

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 38

Robert Janke

**Investigation of mammalian cell metabolism by
quantification of key metabolic enzyme activities**

Shaker Verlag
Aachen 2013

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2012

Copyright Shaker Verlag 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-1663-5

ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Bei der Kultivierung von Säugerzellen in glutaminhaltigen Medien werden große Mengen an Laktat und Ammonium in den Kulturüberstand ausgeschieden. Diese toxischen Nebenprodukte können sich nicht nur negativ auf die Zellvitalität und die Produktivität auswirken, sondern auch das Wachstum zu hohen Zelldichten verhindern. Verschiedene Produktionszelllinien, die für die Herstellung von biopharmazeutischen Produkten eingesetzt werden, können zum Beispiel auch mit Pyruvat (Pyr) anstelle von Glutamin (Gln) im Kulturmedium wachsen. Als Folge verbrauchen diese Zellen nicht nur weniger Glucose (Gluc), sie produzieren auch signifikant weniger Laktat und kein Ammonium.

Eine Möglichkeit, den Zellstoffwechsel und die zugrunde liegenden zellulären regulatorischen Mechanismen näher zu untersuchen, stellen Enzymaktivitätsstudien dar. Obwohl die Analyse von Enzymen relativ komplex ist und Hochdurchsatztechnologien für Enzymaktivitäten nicht überall zur Verfügung stehen, kann deren Messung wertvolle Informationen über Flussraten im Stoffwechselweg liefern, die für das Verständnis von metabolischen Netzwerken von großer Bedeutung sind. Darüber hinaus können Datensätze zu Enzymaktivitäten zusammen mit Proteom- und Metabolomdaten im Sinne eines systembiologischen Ansatzes in mathematische Modelle zum Zellmetabolismus integriert werden. Solche Modelle können Informationen über Stoffwechselwege liefern, die wichtig für die Optimierung von Zelllinien und Kulturmedien sind.

Die Zielsetzung der vorliegenden Studie bestand im Wesentlichen in der Charakterisierung der Wirkung von verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf die Aktivitäten von Schlüsselenzymen des Zentralstoffwechsels der Madin-Darby canine kidney (MDCK)-Produktionszelllinie. Auf Basis einer Hochdurchsatzplattform für Enzymaktivitätsmessungen in Pflanzenzellextrakten sollte zunächst eine effiziente Analyseplattform zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in Säugerzellen entwickelt werden. Eine geeignete Gruppierung von verschiedenen Enzymen sollte es ermöglichen, deren Aktivitäten mit einer gemeinsamen Messmethode nachzuweisen.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit befasste sich mit der Etablierung von sensitiven und auf Mikroplattenbasierenden Assays zur Messung von 28 Enzymen des zentralen Kohlenstoff- und Gln-Metabolismus in Säugerzellen. Die neue Hochdurchsatzplattform zur Bestimmung von Enzymaktivitäten bestand aus vier verschiedenen Cycling-Assays. Der Vorteil bei der Verwendung von enzymatischen Cycling-Assays und 96-Well Mikrotiterplatten lag in der hohen Sensitivität bei der Produktbestimmung (0,025 bis 0,4 nmol) und im Probendurchsatz. Aufgrund des Fehlens von Zellwänden in Säugerzellen war die Generierung von Proben im Vergleich zur Plattform für Pflanzenzellen einfacher. Zudem können kontinuierliche Zelllinien leicht unter kontrollierten Bedingungen wachsen. Auch waren entsprechende Versuche weit weniger zeitaufwendig als Experimente mit Pflanzen. Zellextrakte konnten stark verdünnt werden, so dass eventuelle Interferenzen durch andere Komponenten im Extrakt verringert sowie Über- und Unterschätzungen der tatsächlichen Enzymaktivität vermieden wurden. Da Substratkonzentrationen im Assay durchgehend auf einem annähernd konstanten Niveau gehalten werden konnten, wurden ferner mögliche Enzyminhibierungen durch zu hohe Produktkonzentrationen unterbunden. Um eine Inhibierung des zu untersuchenden Enzyms durch zu hohe Substratlevel zu vermeiden, wurde die maximal mögliche Substratkonzentration verwendet, bei der keine Inhibierung beobachtet wurde. Alle Enzymassays wurden mit MDCK-Zellextrakt optimiert und validiert.

Im Zuge der Entwicklung der Assay-Plattform für Säugerzellen wurde im zweiten Schritt der Arbeit ein wichtiges Kopplungsenzym für die Anwendung in sensitiven Glycerol-3-Phosphat (G3P)-Assays produziert, welches auch für zukünftige Studien zum Zellstoffwechsel Verwendung finden kann. Dazu wurde eine Glycerokinase (GK) aus *Pichia farinosa* mit einem 5-L Bioreaktor rekombinant in *Pichia pastoris* hergestellt. Das Enzym wurde anschließend mit einer Kombination aus Nickel-Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die spezifische Aktivität des finalen Produkts lag bei etwa 200 Units pro mg an Protein. Das pH- und Temperaturoptimum lag bei 7,0 beziehungsweise 45 °C. Der effektivste Phosphatdonor für die Umwandlung von Glycerol in G3P war ATP, wobei auch ITP, UTP, GTP oder CTP genutzt werden konnte. Das Enzym zeigte mit UTP, GTP und CTP das Phänomen der negativen Kooperativität und konnte erfolgreich für die Messung der Pyruvatkinase-Aktivität in MDCK Zellen verwendet werden.

Im dritten Teil der Studie wurde die entwickelte Assay-Plattform für die Untersuchung der Wirkung von Medienwechsel auf Enzymaktivitäten des Gluc- und Gln-Metabolismus von adhären MDCK-Zellen genutzt. Dabei wurden die Zellen in Sechs-Well-Platten mit Gln- oder Pyr-haltigem GMEM-Medium bis zur exponentiellen und stationären Wachstumsphase kultiviert und die Aktivitäten von 28 metabolischen Enzymen in Zellextrakten untersucht. Vorangegangene Studien zu Stoffflussanalysen in MDCK-Zellen vermuteten unter anderem, dass dem Medium zugesetztes extrazelluläres Pyruvat direkt in den Citratsäurezyklus eingeht. Während des exponentiellen Wachstums in Pyr-haltigem Medium waren die Enzymaktivitäten des Pentosephosphatweges insgesamt höher, was auf einen erhöhten Fluss von Glucose-6-Phosphat in den oxidativen Teil dieses Stoffwechselweges hindeutete. Darüber hinaus zeigten die anaplerotischen Enzyme Pyruvatcarboxylase und Pyruvatdehydrogenase höhere zellspezifische Aktivitäten mit dem Pyr-haltigen Medium. Gesteigerte Aktivitäten wurden ebenfalls bei der NAD⁺-abhängigen Isocitratdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und Glutaminsynthetase in MDCK-Zellen mit Pyr als Kohlenstoff- und Energiequelle gefunden. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Anstieg in den Enzymaktivitäten höchstwahrscheinlich für die Kompensierung des Energiebedarfs der Zelle und zur Auffüllung des Gln-Pools benötigt wurde. Zudem waren die Aktivitäten der glutaminolytischen Enzyme Aspartat- und Alanintransaminase,

Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und des NADP⁺-abhängigen Malatenzyms (ME) geringer, was auf einen verminderten Gln-Stoffwechsel in mit dem Pyr-haltigen Medium kultivierten Zellen vermuten ließ.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Virus-Wirtszell-Interaktion und der Zellantwort während der frühen Virusinfektion von adhärennten MDCK-Zellen. Frühere Studien zu Infektionsexperimenten mit Influenzaviren zeigten deutliche Änderungen im Proteom sowie im Verlauf von intra- und extrazellulären Metaboliten während der späten Infektionsphase in MDCK-Zellen. Konfluente Zellen wurden in der vorliegenden Studie mit einem Influenza-A-Virus (H1N1) bei einer hohen Infektionsmultiplizität infiziert und hinsichtlich Aktivitätsänderungen von Enzymen des Zentralstoffwechsels untersucht. Virusinfizierte Zellen zeigten eine Hochregulierung einzelner Schlüsselenzyme, die für die Produktion des Reduktionsäquivalents NADPH (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und ME) und Acetyl-CoA (Citratlyase und Acetat-CoA-Ligase), ein wichtiger Vorläufermetabolit für die Lipid- und Cholesterolsynthese, verantwortlich sind. Da sich Viren unter Mitnahme von Zellmembranbestandteilen (Lipidhülle) von der Wirtszelloberfläche ablösen, scheint die Synthese von Fettsäuren und Cholesterin eine wichtige Rolle bei der Replikation von Influenzaviren in MDCK-Zellen zu spielen.

Zusammenfassend konnte eine Hochdurchsatzplattform für die Bestimmung von Enzymaktivitäten in Säugerzellen etabliert werden, mit der metabolische Zustände von Produktionszellen näher charakterisiert werden können. Dies kann anschließend dazu verwendet werden, um zelluläre Prozesse besser zu verstehen und Zelllinien und Kulturmedien zu optimieren. Darüber hinaus können die Datensätze zu Enzymaktivitäten zusammen mit Daten zu intra- und extrazellulären Metabolitkonzentrationen für die Erstellung und Validierung von mathematischen Modellen zum Zellstoffwechsel von Nutzen sein.