

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

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur

(Dr.-Ing.)

von: Dipl.-Ing. Robert Janke

geb. am: 07.03.1983 in Dresden

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission: Prof. Dr.-Ing. Andreas Seidel-Morgenstern

Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl

Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors

Dr.-Ing. Aljoscha Wahl

eingereicht am: 20.06.2012

Promotionskolloquium am: 07.12.2012

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

Danksagung

Diese Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Bioprozesstechnik-Gruppe des Max-Planck-Instituts für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg angefertigt. Ich danke allen herzlichst, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken und unter exzellenten Forschungsbedingungen zu promovieren. Die dabei mir zugestandenen Freiräume während meiner Studien sowie die stetige Diskussionsbereitschaft habe ich sehr geschätzt.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors sowie Herrn Dr.-Ing. Aljoscha Wahl danke ich vielmals für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit. Herrn Prof. Dr.-Ing. Andreas Seidel-Morgenstern danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Frau Dr. rer. nat. habil. Yvonne Genzel danke ich sehr für ihre Betreuung und Unterstützung meiner Arbeiten sowie die anregenden Diskussionen und Ratschläge bei der Gestaltung und beim Verfassen der wissenschaftlichen Beiträge.

Herrn Prof. Dr. Mark Stitt, Herrn Dr. Yves Gibon und Herrn Dr. John Lunn der Abteilung Metabolische Netzwerke (Systemregulation) des Max-Planck-Instituts für molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam/Golm danke ich sehr für die aktive Unterstützung beim Wissens- und Methodentransfer im Rahmen der Plattform für Enzymaktivitätsmessungen.

Allen technischen AssistentInnen, insbesondere Ilona Behrendt, Claudia Best, Susanne König und Nancy Wynserski sei herzlich gedankt für die stets gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe bei der Durchführung der Analysen und Kultivierungen im Labor.

Besonders danke ich Christine Rühmkorf, Peter Schäfer, Janine Seidemann, Nadine Händel und Maria Wetzel für ihr Engagement im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten und den damit verbundenen Beiträgen zu dieser Arbeit.

Allen Kollegen in der Bioprozesstechnik-Gruppe, insbesondere Björn Heynisch, Marc Rüger, Jana Rödiger und Susann Freund danke ich vielmals für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Anregungen.

Dem BMBF danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des FORSYS-Projekts „Systemanalyse von Signal- und Regulationsnetzwerken“ (FKZ: 0313922).

Der größte Dank gilt meiner lieben Familie.

Meinen Eltern

Kurzfassung

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 adhärennten 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 Enzym-

aktivitäten 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 Cholesterolbiosynthese, verantwortlich sind. Da sich Viren unter Mitnahme von Zellmembranbestandteilen (Lipidhülle) von der Wirtszelloberfläche ablösen, scheint die Synthese von Fettsäuren und Cholesterol 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.

Abstract

During growth of mammalian cells in glutamine-containing media, large amounts of lactate and ammonia are secreted into the culture supernatant. These toxic by-products not only affect cell viability and productivity but often also prevent growth to high cell densities. However, different production cell lines typically used for manufacturing of biopharmaceuticals and viral vaccines can also grow on pyruvate (Pyr) instead of glutamine (Gln) in the culture medium. As a consequence, these cells not only release no ammonia but glucose (Gluc) consumption and lactate production are also reduced significantly.

One possibility to better understand cell metabolism and the cellular regulatory mechanisms that govern cell growth is to perform enzyme activity studies. Although the analysis of enzymes is more complex and high-throughput technologies for enzyme activities are not commonly available, enzyme activities provide information on pathway flux rates, which is important for the understanding of metabolic networks. Furthermore, the integration of enzyme activity data into mathematical models of cell metabolism together with proteome and metabolome data by systems biology approaches will significantly contribute towards a better understanding of metabolic pathways relevant for cell line and media optimization.

The objective of this thesis was to characterize the effect of different culture conditions on key enzyme activities of central metabolic pathways in the Madin-Darby canine kidney (MDCK) production cell line. On the basis of a high-throughput platform for measuring enzyme activities in plant cell extracts, the work first involved the development of a platform to determine enzyme activities in mammalian cells including grouping of various enzymes that share a common detection method.

The first part of this work addressed the establishment of sensitive microplate-based assays to measure the activities of 28 enzymes involved in central carbon and Gln metabolism of mammalian cells. The new high-throughput platform for enzyme activity measurements consisted of four different cycling assays. The use of enzymatic cycling methods combined with the application of 96-well microplates allowed a more sensitive (0.025 to 0.4 nmol product) and faster determination of enzyme activities than most of the existing assays. Compared to the platform for plant cells, sample preparation steps were less laborious for mammalian cell lines as disruption of cell walls was not required. Furthermore, continuous cell lines can be easily grown under controlled conditions and studies were not as time-consuming as experiments using plant cells. Cell extracts could be highly diluted, which

reduced possible interferences caused by other components of the extract and additionally minimized under- or overestimation of the actual enzyme activity. Furthermore, possible enzyme inhibition by high concentration of a product was prevented since substrate concentrations could be maintained at a near constant level throughout the assay. Enzyme inhibition by high substrate levels was avoided by using the maximum possible substrate concentration at which no inhibition was observed. All enzyme assays were validated and optimized with extracts from adherent MDCK cells.

Within the development of the assay platform for mammalian cells, the second step of this work was comprised of the production of an important coupling enzyme to exploit all the benefits of the glycerol 3-phosphate (G3P) cycle. Therefore, a glycerokinase (GK) from *Pichia farinosa* was produced recombinantly in *Pichia pastoris* using a 5-L stirred-tank bioreactor. The enzyme was purified by a combination of nickel affinity chromatography and anion exchange chromatography. The specific activity of the final preparation was approximately 200 units per mg protein. The pH and temperature optimum was determined as 7.0 and 45 °C, respectively. Although the most effective phosphoryl group donor tested was ATP, GK from *P. farinosa* could also utilize ITP, UTP, GTP, or CTP to produce G3P. The kinetic properties of the enzyme with respect to UTP, GTP, and CTP suggested that GK exhibited negative cooperativity as double reciprocal plots showed a biphasic response to increasing nucleoside triphosphate concentrations. Finally, the homogeneous enzyme preparation was successfully applied to measure the specific activity of pyruvate kinase (PK) in MDCK cell extracts by coupling the PK-induced ATP production to the formation of G3P.

In the third stage of this thesis, the developed assay platform was used to investigate the impact of media changes on Gluc and Gln metabolism of adherent MDCK cells. Therefore, the cells were grown to stationary and exponential phases in six-well plates in GMEM supplemented with Gln or Pyr, and 28 key metabolic enzyme activities of cell extracts were analyzed. Previous studies on MDCK cell metabolism focused, for example, on the measurement of intracellular metabolites or on metabolic flux models. Evaluation of flux distributions suggested that the additional extracellular Pyr enters the TCA cycle directly, whereas most of the consumed Gluc is excreted as lactate in MDCK cells. During exponential cell growth in Pyr-containing medium, the overall activity of the pentose phosphate pathway was up-regulated, which suggested that more glucose 6-phosphate was channeled into the oxidative branch. Furthermore, the anaplerotic enzymes pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase showed higher cell-specific activities with Pyr.

Increased specific activities were also found for NAD^+ -dependent isocitrate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in MDCK cells grown with Pyr. It could be assumed that the increase in enzyme activities was most likely required to compensate for the energy demand and to replenish the Gln pool. Moreover, the activities of the glutamolytic enzymes aspartate transaminase, alanine transaminase, malic enzyme (ME) and phosphoenolpyruvate carboxykinase were decreased in MDCK cells grown with Pyr, which seemed to be related to a decreased Gln metabolism.

The last part of this work dealt with the investigation of virus-host cell interactions and the cell response during early virus infection in adherent MDCK cells. Previous infection experiments with influenza viruses clearly showed proteome alterations as well as changes in intra- and extracellular metabolites during late virus infection in MDCK cells. In this study, confluent cells were infected with an influenza A (H1N1) virus at a high multiplicity of infection, and key metabolic enzyme activities of cell extracts were analyzed. Virally infected cells showed an up-regulation of some key enzymes producing the reducing equivalent NADPH (glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and ME) and acetyl-CoA (citrate lyase and acetate-CoA ligase), a precursor needed for lipid and cholesterol biosynthesis. It seemed that the synthesis of fatty acids and cholesterol plays a crucial role for the replication of influenza viruses in adherent MDCK cells as they acquire lipid envelopes from their host cells (specific regions of the apical membrane) during budding.

Taken together, a high-throughput platform for the measurement of enzyme activities in mammalian cells was established where metabolic states of production cell lines can now be further characterized. This can then be used to improve the understanding of metabolic pathways relevant for cell line and media optimization. Furthermore, valuable datasets on enzyme activities together with data on intra- and extracellular metabolite concentrations will support the validation of mathematical models of cellular metabolism in systems biology approaches.

1	<i>Introduction</i>	1
2	<i>Background and Theory</i>	6
2.1	Metabolism in mammalian cell culture	6
2.1.1	Glucose metabolism: glycolysis and pentose phosphate pathway	7
2.1.2	Glutamine metabolism: glutaminolysis	11
2.1.3	Metabolic waste products of <i>in vitro</i> cultured cell lines	13
2.1.3.1	Ammonium and lactate	13
2.1.3.2	Measures to reduce toxic by-product formation during cultivation	15
2.1.4	Cell metabolism under stress conditions: viral infection	16
2.1.5	Analytical tools to measure cell metabolism	19
2.2	Measuring enzyme activities in mammalian cells	23
2.2.1	The Michaelis-Menten equation	24
2.2.2	Graphical determination of K_m and V_{max}	26
2.2.3	Key enzymes and metabolic fluxes	28
2.2.4	Determination of maximum enzyme activities	31
2.2.4.1	Overview on available assay procedures	31
2.2.4.2	Continuous and discontinuous assay systems	32
2.2.4.3	Increasing the sensitivity by enzymatic cycling	33
2.2.4.4	Coupling enzymes	36
2.3	The <i>Pichia pastoris</i> expression system	37
3	<i>Materials and Methods</i>	39
3.1	Cell line and culture media	39
3.2	Cell culture	39
3.3	Virus culture	40
3.4	Analytical techniques	40
3.4.1	Cell concentration and cell viability	40
3.4.2	Extracellular metabolites	41
3.4.3	Virus titer	41
3.4.4	Protein concentration	42
3.5	Specific growth rate, doubling time and yield coefficient	42
3.6	Intracellular enzyme activity measurements	43
3.6.1	Preparation of cell-free crude extract	43
3.6.2	Pipetting scheme for enzyme assays	44
3.6.2.1	Indirect assays with enzymatic cycling	44
3.6.2.2	Direct assays	45
3.6.3	Enzyme activity assays	46

3.6.3.1	Citrate synthase (CS: EC 2.3.3.1)	46
3.6.3.2	Citrate lyase (CL: EC 2.3.3.8)	47
3.6.3.3	NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase (NAD-ICDH: EC 1.1.1.41)	47
3.6.3.4	Fumarase (FUM: EC 4.2.1.2)	47
3.6.3.5	Glutamate dehydrogenase (GLDH: EC 1.4.1.2).....	48
3.6.3.6	Alanine transaminase (AlaTA: EC 2.6.1.2).....	48
3.6.3.7	Aspartate transaminase (AspTA: EC 2.6.1.1).....	48
3.6.3.8	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK: EC 4.1.1.32)	49
3.6.3.9	Acetate-CoA ligase (ACoAL: EC 6.2.1.1)	49
3.6.3.10	Hexokinase (HK: EC 2.7.1.1).....	50
3.6.3.11	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH: EC 1.1.1.49).....	50
3.6.3.12	6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH: EC 1.1.1.44)	50
3.6.3.13	NADP ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH: EC 1.1.1.42).....	51
3.6.3.14	Malic enzyme (ME: EC 1.1.1.40).....	51
3.6.3.15	Phosphofructokinase (PFK: EC 2.7.1.11).....	51
3.6.3.16	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA: EC 4.1.2.13)	52
3.6.3.17	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH: EC 1.2.1.12).....	52
3.6.3.18	Pyruvate kinase (PK: EC 2.7.1.40).....	52
3.6.3.19	Transketolase (TK: EC 2.2.1.1)	53
3.6.3.20	Transaldolase (TA: EC 2.2.1.2)	53
3.6.3.21	Glycerokinase (GK: EC 2.7.1.30).....	54
3.6.3.22	Glutaminase (GLNase: EC 3.5.1.2)	54
3.6.3.23	Glutamine synthetase (GS: EC 6.3.1.2).....	54
3.6.3.24	Lactate dehydrogenase (LDH: EC 1.1.1.27).....	55
3.6.3.25	Malate dehydrogenase (MDH: EC 1.1.1.37)	55
3.6.3.26	Phosphoglucose isomerase (PGI: EC 5.3.1.9)	55
3.6.3.27	Triose-phosphate isomerase (TPI: EC 5.3.1.1).....	56
3.6.3.28	Pyruvate dehydrogenase (PDH: EC 1.2.4.1)	56
3.6.3.29	Pyruvate carboxylase (PC: EC 6.4.1.1)	56
3.6.4	Cycling assay reagents	57
3.6.4.1	NAD ⁺ cycling assay	57
3.6.4.2	NADP ⁺ cycling assay.....	57
3.6.4.3	G3P cycling assay	58
3.6.4.4	Glu cycling assay	58
3.6.5	Expression of results	59
3.7	Cloning, expression, purification, and characterization of <i>Pichia farinosa</i> glycerokinase.....	59
3.7.1	Strains, plasmids, enzymes and reagents	59
3.7.2	Construction of the expression vector	60
3.7.3	Transformation of <i>Pichia pastoris</i>	61
3.7.4	Production of <i>Pichia farinosa</i> glycerokinase by <i>Pichia pastoris</i>	62
3.7.5	Purification of His ₆ -tagged recombinant glycerokinase.....	63
3.7.6	Protein analysis	64
3.7.7	Determination of glycerol and methanol	64

3.7.8	Enzymatic characterization of recombinant His ₆ -tagged GK.....	65
4	Results.....	66
4.1	Development of an enzymatic assay platform for mammalian cells	66
4.1.1	Optimization of extraction and reaction conditions for enzymes from mammalian cells.....	67
4.1.2	Establishment of a new glutaminase assay	72
4.1.2.1	Optimization of cycling reagent concentrations	73
4.1.2.2	Calibration curve with standard liquid samples.....	74
4.1.2.3	Confirmation with cell extract	75
4.1.3	Validation of the remaining enzyme assays.....	77
4.1.4	Application of the established enzyme platform on MDCK cells	85
4.2	Production of <i>Pichia farinosa</i> glycerokinase for the application in sensitive cycling assays	89
4.2.1	Construction of expression vector for His ₆ -tagged glycerokinase.....	90
4.2.2	Glycerokinase production by exponential feeding of methanol	91
4.2.3	Purification of recombinant glycerokinase	92
4.2.4	Biochemical characterization of glycerokinase	95
4.2.5	Use of the recombinant glycerokinase as a coupling enzyme	97
4.3	Central metabolic enzymes in MDCK cells under different cultivation conditions	98
4.3.1	Cell growth in six-well plates in glutamine and pyruvate-containing medium..	98
4.3.1.1	Cell densities	99
4.3.1.2	Extracellular metabolites.....	100
4.3.1.3	Cellular protein concentration.....	103
4.3.2	Maximum enzyme activities in glutamine- and pyruvate-containing medium	104
4.3.2.1	Glycolysis.....	107
4.3.2.2	Pentose phosphate pathway	108
4.3.2.3	Tricarboxylic acid cycle.....	109
4.3.2.4	Glutaminolysis	111
4.4	Influence of influenza virus infection on key metabolic enzyme activities in MDCK cells.....	113
4.4.1	Cell numbers and virus replication	113
4.4.2	Maximum enzyme activities in influenza infected cells	114
5	Discussion.....	119
5.1	Development of an enzymatic assay platform for mammalian cells	119
5.1.1	Development of 28 enzyme assays.....	121
5.1.2	Advantages and disadvantages of enzymatic cycling assays	123
5.1.3	Enzyme activities in confluent MDCK cells	124

5.2 Production of <i>Pichia farinosa</i> glycerokinase: “missing enzyme” for PK analysis in G3P cycling assay.....	127
5.2.1 Biochemical characterization of glycerokinase	129
5.2.2 Use of the recombinant glycerokinase as a coupling enzyme	130
5.3 Effect of different cultivation conditions on central metabolic enzymes in MDCK cells.....	131
5.3.1 Glucose metabolism.....	132
5.3.2 Glutamine metabolism	135
5.4 Influence of influenza virus infection on key metabolic enzyme activities in MDCK cells.....	138
6 Conclusions.....	143
7 Outlook.....	147
List of Figures and Tables	149
References.....	152
Appendix	169