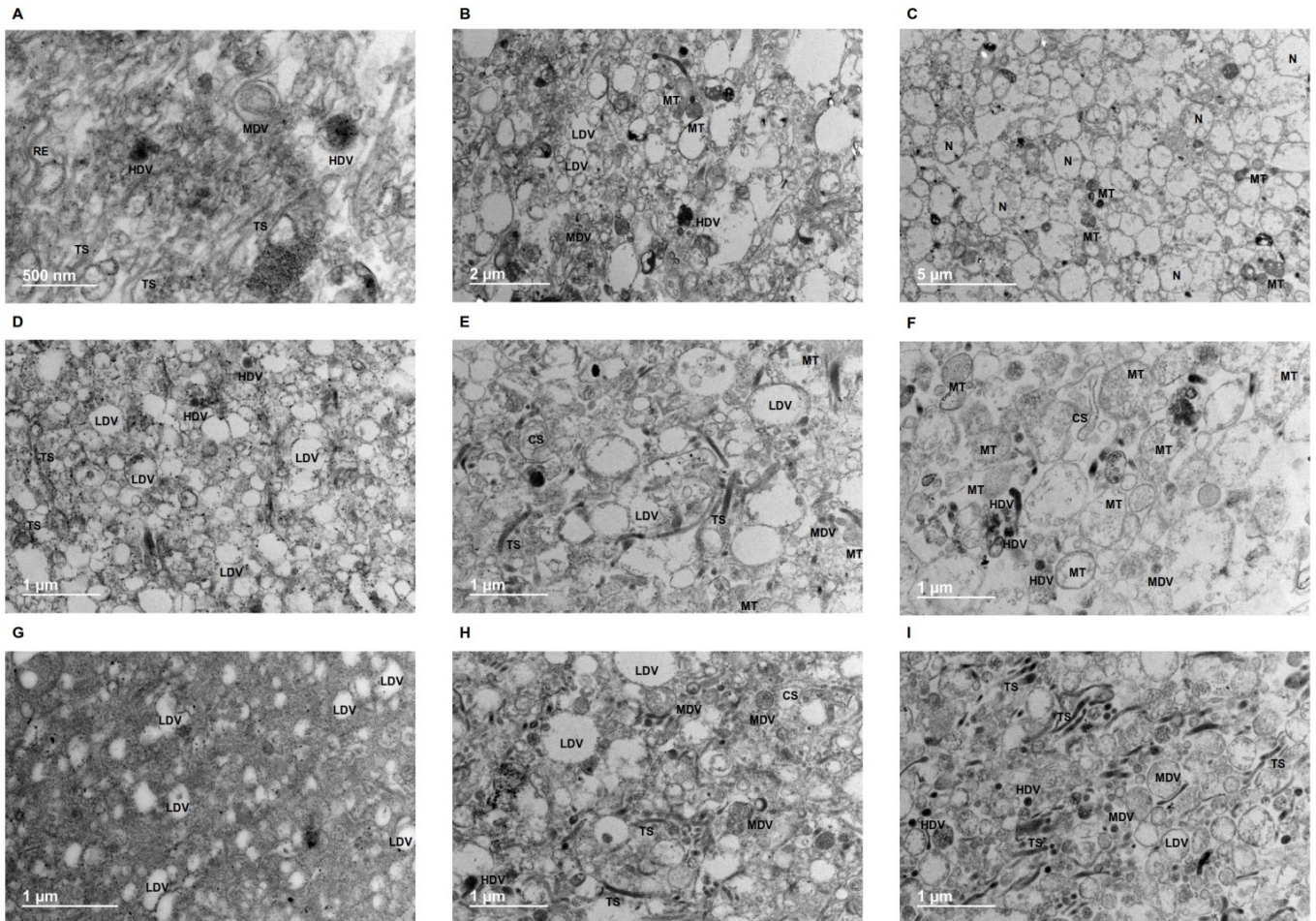
Anexo 3. Caracterización de compartimentos subcelulares mediante TEM. De acuerdo con su morfología, las estructuras observadas en los precipitados nuclear (A, D), mitocondrial (B, E) y microsomal (C, F) se clasificaron como núcleo (N), mitocondria (MT), estructura tubular (TS), cisterna (Cs), retículo endoplásmico (RE) y vesículas de baja (LDV), media (MDV) y alta densidad electrónica (HDV). Se mostraron dos imágenes representativas de cada muestra en diferentes escalas (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b).



Anexo 4. Actividad específica de catalasa en gradientes de sacarosa nuclear y mitocondrial. La actividad enzimática de los picos de proteínas en gradientes nuclear (P1-P3) y mitocondrial (P4-P6) se determinó a partir de la altura de la columna de espuma formada (mm) por miligramo de proteína en tampón fosfato con Tritón X-100 y peróxido de hidrógeno. La desviación estándar se calculó a partir de dos réplicas biológicas (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b).



Anexo 5. Microscopía electrónica de transmisión de gradientes de sacarosa nuclear, mitocondrial y microsomal. Los picos de proteínas de los gradientes nuclear (A [P1], B [P2], C [P3]), mitocondrial (D [P4], E [P5], F [P6]) y microsomal (G [P7], H [P8], I [P9]) se caracterizaron de acuerdo a su morfología como núcleo (N), mitocondria (MT), estructura tubular (TS), cisterna (CS), retículo endoplásmico (RE) y vesículas de baja (LDV), media (MDV) y alta densidad (HDV) (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020b).



Anexo 6. Métodos de precipitación y sus modificaciones (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020c).

Método de precipitación	Abreviatura	Modificaciones con respecto al método de referencia	Variantes evaluadas
<i>Metanol-cloroformo</i> ^a	M/C	Ninguna	1. E ^d 2. E + NaOH ^e 3. CD ^f 4. CD + NaOH 5. BU ^g 6. BU + NaOH 7. HU ^h 8. HU + NaOH
<i>Ácido tricloroacético-acetona</i> ^b	TCA-acetona	- Concentración final de TCA: 15% - La incubación con TCA se extendió a 16 h - Acetona al 80% en la solución de lavado - Se cambió la solución de solubilización por tampón IEF, para adaptar el protocolo a muestras de cultivo celular	1. E 2. E + NaOH 3. CD 4. CD + NaOH 5. CD + BU 6. CD + BU + NaOH 7. CD + HU 8. CD + HU + NaOH
<i>Acetona</i> ^c	Ninguna	- Acetona al 80% en las soluciones de precipitación y lavado - Un paso adicional de lavado	1. E 2. E + NaOH 3. CD 4. CD + NaOH 5. BU 6. BU + NaOH 7. HU 8. HU + NaOH

^a Método de referencia: Wessel, D. y Flügge, U. I. (1984).

^b Método de referencia: Mechin, V., Damerval, C. y Zivy, M. (2007).

^c Método de referencia: Crowell, A.M.J., Wall, M.J. y Doucette, A.A. (2013). Todos los procedimientos incluyen la adición de NaCl a una concentración final de 100 mM, antes de la precipitación con solventes

^d Protocolo estándar se refiere a la referencia original con las modificaciones indicadas en caso de que las presenten

^e Protocolo estándar con adición de NaOH antes del paso de solubilización del precipitado

^f Protocolo estándar con 5 ciclos de congelación/descongelación

^g Protocolo estándar con 10 ciclos de ultrasonido, de 10 seg cada uno, con intervalos de descanso de 10 seg, a 4 °C en un baño de ultrasonido

^h Protocolo estándar con 10 ciclos de ultrasonido, de 10 seg cada uno, con intervalos de descanso de 10 seg, en hielo, en un homogenizador ultrasónico

Anexo 7. Distribución de proteínas de células CHO en SDS-PAGE. Proteínas recuperadas tras precipitación con metanol-cloroformo (M/C) con ciclos de homogenizador ultrasónico (HU), el protocolo estándar (E) de acetona y la variante de TCA-acetona con ciclos de congelación/descongelación (CD), incluyendo en todos los casos pre-solubilización con NaOH. Los asteriscos indican bandas de proteínas con una abundancia diferente entre los carriles. Los valores de porcentaje sobre cada carril indican el porcentaje de abundancia de proteínas totales de cada muestra con respecto al homogenizado (100%), medido a partir de la intensidad obtenida en ImageJ v1.52a. SDS-PAGE representativo de 2 muestras biológicas. Carriles, 1: Marcador de peso molecular (PM), 2: homogenizado de células CHO, 3: M/C, 4: TCA-acetona, 5: acetona (Tomado de Pérez-Rodríguez *et al.*, 2020c).

