

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Transiente Transfektion von primären Hepatozyten, HepG2
und HeLa-Zellen mit mRNA-kodierten Enzymen zur in vitro Evaluation einer
Enzymersatztherapie bei Phenylketonurie.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Daniel Frank
aus Villach

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

14. Juli 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
1 Einleitung und Ziel der Dissertation	1
1.1 mRNA-basierte molekulare Therapie.....	1
1.2 Enzymersatztherapie für Phenylketonurie - Ziel dieser Dissertationsanschrift.....	2
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Hyperphenylalaninämie.....	3
2.1.1 Der Phenylalanin-Stoffwechsel.....	4
2.1.2 Die enzymatische Funktion der Phenylalaninhydroxylase	5
2.1.3 Struktur der Phenylalaninhydroxylase und Pathogenese	5
2.1.4 Klinische Verlaufsformen.....	6
2.2 Therapieansätze der Phenylketonurie	7
2.2.1 Diätische Behandlung.....	8
2.2.2 Protein-Substitution	8
2.2.3 Enzymersatz durch Organ- oder Zelltransplantation.....	8
2.2.4 Substitution mit dem Ko-Faktor BH ₄	9
2.2.5 Enzymsubstitutionstherapie.....	9
2.2.6 Gentherapie	10
2.2.7 mRNA-Enzymersatztherapie für PKU	11
2.3 mRNA-Therapien	11
2.3.1 Struktur und Herstellung der IVT-mRNA	12
2.3.2 Modifikation der mRNA zur Verbesserung der Stabilität	13
2.3.3 Immunologische Relevanz der IVT-mRNA.....	15
2.3.4 mRNA-Transport.....	16
2.3.5 <i>In vitro</i> Evaluation von IVT-mRNAs.....	17
3 Material	18
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
3.1.1 Geräte.....	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
3.2 Chemikalien und Medien.....	20
3.2.1 Chemikalien	20
3.2.2 Medien	20
3.3 Sonstige Materialien.....	21
3.4 Software	22

4	Methoden	23
4.1	Kultivierung permanenter Zelllinien.....	23
4.1.1	HeLa	23
4.1.2	HepG2	23
4.2	Isolierung muriner Hepatozyten	23
4.3	Kultivierung primärer muriner Hepatozyten	25
4.4	Optimierung der Kultivierung	25
4.5	Isolierung nicht-parenchymatischer Zellen (NPC)	26
4.6	Kultivierung nicht-parenchymatischer Zellen (NPC)	26
4.7	Transfektion mit mRNA durch Liponanopartikel	27
4.8	Fluoreszenz Mikroskopie	28
4.9	Ernte der rekombinanten Proteine	28
4.10	Western Blotting.....	28
4.10.1	Gelelektrophorese	28
4.10.2	Gel Transfer.....	29
4.10.3	Revealing-Prozess.....	30
4.11	Durchflusszytometrie.....	30
4.12	Konfokale Mikroskopie.....	31
4.13	L-Phenylalanin Assay.....	31
5	Ergebnisse.....	33
5.1	Transfektion permanenter Zelllinien.....	33
5.1.1	Nachweis der therapeutischen Proteine.....	35
5.2	Transfektion primärer Zelllinien.....	37
5.2.1	Primäre murine Hepatozyten.....	37
5.2.2	Primäre murine NPC	41
5.3	Nachweis der Enzymlokalisierung in Zellen.....	41
5.4	Nachweis der Funktion rekombinanter PAH.....	42
5.4.1	L-Phenylalanin Assay	42
6	Diskussion	47
6.1	Etablierung eines Systems zum Proteinnachweis	47
6.1.1	Nachweis des Signalproteins GFP	47
6.1.2	Nachweis von therapeutischen Proteinen	48
6.1.3	Primäre Zelllinien als Korrelat zum Tiermodell.....	49
6.2	Etablierung einer Methode zur Funktionsanalyse der therapeutischen Proteine	51
6.2.1	Enzymaktivität und Kinetik.....	53
6.3	Präklinisches Screening neuer mRNA-Konstrukte	55
6.4	Ausblick und Herausforderungen.....	55

7	Zusammenfassung.....	57
8	Literaturverzeichnis	58
9	Anhang.....	68
10	Danksagung.....	69
11	Tabellarischer Lebenslauf	70

Abkürzungsverzeichnis

ARCA	Anti-reverse Cap Analoga
AvPAL	Anabaena variabilis Phenylalaninlyase
BH ₂	Dihydrobiopterin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
CFTR	engl. cystic fibrosis transmembrane conductor regulator
DHPR	Dihydropteridin-Reduktase
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DPBS	engl. Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTT	Dithiothreitol
GFP	engl. green fluorescent protein
GMP	Glykomakropeptid
HBSS	engl. Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HPA	Hyperphenylalaninämie
HhPAH	humane Phenylalaninhydroxylase
IVT	<i>in vitro</i> -Transkription
LNAAs	engl. long neutral amino acids
MmPAH	murine Phenylalaninhydroxylase
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
NPC	engl. non-parenchymal Cells
ORF	engl. open reading frame
PAH	Phenylalaninhydroxylase
PCD	Pterin-Carbinolamin-Dehydratase
PCR	engl. polymerase chain reaction
PH	Primäre Hepatozyten
PKR	Protein Kinase R
PKU	Phenylketonurie
rhEGF	recombinant humane Epithelial Growth Factor
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TLR	engl. Toll-like Rezeptor
UTR	engl. untranslated region
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phenylalanin-Stoffwechsel.....	4
Abbildung 2: Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin.....	5
Abbildung 3: Therapeutische Ansätze zur Behandlung der PKU	7
Abbildung 4: Isolation primärer Leberzellen.....	25
Abbildung 5: In vitro Transfektion mit 4 verschiedenen mRNAs.....	27
Abbildung 6: In vitro System zur Herstellung rekombinanter Proteine.....	28
Abbildung 7: Anordnung Western Blot.....	29
Abbildung 8: PAH Aktivitäts-Assay Arbeitsablauf.....	32
Abbildung 9: Gating Strategie.....	33
Abbildung 10: HeLa Zellen kultiviert für 24h und transfiziert mit GFP mRNA für 24h	34
Abbildung 11: HepG2 Zellen kultiviert für 24h und transfiziert mit GFP mRNA für 24h	34
Abbildung 12: FACS-Analyse von HeLa Zellen	35
Abbildung 13: FACS-Analyse von HepG2 Zellen.....	35
Abbildung 14: Westernblot zum Nachweis therapeutischer Proteine	36
Abbildung 15: Westernblot zum Nachweis therapeutischer Proteine	36
Abbildung 16: Westernblot zum Nachweis therapeutischer Proteine	37
Abbildung 17: Primäre Hepatozyten kultiviert für 24h und mit GFP mRNA transfiziert.....	38
Abbildung 18: Primäre Hepatozyten transfiziert mit GFP-mRNA	38
Abbildung 19: FACS-Analyse von primären Hepatozyten transfiziert mit GFP-mRNA	39
Abbildung 20: PH-Kultur supplementiert mit hrEGF mit Fluoreszenz.....	40
Abbildung 21: primäre murine Hepatozyten nativ und unter Fluoreszenzlicht.....	40
Abbildung 22: FACS-Analyse von primären murinen Hepatozyten	40
Abbildung 23: NPCs transfiziert mit GFP mRNA.....	41
Abbildung 24: Konfokalmikroskopische Bilder von HeLa Zellen.....	41
Abbildung 25: Normalisierter Tyrosin-Anstieg im Kulturmedium	42
Abbildung 26: Enzymaktivität der MmPAH nach 24h.....	43
Abbildung 27: Enzymaktivität bei unterschiedlichen BH ₄ Konzentrationen.....	44
Abbildung 28: Enzymaktivität der HhPAH nach 24h	44
Abbildung 29: Enzymaktivität der AvPAL nach 24h	45
Abbildung 30: Enzymaktivität der MmPAH nach 48h.....	46
Abbildung 31: Enzymaktivität der MmPAH nach 24h und 48h	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	18
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 3: Chemikalien	20
Tabelle 4: Ausgangsmaterialien	20
Tabelle 5: Supplementierte Medien	21
Tabelle 6: Anästhetika	21
Tabelle 7: Enzyme, Antikörper und Sonstige	22
Tabelle 8: Software	22
Tabelle 9: Initialer L-Phen Assay	68
Tabelle 10: Verschiedene BH ₄ -Konzentrationen.....	68

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

1.1 mRNA-basierte molekulare Therapie

Messenger RNA (mRNA) ist im zentralen Dogma der molekularen Biologie der Vermittler zwischen dem Erbgut (DNA) und den funktionierenden Proteinen der Zelle (Hajj and Whitehead, 2017). DNA wird zu mRNA transkribiert und diese wird anschließend in ein Protein translatiert. Sie ist weder funktionierendes Endprodukt noch permanenter Bauplan, doch exakt dieser transiente Charakter verleiht der mRNA enorme Flexibilität und breitere therapeutische Einsatzmöglichkeiten als fast jede andere bekannte Medikation (Hajj and Whitehead, 2017).

Die Translation von exogen applizierter mRNA wurde zuerst 1970 in Froscheiern und Oozyten nachgewiesen (Gurdon et al., 1971). Neben dem immunologischen Ansatz dendritische Zellen mithilfe von mRNA effektiv mit Tumorantigenen zu beladen (Boczkowski et al., 1996, Conry et al., 1995) wurde 1990 die erste direkte Proteinexpression *in vivo* demonstriert (Wolff et al., 1990). Zwei Jahre später konnte mit der Therapie von Vasopressin-Mangel in Mäusen der erste Nachweis für eine potenzielle mRNA-basierte Proteinersatztherapie erbracht werden (Jirikowski et al., 1992).

Dabei ist und war der limitierende Faktor der Ersatztherapien die Immunogenität der mRNA, die durch RNA-Sensoren (TLR, RIG-I, PKR) vermittelt wird (Alexopoulou et al., 2001, Diebold et al., 2004, Hornung et al., 2006). Durch Nukleosidmodifikation kann die mRNA jedoch so verändert werden, dass bei minimaler Immunogenität eine hohe Expression der rekombinanten Proteine erreicht wird (Kariko et al., 2005).

Die grundsätzliche Anwendbarkeit einer molekularen, mRNA-basierten Therapie konnte in ersten *in vivo*-Experimenten bereits gezeigt werden: Nach der intraperitonealen Injektion von Erythropoetin-mRNA in Mäusen konnte das Protein an den drei darauffolgenden Tagen in deren Serum nachgewiesen werden (Thess et al., 2015). Die Injektion bewirkte nicht nur eine Erythropoetin-Expression, sondern auch eine Veränderung physiologisch relevanter Parameter und damit den Nachweis der Funktion des Proteins. So kam es sowohl zu einem Anstieg der Retikulozyten nach vier Tagen als auch zu einem starken Anstieg des Hämokrit nach 18 Tagen in den therapierten Mäusen (Thess et al., 2015). Trotz wiederholter Applikation von mRNA in höheren Dosen konnte keine schädliche Stimulation des Immunsystems beobachtet werden (Thess et al., 2015).

Des Weiteren konnte in einer anderen Arbeit der rasche Anstieg von Serumantikörpertitern nach passiver Immunisierung durch in Liponanopartikeln verpackte mRNAs in drei verschiedenen Indikationen nachgewiesen werden. Die hohen und langanhaltenden Antikörpertiter sprechen für einen prophylaktischen und therapeutischen Schutz vor den entsprechenden Erkrankungen (Botulinumintoxikation, letale Tollwutinfektion bzw. einer letalen Tumoringektion) (Thran et al., 2017).

Im Gegensatz zu den auf mRNA basierenden Immuntherapien und Impfungen gegen Tumoren ist die Mehrheit der mRNA-codierten Proteinersatztherapien noch in der präklinischen Entwicklung. Moleküle, die es bis in klinische Studien geschafft haben, sind mRNAs, die für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) oder den cystic fibrosis transmembrane conductor regulator (CFTR) codieren (Hajj and Whitehead, 2017).

1.2 Enzyersatztherapie für Phenylketonurie - Ziel dieser Dissertationsanschrift

Mit dieser Arbeit soll eine Enzyersatztherapie für Phenylketonurie (PKU) durch Applikation von mRNA-Konstrukten für die Proteine murine Phenylalaninhydroxylase (MmPAH) und humane Phenylalaninhydroxylase (HhPAH) evaluiert werden. mRNAs für die Proteine Green fluorescent protein (GFP) und Phenylalaninlyase (AvPAL) werden hierbei als Kontroll- und Testproteine verwendet.

Die Hauptkriterien für die erfolgreiche Nutzung von mRNA als Plattform in der Proteinersatztherapie sind sowohl eine erfolgreiche Aufnahme der therapeutischen mRNA in das Zytoplasma als auch eine effektive Translation des Moleküls und eine vernachlässigbare Toxizität für die Zelle. Das erste Hauptziel dieser Arbeit ist somit der Nachweis der Proteine *in vitro*. Dafür sollen zwei permanente und zwei primäre Zelllinien verwendet werden.

Das zweite Hauptziel dieser Arbeit ist die Überprüfung der Funktion der translatierten Enzyme. Dafür soll ein Enzymtest etabliert werden, mit dem die Stoffwechselprodukte und -edukte und somit die Funktion der entstandenen Enzyme nachgewiesen werden kann.

Ferner soll so eine Grundlage geschaffen werden, das pharmakokinetische Verhalten und die Halbwertszeit der therapeutischen mRNAs *in vivo* einschätzen zu können und damit eine Vorselektion der *in vivo* zu prüfenden Konstrukte zu ermöglichen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Hyperphenylalaninämie

Die Phenylketonurie (PKU) ist eine angeborene Erkrankung des Aminosäurestoffwechsels, die durch eine fehlende oder nicht funktionsfähige Phenylalaninhydroxylase (PAH) gekennzeichnet ist. Dieser Defekt betrifft eines von 10.000 Neugeborenen in der kaukasischen Bevölkerungsgruppe, wird autosomal-rezessiv vererbt und ist damit der häufigste genetische Defekt im Aminosäure-Stoffwechsel in der westlichen Bevölkerung (Zschocke, 2003, van Spronsen et al., 2021).

PAH bewirkt die Hydroxylierung der essenziellen Aminosäure L-Phenylalanin zu L-Tyrosin unter der Beteiligung des Ko-Faktors Tetrahydrobiopterin (BH_4). Eine partiell oder komplett fehlende enzymatische Aktivität von PAH, welche in 98% durch Punktmutationen im Phenylalaninhydroxylase-Gen ausgelöst wird (Scriver, 2007), führt zu einer pathologischen Akkumulation von L-Phenylalanin in Geweben und Körperflüssigkeiten. Dies wird als Hyperphenylalaninämie (HPA) bezeichnet und gilt als der primäre Biomarker der PKU. Dadurch wird ein alternativer metabolischer Signalweg induziert, der zur Bildung von Phenylketonen führt, die im Urin und Schweiß der Patienten anhand des charakteristischen Geruchs identifizierbar sind (Ho and Christodoulou, 2014). Bei 2% aller Fälle liegt eine Störung im Stoffwechsel des Ko-Faktors Tetrahydrobiopterin vor, man spricht von der atypischen Phenylketonurie, die hier nur am Rande erwähnt sein soll.

1966 wurde ein Früherkennungstest für PKU (Guthrie-Test) in die klinische Routine in deutschen Gesundheitseinrichtungen integriert, sodass genauere Analysen der Langzeitfolgen eines lebenslangen normalen Phenylalanin-Konsums nur begrenzt vorhanden sind und die PKU ein Beispiel für eine behandelbare genetische Erkrankung wurde (Muntau and Gersting, 2010, Scriver and Waters, 1999).

Aktuell wird das Neugeborenencreening mittels Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt. Dort gemessene Plasma-Phenylalanin Werte über 2 mg/dl (120 $\mu\text{mol/l}$) deuten bei einem Phenylalanin/Tyrosin-Verhältnis größer 3:1 auf das Vorliegen einer HPA hin. Neben der erwähnten Funktionseinschränkung des Enzyms PAH und einem Ko-Faktor-Mangel können auch exogene bzw. transitorische Ursachen zu einer HPA führen (Muntau et al., 2002).

2.1.1 Der Phenylalanin-Stoffwechsel

Die essenzielle Aminosäure Phenylalanin kommt in der Natur in der L-Form vor und ist in der D-Form für den Stoffwechsel nicht verwertbar. Phenylalanin ist eine aromatische Aminosäure und wird im weiteren Stoffwechsel zunächst zu Tyrosin hydroxyliert, was in weiterer Folge zur Synthese von Dopamin und den Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin benötigt wird. Zusätzlich nutzt der menschliche Körper Tyrosin zur Herstellung des Hautpigments Melanin (Abb. 1).

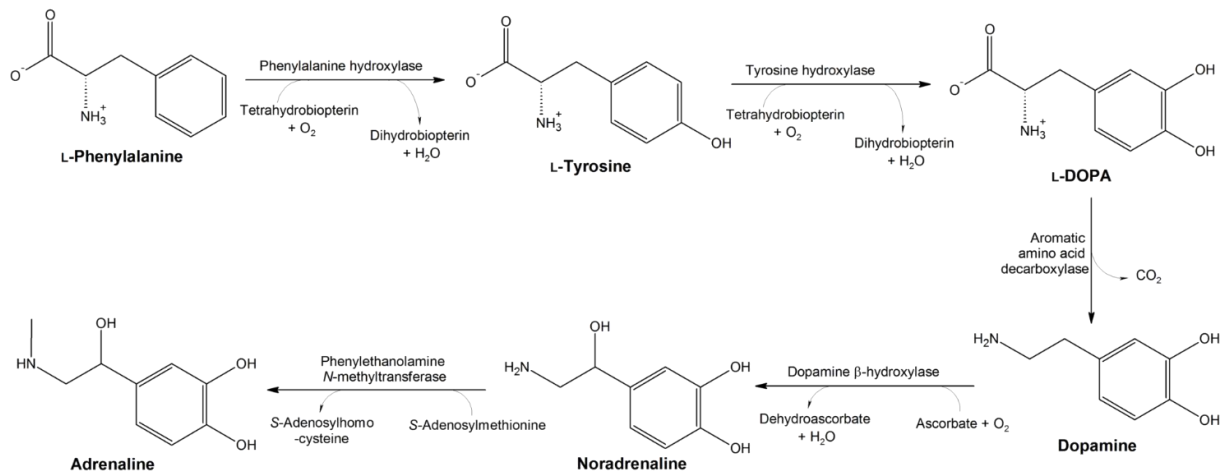


Abbildung 1: Phenylalanin-Stoffwechsel (LHchem, 2012)

Phenylalanin ist in Proteinen und Peptiden enthalten und liegt in Nahrungsmitteln fast ausschließlich als chemisch gebundenes L-Phenylalanin vor, nicht als freies Phenylalanin. Der Phenylalaninbedarf ist abhängig von der Tyrosinaufnahme. In normaler proteinhaltiger Nahrung sind sowohl Phenylalanin als auch Tyrosin vorhanden. 90% des über die Nahrung aufgenommenen Phenylalanins wird weiter zu Tyrosin abgebaut (Al Hafid and Christodoulou, 2015). Der menschliche Körper eines Erwachsenen kann jedoch auch seinen gesamten Tyrosinbedarf durch Phenylalanin decken. Somit ergibt sich eine Bandbreite des Phenylalaninbedarfs von 50mg/kg/d, wenn kein Tyrosin vorhanden ist und 10mg/kg/d, wenn Tyrosin im Überschuss bereitgestellt wird. Stehen Phenylalanin und Tyrosin im Verhältnis 60:40 zur Verfügung, kann eine optimale Verwertung stattfinden (Pencharz et al., 2007).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Phenylalanin-Metabolismus ist die Hydroxylierungsreaktion von Phenylalanin zu Tyrosin. Er wird durch die Phenylalaninhydroxylase (PAH) katalysiert und benötigt den Ko-Faktor Tetrahydrobiopterin (BH4) sowie molekularen Sauerstoff (Abb. 2).

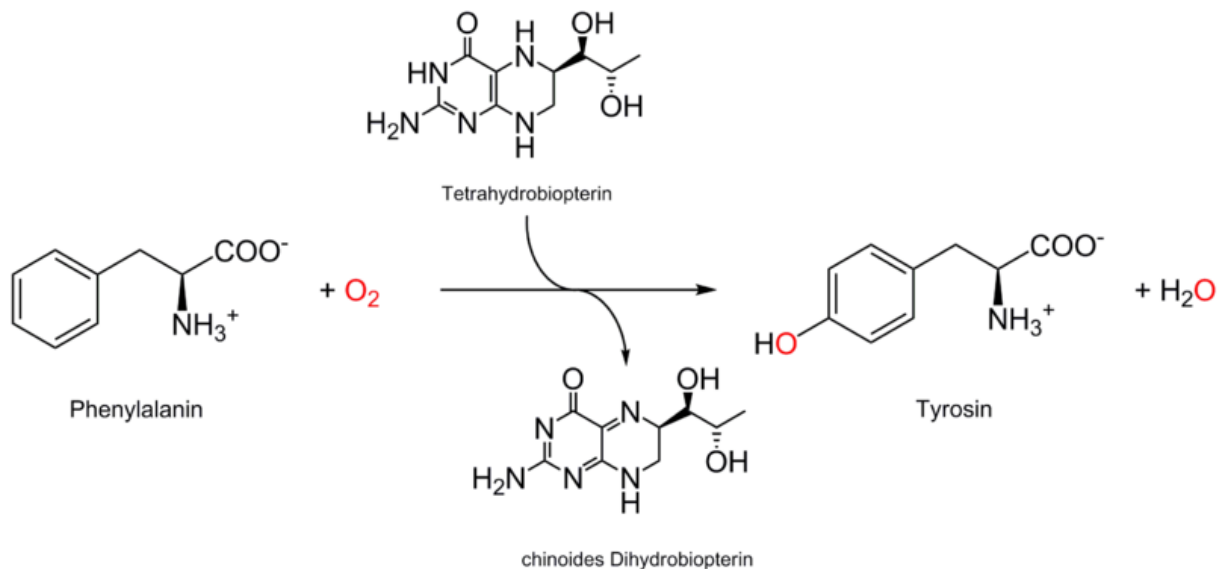


Abbildung 2: Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin (Yikrazuul, 2007)

2.1.2 Die enzymatische Funktion der Phenylalaninhydroxylase

Die PAH wird hauptsächlich in der Leber sowie zu einem geringen Teil in der Niere exprimiert und ist dort im Zytoplasma lokalisiert. Das Enzym gehört zu der Familie der aromatischen Aminosäurehydroxylasen, das sind Monooxygenasen, die molekularen Sauerstoff zur Katalyse einer Reaktion benötigen (Fitzpatrick, 2000, Udenfriend and Cooper, 1952). Außerdem ist die PAH auf Eisen angewiesen, welches während der Hydroxylierung von Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert wird. Die dazu benötigten Elektronen werden von dem Ko-Faktor BH_4 bereitgestellt. Ein Elektron wird für die Bildung von Wasser und Sauerstoff und ein weiteres für die Reduktion von Eisen verwendet. Dadurch wird der Ko-Faktor BH_4 zu Dihydrobiopterin (BH_2) oxidiert. Die Regeneration des Ko-Faktors wird unter anderem durch die Enzyme Pterin-Carbinolamin-Dehydratase (PCD) und Dihydropteridin-Reduktase (DHPR) katalysiert (Werner et al., 2011, Thony et al., 2000).

2.1.3 Struktur der Phenylalaninhydroxylase und Pathogenese

Die humane PAH ist ein homotetrameres Enzym, das aus zwei Dimeren aufgebaut ist und in einem Gleichgewicht aus Tetra- und Dimeren vorliegt (Erlandsen and Stevens, 1999). Jede monomerische Untereinheit ist ca. 50kDa groß und besteht aus drei funktionellen Domänen: Die N-terminale regulatorische Domäne (Aminosäuren 1-142), die katalytische Domäne mit Bindungsstellen für Substrat und Ko-Faktor (Aminosäuren 143-410) und die kurze Oligomerisierungsdomäne am C Terminus (Aminosäuren 411-452). Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass ein hoher Grad der strukturellen Interaktion zwischen den einzelnen Domänen und den Untereinheiten existiert (Kobe et al., 1999, Erlandsen et al., 1997, Fusetti et al., 1998).

Die Bindung von Substrat und Ko-Faktor induziert durch komplexe Seitenketteninteraktionen Konformationsänderungen im Enzym (Thorolfsson et al., 2003, Andersen et al., 2003). Das ist die Grundlage für homotrope Allosterie, die eine feine Regulation der PAH-Enzymaktivität einschließlich Substrataktivierung und Affinität zu Substrat und Ko-Faktor gewährleistet. Diese verschiedenen Mechanismen der Enzymregulation basieren auf der Flexibilität und der Reversibilität der konformationellen Veränderungen des gesamten Enzyms (Erlandsen and Stevens, 1999, Erlandsen et al., 2004, Pey et al., 2004). Dies wiederum macht das Enzym vulnerabel für die Auswirkungen von Fehlfaltungsprozessen, gestörte Oligomerisierung und schnelleren Abbau (Gersting et al., 2008).

Das PAH-Gen ist rund 100kb lang und auf Chromosom 12q23.2 lokalisiert. Die 13 Exons machen gerade einmal 3% des gesamten Genabschnittes aus (Scriver, 2007). Ungefähr 80% aller Mutationen im PAH-Gen sind missense Mutationen. Dies bedeutet, dass durch den Austausch einer Base im Genom an einer Stelle im Protein eine falsche Aminosäure eingebaut wird. Dadurch kommt es zu Fehlfaltungen, allosterischen Auswirkungen und Stabilitätsproblemen (Bjorgo et al., 1998, Knappskog et al., 1996, Erlandsen et al., 2004, Pey et al., 2004). Des Weiteren sind Deletionsmutationen, Splice Mutationen, Nonsense Mutationen, bei denen ein Aminosäurekodon zu einem Stoppkodon umgewandelt wird, und Insertionen bekannt. Insgesamt wurden aktuell 1063 krankheitsrelevante Mutationen im PAH-Gen identifiziert (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>, Abfrage am 23.07.2021). Dabei sind sechs Mutationen für die meisten Fälle bei Europäern und Asiaten verantwortlich (Scriver CR, 2009).

Die meisten phänotypisch manifesten HPA-Patienten sind genetisch Compound-Heterozygot, das heißt sie tragen jeweils zwei verschiedene Mutationsvarianten auf ihren zwei Allelen. Die Funktionalität des korrelierenden Enzyms hängt von der Kombination dieser genetischen Varianten ab und wird klinisch anhand der Schwere der HPA eingeteilt.

2.1.4 Klinische Verlaufsformen

Klinisch lässt sich die Restaktivität der PAH anhand der prätherapeutischen Phenylalaninkonzentration im Serum bestimmen. So werden drei klinische Phänotypen der Erkrankung unterschieden: 1. Klassische Phenylketonurie ($> 1200 \mu\text{mol/l}$), 2. Milde Phenylketonurie ($600\text{-}1200 \mu\text{mol/l}$) und 3. Milde Hyperphenylalaninämie ($120\text{-}600 \mu\text{mol/l}$). Diese Einteilung ist historisch gewachsen und deswegen orientieren sich therapeutische Empfehlungen nur teilweise daran. Es besteht internationaler Konsens, dass Patienten mit Konzentrationen $< 360 \mu\text{mol/l}$ auf eine diätische Behandlung verzichten können, während Patienten mit Werten $> 600 \mu\text{mol/l}$ darauf angewiesen sind, um ihrem Körper eine normale Entwicklung zu gewährleisten. Für Phenylalaninkonzentrationen zwischen 360 und $600 \mu\text{mol/l}$ existieren verschiedenen Empfehlungen (Weglage et al., 2001).

2.2 Therapieansätze der Phenylketonurie

Für die klassische Phenylketonurie steht derzeit keine kurative Therapie zur Verfügung. Der Verlauf der Erkrankung führt ohne diätetische Maßnahmen zu progressiven und irreversiblen neurologischen Einschränkungen im Neugeborenen und Säuglingsalter. Die Patienten zeigen schwere intellektuelle Defizite, Epilepsie, Neurodegeneration, Mikrozephalie und Wachstumsstörungen. Außerdem haben alle unbehandelten Patienten psychosoziale Verhaltensauffälligkeiten wie Stereotypien, Hyperaktivität und Angstzustände. Äußerlich fallen die Kinder durch einen mäuseartigen Geruch, Ekzeme und helle Augen-, Haut- und Haarfarbe auf, welche aufgrund des Melaninmangels entstehen. Die Schwere der klinischen Symptome korreliert direkt mit der Menge an Phenylalanin im Serum (Strisciuglio and Concolino, 2014). Obwohl der PAH-Defekt der Häufigste im humanen Aminosäurenstoffwechsel ist, ist der pathophysiologische Mechanismus, der zu den neurologischen Fehlfunktionen führt, noch nicht abschließend verstanden (van Spronsen et al., 2021).

Die zurzeit einzig mögliche Basistherapie ist die strikte Einhaltung einer lebenslangen Diät. Innovativere Ansätze zur Behandlung von Phenylketonurie lassen sich nach ihrem Zielorgan einteilen. Diese Kategorien beinhalten enterale, hepatische und systemische Ansätze (Abbildung 3: Therapeutische Ansätze zur Behandlung der PKU modifiziert nach Harding (2008)). Aufgrund der Rückschläge und Nachteile der vorhandenen Behandlungsoptionen sind weitere Therapieansätze wie mRNA- und Gentherapie in der Entwicklung (van Spronsen et al., 2021).

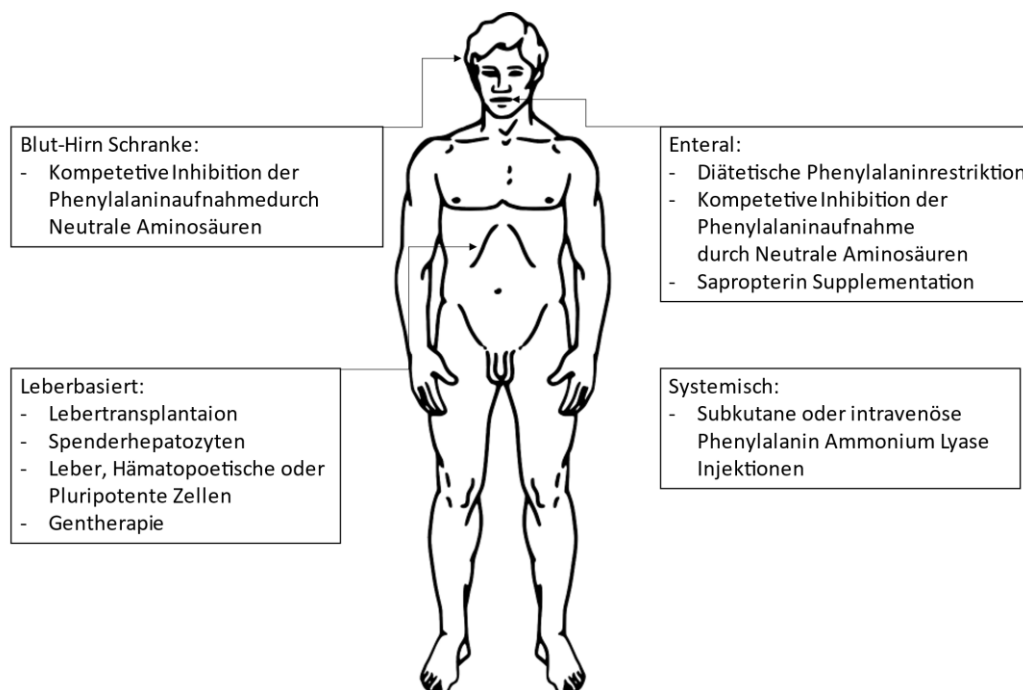


Abbildung 3: Therapeutische Ansätze zur Behandlung der PKU modifiziert nach Harding (2008)

2.2.1 Diätische Behandlung

1953 behandelte der deutsche Kinderarzt Horst Bickel zum ersten Mal erfolgreich eine PKU-Patientin mittels einer Phenylalanin-armen Diät (Bickel et al., 1953). Seitdem war der diätische Ansatz sehr erfolgreich in der Prävention von intellektuellen Einschränkungen und dem Erreichen von nahezu normalen IQ- Werten. Die diätische Therapie besteht aus drei Aspekten: Restriktion der natürlichen Proteinaufnahme, Supplementation durch einen Phenylalanin-freien Aminosäuren-Mix und den Konsum von proteinarmen Nahrungsprodukten. Diese Therapie bringt jedoch vier Herausforderungen mit sich: (I) Mangelnde Compliance aufgrund von unangenehmer Diät; (II) Bleibende neurologische und psychische Einschränkungen trotz früher Intervention; (III) potenzielle Mangelernährung wegen der strengen Diät; (IV) finanzielle Probleme wegen des hohen Kostenaufwands für medizinische Nahrung und Supplemente (Al Hafid and Christodoulou, 2015). Ein systematisches Review von Studien mit früh diätisch therapierten Patienten ergab, dass von 150 untersuchten Studien 140 mindestens ein signifikant schlechteres Ergebnis in Bereichen wie Neurokognition, Lebensqualität, Gehirnpathologie, Wachstum, Knochenpathologie und/oder maternale PKU im Vergleich mit Kontrollgruppen oder standardisierten Normen/Referenzen zeigten (Enns et al., 2010).

2.2.2 Protein-Substitution

Neben der diätischen Basistherapie zählt die Supplementierung mit großen neutralen Aminosäuren (LNAA), Glykomakropeptid (GMP) oder Tetrahydrobiopterin zu der enteralen Therapiestrategie. LNAAs wie Tryptophan, konkurrieren an spezifischen Transportern im Darm und an der Blut-Hirn-Schranke mit Phenylalanin und sorgen so für eine geringere Resorption im Darm und eine geringere Konzentration im Gehirn. GMP wird auf natürlichem Weg aus Molke isoliert und stellt eine adäquate Eiweißquelle für PKU-Patienten dar, weil es nur einen niedrigen Phenylalaninanteil hat und anti-inflammatorisch wirkt (Harding, 2008, Ho and Christodoulou, 2014, Sawin et al., 2015). Eine weitere Verbesserung der Metabolisierung von freien Aminosäuren konnte durch eine Einkapselung erreicht werden. Dadurch können essenzielle Aminosäuren besser absorbiert und zur Proteinsynthese verwendet werden (van Spronsen et al., 2021).

2.2.3 Enzymersatz durch Organ- oder Zelltransplantation

Da der Hauptteil der PAH in der Leber gebildet wird, ist Enzymersatz auf hepatischer Ebene ein wichtiger Ansatzpunkt. So kann durch eine Lebertransplantation der metabolische Phänotyp korrigiert werden. Die PKU ist an sich allerdings keine Indikation zur Transplantation. Auf zellulärer Ebene wird nun versucht durch Transplantation von Hepatozyten eine ausreichende PAH-Expression zu gewährleisten.

Die Herausforderung dabei ist, dass die transplantierten Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den nativen Hepatozyten benötigen (Strisciuglio and Concolino, 2014, Harding, 2008).

2.2.4 Substitution mit dem Ko-Faktor BH₄

Etwa ein Drittel aller PKU-Patienten profitiert von einer zusätzlichen Behandlung mit synthetischem Tetrahydrobiopterin (BH₄), unter Sapropterin (Kuvan®) bekannt, dem Ko-Faktor der PAH (Burnett, 2007). Der Mechanismus ist noch nicht abschließend erforscht, es wird aber eine pharmakologische Chaperonwirkung angenommen, die das mutierte und fehlgefaltete PAH-Enzym stabilisiert und somit wieder für mehr Funktion sorgt (Gersting et al., 2010). Dadurch kann der Phenylalaninspiegel im Serum um etwa 30% gesenkt werden (Sanford and Keating, 2009). Um optimale Serumspiegel zu erreichen, sollte die Therapie dennoch durch eine phenylalaninarme Diät gestützt werden.

Ursprünglich wurde das synthetische Sapropterin zur Behandlung der atypischen PKU verwendet, dann jedoch 2008 in Europa auch für die Behandlung der klassischen PKU zugelassen. Es wird täglich peroral eingenommen. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören Kopfschmerzen und Rhinorrhoe (bei einem von zehn Patienten), insbesondere bei jüngeren Patienten können zudem Hypophenylalaninämien auftreten (EMA, 2008).

2.2.5 Enzymsubstitutionstherapie

Ein neuer Wirkstoff zur medikamentösen Behandlung der HPA ist das in Pflanzen und Bakterien vorkommende und gentechnisch hergestellte Enzym Phenylalanin Ammoniak Lyase (PAL), bekannt unter dem Namen Pegvaliase (Palynziq®) (Levy et al., 2018). Es wandelt Phenylalanin unter Freisetzung von Ammoniak zu Zimtsäure um. Dadurch können die Plasma-Phenylalanin-Spiegel um bis zu 70% im Vergleich zum Ausgangswert reduziert werden (Hydery and Copenrath, 2019). Somit wird der toxische Effekt des akkumulierenden Phenylalanins vermieden und die meisten Patienten können die diätischen Maßnahmen reduzieren oder beenden (Burton et al., 2020). Allerdings entsteht durch diesen alternativen Abbauweg kein Tyrosin, welches weiterhin in ausreichender Menge durch die Nahrung aufgenommen werden muss. Im Mai 2019 wurde Pegvaliase von der EMA als Orphan drug für Erwachsene und Jugendliche ab 16 Jahren zugelassen (Harding et al., 2018, Thomas et al., 2018). Das Medikament besteht aus dem gentechnisch aus *Escherichia coli* gewonnenem und zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit und Senkung der Immunogenität PEGylierten Enzym, das subkutan appliziert wird (EMA, 2019).

Durch die Immunreaktion des Körpers entstehen allerdings dennoch Nebenwirkungen. So treten Überempfindlichkeitsreaktionen, Reaktionen an der Injektionsstelle und Arthralgien in 75%-90% der Anwendungen auf (EMA, 2019). Die unerwünschten Wirkungen sind am häufigsten in der wöchentlichen Induktionsphase. Deshalb wird dort auch eine Prämedikation mit Antihistaminika empfohlen. Zudem kann durch Kontakt des Immunsystems mit dem PEG-Polymer eine Reaktion auf andere PEGylierte Medikamente entstehen (Thomas et al., 2018).

Eine andere Möglichkeit der Enzymsubstitutionstherapie ist der Versuch Pegvaliase in Erythrozyten der Blutgruppe 0 negativ zu produzieren, welche dann in den Patienten transfundiert werden. So können Immuneffekte, die durch den direkten Kontakt von Immunzellen mit dem Enzym entstehen, vermieden werden (Pascucci et al., 2018, Rossi et al., 2014).

2.2.6 Gentherapie

Die ideale Therapie der PKU wäre die Wiederherstellung der Enzymaktivität in den Leberzellen und folglich eine Heilung des genetischen Defekts. Mit der Hilfe von CRISPR/Cas gelang es im Mausmodell eine ausreichende PAH-Aktivität (>20% der normalen Aktivität) zu erreichen, um physiologische Phenylalaninspiegel im Blut zu gewährleisten. CRISPR/Cas ermöglicht den Nukleotidaustausch und die homologe Rekombination der DNA (Villiger et al., 2018).

Genkorrektur ist im Mausmodell zudem mit aus vorbehandelten, humanen hämatologischen Stammzellen isolierten Adeno-assoziierten Viren (AAV) gelungen (Ahmed et al., 2020). Der Vorteil dieser Technologie ist, dass das gesunde Gen an neue Hepatozyten weitergegeben werden kann, was die Enzymaktivität bei Leberzellproliferation stabilisiert. Die Genkorrektur wurde durch einen spezifischen Promotor auf Leberzellen beschränkt. Dieser Ansatz ist trotz der guten Erfolge im Mausmodell aufgrund des Risikos von ungewollten genetischen Veränderungen noch nicht für die Untersuchung in klinischen Studien zugelassen.

Alternativ zur Genkorrektur kann durch das Hinzufügen eines zusätzlichen funktionsfähigen PAH-Gens über eine vektorviral eingebrachte cDNA ebenfalls die Enzymaktivität wiederhergestellt werden (Mochizuki et al., 2004). Erste Versuche zeigten nur begrenzte Erfolge, da der Phenylalaninspiegel nach 40 Wochen wieder anstieg und eine adäquate Applikation nur über die Pfortader möglich war (Oh et al., 2004). In weiteren Experimenten zeigten sich durch die Verwendung von hepatotropen AAV serotyp 2 und 8 eine länger anhaltende Verbesserung der PAH-Aktivität, auch mit niedrigeren Dosen und systemischer Applikation (Harding et al., 2006, Ding et al., 2006, Yagi et al., 2011, Thöny et al., 2014). Die DNA verbleibt episomal und integriert normalerweise nicht in das Genom, was das Risiko für Mutagenese verringert (Thöny et al., 2014).

Ein daraus resultierender Nachteil ist, dass die Aktivität, besonders bei hepatozellulärer Proliferation, über die Zeit abnimmt. Überdies löst der virale Vektor eine Immunreaktion aus, die eine wiederholte Applikation unmöglich macht. Weiterhin schränkt das Vorkommen von präexistierenden Antikörpern gegen den viralen Vektor die profitierende Patientengruppe ein.

Aktuell befinden sich zwei Therapeutika in klinischen Studien in den USA (van Spronsen et al., 2021). In der ersten wird AAVHSC15 (NCT03952156) verwendet, in der anderen AAV5 (NCT04480567), wobei diese kürzlich (11/21) aufgrund der präklinischen Sicherheitslage von der Food and Drug Administration (FDA) pausiert wurde.

2.2.7 mRNA-Enzymersatztherapie für PKU

Eine neuartige Herangehensweise in der Therapie der PKU ist das Konzept, den Leberzellen den Bauplan des funktionsfähigen Enzyms in Form einer stabilen mRNA zuzuführen und so den zelleigenen Apparat zur Enzymproduktion zu nutzen. Ziel dieser molekularen Therapie ist es, fehlende oder defekte Proteine durch mRNA vermittelte Expression in therapeutisch wirksamer Menge zu ersetzen. Dies kann im Gegensatz zu einer Applikation von *ex vivo* rekombinant hergestellten Proteinen unerwünschte Immunantworten vermeiden. Außerdem hat die mRNA als Übermittler der Information zur Expression therapeutisch relevanter Proteine gegenüber der DNA den Vorteil, dass keine Translokation in den Zellkern stattfinden muss, keine Gefahr der Integration ins Genom besteht und damit die Expression kontrollierbar und transient erfolgen kann (Schlake et al., 2012, Thess et al., 2015). Dieser Ansatz wurde im Tiermodell bereits für mehrere Stoffwechselerkrankungen erfolgreich getestet. So gibt es Studien zu Methylmalonazidämie (An et al., 2017), Arginase- und Citrinmangel (Truong et al., 2019, Cao et al., 2019), akute intermittierende Porphyrie (Jiang et al., 2018), Morbus Fabry (Zhu et al., 2019) und Galaktosämie (Balakrishnan et al., 2020). Im Vergleich zu einer DNA-basierten Therapie wären bei einer mRNA-Therapie wiederholte Gaben notwendig, um den therapeutischen Effekt aufrecht zu erhalten. Die Frequenz muss noch bestimmt werden.

Aktuell gibt es noch keine klinischen Daten einer mRNA-Therapie für PKU und auch über die Effektivität in PKU-Mausmodellen wurde zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht berichtet (van Spronsen et al., 2021). Im Jahr 2022 wurden zwei Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht (Cacicedo et al., 2022, Perez-Garcia et al., 2022).

2.3 mRNA-Therapien

Seit den 1990er Jahren haben vielversprechende Verbesserungen im Bereich der mRNA-Therapien das Potenzial derselben in der Medizin gefestigt und erweitert. So hat sich in den letzten 30 Jahren die Anzahl der jährlichen Publikationen zu dem Thema von unter 100 auf

über 7000 vervielfacht (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=mrna%20therapeutics>). Durch die SARS-Cov-2-Pandemie und dem damit einhergehenden Forschungswettlauf zur Impfstoffherstellung bekam diese Technologie zusätzlichen Rückenwind. Seit der Entdeckung in den 1960er Jahren (Brenner et al., 1961) wurden unzählige mRNA-basierte Therapieansätze entwickelt und getestet. Im Wesentlichen lassen sich zwei Konzepte unterscheiden. Zum einen lassen sich Zellen des Patienten *ex vivo* transfizieren und diese re-applizieren. Dafür gibt es verschiedene Forschungsansätze in den Bereichen des Genomengineering, der genetischen Reprogrammierung und der T-Zell- und dendritischen Zellbasierten Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren oder infektiösen Krankheiten. Zum anderen kann die mRNA auf direktem Weg über verschiedene Vehikel in die Zielzellen eingebracht werden. Diese Methode wird für Anwendungen in der Onkologie, der Infektiologie, der Therapie von Allergien und von Proteinersatztherapien entwickelt (Sahin et al., 2014).

Dennoch wurde die mRNA in den ersten Jahrzehnten nach ihrer Entdeckung nicht als eine neue Art der Therapie gehandelt (Weng et al., 2020). Instabilität und Immunogenität waren anfänglich Hürden und sorgten so für einen Entwicklungsnachteil im Vergleich zur DNA in der Gentherapie (Hajj and Whitehead, 2017, Sahin et al., 2014). Durch die Modifikation der Nukleotide und neuen Methoden des organ- und zellspezifischen Transports konnten in den letzten Jahren viele dieser Probleme gelöst werden. Inzwischen bietet die mRNA im Vergleich zur DNA einige Vorteile (Weng et al., 2020): Einerseits ist mRNA bereits im Zytoplasma aktiv und muss nicht in den Zellkern gelangen, was eine effizientere Proteintranslation gewährleistet. Somit ist eine Integration in das Genom nicht notwendig. Dadurch ergibt sich ein sehr niedriges mutagenes Potenzial und eine hohe Sicherheit (Cavazzana et al., 2016, Schlaeger et al., 2015). Weiterhin ist die Herstellung synthetischer mRNA durch einen *in vitro* Transkriptionsprozess (IVT) relativ einfach, leicht replizierbar und zudem ist dieser Prozess vergleichbar kostengünstig und kann für verschiedene Therapien angewandt werden (Sahin et al., 2014). Im Folgenden sollen einige wichtige Grundlagen dieser Technologie beleuchtet werden.

2.3.1 Struktur und Herstellung der IVT-mRNA

Ziel der Herstellung von IVT-mRNA ist es, eine strukturelle Ähnlichkeit zu der natürlich vorkommenden mRNA im Zytoplasma von Eukaryonten zu erreichen. Damit kann die Maschinerie der transfizierten Zelle verwendet werden, die exogene mRNA in das pharmakologisch aktive Protein zu translatieren. Die IVT-mRNA hat eine 5'-Cap-Struktur und einen 3'-Poly-A Schwanz. Der Poly-A Schwanz ist für den Ableseprozess und die Stabilität der mRNA von großer Bedeutung (Eckmann et al., 2011). Auf der einzelsträngigen mRNA ist der Open Reading Frame (ORF), der für das gewünschte Protein codiert, mit einem Start und einem

Stopp Codon markiert und von jeweils einer nicht translatierten Region (UTR) flankiert, welche die Degradation der 5' Cap und somit den Abbau der mRNA verhindern (Ross and Sullivan, 1985, Zinckgraf and Silbart, 2003). Die mRNA wird in einem zellfreien System mittels IVT auf der Grundlage eines DNA-Plasmids, PCR-Produktes oder von Doppelstrang Oligonukleotiden synthetisiert. Mit Ausnahme der 5'-Cap sind alle funktionellen Anteile der mRNA in der DNA-Vorlage enthalten. Die *in vitro* Transkription wird mit T3-, T7- oder SP6-Phagen-Polymerasen (Stump and Hall, 1993) in der Gegenwart von Nukleotiden durchgeführt und die entstandene komplementäre mRNA in der Folge enzymatisch mit dem 5'-Cap versehen (Loomis et al., 2018, Sahin et al., 2014, Li and Kiledjian, 2010). Diese spielt eine entscheidende Rolle in der Reifung, dem Splicing und der Translation der mRNA (Dwarki et al., 1993). Danach wird die Muster-DNA von Dnase in ihre Einzelteile zerlegt und die mRNA mit konventionellen Methoden aufgereinigt.

2.3.2 Modifikation der mRNA zur Verbesserung der Stabilität

Im Gegensatz zu der im Zellkern produzierten mRNA, die durch die Nukleosporen in das Zytoplasma geschleust wird, muss die IVT-mRNA aus dem Extrazellularraum in das Zytoplasma gelangen. Hier besteht die Gefahr des Abbaus durch aktive RNasen, die im Extrazellularraum omnipräsent sind. Ein weiterer Faktor, der die Bioverfügbarkeit in der Zelle beeinflusst, ist die Zellmembran, die eine passive Diffusion der großen, negativ geladenen mRNA-Moleküle in das Zytoplasma verhindert (Sahin et al., 2014). Um die Bioverfügbarkeit zu optimieren, wurden verschiedene Möglichkeiten der Modifikation auf molekularer Ebene getestet. Dabei wurden unter anderem die codierende Region, die UTRs, 5'-Cap und Poly-A-Schwanz in Betracht gezogen (Weng et al., 2020).

Die 5'-Cap ist zum einen durch das Binden an den Translationsinitiationsfaktor 4E für das Ablesen und Übersetzen der Information von der mRNA essenziell, zum anderen wird durch ihre Bindung an Decapping-Enzyme (DCP1, DCP2, DCPS) der Abbau der mRNA reguliert (Li and Kiledjian, 2010). Die normale eukaryotische mRNA hat ein 7-Methylguanosin (m^7G) Cap, welches während des Transkriptionsprozesses über eine 5'-5'-Triphosphat-Brücke mit der mRNA verbunden wird. Die am meisten benutzten Cap Analoga sind sogenannte Anti-reverse Cap Analoga (ARCA) (Jemielity et al., 2003, Sahin et al., 2014). Die Vorteile bestehen in einer erhöhten Affinität zu den Translationsinitiationsfaktoren und einer geringeren Anfälligkeit gegenüber dem Decapping-Enzymkomplex (Kowalska et al., 2008). Vor kurzer Zeit wurde eine neue Klasse der Cap-Analoga konstruiert. Hier werden die Stärken der ARCA, der Triphosphat-Modifikation und einer Polyphosphatkette kombiniert. Diese 2S Analoga bewiesen eine erhöhte Translationsrate in unreifen humanen dendritischen Zellen und

schnitten besser ab als die bereits in klinischen Studien verwendeten Phosphat-modifizierten Analoga (Strenkowska et al., 2016).

Gemeinsam mit der Cap-Struktur gewährleistet der Poly-A Schwanz Stabilität und eine effektive Translation der mRNA (Gallie, 1991, Chang et al., 2014). Die Polyadenylierung, also das Anhängen der Adenin-Nukleotid Sequenz an die IVT-mRNA, kann entweder enzymatisch durch eine Poly-A-Polymerase oder durch das Einbringen der Sequenz in das DNA-Template erreicht werden. Die enzymatische Polyadenylierung ermöglicht die Verwendung von modifizierten Nukleotiden in der Schwanzstruktur, um eine Deadenylierung durch spezifische Nukleasen zu verhindern. Allerdings mangelt es an Reproduzierbarkeit, da die Länge der Poly-A Kette ungewollt variiert (Körner and Wahle, 1997). Somit hat sich in der industriellen Herstellung vor allem für medizinische Applikationen die *in vitro* Transkription über ein Poly-A-Template durchgesetzt. Längere Poly-A-Strukturen von über 100 Nukleotiden scheinen mit einer besseren Proteinexpression in der Zellkultur einherzugehen als die konventionellen mit 64 Nukleotiden (Wu and Brewer, 2012, Mockey et al., 2006, Holtkamp et al., 2006). Dies bedeutet jedoch noch nicht unbedingt, dass die Länge immer positiv mit einer besseren Proteinexpression korreliert. Einige Wissenschaftler nehmen an, dass die spezifische Länge für bestimmte Verhaltensweisen der mRNA in Zellen relevant ist. So kann es in bestimmten Kontexten besser für die Zelle sein, wenn die mRNA einen kürzeren Poly-A-Schwanz hat (Choi and Hagedorn, 2003, Jalkanen et al., 2014, Meijer et al., 2007, Yang et al., 2011).

Überdies spielen die UTRs an beiden Enden der mRNA nachweislich eine Rolle in der Langlebigkeit des Moleküls. So wurden Sequenzen entdeckt, die in der endogenen mRNA die Translation modulieren. Die 3'-UTR der α - und β -Globin-mRNA beispielsweise sorgt für eine Halbwertszeit von über einem Tag (Karikó et al., 1999). Zudem kann durch die Aneinanderreihung von zwei dieser Sequenzen eine noch höhere Halbwertszeit erreicht werden (Holtkamp et al., 2006). Weitere zelluläre und virale 5'- und 3'-UTRs, wie die 3'-UTR des eukaryote elongation factor 1 α (EEF1A1), die 5'-UTR des human heat shock protein 70 und eine 5'-UTR Sequenz, die in vielen Orthopocken-Viren vorkommt, hemmen das Decapping und den Abbau durch Exonukleasen (Zinckgraf and Silbart, 2003, Yakubov et al., 2010, Vivinus et al., 2001, Bergman et al., 2007).

Die Zusammensetzung der kodierenden Region trägt einen wesentlichen Teil zur Translationseffektivität bei. So kann durch den Ersatz von weniger häufig vorkommenden Codons mit häufiger vorkommenden, synonymen Codons die Frequenz der Translationen pro mRNA erhöht werden. Weil es für eine Aminosäure mehrere mögliche codierende Basensequenzen gibt, können verschiedene mRNA-Konstellationen für das gleiche Protein

codieren. Allerdings wirkt sich die Anordnung der Triplets auch auf die sekundäre Faltung des Proteins und auf die Funktion in der Zelle aus. In diesem Zusammenhang gibt es Untersuchungen, die belegen, dass die Sekundärstruktur der mRNA durch die Kontrolle der Translationshalbwertszeit einen regulierenden Einfluss auf die Protein-Expression hat (Mauger et al., 2019). Diese Art der mRNA-Modifikation wurde bereits erfolgreich in therapeutischen Anwendungen für Proteinersatz und Impfungen verwendet (Frelin et al., 2004, Kim et al., 2015). Es gibt jedoch zudem Gründe, von einer Optimierung der codierenden Sequenz abzusehen. So können komplexere Faltungsprozesse nur durch eine langsame Translation gewährleistet werden, die wiederum auf seltene Codons zurückzuführen ist (Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

2.3.3 Immunologische Relevanz der IVT-mRNA

Normalerweise kommt mRNA im Extrazellularraum gar nicht und intrazellulär nur als Einzelstrang vor, sodass die IVT-mRNA vom Körper als Zeichen einer Virusinfektion wahrgenommen wird. Infolgedessen kann eine Aktivierung des Immunsystems erfolgen (Weng et al., 2020). Diese stimulierende Wirkung kann im Falle der Anwendung als Impfung als adjuvanter Effekt von Nutzen sein, um eine potente, antigenspezifische, zelluläre und humorale Immunantwort zu generieren. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung des Immunsystems ein großer Nachteil für eine Applikation in Proteinersatztherapien. Die Art der Immunreaktion hängt neben der Größe und Struktur der Verpackungsmolekülen von weiteren mRNA-spezifischen Faktoren ab und kann auf verschiedenen Ebenen der zellulären Abwehr ausgelöst werden (Sahin et al., 2014).

Grundlage für die Aktivierung des Immunsystems sind spezielle Pattern-Recognition-Rezeptoren, deren natürliche Aufgabe es ist, auf virale RNAs zu reagieren und verschiedene Signalkaskaden in Gang zu setzen. Während Nicht-Immunzellen einen retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) Rezeptor besitzen (Hornung et al., 2006), erkennen Immunzellen exogene mRNA durch Toll-like Rezeptoren und setzen inflammatorische Prozesse in Gang (Hornung et al., 2008, Diebold et al., 2006). Die Toll-like Rezeptoren TLR3, TLR7 und TLR8 sind in den Endosomen lokalisiert, wo sie durch endozytierte IVT-mRNA aktiviert werden und die Ausschüttung von Zytokinen auslösen (Diebold et al., 2004). TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (Alexopoulou et al., 2001), während TLR7 und TLR8 auf einzelsträngige RNA reagiert (Diebold et al., 2004, Heil et al., 2004). Bereiche der mRNA mit großem Uracil-Anteil werden über den TLR7 erkannt und sorgen besonders häufig für schwere Immunreaktionen. Durch die Reduktion und den Ersatz von Uridin mit 2-thiouridin, 5-methyluridin, 5-methoxyuridin, Pseudouridin oder N¹-methylpseudouridin gibt es die Möglichkeit die Immunogenität der IVT-mRNA zu reduzieren (Thess et al., 2015).

Weitere Strategien, um durch eine chemische Modifikation der mRNA eine verringerte Immunantwort zu generieren, beinhalten den Austausch von Adenosin mit N¹-methyladenosen oder N⁶-methyladenosen und den Ersatz von Cytidin durch 5-methylcytidin (Kariko et al., 2005, Hajj and Whitehead, 2017). Pseudouridin und 5-methylcytidin bieten neben dem immunologischen Vorteil auch eine erhöhte Translationseffizienz (Kariko et al., 2008). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ein längerer Poly-A-Schwanz durch Senkung oder Abschirmung des Uridin-Anteils ein reduziertes immunogenes Potenzial gewährleisten kann (Weissman and Karikó, 2015).

2.3.4 mRNA-Transport

Freie mRNA kann ungeschützt nicht in relevanten Mengen intakt ins Zytoplasma gelangen, um dort zu einem bioaktiven Protein translatiert zu werden (Weng et al., 2020). Aufgrund ihrer Größe, Ladung und dem schnellen extrazellulären Abbau kann die Menge, die über die Zellmembran in die Zelle gelangt, von Zelltyp zu Zelltyp stark variieren und ist zumeist ineffizient. Es gibt spezielle Fress-Rezeptoren, über die mRNA in die Zelle gelangen kann. Dort akkumuliert sie allerdings in Endosomen und entweicht nur in sehr geringen Mengen in das Zytoplasma (Lorenz et al., 2011). Dendritische Zellen bilden eine Ausnahme, da sie im Zuge ihrer Umgebungsüberwachung regelmäßig große Mengen der Extrazellulärflüssigkeit aufnehmen. So nehmen sie auch ungeschützte mRNA über Makropinozytose in relevanten Mengen auf (Selmi et al., 2016).

Daraus folgt, dass für eine adäquate Expression therapeutischer Proteine Transportmittel notwendig sind, die eine möglichst hohe Anzahl der Zielzellen erreichen und dort eine ausreichende Aufnahme von mRNA pro Zelle gewährleisten. Eines der am weitesten entwickelten Transportsysteme ist die Ko-Formulierung von mRNA in Liponanopartikel (LNPs) (Kauffman et al., 2015). Die Kapsel besteht aus mehreren Komponenten, die dem Aufbau der Zellmembran ähneln, und so die mRNA vor Abbau schützt und für eine effektivere Aufnahme in das Zellinnere sorgt (Kowalski et al., 2019). Der genaue Mechanismus der mRNA-Freisetzung in der Zelle ist noch nicht abschließend erklärt. Die LNPs werden von der Zelle durch Endozytose aufgenommen und die mRNA gelangt durch eine Kaskade von Reaktionen in das Zytoplasma, wo der Translationsprozess startet (Yanez Arteta et al., 2018).

Leberzellen können mithilfe von verschiedenen liposomalen und polymerbasierten Transportsystemen erreicht werden und so für die Herstellung großer Mengen rekombinanter Proteine genutzt werden (Sahin et al., 2014). Da vielen angeborenen Stoffwechselerkrankungen ein fehlendes oder defektes Enzym in der Leber zugrunde liegt, bietet der mRNA-basierte Enzymersatz hier einen vielversprechenden Therapieansatz (Trepotec et al., 2019).

2.3.5 *In vitro* Evaluation von IVT-mRNAs

Für IVT-mRNA-Konstrukte gilt es, vor der Anwendung im Tierversuch einige grundlegende Aspekte in der Zellkultur zu klären und damit eine Vorselektion für die *In vivo* Applikation zu treffen. Es gilt zu erkennen, welche hepatische Zellpopulation die mRNA mit welcher Effektivität aufnimmt und wie die Zellen darauf reagieren. Im Gegensatz zur Vakzinierung, bei der eine lokale Behandlung der Haut oder des Muskels bereits ausreicht, ist bei Proteinersatztherapien zumeist die Expression eines Proteins in einem inneren Organ, Gewebe bzw. spezifischen Zielzellen erforderlich, um den therapeutischen Effekt zu erzielen. Um eine möglichst hohe Expression zu erreichen, sollte daher eine höchstmögliche Menge an verabreichter mRNA von den primären Leberzellen aufgenommen und exprimiert werden. Andererseits sollte sichergestellt werden, dass die mRNA keine toxischen Auswirkungen auf die verschiedenen Zellpopulationen der Leber hat.

Des Weiteren ist es essenziell, die Enzymaktivität des durch die mRNA kodierten Enzyms zu messen und so nicht nur eine quantitative Aussage über das exprimierte Protein zu machen, sondern auch qualitativ Information über die Funktionalität desselben zu erhalten. Die Etablierung einer Enzymaktivität in circa 10% aller Hepatozyten reicht aus, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, der das Phenylalanin-Level auf ein Niveau senkt, bei dem keine Schädigungen auftreten (Hamman et al., 2005). Eine geringe Wiederherstellung der Phenylalaninhydroxylase-Enzymaktivität mithilfe eines adenoviralen Vektors sicherte bereits eine fast normale Phenylalanin-Toleranz mit normalem Phenylalanin-Niveau im Serum experimenteller Mäuse (Oh et al., 2004).

3 Material

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Absaugsystem VACUSAFE comfort	INTEGRA Biosciences (Fernwald, D)
Analysewaage 770	Kern & Sohn (Balingen-Frommern, D)
Biochrom 30 – Amino Acid Analyzer	Biochrom (Cambridge, UK)
CO2-Begasungsbrutschrank Hera cell 240	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Desinfektionsgerät G 7836 CD	Miele Professional (Gütersloh, D)
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Gefrierschrank	Firma Liebherr (Bulle, CH)
Konfokalmikroskop LSM 710 NLO	Zeiss (Oberkochen, D)
Kühlschrank	Siemens (Berlin & München, D)
Lichtmikroskop IX50	Olympus (Tokio, J)
Magnetrührer MR 3002	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Mikroskopkamera U-LS30-3	Olympus (Tokio, J)
Manuelle Pipetten 2,5-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, D)
Perfusionspumpe Module DPS Vial medical	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Pipettierhilfe pipetus®	Carl Roth (Karlsruhe, D)
PowerPac™	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Schüttelmaschine Reax 2000	Heidolph Instruments (Kelheim, D)
Sicherheitswerkbank HERAsafe® KS18	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Thermostat Ecoline E 100	Dr. R. Wobser (Lauda-Königshofen, D)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H	BANDELIN electronic (Berlin, D)
Vortexer Agitateur Top-Mix 11118	Bioblock Scientific, Frankreich
VWR® Imager gel documentation	VWR International, USA
Wasserbad ECO 12 T	Dr. R. Wobser (Lauda-Königshofen, D)
Zählkammer BLAUBRAND® Improved Neubauer bright-line	BRAND (Wertheim, D)
Zentrifuge 1: Heraeus Multifuge 3 SR	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge 2: Heraeus Megafuge 1.0RS	Thermo Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 1: Geräte

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Information	Hersteller
FACS-Röhrchen Falcon®		Corning, USA
Handschuhe	Star Guard Comfort	StarLab, Hamburg
Kanülen	26G x ½, 0,45 mm x 13mm	Becton Dickinson, Spanien
Mikroreaktionsgefäße	2/1,5/0,5 ml 3810X	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten	Pasteur Capillary Pipettes 230mm	WU, Mainz
Perfusionsspritzen	Perfusor® Spritze 50ml	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen	2/200/1000 µl TipOne®	STARLAB, Hamburg
Serologische Glaspipetten	5/10/25 ml Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritze	Injekt®-F 1ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Minisart®	Satorius, Göttingen
Teströhrchen 5ml	Falcon™ 12 x 75 mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Teströhrchen 15ml	Falcon Blue Max Jr.™	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Teströhrchen 50ml	Falcon Blue Max™	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Venenkanüle	50 Kliniject	Klinika Medical GmbH, Usingen
Verbindungsschlauch	Injectomat® Line 150 cm	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Zellkulturplatten	Nunc Multidish 6-/12-/24-/48-well	Thermo Fisher Scientific, USA
Zellkulturflaschen	CELLSTAR® 250ml, 500ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb	EASYstrainer™ 70µm	Greiner Bio-One, Österreich

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

3.2 Chemikalien und Medien

3.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol 50 µM	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
6[R]-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH ₄)	Cayman Chemicals, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 70%, vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hanks'Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Halt™ Protease-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (Lösung Ca und Mg frei, 1M) (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Histodenz™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lipofectamine™ MessengerMAX™	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NuPAGE® Elektrophorese System	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
MEM-Non-Essential Amino Acid Solution 100x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyacrylsäure, 2000 g/mol	Polysciences, Inc., USA
Polyethylenimin, 25000 g/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
Tris-buffered saline with Tween20 (TBST)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zellysepuffer	Thermo Fisher Scientific Inc, USA

Tabelle 3: Chemikalien

3.2.2 Medien

Medium	Hersteller
L-15 Medium (Leibovitz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Opti-MEM™ Medium	Thermo Fisher Scientific Inc, USA

Tabelle 4: Ausgangsmedien

Verwendung	Ausgangsmedium	Zusätze	Anteil
Perfusionsmedium I	HBSS	NaHCO ₃	350 mg/l
		EDTA	190 mg/ml
		HEPES (Pulver)	2,6 g/l
Perfusionsmedium II	Leibovitz L-15 Medium	Glucose (45 %)	1 g/l
		Collagenase	40 mg/100 ml, (100 U/ml)
		Dnase I	0,001 %
Perfusionsmedium III	HBSS	FCS	5 %
		Collagenase	40 mg/ 100ml, (100 U/ml)
		Dnase I	0,001 %
Waschmedium	RPMI-1640 Medium	FCS	5 %
		Pen/Strep	1 %
Kulturmedium I (R ₁₀)	RPMI-1640 Medium	FCS	10 %
		Pen/Strep	1 %
		Hepes	1 %
		Na-Pyruvat	1 %
		L-Glutamin	1 %
		Non-Essential Amino Acids	1 %
Kulturmedium II	Kulturmedium I	Dexamethason	10 µg/ml in Ethanol
		Insulin	3,5 µg/ml
		rhEGF	100 µg/ml
FACS-Puffer	DPBS	FCS	5 %
NPC-Kulturmedium	Kulturmedium I	2-Mercaptoethanol	50 µM (1:1000)
Blocking-Solution	TBST-Puffer	Milchpulver	5%

Tabelle 5: Supplementierte Medien

3.3 Sonstige Materialien

Wirkstoff	Handelsname	Konzentration	Hersteller
Ketaminhydrochlorid	Ketamin-hameln	50 mg/ml	Hameln pharma plus GmbH, Hameln
Xylazin	Rompun	2 %	Bayer AG, Leverkusen
Isofluran	Forene®	100 %	Abbivie GmbH + Co. KG, Wiesbaden

Tabelle 6: Anästhetika

Material	Information	Hersteller
Recombinant Anti-PAH antibody [EPR12381]	100µl, Reaktivität: human, murin	abcam®, USA
Anti-PAH Primary Antibody [EPR12380]	100ul, Reaktivität: human	abcam®, USA
Dexamethason	96%	Thermo Fisher, USA
Dnase I	1000 U/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Collagenase A	0,255 U/mg	Roche Diagnostics, USA
Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix		Becton Dickinson, USA
Insulin	human 22ecombinant, Zinklösung	Thermo Fisher, USA
Mouse anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP		Thermo Fisher, USA
mRNA-Konstrukte	MmPAH, HhPAH, GFP, AvPAL	CureVac, DE
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	REF 31466, Alexa 488	abcam®, USA
rhEGF	REF G502A 100µg	Promega, USA
Roti® Mount FluorCare DAPI	Anregung/Emission: 359/461nm	Carl Roth, DE
Texas Red™-X Phalloidin	Anregung/Emission: 591/608nm	Invitrogen, USA
Collagen I, bovine	5mg/ml	Thermo Fisher, USA

Tabelle 7: Enzyme, Antikörper und Sonstige

3.4 Software

Name	Information	Hersteller
BD FACSDiva™ 6.1.1	FACS Akquisition	Becton Dickinson (Heidelberg)
BioRender	Grafiken	BioRender (Toronto)
cellSens Entry	Mikroskopie Aufnahme	Olympus (Tokio)
Flowjo Version 9	FACS Datenverarbeitung	Tree Star Inc. (Ashland)
EndNote X9	Quellenverwaltung	Thomson Reuters (New York)
Graphpad PRISM 7.0	Datenverarbeitung	GraphPad Software (La Jolla)
Office 2021	Datenverarbeitung	Microsoft (Redmond)

Tabelle 8: Software

4 Methoden

4.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

Die in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff ($<-140^{\circ}\text{C}$) kryokonservierten Zellen wurden zum Auftauen in einem Wasserbad geschwenkt (1 Minute, 37°C) und dann rasch mit R_{10} Kulturmedium (37°C) verdünnt, da das Gefriermedium toxische Einflüsse auf die Zellen hat. Nach einer Zentrifugation (10 Minuten, 4°C , 300G) wurde der Überstand entsorgt, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Die Flasche wurde in einem Zellkultur Brutschrank platziert (37°C , 5% CO_2). Nach einem Tag wurden die Morphologie und Konfluenz der Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops beurteilt.

4.1.1 HeLa

Die sehr resistenten Epithelzellen wurden als Kontrollkultur ausgewählt. Kultiviert wurde in 250 ml Zellkulturflaschen in R_{10} Kulturmedium (Tab. 5). Bei jeweils 90% Konfluenz wurde passagiert. Zunächst wurde das alte Medium abpipettiert und entsorgt. Die Zellen wurden mit DPBS-Puffer gewaschen und mit 3 ml vorgewärmtem Trypsin bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde durch Zugabe von 7 ml vorgewärmtem R_{10} Kulturmedium das Trypsin inaktiviert, die Zellen suspendiert und in ein 15 ml Falcon-Gefäß transferiert. Nach einer Zentrifugation (300xg, 4°C , 10 Minuten) und Resuspension in frischem Medium wurden die Lebendzellzahl mithilfe der Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt ($\sim 9-12 \times 10^6$). Mit dem Ziel die Zellen eine Woche in Kultur zu halten, wurden die Zellen im Verhältnis 1:200 (~ 70.000 Zellen) in 20ml R_{10} Nährmedium neu ausgesät. Abschließend wurde die Kultur im Mikroskop auf Zelldichte und Zellform evaluiert und in den Brutschrank platziert.

4.1.2 HepG2

Als permanente Leberzelllinie wurden HepG2-Zellen kultiviert. Die Passage wurde wie oben (4.1.1) beschrieben durchgeführt. Mit dem Ziel 90% Konfluenz in einer Woche zu erreichen, wurden die Zellen im Verhältnis 1:25 (~ 500.000 Zellen) in 20 ml R_{10} Nährmedium neu ausgesät.

4.2 Isolierung muriner Hepatozyten

Murine Hepatozyten wurden jeweils frisch durch eine Leberperfusion am offenen Situs gewonnen. Zu Beginn wurde jede C57BL/6 Wildtyp-Maus durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin/Rompun-Lösung betäubt und die Narkose, wenn nötig, mit Isofluran aufrechterhalten. Nach der Fixierung auf einer Operationsunterlage wurde der Bauch mit 70% Ethanol desinfiziert und von kaudal nach kranial eröffnet.

Durch das Beiseiteschieben des Darmes nach rechts wurde die Pfortader freigelegt und mit einer 26g Venenverweilkanüle kanüliert. Darüber wurde die Leber für vier Minuten und einer Durchflussgeschwindigkeit von 180 ml/h mit dem auf 42°C vorgewärmten Perfusionsmedium I (Tab. 5) perfundiert. Ein Anschwellen und Verblässen der dunkelrot gefärbten Leberlappen zeigten den Erfolg der Perfusion an. Anschließend wurde die untere Hohlvene inzidiert, um das zusätzliche Volumen zu entlassen. Durch Abklemmen der unteren Hohlvene in Abständen von 30 Sekunden wurde die Perfusion der Leber optimiert. Dieser Schritt diente zur Auflösung der kalziumabhängigen zwischenzellulären Verbindungen. Anschließend folgte das ebenfalls auf 42°C vorgewärmte Perfusionsmedium II für 15 Minuten mit 180 ml/h. Die dort enthaltene Collagenase und Dnase baut die extrazelluläre Matrix an und setzt so die Leberzellen frei. Nach diesen zwei Perfusionen wurde die Leber aus dem Situs entnommen und die Gallenblase mit Vorsicht abpräpariert, um so den schädlichen Einfluss der Gallenflüssigkeit auf die Leberzellen zu vermeiden. Die Leberlappen wurden in einer Petrischale mit 5 ml Perfusionsmedium II (Tab. 5) mit einer Pinzette und Schere durch Abstreifen und Abzupfen mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Zellen durch Pipettieren mit einer 50ml Pipette weiter aus der Matrix herausgelöst und durch ein 100µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die in der Petrischale verbliebenen Gewebsreste wurden mit Waschmedium gespült und die letzten Leberzellen wurden durch das Zellsieb in die Suspension eingebracht. Anschließend wurde das Röhrchen mit Waschmedium auf 50 ml aufgefüllt und dreimal zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 400rpm). Nach jedem Waschvorgang wurde der Überstand mit toten Zellen und kleineren, nicht parenchymalen, Zellen vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet, das sich am Boden gesammelt hat, neu in Suspension gebracht. Wenn der Überstand nach dem Waschvorgang nicht klar war, wurde der Reinigungsschritt wiederholt. Die Leberzellen im übrig gebliebenen Zellpellet wurden im Kulturmedium aufgenommen und die Lebendzellzahl mittels einer Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

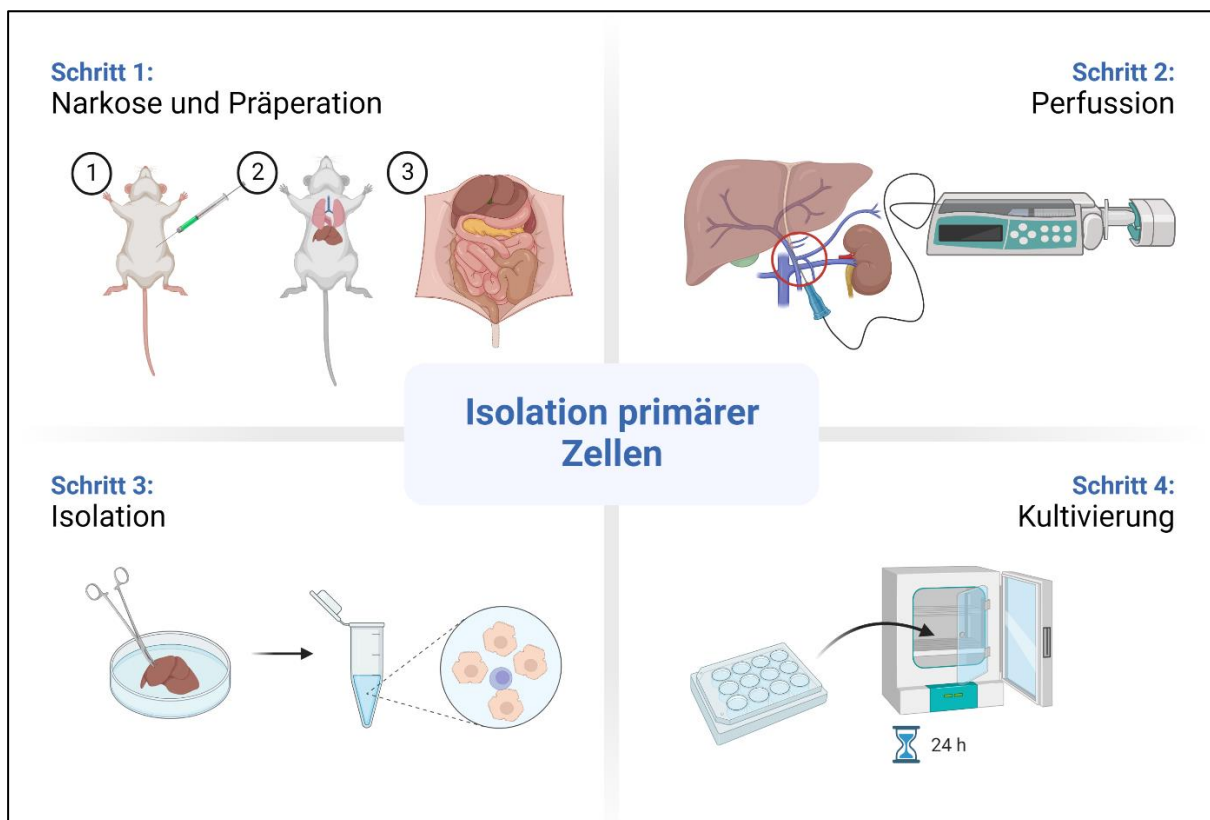


Abbildung 4: Isolation primärer Leberzellen

Schritt 1: i.p. Injektion des Anästhetikums (1), Vorbereitung der Maus auf dem Arbeitstisch (2), Eröffnen des Abdomens und Freilegen der Leber (3); Schritt 2: Kanülierung der V. portae und Perfussion der Leber; Schritt 3 & 4: Isolierung der Leberzellen und Aussaat in Multiwellplatten (erstellt mit BioRender.com)

4.3 Kultivierung primärer muriner Hepatozyten

Aus einer Mausleber wurden ca. zwischen vier und acht Millionen Zellen isoliert. Diese wurden jeweils für 24h in 12-Well-Multiwellplatten zu jeweils 100.000 – 200.000 Zellen/ Kavität in 1 ml R₁₀ Nährmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bevor sie mit den mRNAs transfiziert wurden. Eine zunächst unzureichende Transfektionsrate (~0,5%) machte eine Optimierung der Kulturbedingungen notwendig (Klaunig et al., 1981).

4.4 Optimierung der Kultivierung

Das Kulturmedium wurde schrittweise mit verschiedenen Konzentrationen von Dexamethason, Insulin und rekombinatem humanen epithelialen Wachstumsfaktor (rhEGF) supplementiert. Die optimalen Konzentrationen (Tab. 5) wurden anhand der besten Transfektionsrate (~40%) ermittelt. Zusätzlich wurden die 12-Well Flachbodenkulturplatten mit Kollagen beschichtet, um den Zellen eine bessere Adhäsionsgrundlage zu geben. Dazu wurden die Kulturplatten 5 Minuten mit flüssigem Kollagen (Tab. 7) bei 37°C inkubiert und der Überstand anschließend verworfen. 5h nach der Aussaat wurde das Medium gewechselt und auf diese Weise die nicht adhärenenten oder toten Zellen entfernt. Nach 24h im Kulturschrank (37°C, 5% CO₂) wurde transfiziert.

4.5 Isolierung nicht-parenchymatischer Zellen (NPC)

Die zuvor anästhesierte Maus wurde fixiert und das Abdomen eröffnet (siehe 4.2). Nach dem Einbringen einer 26g Venenverweilkanüle wurde die Leber über eine 50ml Spritze langsam per Hand mit 20 ml Perfusionsmedium III (Tab. 5) gespült und durch einen Einschnitt in die untere Hohlvene entlastet. Dieser Vorgang wurde durch Abklemmen der unteren Hohlvene in Abständen von 20-30 Sekunden wiederholt und ein Ausschwemmen der roten Blutkörperchen aus der Leber war zu beobachten. Im Anschluss wurde die Leber entnommen und die Gallenblase entfernt. Die Leber wurde in kleinere Stück zerschnitten und mit 5ml Perfusionsmedium III in einem 50 ml Falcon bei 37°C und 5% CO₂ für 15 Minuten inkubiert. Die exakte Einhaltung der Zeit ist aufgrund des Risikos einer Degradierung der Oberflächenmarker insbesondere der Kupferzellen bedeutsam. Anschließend wurde das angedaute Lebergewebe auf Eis gekühlt und so die enzymatische Aktivität gestoppt. Ein 100 µm Zellsieb wurde benutzt, um die Zellen aus dem Gewebe zu befreien. Dazu wurden die Leberteile auf das Sieb gegossen und anschließend mit dem Spritzenstempel einer 1 ml Spritze vorsichtig durch das Sieb in ein 50 ml Falcon gepresst. In regelmäßigen Abständen wurde das Sieb mit Waschmedium gespült, bis alle Fragmente zerkleinert waren. Das Gefäß wurde mit Waschmedium auf 50 ml aufgefüllt und 15 Minuten zentrifugiert (400 rpm / 30g, 4°C). Die in Suspension verbliebenen, nicht parenchymalen Zellen wurden abpipettiert und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 300g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet mit 1 ml eisgekühltem Ca- und Mg- freiem HBSS in einem 5ml Zentrifugenröhrchen resuspendiert. Wiederum 1 ml dieser Suspension wurde mit 2 ml 30% Histodenz vermischt und 1 ml kaltes Ca- und Mg- freies HBSS darüber geschichtet. Daraufhin wurde eine Dichtegradientenzentrifugation auf niedrigster Beschleunigungs- und Bremsstufe durchgeführt (20 Minuten, 1500g, 4°C). Die Zellen in der trüben Schicht, die sich von den zwei klaren Schichten optisch unterscheiden ließ, wurden mithilfe einer sterilen Pasteurpipette in ein 15 ml Falcon mit 12 ml Waschmedium transferiert und zentrifugiert (10 Minuten, 300g, 4°C). Das entstandene Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und gezählt.

4.6 Kultivierung nicht-parenchymatischer Zellen (NPC)

Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 250.000/ Kavität in 500µl NPC-Kulturmedium ausgesät. Dazu wurden 48-Well-Multiwellplatten verwendet. Die Kultivierung fand über 24 h bei 37°C und 5% CO₂ statt.

4.7 Transfektion mit mRNA durch Liponanopartikel

Die Transfektion wurde für alle Zelllinien in 12-Well-Multiwellplatten durchgeführt. Das Volumen pro Well betrug 1ml (0,5µl mRNA (1µg/µl), 4µl Lipofectamine™ MessengerMAX™ Reagent, 125µl Opti-MEM™ Medium, 875,5µl R₁₀ Kulturmedium I bzw. modifiziertes R₁₀ Kulturmedium II). Alle Proben und Kontrollen wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Zunächst wurde das Lipofectamine mit 62,5µl des Opti-MEM gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die mRNA wurde ebenfalls mit 62,5µl Optimem gemischt und für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden die beiden Mischungen miteinander für weitere 5 Minuten inkubiert und das Kulturmedium wurde hinzugefügt. Das alte Kulturmedium wurde aus den Wells entfernt und mit der Transfektionslösung ersetzt. Die Multiwellplatte wurde für 24h in dem Zellkulturschrank platziert (37°C, 5% CO₂).

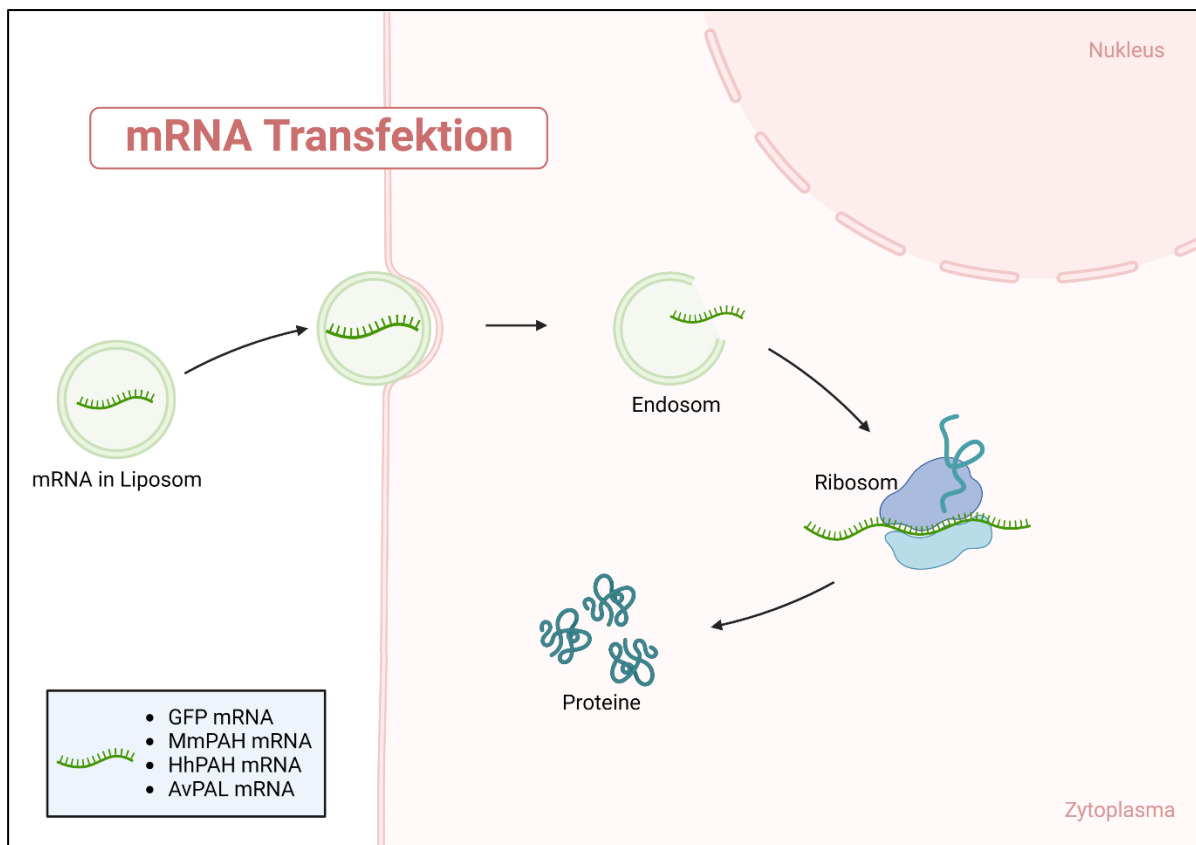


Abbildung 5: In vitro Transfektion mit 4 verschiedenen mRNAs (erstellt mit BioRender.com)

4.8 Fluoreszenz Mikroskopie

Im Anschluss an die Transfektion wurden der Zustand und die Morphologie der Zellen unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Zusätzlich wurden die Transfektionsrate und Verteilung der exprimierten GFP Signalproteine durch Fluoreszenzmikroskopie evaluiert. Dazu wurden die Zellen mit UV-Licht (475 nm) angeregt (Exposition 100 ms) und das emittierte Licht als Bild festgehalten. Verwendet wurde die Software cellSens Entry.

4.9 Ernte der rekombinanten Proteine

Der Überstand der Zellkulturen wurde abpipettiert und asserviert. Die Zellen wurden mit Zelllysepuffer (400µl) und Proteinase Inhibitor (1:100) aus ihrer Formation herausgelöst und die Zellmembran zerstört. Durch wiederholtes Pipettieren wurden die Zellen resuspendiert, in ein Eppendorf Gefäß überführt und für 3 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der die Proteine beinhaltende, flüssige und klare Teil der Lysate wurde abpipettiert, die größeren Zellreste wurden verworfen.

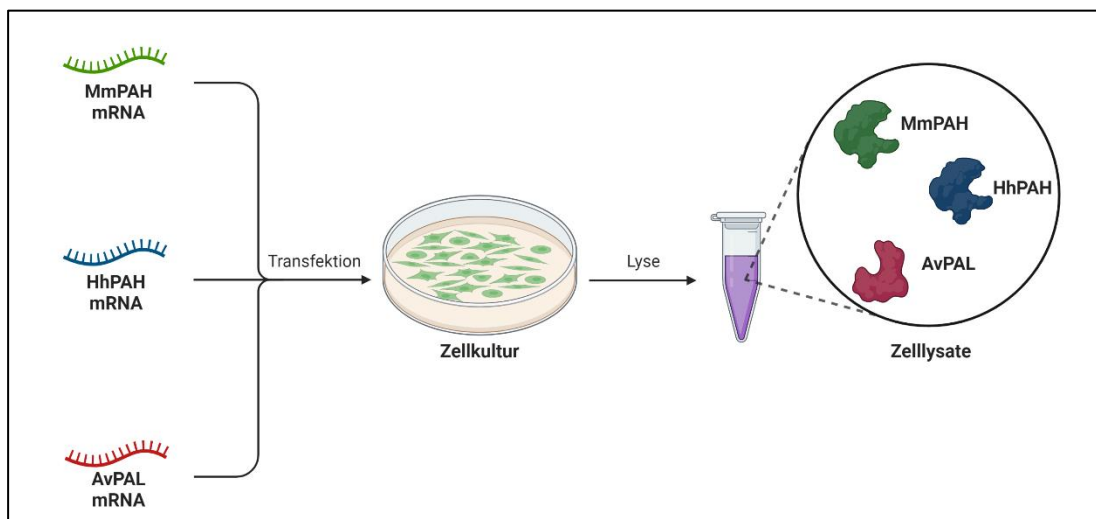


Abbildung 6: In vitro System zur Herstellung rekombinanter Proteine (erstellt mit BioRender.com)

4.10 Western Blotting

4.10.1 Gelelektrophorese

Die zuvor durch Zelllyse gewonnenen Proteinproben (13 µl) wurde mit NuPAGE® LDS Sample Puffer (5 µl) und NuPAGE® Reducing Agent (2 µl) in einem Thermoblock für 10 Minuten auf 70°C erhitzt und dann auf Eis gekühlt. Danach wurde der Kamm aus dem vorgefertigten NuPAGE® Gel entfernt und die Taschen wiederholt mit NuPAGE® Running-Puffer gespült. Nachdem der Plastikstreifen zum Schutz des elektrischen Kontakts entfernt war, wurde das Gel so in der Kammer positioniert, dass die offene Seite nach innen zeigte.

Durch ein Befüllen der inneren Kammer mit wenig Running-Puffer konnte die Dichtigkeit der Kammer getestet werden. Nun wurde die innere Kammer komplett mit Running-Puffer aufgefüllt. Die vorgesehenen Taschen wurden vorsichtig mit den vorbereiteten Proben (20 µl) und eine Tasche mit 5 µl der BenchMark™ Protein Ladder zur Größenbestimmung der Proteine befüllt. Darauffolgend wurde die äußere Kammer mit Running-Puffer befüllt und an 200 V Gleichspannung angeschlossen. Nachdem die blau sichtbaren Banden das Gel auf der Unterseite verlassen hatten, war die Gelelektrophorese beendet, die Stromversorgung wurde ausgeschaltet und die Verbindung zur Kammer getrennt.

4.10.2 Gel Transfer

Mit diesem Schritt wurden die Proteinbanden von dem Elektrophorese-Gel auf die Western-Blot-Membran transferiert. Zunächst wurde die Gekassette aus der Kammer entfernt und geöffnet. Die Taschen und das Fußteil des Gels wurden mit einem Gelmesser entfernt und eine in Transfer-Puffer getränktes Filterpapier ohne Luftblasen auf das Gel platziert. Danach wurde das Gel auf die Filterpapierseite gelegt, die ebenfalls in NuPAGE® Transfer-Puffer getränkte Transfermembran auf das Gel gelegt und mit einem weiteren Filterpapier abgedeckt. Zwei mit Transfer-Puffer getränkte Schwämme wurden in die Kathode (-) des Blotting-Moduls gelegt. Die Kathode ist der tiefere der zwei Einzelteile des Blotting-Moduls. Nun wurde der Membran/Gel-Komplex so in die Kathode gelegt, dass das Gel unten war (Abb. 7) und zwei weitere mit Transfer-Puffer getränkte Schwämme abschließend platziert, sodass die Kante der Kathode etwas überragt wurde. Anschließend wurde die Anode angebracht und das Blotting-Modul in die gewaschene Elektrophorese-Kammer geklemmt. Die innere Kammer wurde mit Transfer-Puffer, die äußere mit deionisiertem Wasser gefüllt und der ganze Komplex wurde auf Eis gestellt. Nachdem die Stromversorgung angeschlossen war, wurde die Spannung auf 30 V Gleichstrom eingestellt und eingeschaltet. Der Prozess dauerte eine Stunde.

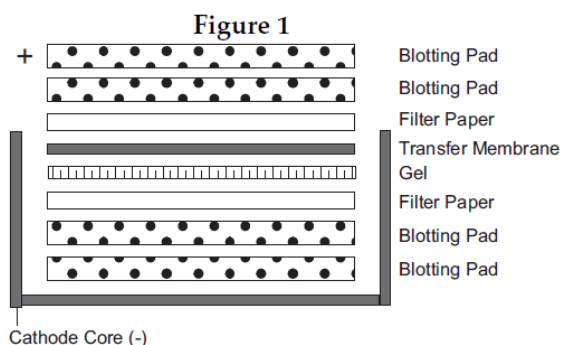


Abbildung 7: Anordnung Western Blot (Manual S37)

4.10.3 Revealing-Prozess

Zunächst wurde das Transfer-Reservoir geöffnet und die Membran mit der Seite, die in direktem Kontakt mit dem Gel war, nach innen eingerollt und in ein 50 ml Falcon-Gefäß platziert. Es wurde 15 ml Blocking-Solution hinzugefügt und das Röhrchen für eine Stunde maschinell gerollt. Parallel wurde die primäre Antikörperlösung aus 10 ml Blocking-Solution und 5 µl Antikörper (Anti-PAH Primary monoclonal Rabbit, 1:2000) vorbereitet. Die 15 ml Blocking-Solution wurden entsorgt, der Primäre Antikörper wurde zugegeben und zur gleichmäßigen Verteilung über Nacht im Kühlraum gerollt. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran mit jeweils 10 ml TBST-Lösung dreimal 5 Minuten gewaschen. Die sekundäre Antikörperlösung bestand aus 10 ml Blocking-Solution und 2 µl sekundärer Antikörper (Mouse anti-Rabbit IgG (H+L), 1:5000). Diese wurde für eine Stunde mit der Membran in Kontakt gebracht. Danach erfolgten wieder drei Waschschrte mit TBST. Vor dem Revealing-System wurde die Membran flach in eine kleine Plastischüssel gelegt und mit jeweils 1 ml der beiden Revealing-Solutions benetzt. Die beiden Lösungen wurden gut gemischt und mehrmals über die Membran pipettiert. Dann wurde die Membran für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde sie in der Western Blot Imaging Maschine platziert sowie digital analysiert und dokumentiert.

4.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence-activated cell sorting) wurde verwendet, um die Transfektionsrate der Zellen zu bestimmen und zu optimieren. Die Untersuchung basiert auf dem Prinzip der Emission von optischen Signalen durch die Zellenoberflächenmarker oder intrazellulären Proteine, welche von einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge angeregt werden. Zusätzlich erlaubt die charakteristische Beugung und Streuung des Lichts Rückschlüsse über die Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Das Vorwärtsstreu-licht (FSC) ist dabei hauptsächlich ein Maß für das Volumen der Zellen und das Seitwärtsstreu-licht (SSC) ein Maß für die Oberfläche der Zellen und die Struktur des Zellkerns. Allein durch diese Eigenschaften können die zu untersuchenden Zellen in bestimmten Arealen eines Diagramms zu erkennen sein. Des Weiteren können fluoreszierende Proteine, die von dem Laserstrahl angeregt wurden, Lichtquanten emittieren und werden so von dem Gerät erkannt. Das intrazelluläre Markerprotein GFP wurde in der Arbeit verwendet, um die mit der entsprechenden mRNA transfizierten Zellen zu identifizieren.

In der Vorbereitung jeder FACS-Analyse wurde zunächst der Überstand aus den Wells abpipettiert und entsorgt. Danach wurden pro Well 400 µl Trypsin hinzugefügt und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert, sodass sich die Zellverbindungen zum Boden lösten.

Die Suspension wurde mit 1,5 ml FACS-Puffer in einem FACS-Röhrchen verdünnt und zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 300g). Der Überstand wurde entsorgt und das Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Analyse wurde mit dem BD LSR II Gerät (BD Biosciences) durchgeführt und mit der Datenverarbeitungssoftware Flowjo Version 9 (Tree Star Inc.) ausgewertet.

4.12 Konfokale Mikroskopie

Die mit GFP- und HhPAH-mRNA transfizierten HeLa- und HepG2-Zellen wurden mit dem Konfokalmikroskop untersucht, um abschließend die Lokalisation der entstandenen Proteine zu visualisieren. Dazu wurden jeweils 70.000 Zellen in 200 µl auf spezielle Glasobjekte in 24-Well-Platten ausgesät und am folgenden Tag wie folgt gefärbt:

Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4% Formaldehyd und 5% Sucrose für 1 h bei 25°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1% TritonX-100 (10 Minuten, 25°C). Danach wurde mit der Blocking-Lösung (2% BSA in PBS) für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Der primäre Antikörper (Anti-PAH, 1:100) wurde für 1 h bei 25°C (alternativ: 24 h bei 4°C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die F-Aktin-Sonde (Texas Red™-X Phalloidin, 1:100) und der sekundäre Antikörper für die HhPAH (Alexa Fluor 488, 1:1000) jeweils in 2% BSA/PBS verdünnt und für 45-60 Minuten (25°C) im Dunkeln inkubiert. Es folgten erneut drei Waschgänge mit PBS und die Montage der Glasobjekte auf die Objektträger. Dazu wurde ein Tropfen des DAPI-haltigen Montage-Mediums (Roti® Mount FluorCare DAPI) auf den Glasträger pipettiert und das Glasobjekt ohne Blasenbildung mit den Zellen auf der Unterseite auf den Träger platziert. Somit wurden die Zellen zwischen Objektträger und Glasobjekt eingeschlossen. Die fertigen Objektträger wurden in einem nicht verschlossenen Behälter zum Trocknen aufbewahrt, da das Medium durch Verdunsten polymerisiert. Nach der Mikroskopie der fluoreszierenden Zellen wurden sie langfristig bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt.

4.13 L-Phenylalanin Assay

Die PAH-Aktivität wurde angelehnt an bereits beschriebene Verfahren bestimmt (Gersting et al., 2008, Miranda et al., 2002). Um die Aktivität des Enzyms im Verlauf zu untersuchen, wurden transfizierte Zellen 24 Stunden und 48 Stunden nach Transfektion lysiert. 200µl Zelllysate mit tetramerer rekombinanter PAH wurden für 5 Minuten bei 25°C mit L-Phe Substrat in einem Standard-Reaktionspuffer (15mM HEPES, 1mg/ml Katalase) prä-inkubiert. Nach der Zugabe von 10 µM Ammoniumeisen (II)-sulfat und 1 Minute Inkubation wurde die Reaktion mit BH₄, das in 2 mM Dithiothreitol (DTT) stabilisiert wurde, gestartet.

Die kinetischen Parameter wurden durch eine zunächst feste L-Phen-Konzentration (1mM) und variable Ko-Faktor Konzentrationen (200µM, 400µM, 600µM) und dann eine feste Ko-Faktor-Konzentration (200µM) und variable L-Phen-Konzentrationen (0-1mM) ermittelt. Alle Konzentrationen beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 500µl. Die Menge an Tyrosin, das nach einer Stunde entstanden war, und das vorhandene Phenylalanin wurden mithilfe von Ionenaustauschchromatographie gemessen und als Triplets durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Graph Pad PRISM. Zur statistischen Auswertung wurde der Dunnett-Test (multipler Vergleichstest) angewandt.

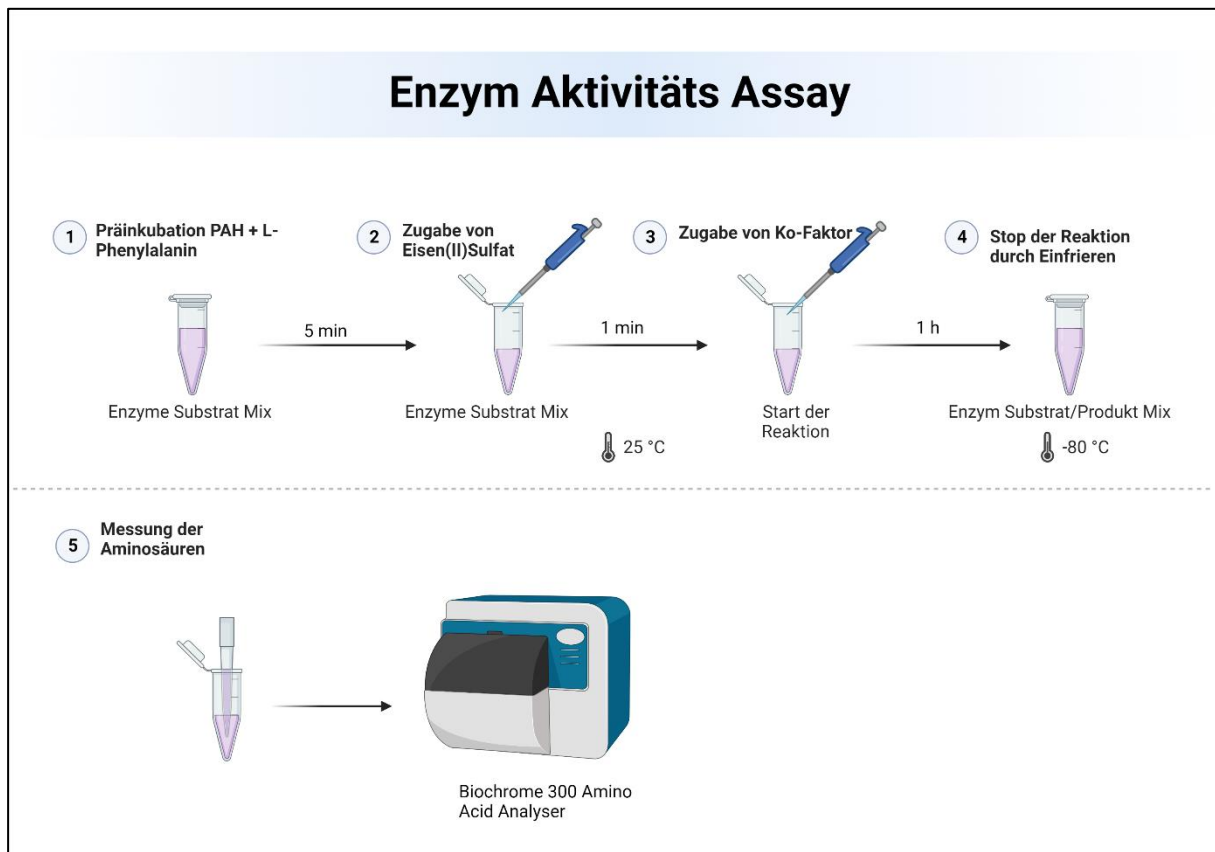


Abbildung 8: PAH Aktivitäts-Assay Arbeitsablauf (erstellt mit BioRender.com)

5 Ergebnisse

5.1 Transfektion permanenter Zelllinien

Zunächst war es das Ziel, das Einbringen der mRNA in etablierte Zelllinien und die folgende Expression zu evaluieren und eine Grundlage für schwerer zu transfizierende primäre Zelllinien zu schaffen. Die mit GFP-mRNA transfizierten Zellen wurden lichtmikroskopisch untersucht und die Transfektionsrate der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Gating Strategie:

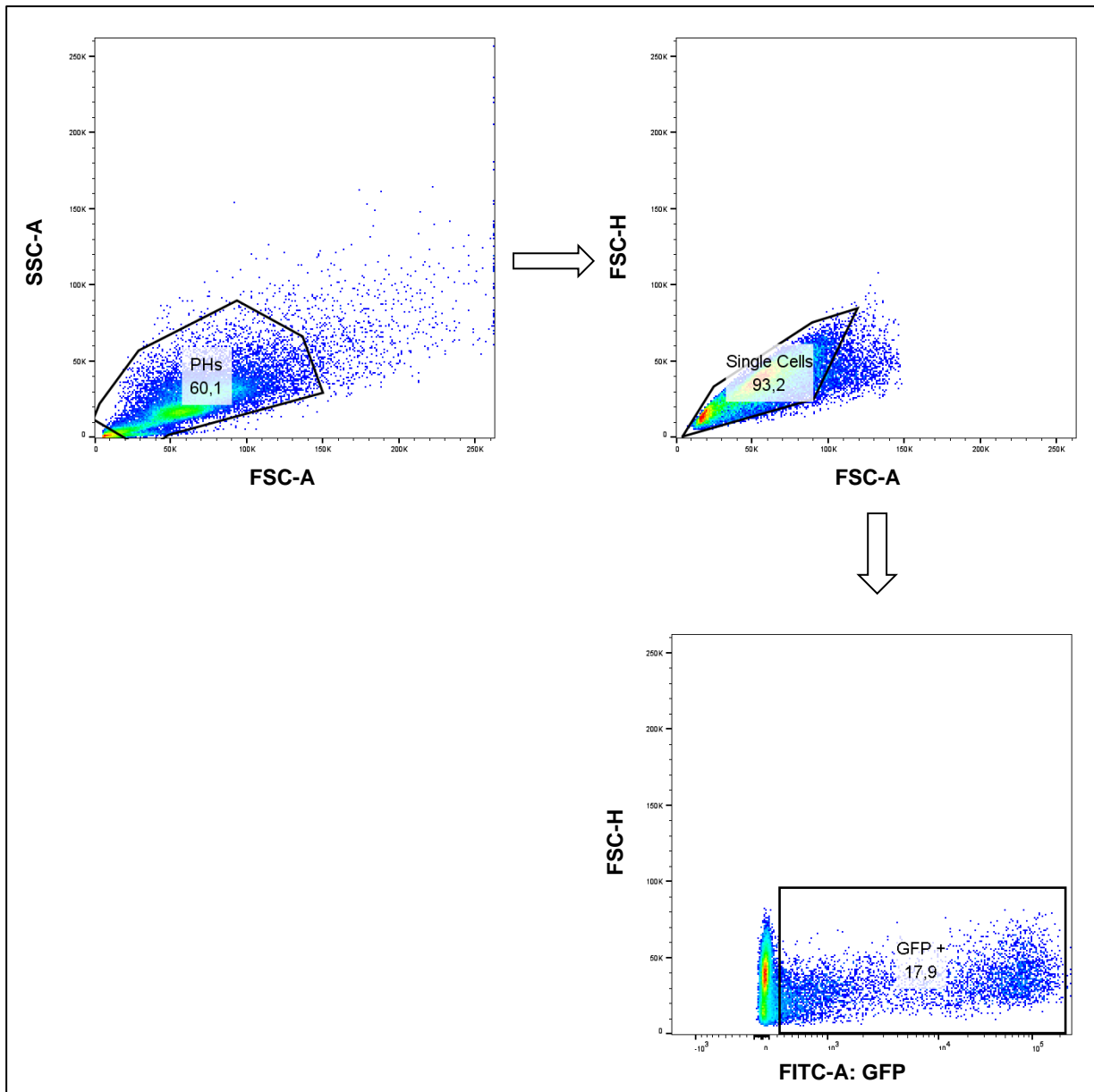


Abbildung 9: Gating Strategie

In der ersten Selektion wurden die Zellen, die die Merkmale primärer Hepatozyten widerspiegeln, ausgewählt. Danach erfolgte der Ausschluss von Zellkonglomeraten und im finalen Schritt die Selektion der GFP-positiven Zellen (Abb. 9).

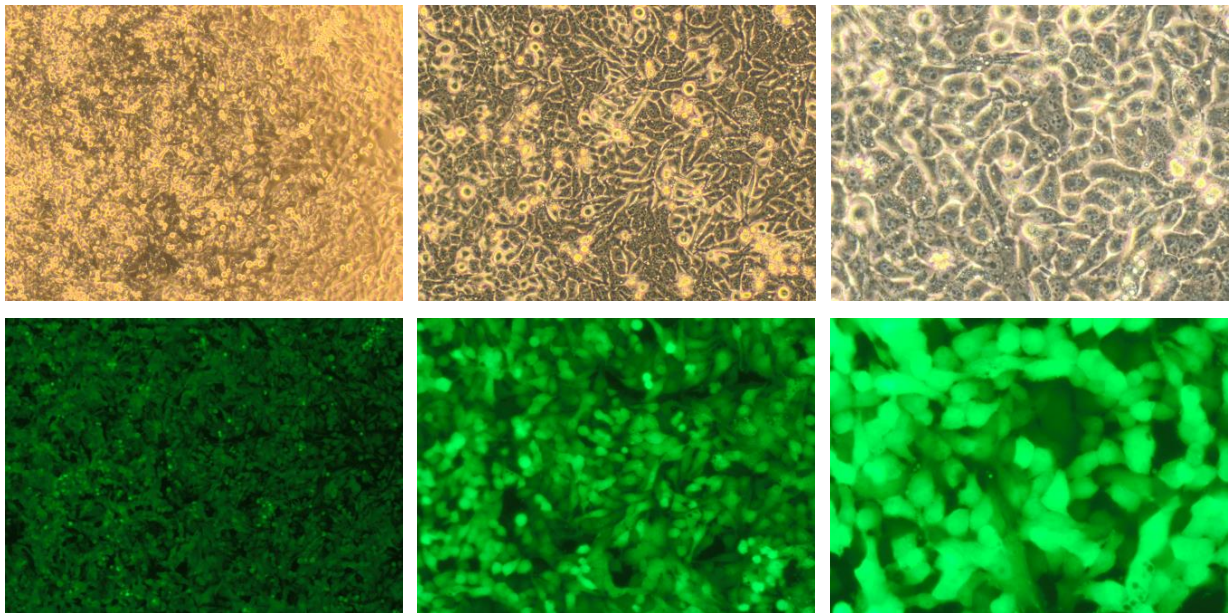


Abbildung 11: HeLa Zellen kultiviert für 24h und transfiziert mit GFP mRNA für 24h
 obere Reihe: Bilder nativ in 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung, untere Reihe: Bilder mit Fluoreszenz in 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung

So konnte eine kontinuierliche Expression des GFP-Proteins in HeLa (Abb. 10) und HepG2 (Abb. 11) Zellen nachgewiesen werden. 97% der HeLa (Abb. 12) und knapp 91% der HepG2 (Abb. 13) Zellen zeigten eine Expression des grün fluoreszierenden Proteins. Des Weiteren konnte die Zellmorphologie vor und nach Transfektion verglichen werden und die Auswirkung des zellfremden Proteins auf die Gesundheit der Zellen eingeschätzt werden.

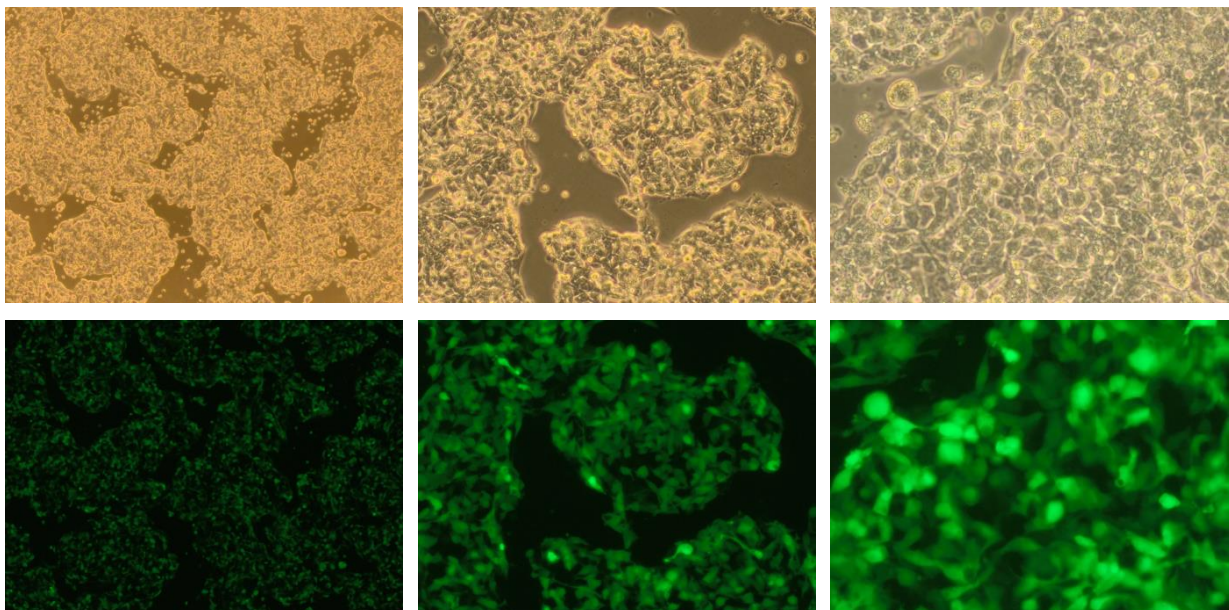


Abbildung 10: HepG2 Zellen kultiviert für 24h und transfiziert mit GFP mRNA für 24h
 obere Reihe: Bilder nativ in 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung, untere Reihe: Bilder mit Fluoreszenz in 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung

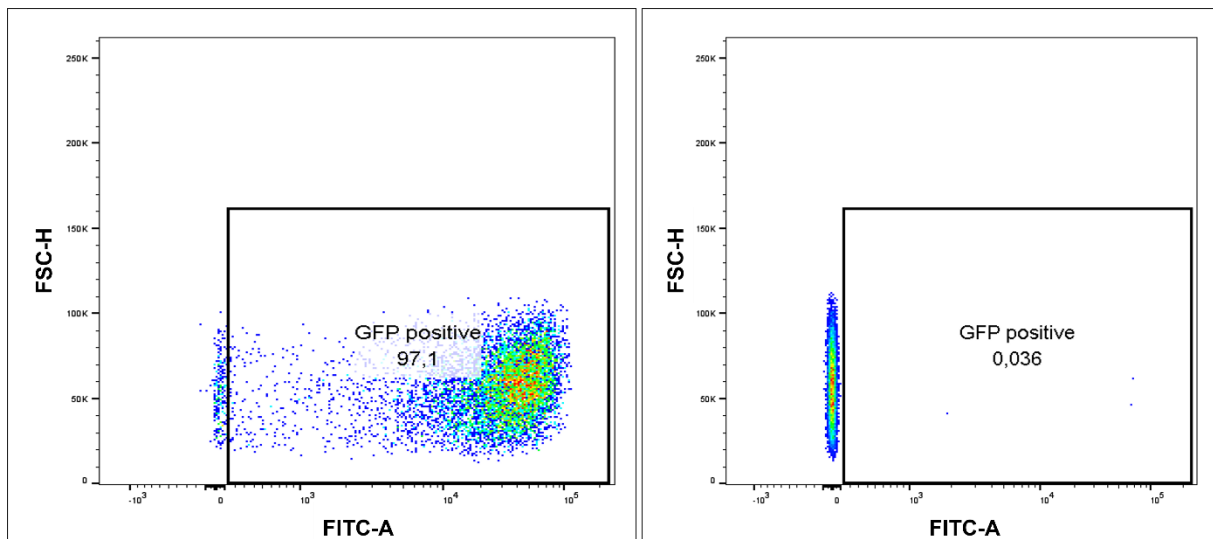


Abbildung 12: FACS-Analyse von HeLa Zellen mit GFP mRNA transfizierte HeLa Zellen links, Negativkontrolle rechts, 24 h nach Transfektion

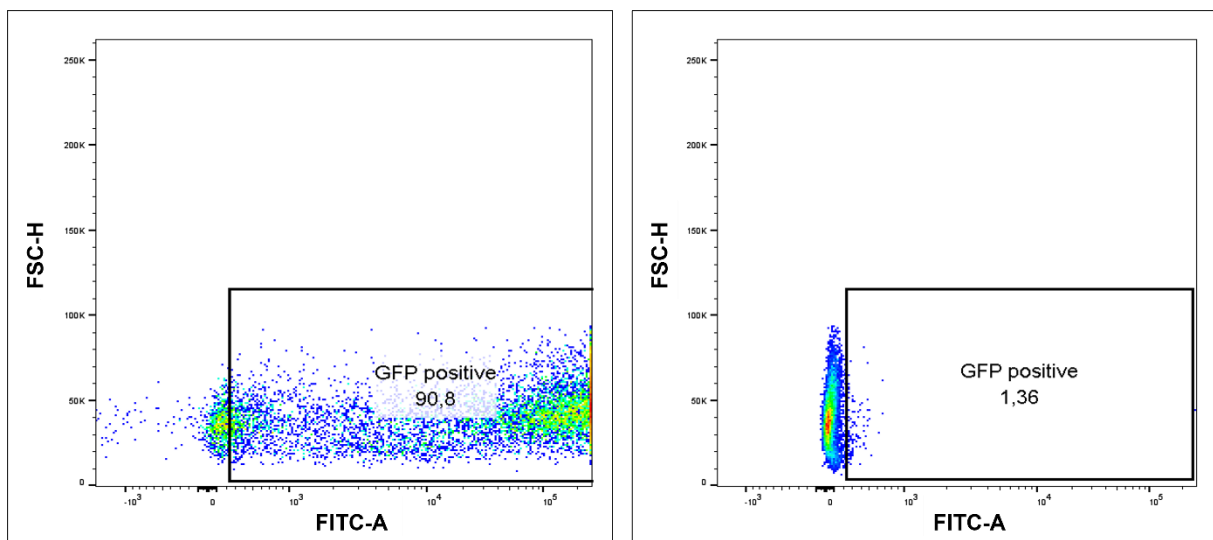


Abbildung 13: FACS-Analyse von HepG2 Zellen mit GFP mRNA transfizierte HepG2 Zellen links, Negativkontrolle rechts, 24 h nach Transfektion

5.1.1 Nachweis der therapeutischen Proteine

Im nächsten Schritt wurden HepG2- und HeLa-Zellen mit therapeutischen mRNAs für avPAL, MmPAH und HhPAH transfiziert und die exprimierten Proteine durch Western Blotting nachgewiesen. Aufgrund der verfügbaren Antikörper und der Relevanz für *in vivo*-Experimente wurde zunächst auf MmPAH und HhPAH getestet.

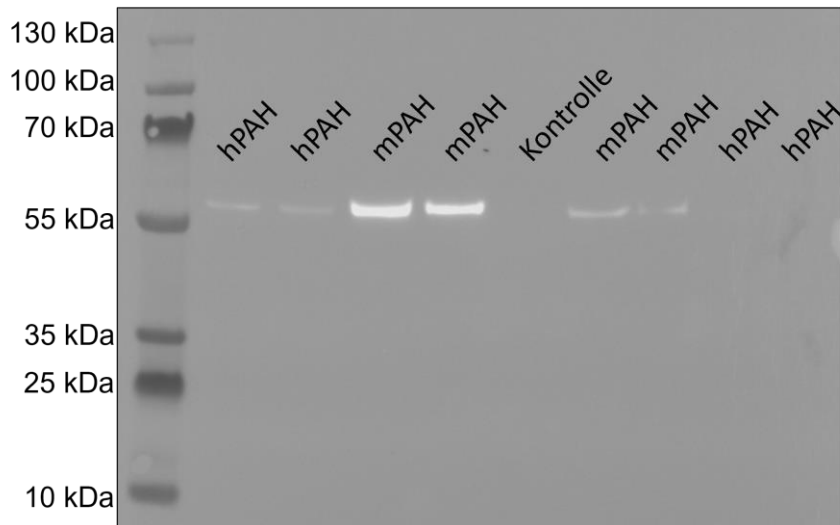


Abbildung 14: Westernblot zum Nachweis therapeutischer Proteine in HeLa-Zellen 24h nach Transfektion

Abb. 14 zeigt je zweimal zwei Banden für die rekombinanten Proteine MmPAH und HhPAH. Die Proteingröße korreliert mit den erwarteten ~60kDa für PAH. Die stärker ausgeprägten Banden für MmPAH hängen vermutlich mit der höheren Affinität des primären Antikörpers gegen Mausproteine zusammen, der besser an das MmPAH bindet. Die rechts der Kontrolle sichtbaren Banden sind von älteren Proben, die bereits längere Zeit tiefgekühlt gelagert worden waren und möglicherweise deshalb ein schlechteres Signal präsentieren.

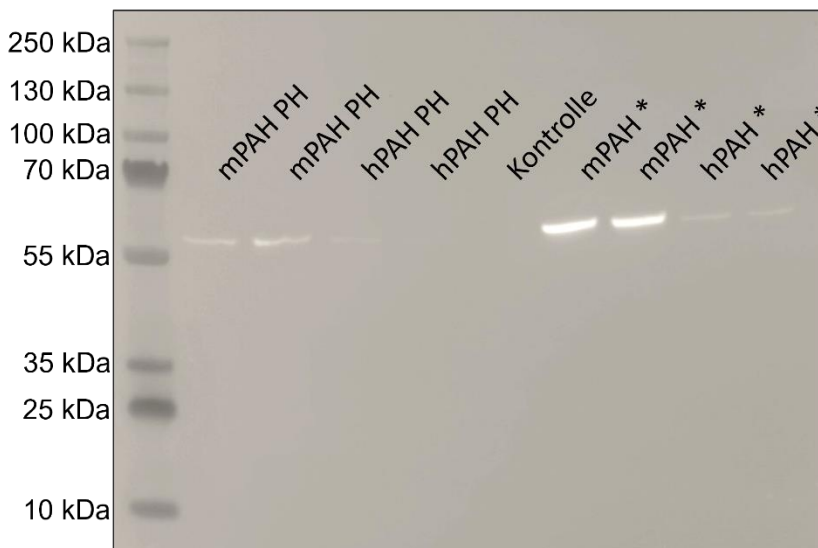


Abbildung 15: Westernblot zum Nachweis therapeutischer Proteine in PH (vor Optimierung des Kulturmediums) und HepG2 (= *) Zellen 24h nach Transfektion

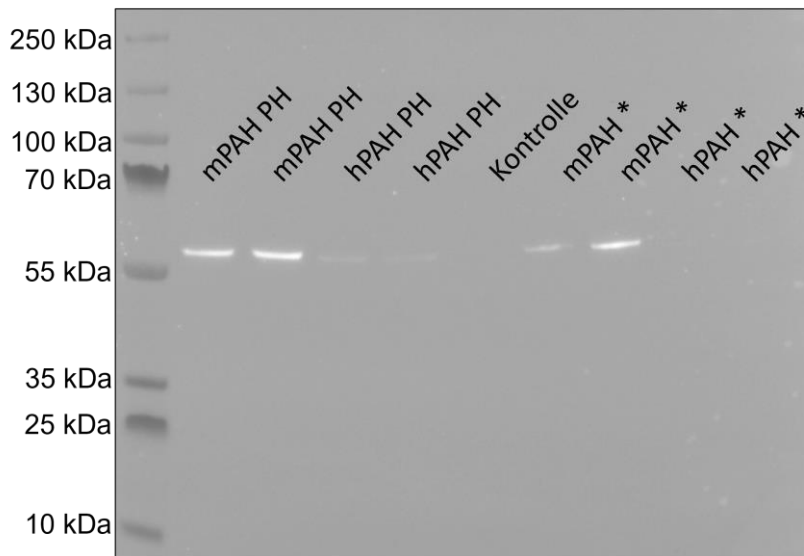


Abbildung 16: Westernblot zum Nachweis therapeutischer Proteine in PH (nach Optimierung des Kulturmediums) und HepG2 (= *) Zellen 24h nach Transfektion

Ähnliche Ergebnisse sind im Westernblot der 24h nach Transfektion lysierten HepG2-Zellen und PHs zu sehen. Abb. 15 zeigt für MmPAH klar positive und für HhPAH leicht positive Banden. Für den Nachweis in PH wurden Proteine zunächst aus noch nicht vollständig optimierten Zellkulturen isoliert. Eindeutiger sind die Banden der Proteine in Abb. 16 nach der abgeschlossenen Optimierung der Kulturbedingungen zu sehen. Auf demselben Gel sind wiederum Proteine aus alten HepG2-Zelllysaten sichtbar. Hier lässt sich, wie bei den HeLa-Zelllysaten, eine Abnahme der Signalstärke erkennen, die unter Umständen für eine Degradation der therapeutischen Proteine über die Zeit spricht.

5.2 Transfektion primärer Zelllinien

5.2.1 Primäre murine Hepatozyten

Nach erfolgreicher Transfektion und Expression sowohl des Signalproteins als auch der therapeutischen Proteine in etablierten Zelllinien wurde das Konzept in primären Zellen untersucht. Zunächst wurden primäre murine Hepatozyten als Zielzellen für die therapeutischen mRNAs kultiviert und mit der GFP-mRNA transfiziert.

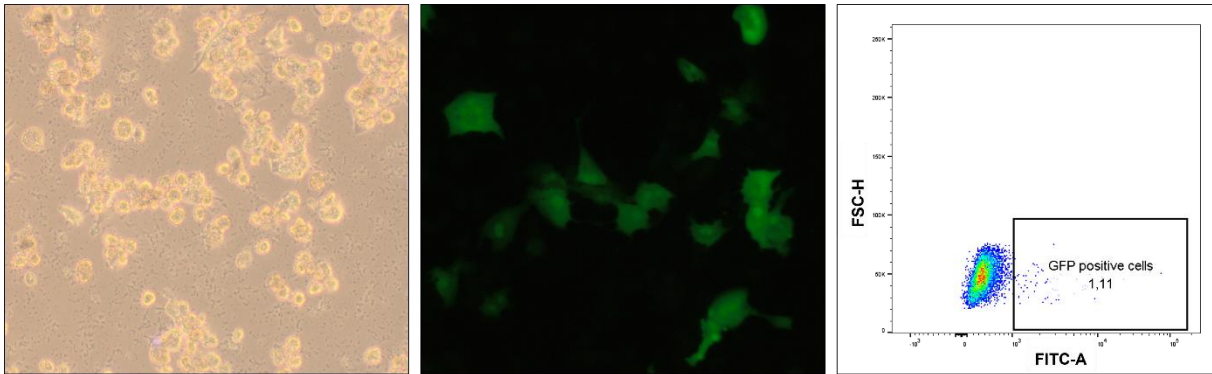


Abbildung 17: Primäre Hepatozyten kultiviert für 24h und mit GFP mRNA transfiziert
links: lichtmikroskopische Aufnahme, Mitte: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit jeweils 10-facher Vergrößerung, rechts: FACS-Analyse von PHs mit GFP-Nachweis im Mikroskop

In Abb. 17 sind die lichtmikroskopischen Bilder nativ und mit Fluoreszenz zu sehen. Die Zellen mit der Morphologie von Hepatozyten zeigten auch eine GFP-Expression, allerdings waren viele Zellen durch den Transfektionsprozess und die vorhergegangene Kulturzeit zugrunde gegangen. Dies ist auf dem nativen Bild im Lichtmikroskop zu sehen. Die runden Zellen, die über den noch adhären Zellen schwimmen, sind tot und sprechen für suboptimale Kulturbedingungen. So war die Transfektionsrate in der FACS-Analyse nur bei ~1%. Das heißt, auch wenn GFP-exprimierende Zellen im Lichtmikroskop sichtbar waren, gab es keine ausreichende Transfektion.

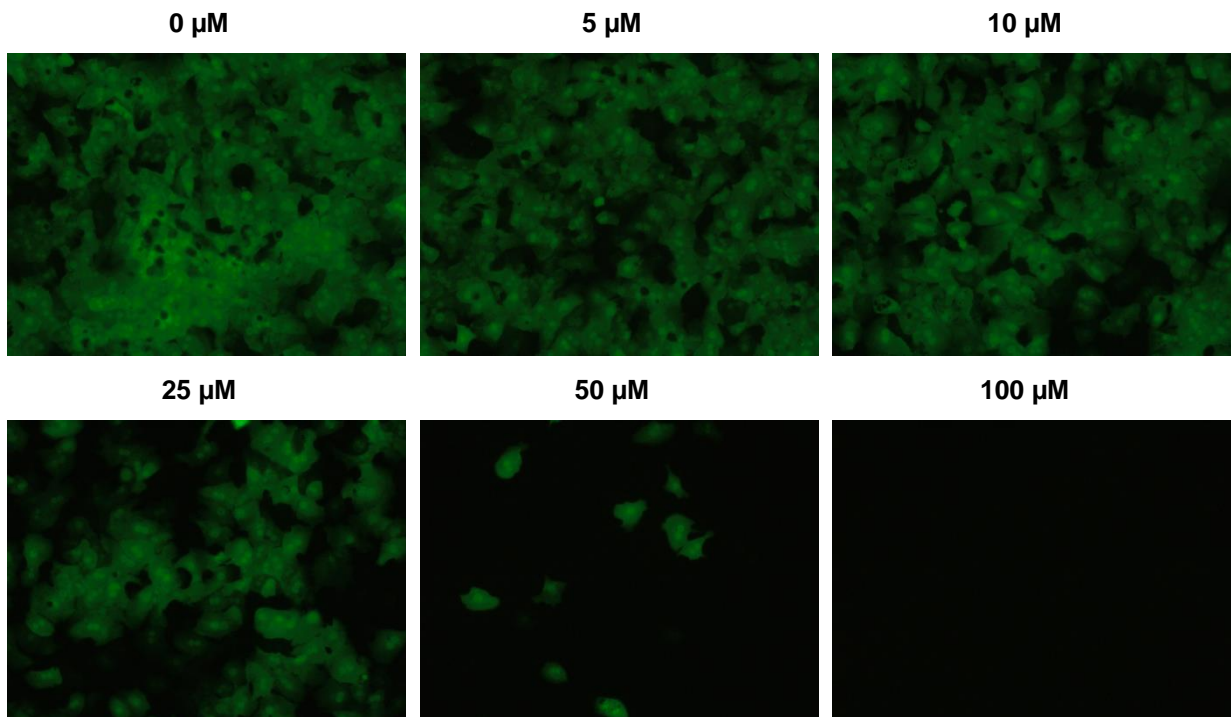


Abbildung 18: Primäre Hepatozyten transfiziert mit GFP-mRNA
Supplementierung der Kultur mit verschiedenen Dexamethasonkonzentrationen 24h nach Transfektion in 10-facher Vergrößerung

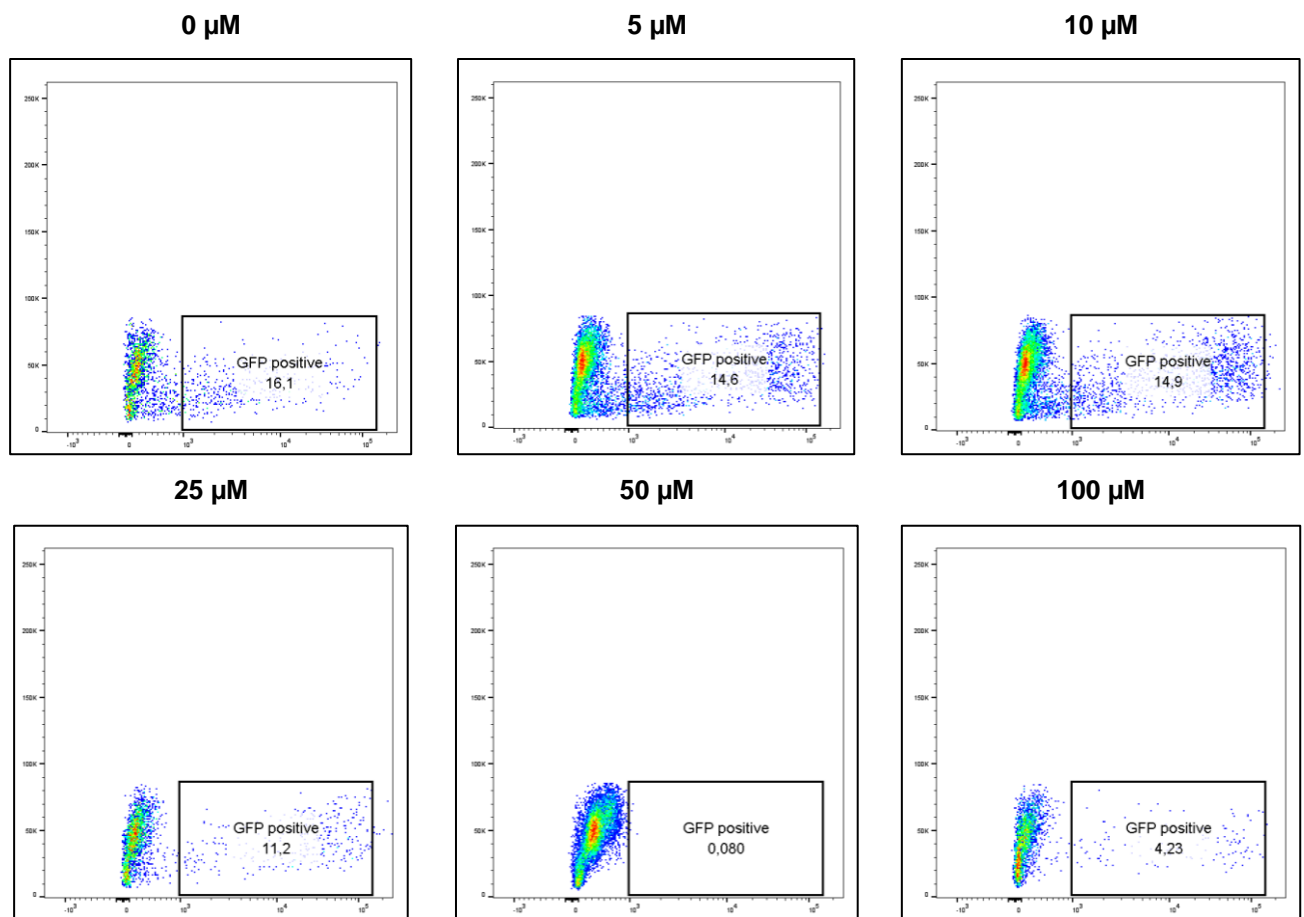


Abbildung 19: FACS-Analyse von primären Hepatozyten transfiziert mit GFP-mRNA Supplementierung des Kulturmediums mit verschiedenen Dexamethasonkonzentrationen, 24h nach Transfektion

Um einen zufriedenstellenden Effekt in primären Zellen und in weiterer Folge auch eine Funktion der therapeutischen Proteine nachweisen zu können, war eine Transfektionsrate von mindestens 30% das Ziel. Dazu wurden die Kulturbedingungen schrittweise angepasst (siehe Methoden 4.4). Abb. 18 und 19 zeigen fluoreszenzmikroskopische Bilder von PH-Kulturen supplementiert mit verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen und die zugehörigen-FACS Analysen. Die optimale Konzentration zur Supplementierung der Kultur ist gering, da bei höheren Konzentrationen die toxischen Einflüsse überwiegen. Die Supplementierung der Kultur mit dem Wachstumsfaktor EGF führte zu einer sprunghaften Verbesserung der Kultur und Transfektion (Abb. 20 und 21). Nach der abgeschlossenen Optimierung und Konzentrationsfindung für die einzelnen Komponenten wurden Transfektionsraten von 30-40% erreicht (Abb. 22).

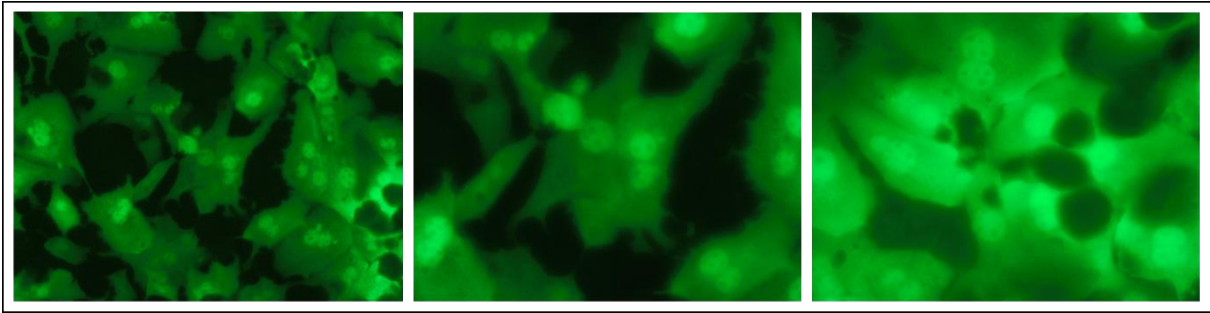


Abbildung 20: PH-Kultur supplementiert mit hrEGF mit Fluoreszenz Transfiziert mit GFP-mRNA; links: 20-fache Vergrößerung, Mitte und rechts: 40-fache Vergrößerung

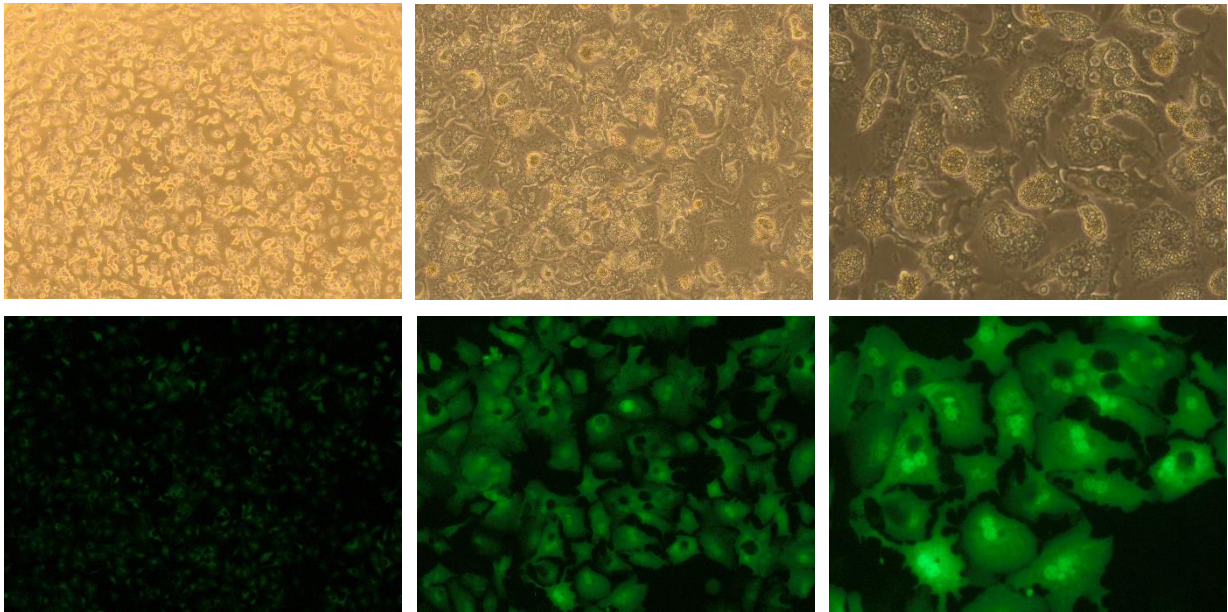


Abbildung 21: primäre murine Hepatozyten nativ und unter Fluoreszenzlicht mit GFP mRNA transfiziert nach Optimierung der Kultur mit hrEGF, Dexamethason und Insulin in 4-, 10-, und 20-facher Vergrößerung

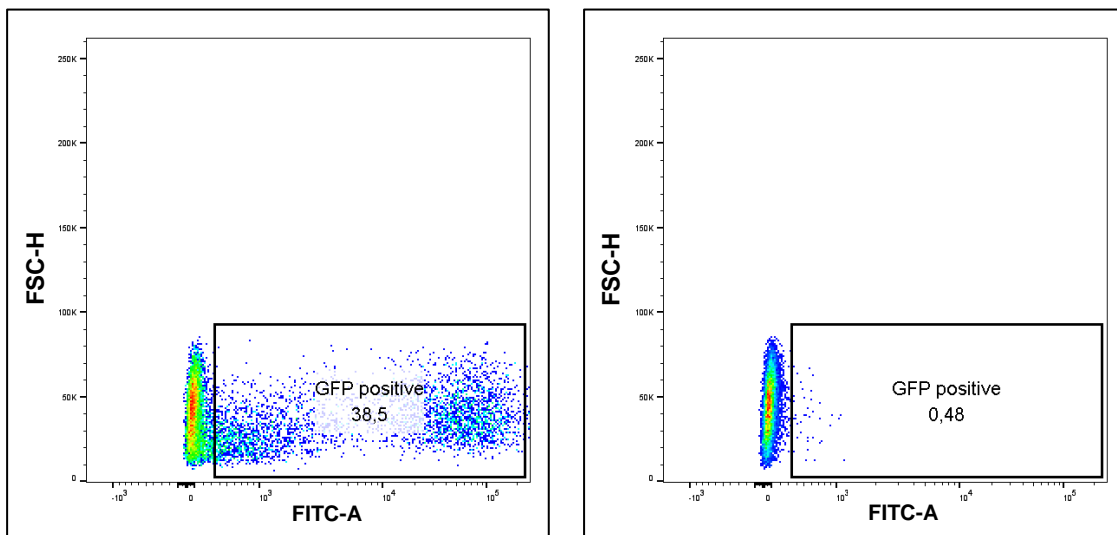


Abbildung 22: FACS-Analyse von primären murinen Hepatozyten nach Optimierung der Kultur mit hrEGF, Dexamethason und Insulin; transfiziert mit GFP mRNA links, Negativkontrolle rechts

5.2.2 Primäre murine NPC

Als zweite primäre Zelllinie wurden NPC der Leber isoliert, kultiviert und mit der mRNA für GFP transfiziert. Die morphologische Beurteilung der Kultur nach 24h mit dem Auflichtmikroskop zeigte einen hohen Anteil apoptotischer Zellen. 24h nach der Transfektion war fluoreszenzmikroskopisch kein GFP-Signal sichtbar (Abb. 23).

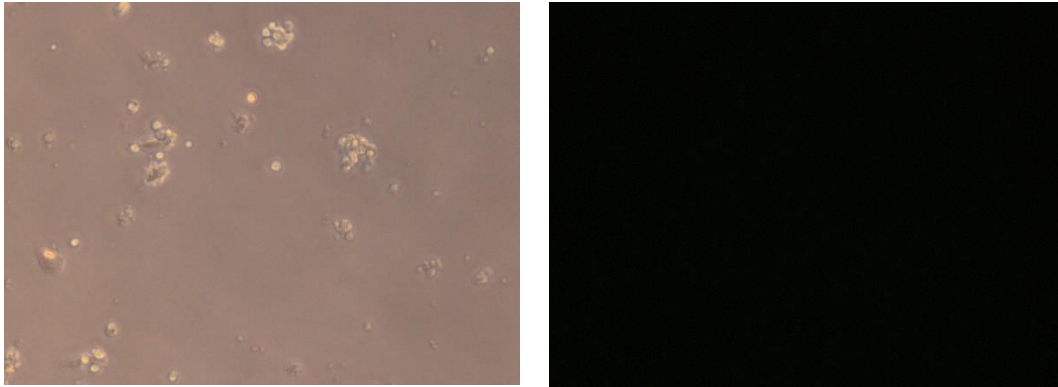


Abbildung 23: NPCs transfiziert mit GFP mRNA unter dem Lichtmikroskop (links) und unter UV Licht (rechts) bei 20-facher Vergrößerung

5.3 Nachweis der Enzymlokalisierung in Zellen

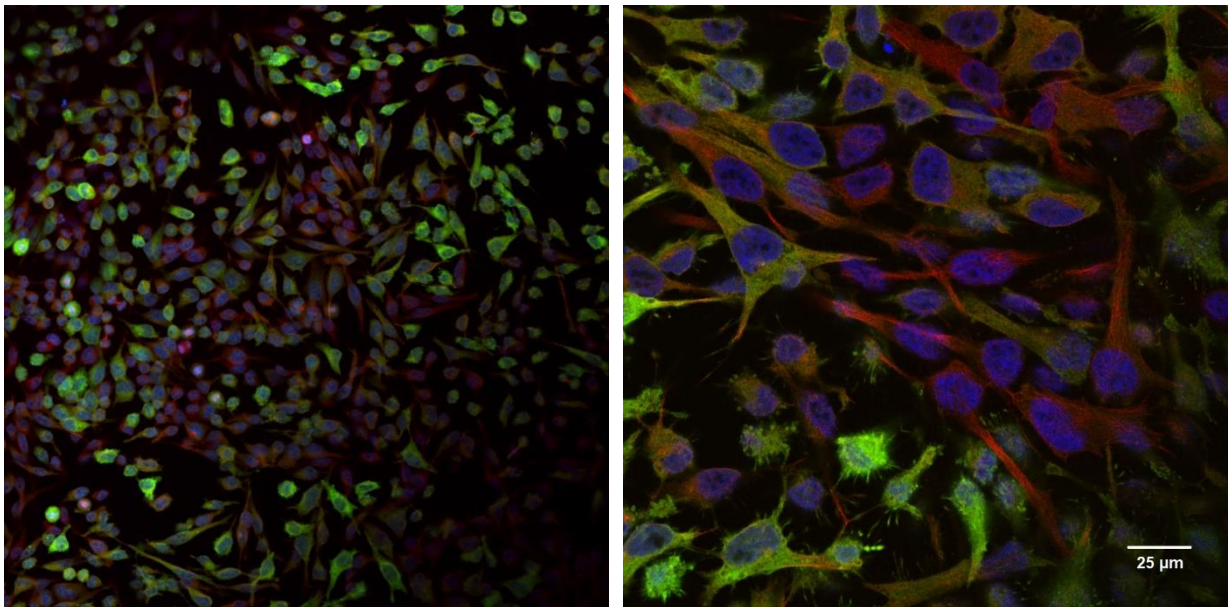


Abbildung 24: Konfokalmikroskopische Bilder von HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden 24h nach Transfektion mit HhPAH fixiert. Zellkern (DAPI, blau) und Zytoskelett (F-Aktin Sonde, rot) wurden zur Zellerkennung gefärbt. Die Anwesenheit des PAH Proteins wurde durch Antikörperbindung sichtbar gemacht (grün).

Da mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie keine Verteilung des Proteins in der Zelle bestimmt werden konnte, wurde mittels Konfokalmikroskopie die Lokalisation des Enzyms untersucht.

Abbildung 24 zeigt die in weiterer Folge für die Enzymaktivität verwendeten HeLa-Zellen. Teile des Zytoskeletts wurden mit einer F-Aktin-Sonde rot gefärbt, die Zellkerne erschienen durch die DAPI-Färbung blau. Das Enzym HhPAH wurde mit einem an einen Farbstoff gekoppelten Antikörper grün gefärbt.

5.4 Nachweis der Funktion rekombinanter PAH

Nachdem es gelungen war die verschiedenen Zelllinien mit der therapeutischen PAH mRNA zu transfizieren, war es für eine weitere Anwendung im Tiermodell notwendig, die Funktionsfähigkeit der entstandenen Proteine zu untersuchen. PAH baut die Aminosäure L-Phenylalanin zu Tyrosin um. Dazu wurde zunächst mittels Ionenaustauschchromatographie L-Phenylalanin und Tyrosin im Überstand der über 24h mit MmPAH-mRNA transfizierten HeLa-Zellen gemessen. Die ersten Messungen zeigten nur geringe Tyrosinspiegel und keine Veränderung der Phenylalaninkonzentration.

5.4.1 L-Phenylalanin Assay

Als erster Verbesserungsschritt wurden die transfizierten HeLa-Zellen für weitere 24h mit Substrat und Ko-Faktor inkubiert. Danach wurden L-Phenylalanin und Tyrosin Konzentrationen im Überstand der Zellkultur bestimmt (Abb. 25). Hier waren bereits reproduzierbar erhöhte Tyrosinwerte messbar.

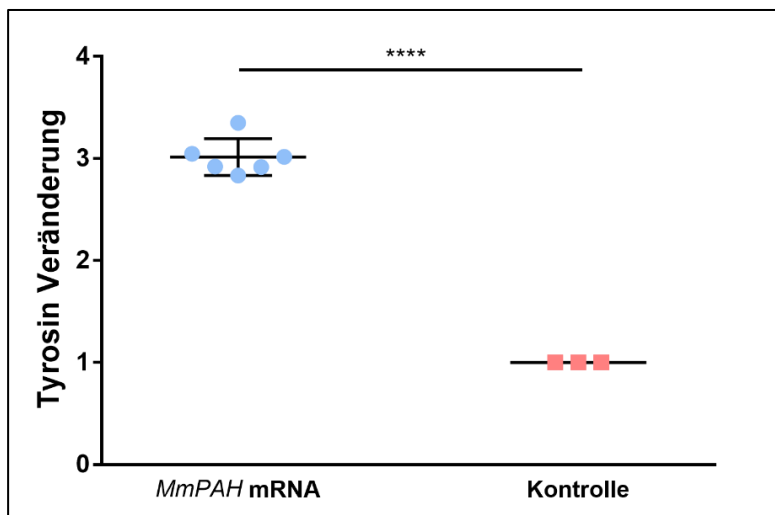


Abbildung 25: Normalisierter¹ Tyrosin-Anstieg im Kulturmedium 24h nach Supplementierung mit 1mmol/l L-Phenylalanin und 200umol/l BH4. Der Unterschied zwischen den mRNA transfizierten Zellen und der nicht transfizierten Kontrolle ist hoch signifikant (**** $p < 0.0001$).

¹ Tyrosinwerte wurden normalisiert in Bezug auf die nicht transfizierte Kontrolle

Für die finale Bestimmung der Enzymaktivität über verschiedene Zeiträume und verschiedene L-Phenylalaninkonzentrationen wurden Zelllysate nach oben beschriebener Methodik inkubiert und gemessen. Die Zellen wurden für 24h kultiviert, 24h nach Transfektion lysiert und für 1h mit Substrat und Ko-Faktor inkubiert.

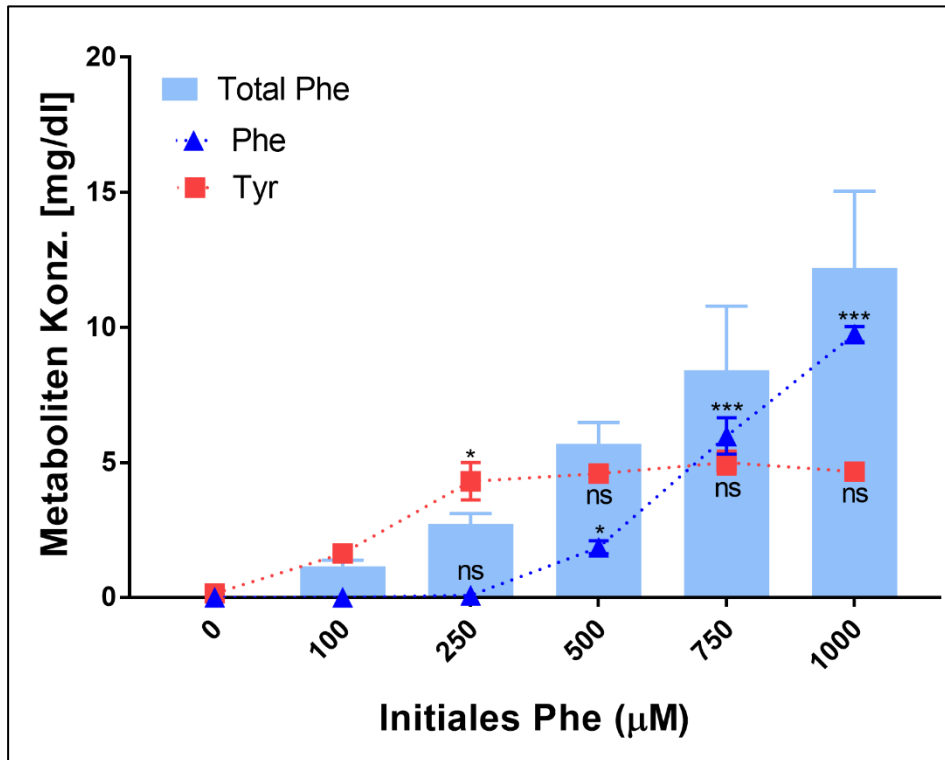


Abbildung 26: Enzymaktivität der MmPAH nach 24h

Die Enzymaktivität von MmPAH wurde 24 h nach Transfektion bei verschiedenen Phe Konzentrationen getestet um die Abhängigkeit des Enzyms von dem Substrat zu überprüfen. Die Balken zeigen die Menge des Phe in der nicht transfizierten Kontrollkultur. Blaue und rote Punkte markieren die Phe- und Tyr-Konzentrationen in transfizierter Kultur. Signifikanter Unterschied zur nicht transfizierten Kontrolle: nicht signifikant (ns), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Des Weiteren wurden drei verschiedene Ko-Faktorkonzentrationen bei einer festen Substratkonzentration überprüft. Hier zeigte sich kein relevanter Unterschied in der Enzymfunktion (Abb. 27).

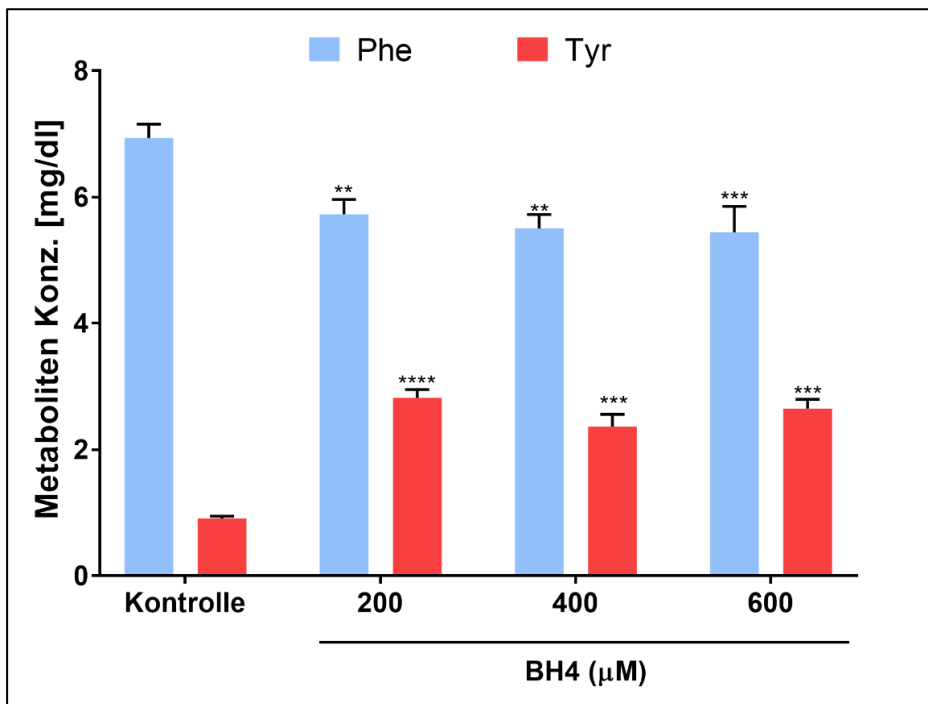


Abbildung 27: Enzymaktivität bei unterschiedlichen BH₄ Konzentrationen
 Es wurden drei Ko-Faktor Konzentrationen für das Aktivitäts-Assay untersucht, wobei keine eindeutigen Unterschiede in dem Abbau von Phe durch das MmPAH Enzym zu erkennen sind. Die Veränderung der Phenylalanin- und Tyrosinspiegel im Vergleich zur Kontrolle sind signifikant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

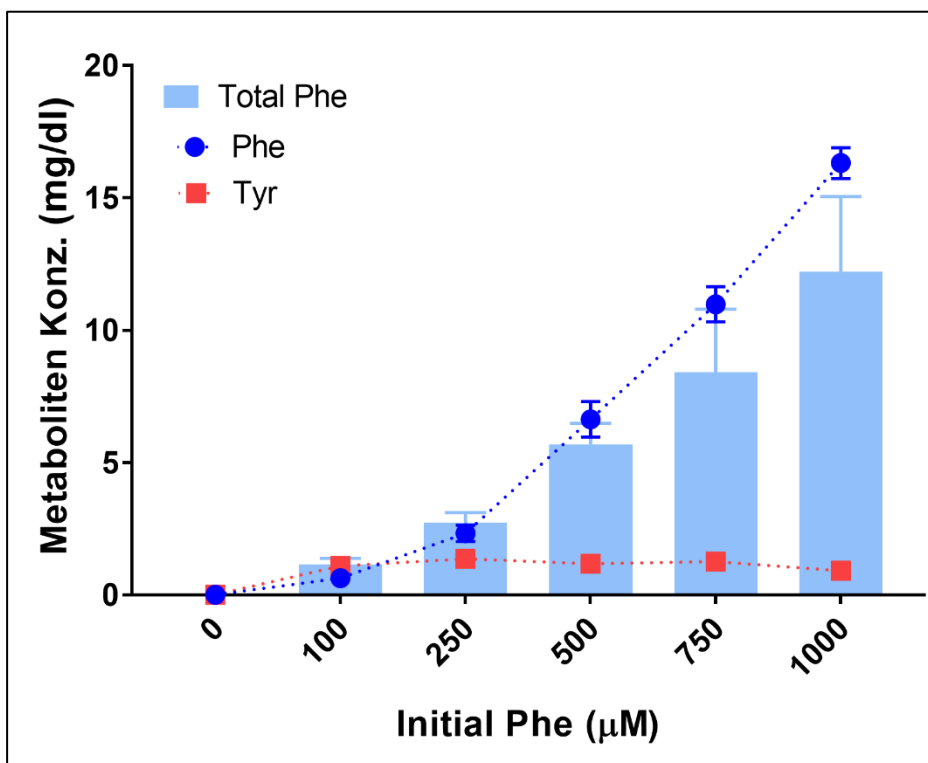


Abbildung 28: Enzymaktivität der HhPAH nach 24h
 Die Enzymaktivität von HhPAH wurde 24h nach Transfektion bei verschiedenen Phe-Konzentrationen getestet, um die Abhängigkeit des Enzyms von dem Substrat zu überprüfen. Die Balken zeigen die Menge des Phe in der nicht transfizierten Kontrollkultur. Blaue und rote Punkte markieren die Phe- und Tyr-Konzentrationen in transfizierter Kultur. Es konnte eine geringe Tyr-Produktion und keine Phe-Degradation beobachtet werden.

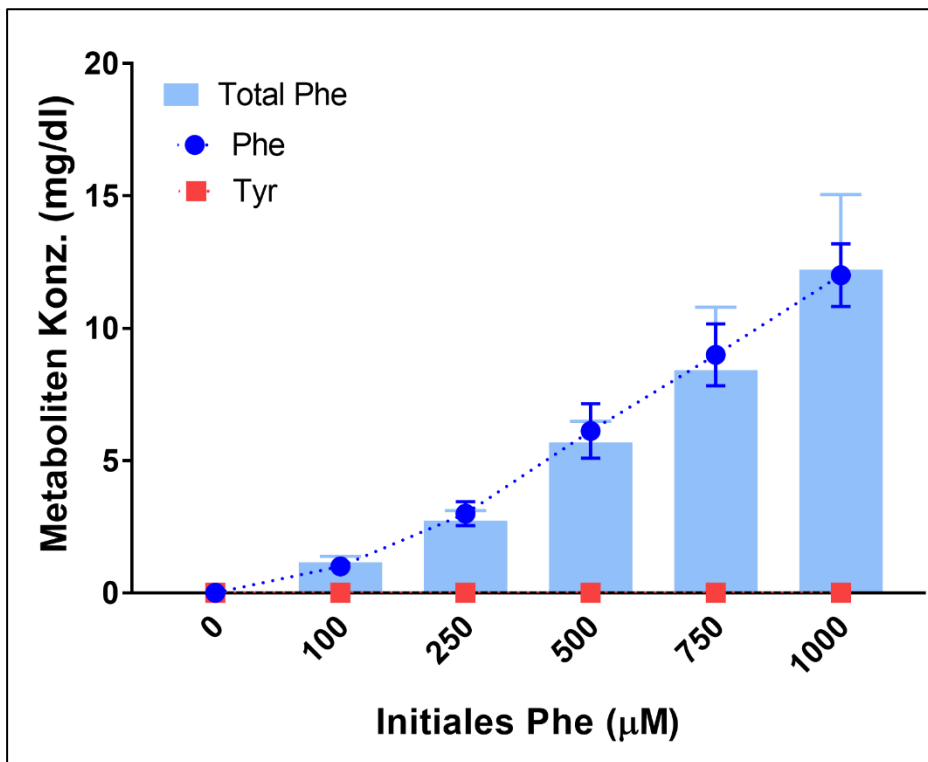


Abbildung 29: Enzymaktivität der AvPAL nach 24h

Die Enzymaktivität von AvPAL wurde 24h nach Transfektion bei verschiedenen Phe-Konzentrationen getestet. Die Balken zeigen die Menge des Phe in der nicht transfizierten Kontrollkultur. Blaue und rote Punkte markieren die Phe- und Tyr-Konzentrationen in transfizierter Kultur. Es konnte keine Tyr-Produktion und keine Phe-Degradation beobachtet werden.

Um die Dynamik der Enzymaktivität und somit auch Rückschlüsse auf die Stabilität des Proteins zu überprüfen, wurden mit MmPAH transfizierte HeLa-Zellen nach 48h lysiert und mit dem Assay überprüft. Ein Rückgang der Enzymaktivität im Vergleich von 24h zu 48h nach Transfektion mit der mRNA für das Protein ist deutlich erkennbar (Abb. 26, 30 und 31).

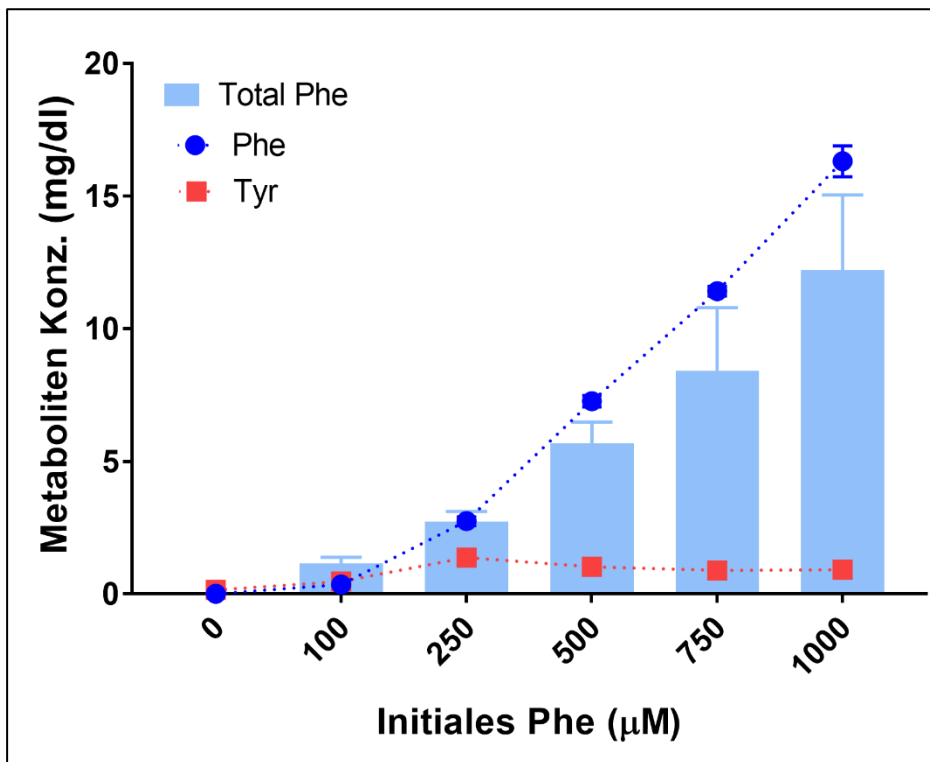


Abbildung 30: Enzymaktivität der MmPAH nach 48h
Die Enzymaktivität von MmPAH wurde 48h nach Transfektion bei verschiedenen Phe-Konzentrationen getestet. Die Balken zeigen die Menge des Phe in der nicht transfizierten Kontrollkultur. Blaue und rote Punkte markieren die Phe- und Tyr-Konzentrationen in transfizierter Kultur. Es konnte eine geringe Tyr-Produktion und keine Phe-Degradation beobachtet werden.

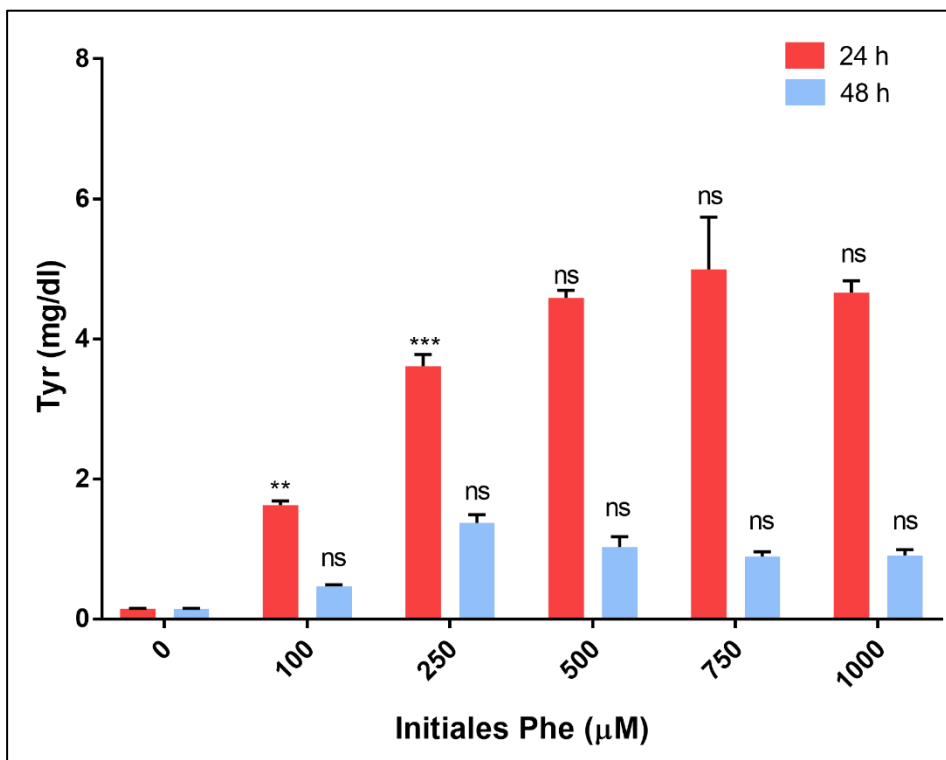


Abbildung 31: Enzymaktivität der MmPAH nach 24h und 48h
Enzymaktivität gemessen 24h und 48h nach Transfektion anhand des entstandenen Tyrosins. Es zeigte sich ein Rückgang der Enzymaktivität nach 48h. Signifikanter Unterschied zur nicht transfizierten Kontrolle: nicht signifikant (ns), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6 Diskussion

6.1 Etablierung eines Systems zum Proteinnachweis

6.1.1 Nachweis des Signalproteins GFP

Die erfolgreiche Transfektion einer Zelle mit der gewünschten mRNA und die folgende Expression des Proteins sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Dabei sind einige dieser Variablen, wie die Vitalität der Zellen, von der Zellkulturtechnik und dem Zelltyp abhängig, andere wiederum von dem richtigen Transportvehikel und der Funktionalität der mRNA (Dalby et al., 2004). Um die zellspezifischen Faktoren zunächst so einfach wie möglich zu halten, sind permanente Zelllinien, die keine komplexen Kulturbedingungen benötigen, eine gute Grundlage. Hier wurden die humane permanente Zelllinie HeLa (Gey, 1952) und die Hepatom Zelllinie HepG2 verwendet (Aden et al., 1979), letztere um dem Zielgewebe der Enzyme näherzukommen. HeLa Zellen exprimieren die PAH nicht, während HepG2-Zellen als Leberzelllinie eine endogene Expression vorweisen (Arzumanian et al., 2021). Diese war jedoch nicht von Relevanz, da sie in der Western Blot-Kontrolle nicht nachweisbar war.

Um die Transfektion so effektiv wie möglich zu gestalten, wurde das kommerzielle Lipofectamine™ MessengerMAX™ Kit zum primären Grundsatzbeweis einer transienten Expression von GFP, einem Signalprotein, benutzt. Die hohen Expressionsraten von 91% in HepG2 und 97% in HeLa-Zellen sprechen für eine gute Funktionalität der mRNA, sowie eine adäquate Aufnahme in die Zielzellen. Darüber hinaus konnte durch die optische Beurteilung der Zellmorphologie und Zellkultur nach Transfektion ein schwerer toxischer Einfluss des mRNA-Präparates auf die Zellen weitgehend ausgeschlossen werden. Die Zellen zeigten keine Anzeichen von metabolischem Stress und es waren im Vergleich zu den Kontrollkulturen auch nicht übermäßig viele tote Zellen zu beobachten.

Expressions- oder Transfektionsraten sind in diesem Kontext eine Hilfsgröße, da sie nur unvollständige Rückschlüsse auf funktionale Unterschiede der mRNAs ermöglicht (Schwanhäusser et al., 2011). Zunächst gibt die Rate Aufschluss über die Anzahl der transfizierten Zellen, die auch das Signalprotein exprimieren. Über die Höhe der Expression pro Zelle ist damit noch nichts bekannt und so ist die Notwendigkeit von hohen Expressionsraten für eine gute Funktion fraglich. Trotzdem ermöglicht diese Größe eine erste Evaluation der zu testenden mRNAs und legt den Grundstein für spätere funktionale *in vivo*-Tests.

Die vier verwendeten synthetischen mRNAs hatten bis auf die proteinkodierende Sequenz einen ähnlichen Aufbau, der eine Übertragbarkeit der Expressionskinetik der GFP-mRNA auf die therapeutischen mRNAs ermöglicht. So konnte analog zu der hohen Expression des Signalmoleküls ebenfalls eine ähnlich hohe Expression der in gleicher Weise applizierten, für ein funktionales Protein kodierenden mRNA nachgewiesen werden. Darüber hinaus war eine gute Verträglichkeit der therapeutischen mRNAs und in weiterer Folge der Proteine in der Zellkultur zu sehen.

6.1.2 Nachweis von therapeutischen Proteinen

Im Vergleich zum Signalprotein GFP können die therapeutischen Proteine MmPAH, HhPAH und AvPAL nicht durch das Fluoreszenzmikroskop visualisiert oder nativ mit der Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Um hier eine qualitative Aussage über das Vorhandensein der Proteine treffen zu können, wurde der Nachweis mithilfe des Western Blot Verfahrens durchgeführt. Der qualitative Nachweis von MmPAH und HhPAH bestätigte die Annahme einer zuverlässigen Expression der therapeutischen Proteine. Starke Signale zeigten sich für MmPAH sowohl in HeLa-Zellen als auch in HepG2-Zellen. Die schwachen Signale im Western Blot für HhPAH in beiden Zelllinien sind am ehesten durch den verwendeten primären Antikörper für die PAH zu erklären. Da der primäre Antikörper an spezifische Strukturen am nachzuweisenden Protein bindet, ist anzunehmen, dass sich die verwendeten Proteinsequenzen für die murine PAH und die humane PAH an der Bindungsstelle unterscheiden (Ledley et al., 1990).

Zusätzlich konnte die Expression und die zytoplasmatische Verteilung des humanen PAH Proteins in HeLa-Zellen konfokalmikroskopisch visualisiert werden. Allerdings waren neben stark PAH positiven Zellen auch Zellen mit geringeren Mengen des Proteins oder auch PAH negative Zellen nachweisbar. Das zeigt die bereits in permanenten Zellkulturen bestehenden komplexen Bedingungen für eine transiente Transfektion und folgende Expression einer externen mRNA. Sowohl die Stabilität der mRNA als auch die Aufnahme durch die Zellen und die Zugänglichkeit für den Proteinsyntheseapparat sind hier entscheidende Faktoren, die eine effektive Translation und damit eine wirkungsvolle Therapie gewährleisten (Lorenz et al., 2011, Iavarone et al., 2017). Morphologisch waren keine toxischen Effekte für die Zellen nachweisbar. Die Integrität der Zellmembran einiger Zellen wurde durch den Färbungsprozess gestört und so konnte sich der Antikörper besser an das Protein binden, was manche Zellen stark grün erscheinen lässt.

Mit dem qualitativen Nachweis der therapeutischen Proteine in den zwei permanenten Zelllinien wurden zwei Ziele erreicht: Zum einen wurde ein *in vitro*-System für die Untersuchung der Enzymaktivität (Staudigl, 2012) etabliert, das zuverlässig und reproduzierbar die zu evaluierenden therapeutischen Proteine generieren kann. Zum anderen konnte vor einer Anwendung in primären Zellkulturen mit intrinsisch komplexeren Voraussetzungen (Corlu and Loyer, 2015, Godoy et al., 2013) ein konzeptioneller Beweis der Funktion der mRNA erbracht werden.

6.1.3 Primäre Zelllinien als Korrelat zum Tiermodell

Frisch isolierte primäre Leberzellen korrelieren in ihrer Funktion und ihren zellulären Aktivitätsabläufen mehr mit dem Zielorgan *in vivo* als permanente Leberzelllinien (Houseman et al., 2015). Besonders im Abbau und der Verstoffwechslung externer mRNA und Proteine sind primäre Zellen näher am *in vivo*-Modell (Wilkening et al., 2003). Um für weitere *in vivo*-Experimente eine aussagekräftige Grundlage zu erreichen, wurden murine Hepatozyten gewählt. Die Evaluation in primären Zellen ermöglichte die schnelle und besser geplante Anwendung der therapeutischen mRNAs in einem PKU Knock-out-Mausmodell (Cacicedo et al., 2022). Somit konnte durch den Nachweis der therapeutischen Enzyme in dem Zielgewebe *in vitro* die Anzahl der Tiere, die für *in vivo*-Experimente benötigt wurden, nach dem 3R Prinzip (siehe 6.3) weiter reduziert werden (Gorzalczany and Rodriguez Basso, 2021).

Nach der Isolation und Kultivierung primärer Hepatozyten aus Wildtyp-Mäusen wurden diese mit der synthetischen mRNA des Signalproteins GFP analog zu den permanenten Zelllinien transfiziert. Trotz morphologisch gesund erscheinender Zellen und fluoreszenzmikroskopisch sichtbarem Signal war die mittels FACS quantifizierte Transfektionsrate nur bei 1% GFP-positiver Zellen.

Durch die fehlende Organstruktur und das veränderte Mikromilieu der primären Zellen nach Isolation ergeben sich hohe Anforderungen an die Kultivierung der Zellen, um eine ausreichende Kompetenz der Zellen für den Transfektionsvorgang zu erreichen (Wilkening et al., 2003). Die regenerativen Fähigkeiten der Hepatozyten ermöglichen einen Wechsel des Zellteilungsstadiums aus dem G0-Zellstillstand in die G1-Phase (Corlu and Loyer, 2015). Als Stimulus im natürlichen Kontext kann ein großer Leberzellverlust, zum Beispiel nach einer partiellen Hepatektomie, eine regenerative Zellteilung induzieren. Auch der Isolationsvorgang ist als solch ein Verlust an Gewebekontext zu verstehen und löst die Teilungsaktivität der Hepatozyten aus (Corlu and Loyer, 2015). Um im Zellzyklus weiter fortschreiten zu können benötigen die Hepatozyten allerdings in weiterer Folge Wachstumsfaktoren, wie heptozyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF) oder transforming growth factor alpha (TGF α) (Corlu and Loyer, 2015).

Wenn isolierte Hepatozyten in Zellmedium ohne Wachstumsfaktor kultiviert werden, führt das zu einem Stillstand der Zellen in der späten G1-Phase und nicht in der Übergangsphase von G0 zu G1 wie in der Leber *in vivo* (Loyer et al., 1996, Corlu and Loyer, 2015). In diesem Anfangsstadium der Zellteilung bedeutet ein Zellstillstand häufig die Aktivierung von Signalkaskaden, die zum programmierten Zelltod führen (Pucci et al., 2000, Donjerkovic and Scott, 2000). Zudem sind molekulare Mechanismen aktiv, die zu einer Entdifferenzierung der Hepatozyten führen (Elaut et al., 2006). Durch die Supplementierung der Hepatozyten-Kultur mit rhEGF wurde der Blockade des Zellteilungszyklus entgegengewirkt, um infolge eine optimale Gen- und Proteinexpression zu ermöglichen. Die Kulturplatten wurden mit Kollagen beschichtet, um bessere Adhärenz der Zellen zu gewährleisten, einen Zellverband in 2D zu simulieren und die Kommunikation der Zellen zu optimieren. Als parenchymale Zellen sind Hepatozyten an eine Matrix gewöhnt, die Struktur und Infrastruktur bereitstellt (Bissell et al., 1987).

Die Kulturzeit von insgesamt 48h bis 72h (24h Kultivierung nach Isolation und 24/48h Kultivierung mit mRNA) stellte neben dem Einfluss der Nanopartikel bei Transfektion eine weitere Herausforderung dar. Primär war bei lichtmikroskopischen Kontrollen der Kultur ein hoher Anteil an apoptotischen Zellen zu beobachten. Um dem Phänomen der spontanen Apoptose *in vitro* entgegenzuwirken, wurde das Kulturmedium weiter mit Dexamethason, das verschiedene Signalkaskaden inhibiert, optimiert (Bailly-Maitre et al., 2002).

Als weiteres Additiv zur Verbesserung der Kulturbedingungen wurde Insulin eingesetzt, das als Wachstumsfaktor auf die Hepatozyten wirkt. Das Hormon ist ein potenter Überlebensfaktor und stimuliert die DNA-Synthese in den Zellen (Takatsuki et al., 1981).

Nicht parenchymale Leberzellen (NPC) waren bei der *in vivo*-Applikation ebenfalls Zielzellen. (Godoy et al., 2013, Cacicedo et al., 2022). Diese haben in ihrer Vielfalt einen großen Einfluss auf die Leberzellbiologie (Arzumanian et al., 2021). Erkenntnisse über die Reaktion von NPCs, besonders der immunologisch relevanten Zellen, auf Transfektion mit externen mRNAs sind somit von Bedeutung (Crispe, 2009). Erste Versuche *ex vivo* in aus Mäuseleber isolierten und kultivierten NPCs zeigten nur eine geringe Transfektionsrate. Sowohl in der Fluoreszenzmikroskopie als auch bei durchflusszytometrischen Untersuchungen war keine Expression des Signalproteins GFP nachzuweisen. Mehrere Gründe könnten dafür verantwortlich sein: Zum einen kann eine suboptimale Isolation und Kultivierung eine Rolle in der schlechten Transfektion spielen, da der Isolationsprozess technisch anspruchsvoll und daher fehleranfällig ist (Mohar et al., 2015). Zum anderen kann auch ein beschleunigter Abbau, etwa durch Kupferzellen (Roberts et al., 2007), oder eine nicht ausreichende Aufnahme der mRNA in die Zellen zu dem negativen Ergebnis geführt haben.

Hepatozyten bilden bei kurzen Kulturzeiten nahezu alle Funktionen des ursprünglichen Organs ab und stellen deshalb ein etabliertes Werkzeug zur Analyse des Metabolismus von Medikamenten dar (Knobeloch et al., 2012, Reder-Hilz et al., 2004, Ullrich et al., 2009). Die hier verwendete einschichtige Kultur ist die einfachste einer Vielzahl von möglichen Lebermodellen. Die Optionen reichen von der Perfusion von intakten Lebern, Leberschnitten und isolierten Zellen bis hin zu Co-Kulturen von verschiedenen Zelltypen und 3D organoiden Strukturen (Godoy et al., 2013). Der Nachweis von HhPAH und MmPAH im Western Blot nach insgesamt 48h Kulturzeit bestätigt die gute Anwendbarkeit von primären Zellen bei kurzen Kulturintervallen.

6.2 Etablierung einer Methode zur Funktionsanalyse der therapeutischen Proteine

Für die Funktionsanalyse wurden HeLa-Zellen verwendet, da diese in der vorliegenden Arbeit die besten Transfektionsraten zeigten. Durch Nutzung von HeLa-Zellen konnte zudem ausgeschlossen werden, dass eine intrinsische PAH-Aktivität bei murinen Hepatozyten im Sinne einer falsch-positiven Aktivität gemessen wurde. Die Verwendung einer etablierten Zelllinie hatte außerdem den Vorteil, dass durch stabilere und reproduzierbarere Kulturbedingungen eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden konnte.

Die Funktion von Proteinen ist, neben der funktionsfähigen mRNA und der korrekten Translation derselben, abhängig von einer Reihe posttranslationaler Modifikationen (Walsh, 2006). Darunter werden reversible oder irreversible chemische Veränderungen zusammengefasst, die ein Protein nach seiner Synthese durchlaufen kann. Besonders für Enzyme sind die posttranslationale Faltung und Konformationsstabilität entscheidend für die Funktion (Walsh, 2006). Wie in Punkt 2.1.2 erklärt, ist die Hauptfunktion der PAH die Verstoffwechslung von Phenylalanin zu Tyrosin unter Beteiligung des Kofaktors BH_4 . Die direkte Messung von Substrat und Produkt erlaubt einen Rückschluss auf die Funktionalität des Enzyms. Ein erhöhtes Produktaufkommen und eine reduzierte Substratkonzentration können somit als Beweis für ein funktionstüchtiges Enzym gewertet werden.

Die gängigen Möglichkeiten der direkten Bestimmung von L-Phenylalanin und Tyrosin setzen eine flüssig- oder ionenaustausch chromatographische Trennung von Substrat und Produkt voraus. Anschließend werden die Aminosäuren mittels Fluoreszenz, Radioaktivität oder Leitfähigkeitsmessung detektiert und identifiziert (Copeland, 2000). Flüssigchromatographie und Ionenaustauschchromatographie stellen in diesem Zusammenhang qualitativ gleichwertige Methoden zum Nachweis von Aminosäuren dar (Smon et al., 2019). In dieser Arbeit wurde die Ionenaustauschchromatographie zur Bestimmung von Aminosäurelevel verwendet.

Initial wurden die Aminosäuren im Überstand der Zellkultur bestimmt. Diese Vorgehensweise beruhte auf der Annahme, dass ein funktionsfähiges Enzym im Zellinneren durch die Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung zu einer Veränderung der Aminosäurespiegel im Überstand führen kann. In diesem Vorversuch waren annähernd gleiche Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin sowohl für mRNA transfizierte- als auch für Kontrollkulturen messbar. Damit war von keiner relevanten Enzymaktivität der PAH in diesem Versuchskonzept auszugehen. Hierfür sind drei mögliche Ursachen zu benennen: 1. In der Zellkultur ist der Ko-Faktor BH_4 nur in geringer Konzentration oder gar nicht vorhanden und muss supplementiert werden. 2. Die enzymatische Reaktion wird erst durch einen Substratüberschuss in Gang gesetzt (Copeland, 2000). Dafür ist eine größere Phenylalaninkonzentration notwendig als in dem nicht modifizierten Nährmedium vorhanden (Shiman et al., 1982, Roberts et al., 2014). 3. Das rekombinante Enzym ist hauptsächlich im Zytoplasma präsent und kann die extrazellulären Aminosäurespiegel so nur in geringer Weise verändern (Pey et al., 2004).

Um die Methode an die unter Punkt 1 und 2 aufgeführten möglichen Probleme anzupassen, wurde zunächst das Nährmedium der Zellkultur mit einer definierten Konzentration von L-Phenylalanin (1mmol/L) und BH_4 (200 μ mol/l) supplementiert und für 24h inkubiert (Staudigl et al., 2011). Die entsprechenden Konzentrationen orientierten sich an den oberen getesteten Werten in der Literatur (Himmelreich et al., 2018, Martinez et al., 1995, Roberts et al., 2014). Mit Supplementierung konnte eine signifikante Zunahme der Tyrosinkonzentration in der Zellkultur mit rekombinanter PAH im Vergleich zu der Kontrolle ohne Enzym festgestellt werden (s.o.). Damit wurde auch bestätigt, dass der Transport von Phenylalanin über Zellmembranen keinen limitierenden Faktor darstellt (Tourian et al., 1969). Allerdings konnte kein Unterschied der Phenylalaninkonzentrationen zwischen den Proben mit Enzym und der Kontrolle nachgewiesen werden.

Bestehende Methoden zum Funktionalitätsnachweis rekombinanter PAH verwenden isolierte Proteine oder Zelllysate zur Analyse anstatt der ganzen Zellkultur (Martinez et al., 1995, Miranda et al., 2002). Zur Aktivierung des Enzyms ist eine Präinkubationszeit mit dem Substrat vorgeschaltet (Roberts et al., 2014). In der Literatur wurde das 30 Sekunden bis 1 Minute nach dem Beginn der Inkubation entstandene Produkt gemessen (Heintz et al., 2012). Für kultivierte Zellen kann die Inkubationszeit auf 30-60 Minuten ausgeweitet werden (Staudigl, 2012).

Die ersten Ergebnisse dieser optimierten Assay-Methode zeigen zunächst nur einen geringen Unterschied zwischen den Proben mit Zelllysaten und rekombinantem Protein und der Kontrolle mit Pufferlösung (s. Anhang).

Um die optimalen Konzentrationen für eine standardisierte Anwendung zu bestimmen, wurden verschiedene Phenylalaninkonzentrationen bei einer festen BH₄-Konzentration und später eine Phenylalaninkonzentration bei verschiedenen BH₄-Konzentrationen untersucht (Staudigl, 2012). Der erste Versuch wurde mit Zelllysaten durchgeführt, die bereits seit Wochen kryokonserviert waren. In den folgenden Versuchen wurden Zelllysate unmittelbar vor dem Assay hergestellt. Um die Reaktionsbedingungen zu verbessern, wurde dem Versuchsprotokoll von Gersting et al. (2008) gefolgt, das zeigen konnte, dass statt destilliertem Wasser als Lösemittel für L-Phenylalanin ein HEPES-Puffer in Kombination mit Katalase erfolgreicher eingesetzt werden konnte.

6.2.1 Enzymaktivität und Kinetik

Der Funktionsnachweis rekombinanter PAH konnte für die drei Enzyme MmPAH, HhPAH und AvPAL schrittweise anhand publizierter Daten (Himmelreich et al., 2018, Martinez et al., 1995, Miranda et al., 2002, Roberts et al., 2014, Staudigl, 2012) optimiert und standardisiert werden. Es zeigte sich eine reproduzierbar messbare Funktion besonders der murinen PAH und auch der humanen PAH 24h nach Transfektion (s.o.). Bei der mit dem gleichen Versuchsaufbau untersuchten rekombinanten AvPAL war in diesem Kontext keine Veränderung der Phenylalanin- und Tyrosinkonzentrationen messbar (s.o.). AvPAL baut Phenylalanin ab, hat aber keinen Einfluss auf die Tyrosinbiosynthese (Levy et al., 2018). Aufgrund der unterschiedlichen Aktivität und Kinetik dieses Enzyms ist die in dieser Arbeit für die PAH entwickelte Aktivitätsanalyse nicht übertragbar (Moisă et al., 2020). Die durchgeführte Titration der BH₄-Konzentration ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Ko-Faktorkonzentrationen bei einer konstanten Substratkonzentration (0,5mM). Somit wurde, entsprechend Heintz et al. (2012), für die weiteren Versuche die Konzentration 200µmol/l gewählt. Der in der Literatur beschriebene sigmoidale Kurvenverlauf zeigt einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität bis zu einer BH₄-Konzentration von 75µmol/l (Staudigl et al., 2011). Obwohl bei allen getesteten BH₄-Konzentrationen eine Sättigung durch den Ko-Faktor und damit eine Stagnation der enzymatischen Aktivität beobachtet wurde, garantiert das Fortbestehen der enzymatischen Aktivität unter diesen Bedingungen eine potenzielle therapeutische Wirkung auch in den Fällen, in denen der Patient mit einer BH₄-Analogtherapie behandelt wird. Die Aktivität der MmPAH im Beisein des Ko-Faktors nachzuweisen war wichtig, da BH₄ natürlicherweise das Enzym stabilisiert und aktiviert (Flydal and Martinez, 2013). Zur genaueren Einordnung der Enzymaktivität bei niedrigeren Ko-Faktorkonzentrationen sind im Zuge einer anschließenden Arbeit weitere Versuche durchgeführt worden.

Sowohl die gemessene Phenylalaninkonzentration als auch die BH₄ abhängige MmPAH-Enzymkinetik zeigt Daten, die mit der Hill-Gleichung für Kooperativität bei Enzymen

übereinstimmt und bereits für die humane Version des Enzyms gezeigt werden konnte (Gersting et al., 2010, Staudigl et al., 2011).

Die Aktivierung der kooperativen Bindung zwischen Enzym und Ko-Faktor durch Präinkubation mit dem Substrat konnte ebenfalls gezeigt werden und weist auf die konformationelle Umlagerungsfähigkeit der rekombinanten PAH hin, die auch in der Wildtyp-PAH nachgewiesen wurde (Gersting et al., 2010). Ab einer L-Phen-Konzentration von 0,5mM ist eine klare Substratsättigung zu erkennen, die sich mit der bisherigen Forschung deckt (Pey and Martinez, 2005, Staudigl et al., 2011). Bemerkenswerterweise ähnelte die Beobachtung, dass die enzymatische Aktivität von MmPAH in Abhängigkeit von der Phe-Konzentration schwankt, Situationen, die unter physiologischen Bedingungen auftreten könnten. So ist die BH₄-Konzentration in der Leber stabil, während sich der verfügbare Phenylalaninanteil vor allem aufgrund der Nahrungsaufnahme ständig ändert.

Die Stabilität der rekombinanten PAH während der Reaktionszeit ist eine kritische Komponente. Durch die Verwendung von größeren Proteinkonzentrationen (200µl Zellysat) war es möglich, mit einer Reaktionszeit von bis zu 1h zu arbeiten (Staudigl, 2012). Ein weiterer wichtiger methodischer Faktor ist die Zeit zwischen Zellyse und der enzymatischen Reaktion. Deshalb empfiehlt sich eine im Rahmen des jeweiligen Experiments frische Lyse und unmittelbare Verwendung der Zellen. Auf diesen Aspekt weist auch Heintz et al. (2012) hin.

Aufgrund der guten Ergebnisse 24h nach Transfektionsstart wurde der Assay mit muriner PAH für 24h und zusätzlich für 48h nach Transfektion durchgeführt, um die Aktivität des rekombinanten Enzyms im Verlauf zu bestimmen. Hierbei zeigte sich eine schwache Aktivität (s.o.). Dafür gibt es mehrere mögliche Gründe: Einerseits kann die Stabilität der verwendeten mRNA nicht ausreichend gewesen sein, um 48h nach Transfektion noch eine ausreichende Menge an Enzym zu gewährleisten. Andererseits kann die schlechter werdende Qualität der primären Zellkultur Grund für eine schlechtere Transkription der mRNA sein. Lichtmikroskopisch waren nach 48h mehr apoptotische Zellen sichtbar als nach 24h. Außerdem ist nicht klar, wie lang die Halbwertszeit der rekombinanten PAH ist. In diesem Zusammenhang besteht die Möglichkeit einer zu hohen Substratkonzentration im Verhältnis zu einem geringeren Anteil des funktionalen Enzyms, was zusätzlich zu einer Inhibition führen kann (Udenfriend and Cooper, 1952, Flydal and Martinez, 2013). Weiterführende Versuche in anderen Zelllinien und im Mausmodell ergaben ebenfalls eine rückläufige Aktivität des rekombinanten Enzyms nach 24h (Cacicedo et al., 2022), sodass eine weitere Optimierung der mRNA bezüglich Stabilität und transienter Expression des Proteins notwendig ist.

Wichtig für eine Übertragbarkeit ins Mausmodell ist nicht nur die Entstehung von Tyrosin, sondern auch die Eliminierung von Phenylalanin, das für die klinische Symptomatik

verantwortlich ist (Weglage et al., 2001). Besonders bei niedrigen Konzentrationen von Phenylalanin konnte ein vollständiger Abbau nachgewiesen werden (s.o.).

6.3 Präklinisches Screening neuer mRNA-Konstrukte

Mit der erfolgreichen Etablierung des Enzym-Assays in Kombination mit dem Nachweis der Expression des Enzyms im Western Blot wurde die Grundlage für ein *in vitro*-Screening von potenziell therapeutisch einsetzbaren mRNA-Konstrukten geschaffen. Die verschiedenen mRNA-Varianten können so in primären Hepatozyten und HeLa-Zellen exprimiert und auf ihre Funktionalität untersucht werden, bevor sie im Tierversuch zum Einsatz kommen.

Dies ist besonders im Kontext von Tierversuchsregulation wichtig. Das 3R Prinzip wurde vor über 50 Jahren entwickelt, um eine humanere Forschung an Tieren zu gewährleisten (Russell and Burch, 1959). Die R's stehen für „Replacement“ = der Ersatz oder das Vermeiden von Tierversuchen, „Reduction“ = Minimierung der verwendeten Tiere durch angemessen geplante Versuche und „Refinement“ = Minimierung der Schmerzen, des Stresses oder des bleibenden Schadens. Durch die Selektion der potenziellen mRNA-Kandidaten nach *in vitro*-Screening können grundsätzliche Versuche im Mausmodell zur Funktion und dem Expressionsverhalten der verschiedenen mRNAs vermieden werden. Zudem liefert das *in vitro*-Modell besonders durch die Verwendung von primären murinen Hepatozyten Informationen, die mit dem lebenden Mausmodell korrelieren und macht so eine umsichtige Versuchsplanung mit einer minimierten Tieranzahl möglich.

6.4 Ausblick und Herausforderungen

Im Zuge dieser Arbeit konnte ein *in vitro*-System für die qualitative und funktionale Untersuchung von therapeutischen Proteinen etabliert werden. Es war möglich, wichtige Faktoren wie die Stabilität und Toxizität der Enzyme vor einem Tierversuch zu untersuchen.

Die gewonnenen Erkenntnisse flossen in die Planung der folgenden *in vivo*-Experimente ein. Damit konnte die Evaluation des hier verwendeten mRNA-Konstrukts für MmPAH *in vivo* zunächst in Wildtyp-Mäusen und dann in einem Knock-out Modell für PKU (Shedlovsky et al., 1993) vervollständigt werden (Cacicedo et al., 2022). Außerdem sind aktuell mehrere optimierte mRNA-Varianten für die MmPAH zur *in vitro*-Evaluation vorgesehen. Zur langfristigen Optimierung des *in vitro*-Verfahrens ist eine Verwendung des Enzym-Assays mit primären Hepatozyten in Arbeit, da man von einer größeren Übertragbarkeit zu den Tierversuchen im Mausmodell ausgehen kann.

Die schlechtere Aktivität der humanen PAH bleibt eine offene Frage in dieser Arbeit. Das Signal spricht auch im Western Blot von HeLa, HepG2 und primären Zellen für eine

geringere Expression. Dem könnten aber, wie bereits erwähnt, methodische Probleme zugrunde liegen. Dafür spräche der konfokal mikroskopische Nachweis der HhPAH in HeLa-Zellen. Da die Anwendung im Menschen noch einige Schritte entfernt ist, bleibt als Frage: Wie relevant ist dieses Problem im Hauptanwendungskontext dieser Arbeit?

Naheliegender ist die Evaluation der erfolgreichen Transfektion von NPCs mit externer mRNA, die ausreichend exprimiert wird. NPCs bestehen unter anderem aus Immunzellen wie dendritischen Zellen, Lymphozyten und Kupferzellen, die einen wichtigen Teil zu einer toxischen Reaktion der Leber beitragen (Godoy et al., 2013). Eine mögliche Immunantwort, die eine sekundäre Leberzellschädigung durch Zytokinausschüttung und Zellaktivierung nach sich zieht, kann in einer Ko-Kultur von Hepatozyten und Kupferzellen untersucht werden (Godoy et al., 2013).

Ein weiterer Aspekt ist die Messmethode der Aminosäuren. Im klinischen Setting war die Flüssigchromatographie lange vergleichbar mit der Ionenaustauschchromatographie für die Analyse physiologischer Proben (Smon et al., 2019). Schnellere Analysezeiten, bessere Spezifität und praktische Vorteile sprechen allerdings für eine Ablösung der Ionenaustauschchromatographie als Goldstandard der Plasma-Aminosäuren-Messung (Carling et al., 2020). In der Forschung ist die Methode der Wahl schon seit einiger Zeit die Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) mit anschließender Detektion mittels Radioaktivität oder Fluoreszenz (Staudigl, 2012, Martinez et al., 1995, Miranda et al., 2002). In dieser Arbeit wurde aufgrund der Verfügbarkeit auf die Ionenaustauschchromatographie zurückgegriffen, welche in diesem Kontext alle Anforderungen erfüllte.

Der konzeptionelle Nachweis von vorteilhaften therapeutischen Effekten dieser neuartigen Enzymersatztherapie im Vergleich zu vorbestehenden Therapieansätzen für PKU wurde erbracht (Cacicedo et al., 2022, Perez-Garcia et al., 2022). Diese Daten legen das Fundament für eine potenzielle klinische Applikation an PKU-Patienten. Um eine optimale Balance zwischen der Pathophysiologie der Erkrankung und einer verbesserten Lebensqualität für den Patienten zu erreichen ist eine längere Halbwertszeit des PAH-Proteins essenziell. Damit können die Abstände zwischen Verabreichungen reduziert und der Behandlungsstandard erhöht werden. mRNA-Technologie ermöglicht das schnelle Erstellen und Modifizieren von neuen PAH mRNA-Konstrukten, die sich selbst durch eine höhere Stabilität auszeichnen oder für langlebigere Proteine codieren. Damit könnte das Anwendungsspektrum der mRNA basierten Enzymersatztherapie von einer Notfallmedikation oder Unterstützung der diätetischen Therapie zu einem kompletten Ersatz der aktuellen Standardtherapie der PKU erweitert werden.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro*-Modell zur Testung von verschiedenen mRNA-Konstrukten für eine neuartige Therapie der PKU etabliert. Dafür wurden zwei permanente und zwei primäre Zelllinien verwendet. Neben dem Nachweis der Zielproteine GFP und PAH wurde ein Enzym-Assay etabliert, auf dessen Grundlage die Funktionalität der transient exprimierten PAH nachgewiesen werden konnte. Für den Nachweis der Proteine wurden drei unabhängige Untersuchungsverfahren eingesetzt: Western-Blotting als Nachweis des de novo-exprimierten Proteins, Durchflusszytometrie zur Beurteilung der Anzahl der transfizierten und Protein exprimierenden Zellen und konfokale Mikroskopie, um die Lokalisation des Proteins innerhalb der transfizierten Zellen hochauflösend darzustellen. Somit können neue mRNA-Konstrukte für die PAH zur therapeutischen Anwendung bereits *in vitro* nach der besten Expressionsrate und Enzymaktivität ausgewählt werden.

Die zentralen Ergebnisse sind:

- Die getesteten mRNA-Konstrukte wurden in dem Zellkulturmodell translatiert und die Proteine waren nachweisbar.
- In der Zellkultur zeigten sich keine toxischen Reaktionen auf mRNA oder Protein.
- Die translatierten Proteine, insbesondere MmPAH, waren funktional und damit im Tiermodell einsetzbar.
- Weitere mRNA Konstrukte können mithilfe des entwickelten Assays evaluiert und so präklinische Tierversuche reduziert werden.

8 Literaturverzeichnis

- ADEN, D. P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I. & KNOWLES, B. B. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282, 615-616.
- AHMED, S. S., RUBIN, H., WANG, M., FAULKNER, D., SENGOOBA, A., DOLLIVE, S. N., AVILA, N., ELLSWORTH, J. L., LAMPPU, D., LOBIKIN, M., LOTTERHAND, J., ADAMSON-SMALL, L., WRIGHT, T., SEYMOUR, A. & FRANCONI, O. L. 2020. Sustained Correction of a Murine Model of Phenylketonuria following a Single Intravenous Administration of AAVHSC15-PAH. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 17, 568-580.
- AL HAFID, N. & CHRISTODOULOU, J. 2015. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Transl Pediatr*, 4, 304-17.
- ALEXOPOULOU, L., HOLT, A. C., MEDZHITOV, R. & FLAVELL, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-8.
- AN, D., SCHNELLER, J. L., FRASSETTO, A., LIANG, S., ZHU, X., PARK, J. S., THEISEN, M., HONG, S. J., ZHOU, J., RAJENDRAN, R., LEVY, B., HOWELL, R., BESIN, G., PRESNYAK, V., SABNIS, S., MURPHY-BENENATO, K. E., KUMARASINGHE, E. S., SALERNO, T., MIHAI, C., LUKACS, C. M., CHANDLER, R. J., GUEY, L. T., VENDITTI, C. P. & MARTINI, P. G. V. 2017. Systemic Messenger RNA Therapy as a Treatment for Methylmalonic Acidemia. *Cell Rep*, 21, 3548-3558.
- ANDERSEN, O. A., STOKKA, A. J., FLATMARK, T. & HOUGH, E. 2003. 2.0A resolution crystal structures of the ternary complexes of human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine or L-norleucine: substrate specificity and molecular motions related to substrate binding. *J Mol Biol*, 333, 747-57.
- ARZUMANIAN, V. A., KISELEVA, O. I. & POVERENNAYA, E. V. 2021. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int J Mol Sci*, 22.
- BAILLY-MAITRE, B., DE SOUSA, G., ZUCCHINI, N., GUGENHEIM, J., BOULUKOS, K. E. & RAHMANI, R. 2002. Spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes: molecular mechanisms and regulation by dexamethasone. *Cell Death & Differentiation*, 9, 945-955.
- BALAKRISHNAN, B., AN, D., NGUYEN, V., DEANTONIS, C., MARTINI, P. G. V. & LAI, K. 2020. Novel mRNA-Based Therapy Reduces Toxic Galactose Metabolites and Overcomes Galactose Sensitivity in a Mouse Model of Classic Galactosemia. *Mol Ther*, 28, 304-312.
- BERGMAN, N., MORAES, K., ANDERSON, J., ZARIC, B., KAMBACH, C., SCHNEIDER, R., WILUSZ, C. & WILUSZ, J. 2007. Lsm proteins bind and stabilize RNAs containing 5' poly(A) tracts. *Nature structural & molecular biology*, 14, 824-31.
- BICKEL, H., GERRARD, J. & HICKMANS, E. M. 1953. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet*, 265, 812-3.
- BISSELL, D. M., ARENSON, D. M., MAHER, J. J. & ROLL, F. J. 1987. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *The Journal of clinical investigation*, 79, 801-812.
- BJORGO, E., KNAPPSKOG, P. M., MARTINEZ, A., STEVENS, R. C. & FLATMARK, T. 1998. Partial characterization and three-dimensional-structural localization of eight mutations in exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene associated with phenylketonuria. *Eur J Biochem*, 257, 1-10.
- BOCZKOWSKI, D., NAIR, S. K., SNYDER, D. & GILBOA, E. 1996. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 184, 465-72.
- BRENNER, S., JACOB, F. & MESELSON, M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190, 576-581.
- BURNETT, J. R. 2007. Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/phenoptin), an orally active synthetic form of BH4 for the treatment of phenylketonuria. *IDrugs*, 10, 805-13.
- BURTON, B. K., LONGO, N., VOCKLEY, J., GRANGE, D. K., HARDING, C. O., DECKER, C., LI, M., LAU, K., ROSEN, O., LARIMORE, K. & THOMAS, J. 2020. Pegvaliase for the treatment of

- phenylketonuria: Results of the phase 2 dose-finding studies with long-term follow-up. *Mol Genet Metab*, 130, 239-246.
- CACICEDO, M. L., WEINL-TENBRUCK, C., FRANK, D., LIMERES, M. J., WIRSCHING, S., HILBERT, K., PASHA FAMIAN, M. A., HORSCROFT, N., HENNERMANN, J. B., ZEPP, F., CHEVESSIER-TÜNNESEN, F. & GEHRING, S. 2022. Phenylalanine hydroxylase mRNA rescues the phenylketonuria phenotype in mice. *Front Bioeng Biotechnol*, 10, 993298.
- CAO, J., AN, D., GALDUROZ, M., ZHUO, J., LIANG, S., EYBYE, M., FRASSETTO, A., KURODA, E., FUNAHASHI, A., SANTANA, J., MIHAI, C., BENENATO, K. E., KUMARASINGHE, E. S., SABNIS, S., SALERNO, T., COUGHLAN, K., MIRACCO, E. J., LEVY, B., BESIN, G., SCHULTZ, J., LUKACS, C., GUEY, L., FINN, P., FURUKAWA, T., GIANGRANDE, P. H., SAHEKI, T. & MARTINI, P. G. V. 2019. mRNA Therapy Improves Metabolic and Behavioral Abnormalities in a Murine Model of Citrin Deficiency. *Mol Ther*, 27, 1242-1251.
- CARLING, R. S., MCDONALD, B. A., AUSTIN, D., BURDEN, D., CORREIA, J., LEUNG, J., MAYERS, B. & JOHN, C. 2020. Challenging the status quo: A comparison of ion exchange chromatography with liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for the measurement of amino acids in human plasma. *Ann Clin Biochem*, 57, 277-290.
- CAVAZZANA, M., SIX, E., LAGRESLE-PEYROU, C., ANDRÉ-SCHMUTZ, I. & HACEIN-BEY-ABINA, S. 2016. Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency: Where Do We Stand? *Hum Gene Ther*, 27, 108-16.
- CHANG, H., LIM, J., HA, M. & KIM, V. N. 2014. TAIL-seq: genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol Cell*, 53, 1044-52.
- CHOI, Y. H. & HAGEDORN, C. H. 2003. Purifying mRNAs with a high-affinity eIF4E mutant identifies the short 3' poly(A) end phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7033-8.
- CONRY, R. M., LOBUGLIO, A. F., WRIGHT, M., SUMEREL, L., PIKE, M. J., JOHANNING, F., BENJAMIN, R., LU, D. & CUIEL, D. T. 1995. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res*, 55, 1397-400.
- COPELAND, R. A. 2000. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, John Wiley & Sons.
- CORLU, A. & LOYER, P. 2015. Culture conditions promoting hepatocyte proliferation and cell cycle synchronization. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. Springer.
- CRISPE, I. N. 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annual review of immunology*, 27, 147-163.
- DALBY, B., CATES, S., HARRIS, A., OHKI, E. C., TILKINS, M. L., PRICE, P. J. & CICCARONE, V. C. 2004. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, 33, 95-103.
- DIEBOLD, S. S., KAISHO, T., HEMMI, H., AKIRA, S. & REIS E SOUSA, C. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303, 1529-31.
- DIEBOLD, S. S., MASSACRIER, C., AKIRA, S., PATUREL, C., MOREL, Y. & REIS E SOUSA, C. 2006. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol*, 36, 3256-67.
- DING, Z., GEORGIEV, P. & THONY, B. 2006. Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 13, 587-93.
- DONJERKOVIC, D. & SCOTT, D. W. 2000. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Research*, 10, 1-16.
- DWARKI, V. J., MALONE, R. W. & VERMA, I. M. 1993. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Methods Enzymol*, 217, 644-54.
- ECKMANN, C. R., RAMMELT, C. & WAHLE, E. 2011. Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2, 348-61.
- ELAUT, G., HENKENS, T., PAPELEU, P., SNYKERS, S., VINKEN, M., VANHAECKE, T. & ROGIERS, V. 2006. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Current drug metabolism*, 7, 629-660.

- EMA 2008. Kuvan® - Sapropterin.
 EMA. 2019. *Palynziq®-Pegvaliase* [Online]. Available:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/palynziq#authorisation-details-section> [Accessed 20.10.2021 2021].
- ENNS, G. M., KOCH, R., BRUMM, V., BLAKELY, E., SUTER, R. & JURECKI, E. 2010. Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: revisiting the evidence. *Mol Genet Metab*, 101, 99-109.
- ERLANDSEN, H., FUSETTI, F., MARTINEZ, A., HOUGH, E., FLATMARK, T. & STEVENS, R. C. 1997. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat Struct Biol*, 4, 995-1000.
- ERLANDSEN, H., PEY, A. L., GAMEZ, A., PEREZ, B., DESVIAT, L. R., AGUADO, C., KOCH, R., SURENDRAN, S., TYRING, S., MATALON, R., SCRIVER, C. R., UGARTE, M., MARTINEZ, A. & STEVENS, R. C. 2004. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16903-8.
- ERLANDSEN, H. & STEVENS, R. C. 1999. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 68, 103-25.
- FITZPATRICK, P. F. 2000. The aromatic amino acid hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 74, 235-94.
- FLYDAL, M. I. & MARTINEZ, A. 2013. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB life*, 65, 341-349.
- FRELIN, L., AHLÉN, G., ALHEIM, M., WEILAND, O., BARNFIELD, C., LILJESTRÖM, P. & SÄLLBERG, M. 2004. Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 11, 522-33.
- FUSETTI, F., ERLANDSEN, H., FLATMARK, T. & STEVENS, R. C. 1998. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem*, 273, 16962-7.
- GALLIE, D. R. 1991. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev*, 5, 2108-16.
- GERSTING, S. W., KEMTER, K. F., STAUDIGL, M., MESSING, D. D., DANECKA, M. K., LAGLER, F. B., SOMMERHOFF, C. P., ROSCHER, A. A. & MUNTAU, A. C. 2008. Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am J Hum Genet*, 83, 5-17.
- GERSTING, S. W., STAUDIGL, M., TRUGER, M. S., MESSING, D. D., DANECKA, M. K., SOMMERHOFF, C. P., KEMTER, K. F. & MUNTAU, A. C. 2010. Activation of phenylalanine hydroxylase induces positive cooperativity toward the natural cofactor. *J Biol Chem*, 285, 30686-97.
- GEY, G. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12, 264-265.
- GODOY, P., HEWITT, N. J., ALBRECHT, U., ANDERSEN, M. E., ANSARI, N., BHATTACHARYA, S., BODE, J. G., BOLLEYN, J., BORNER, C., BOTTGER, J., BRAEUNING, A., BUDINSKY, R. A., BURKHARDT, B., CAMERON, N. R., CAMUSSI, G., CHO, C. S., CHOI, Y. J., CRAIG ROWLANDS, J., DAHMEN, U., DAMM, G., DIRSCH, O., DONATO, M. T., DONG, J., DOOLEY, S., DRASDO, D., EAKINS, R., FERREIRA, K. S., FONSA TO, V., FRACZEK, J., GEBHARDT, R., GIBSON, A., GLANEMANN, M., GOLDRING, C. E., GOMEZ-LECHON, M. J., GROOTHUIS, G. M., GUSTAVSSON, L., GUYOT, C., HALLIFAX, D., HAMMAD, S., HAYWARD, A., HAUSSINGER, D., HELLERBRAND, C., HEWITT, P., HOEHME, S., HOLZHUTTER, H. G., HOUSTON, J. B., HRACH, J., ITO, K., JAESCHKE, H., KEITEL, V., KELM, J. M., KEVIN PARK, B., KORDES, C., KULLAK-UBLUCK, G. A., LECLUYSE, E. L., LU, P., LUEBKE-WHEELER, J., LUTZ, A., MALTMAN, D. J., MATZ-SOJA, M., MCMULLEN, P., MERFORT, I., MESSNER, S., MEYER, C., MWINYI, J., NAISBITT, D. J., NUSSLER, A. K., OLINGA, P., PAMPALONI, F., PI, J., PLUTA, L., PRZYBORSKI, S. A., RAMACHANDRAN, A., ROGIERS, V., ROWE, C., SCHELCHER, C., SCHMICH, K., SCHWARZ, M., SINGH, B., STELZER, E. H., STIEGER, B., STOBER, R., SUGIYAMA, Y., TETTA, C., THASLER, W. E., VANHAECKE, T., VINKEN, M., WEISS, T.

- S., WIDERA, A., WOODS, C. G., XU, J. J., YARBOROUGH, K. M. & HENGSTLER, J. G. 2013. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87, 1315-530.
- GORZALCZANY, S. B. & RODRIGUEZ BASSO, A. G. 2021. Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. *Pharmacol Res Perspect*, 9, e00863.
- GURDON, J. B., LANE, C. D., WOODLAND, H. R. & MARBAIX, G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233, 177-82.
- HAIJ, K. A. & WHITEHEAD, K. A. 2017. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 2, 17056.
- HAMMAN, K., CLARK, H., MONTINI, E., AL-DHALIMY, M., GROMPE, M., FINEGOLD, M. & HARDING, C. O. 2005. Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol Ther*, 12, 337-44.
- HARDING, C. 2008. Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria. *Clin Genet*, 74, 97-104.
- HARDING, C. O., AMATO, R. S., STUY, M., LONGO, N., BURTON, B. K., POSNER, J., WENG, H. H., MERILAINEN, M., GU, Z., JIANG, J., VOCKLEY, J. & INVESTIGATORS, P.-. 2018. Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: A pivotal, double-blind randomized discontinuation Phase 3 clinical trial. *Mol Genet Metab*, 124, 20-26.
- HARDING, C. O., GILLINGHAM, M. B., HAMMAN, K., CLARK, H., GOEBEL-DAGHIGHI, E., BIRD, A. & KOEBERL, D. D. 2006. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther*, 13, 457-62.
- HEIL, F., HEMMI, H., HOCHREIN, H., AMPENBERGER, F., KIRSCHNING, C., AKIRA, S., LIPFORD, G., WAGNER, H. & BAUER, S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303, 1526-9.
- HEINTZ, C., TROXLER, H., MARTINEZ, A., THONY, B. & BLAU, N. 2012. Quantification of phenylalanine hydroxylase activity by isotope-dilution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab*, 105, 559-65.
- HIMMELREICH, N., SHEN, N., OKUN, J. G., THIEL, C., HOFFMANN, G. F. & BLAU, N. 2018. Relationship between genotype, phenylalanine hydroxylase expression and in vitro activity and metabolic phenotype in phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 125, 86-95.
- HO, G. & CHRISTODOULOU, J. 2014. Phenylketonuria: translating research into novel therapies. *Transl Pediatr*, 3, 49-62.
- HOLTKAMP, S., KREITER, S., SELMI, A., SIMON, P., KOSLOWSKI, M., HUBER, C., TÜRECI, O. & SAHIN, U. 2006. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 108, 4009-17.
- HORNUNG, V., BARCHET, W., SCHLEE, M. & HARTMANN, G. 2008. RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handb Exp Pharmacol*, 71-86.
- HORNUNG, V., ELLEGAST, J., KIM, S., BRZOZKA, K., JUNG, A., KATO, H., POECK, H., AKIRA, S., CONZELMANN, K. K., SCHLEE, M., ENDRES, S. & HARTMANN, G. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, 314, 994-7.
- HOUSEMAN, L., EDWARDS, M., PHILLIPS, I. R. & SHEPHARD, E. A. 2015. Isolation and culture of mouse hepatocytes: gender-specific gene expression responses to chemical treatments. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. Springer.
- HYDERY, T. & COPPENRATH, V. A. 2019. A Comprehensive Review of Pegvaliase, an Enzyme Substitution Therapy for the Treatment of Phenylketonuria. *Drug Target Insights*, 13, 1177392819857089.
- IAVARONE, C., O'HAGAN, D. T., YU, D., DELAHAYE, N. F. & ULMER, J. B. 2017. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 16, 871-881.
- JALKANEN, A. L., COLEMAN, S. J. & WILUSZ, J. 2014. Determinants and implications of mRNA poly(A) tail size--does this protein make my tail look big? *Semin Cell Dev Biol*, 34, 24-32.

- JEMIELITY, J., FOWLER, T., ZUBEREK, J., STEPINSKI, J., LEWDOROWICZ, M., NIEDZWIECKA, A., STOLARSKI, R., DARZYNKIEWICZ, E. & RHOADS, R. E. 2003. Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties. *Rna*, 9, 1108-22.
- JIANG, L., BERRAONDO, P., JERICÓ, D., GUEY, L. T., SAMPEDRO, A., FRASSETTO, A., BENENATO, K. E., BURKE, K., SANTAMARÍA, E., ALEGRE, M., PEJENAUTE, Á., KALARIYA, M., BUTCHER, W., PARK, J. S., ZHU, X., SABNIS, S., KUMARASINGHE, E. S., SALERNO, T., KENNEY, M., LUKACS, C. M., ÁVILA, M. A., MARTINI, P. G. V. & FONTANELLAS, A. 2018. Systemic messenger RNA as an etiological treatment for acute intermittent porphyria. *Nat Med*, 24, 1899-1909.
- JIRIKOWSKI, G. F., SANNA, P. P., MACIEJEWSKI-LENOIR, D. & BLOOM, F. E. 1992. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science*, 255, 996-8.
- KARIKO, K., BUCKSTEIN, M., NI, H. & WEISSMAN, D. 2005. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23, 165-75.
- KARIKÓ, K., KUO, A. & BARNATHAN, E. 1999. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. *Gene Ther*, 6, 1092-100.
- KARIKO, K., MURAMATSU, H., WELSH, F. A., LUDWIG, J., KATO, H., AKIRA, S. & WEISSMAN, D. 2008. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 16, 1833-40.
- KAUFFMAN, K. J., DORKIN, J. R., YANG, J. H., HEARTLEIN, M. W., DEROSA, F., MIR, F. F., FENTON, O. S. & ANDERSON, D. G. 2015. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett*, 15, 7300-6.
- KIM, Y.-H., YOUN, H., NA, J., HONG, K.-J., KANG, K. W., LEE, D. S. & CHUNG, J.-K. 2015. Codon-optimized Human Sodium Iodide Symporter (opt-hNIS) as a Sensitive Reporter and Efficient Therapeutic Gene. *Theranostics*, 5, 86-96.
- KIMCHI-SARFATY, C., OH, J. M., KIM, I. W., SAUNA, Z. E., CALCAGNO, A. M., AMBUDKAR, S. V. & GOTTESMAN, M. M. 2007. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315, 525-8.
- KLAUNIG, J. E., GOLDBLATT, P. J., HINTON, D. E., LIPSKY, M. M. & TRUMP, B. F. 1981. Mouse liver cell culture. II. Primary culture. *In Vitro*, 17, 926-34.
- KNAPPSKOG, P. M., FLATMARK, T., AARDEN, J. M., HAAVIK, J. & MARTINEZ, A. 1996. Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. *Eur J Biochem*, 242, 813-21.
- KNOBELOCH, D., EHNERT, S., SCHYSCHKA, L., BÜCHLER, P., SCHOENBERG, M., KLEEFF, J., THASLER, W. E., NUSSLER, N. C., GODOY, P. & HENGSTLER, J. 2012. Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. *Human cell culture protocols*. Springer.
- KOBE, B., JENNINGS, I. G., HOUSE, C. M., MICHELL, B. J., GOODWILL, K. E., SANTARSIERO, B. D., STEVENS, R. C., COTTON, R. G. & KEMP, B. E. 1999. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol*, 6, 442-8.
- KÖRNER, C. G. & WAHLE, E. 1997. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J Biol Chem*, 272, 10448-56.
- KOWALSKA, J., LEWDOROWICZ, M., ZUBEREK, J., GRUDZIEN-NOGALSKA, E., BOJARSKA, E., STEPINSKI, J., RHOADS, R. E., DARZYNKIEWICZ, E., DAVIS, R. E. & JEMIELITY, J. 2008. Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. *Rna*, 14, 1119-31.
- KOWALSKI, P. S., RUDRA, A., MIAO, L. & ANDERSON, D. G. 2019. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol Ther*, 27, 710-728.
- LEDLEY, F. D., GRENETT, H. E., DUNBAR, B. S. & WOO, S. L. 1990. Mouse phenylalanine hydroxylase. Homology and divergence from human phenylalanine hydroxylase. *Biochem J*, 267, 399-405.

- LEVY, H. L., SARKISSIAN, C. N. & SCRIVER, C. R. 2018. Phenylalanine ammonia lyase (PAL): From discovery to enzyme substitution therapy for phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 124, 223-229.
- LHCHEM 2012. Conversion of phenylalanine and tyrosine to its biologically important derivatives. https://de.wikipedia.org/wiki/Tyrosin#/media/Datei:Conversion_of_phenylalanine_and_tyrosine_to_its_biologically_important_derivatives.png.
- LI, Y. & KILEDJIAN, M. 2010. Regulation of mRNA decapping. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 1, 253-65.
- LOOMIS, K. H., LINDSAY, K. E., ZURLA, C., BHOSLE, S. M., VANOVER, D. A., BLANCHARD, E. L., KIRSCHMAN, J. L., BELLAMKONDA, R. V. & SANTANGELO, P. J. 2018. In Vitro Transcribed mRNA Vaccines with Programmable Stimulation of Innate Immunity. *Bioconjug Chem*, 29, 3072-3083.
- LORENZ, C., FOTIN-MLECZEK, M., ROTH, G., BECKER, C., DAM, T. C., VERDURMEN, W. P., BROCK, R., PROBST, J. & SCHLAKE, T. 2011. Protein expression from exogenous mRNA: uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the lysosomal pathway. *RNA Biol*, 8, 627-36.
- LOYER, P., CARIOU, S., GLAISE, D., BILODEAU, M., BAFFET, G. & GUGUEN-GUILLOUZO, C. 1996. Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in vitro. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1. *J Biol Chem*, 271, 11484-92.
- MARTINEZ, A., KNAPPSKOG, P. M., OLAFSDOTTIR, S., DOSKELAND, A. P., EIKEN, H. G., SVEBAK, R. M., BOZZINI, M., APOLD, J. & FLATMARK, T. 1995. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in Escherichia coli circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem J*, 306 (Pt 2), 589-97.
- MAUGER, D. M., CABRAL, B. J., PRESNYAK, V., SU, S. V., REID, D. W., GOODMAN, B., LINK, K., KHATWANI, N., REYNDERS, J., MOORE, M. J. & MCFADYEN, I. J. 2019. mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 24075-24083.
- MEIJER, H. A., BUSHELL, M., HILL, K., GANT, T. W., WILLIS, A. E., JONES, P. & DE MOOR, C. H. 2007. A novel method for poly(A) fractionation reveals a large population of mRNAs with a short poly(A) tail in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 35, e132.
- MIRANDA, F. F., TEIGEN, K., THOROLFSSON, M., SVEBAK, R. M., KNAPPSKOG, P. M., FLATMARK, T. & MARTINEZ, A. 2002. Phosphorylation and mutations of Ser(16) in human phenylalanine hydroxylase. Kinetic and structural effects. *J Biol Chem*, 277, 40937-43.
- MOCHIZUKI, S., MIZUKAMI, H., OGURA, T., KURE, S., ICHINOHE, A., KOJIMA, K., MATSUBARA, Y., KOBAYASHI, E., OKADA, T., HOSHIKA, A., OZAWA, K. & KUME, A. 2004. Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Therapy*, 11, 1081-1086.
- MOCKEY, M., GONÇALVES, C., DUPUY, F. P., LEMOINE, F. M., PICHON, C. & MIDOUX, P. 2006. mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem Biophys Res Commun*, 340, 1062-8.
- MOHAR, I., BREMPPELIS, K. J., MURRAY, S. A., EBRAHIMKHANI, M. R. & CRISPE, I. N. 2015. Isolation of Non-parenchymal Cells from the Mouse Liver. *Methods Mol Biol*, 1325, 3-17.
- MOISĂ, M. E., AMARIEI, D. A., NAGY, E. Z. A., SZARVAS, N., TOȘA, M. I., PAIZS, C. & BENCZE, L. C. 2020. Fluorescent enzyme-coupled activity assay for phenylalanine ammonia-lyases. *Sci Rep*, 10, 18418.
- MUNTAU, A. C., BEBLO, S. & KOLETZKO, B. 2002. Phenylketonurie und Hyperphenylalaninämie. In: KOLETZKO, B., REINHARDT, D. & STÖCKLER-IPSIROGLU, S. (eds.) *Pädiatrie upgrade 2002: Weiter- und Fortbildung*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- MUNTAU, A. C. & GERSTING, S. W. 2010. Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis*, 33, 649-58.

- OH, H. J., PARK, E. S., KANG, S., JO, I. & JUNG, S. C. 2004. Long-term enzymatic and phenotypic correction in the phenylketonuria mouse model by adeno-associated virus vector-mediated gene transfer. *Pediatr Res*, 56, 278-84.
- PASCUCCI, T., ROSSI, L., COLAMARTINO, M., GABUCCI, C., CARDUCCI, C., VALZANIA, A., SASSO, V., BIGINI, N., PIERIGÈ, F., VISCOMI, M. T., VENTURA, R., CABIB, S., MAGNANI, M., PUGLISI-ALLEGRA, S. & LEUZZI, V. 2018. A new therapy prevents intellectual disability in mouse with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 124, 39-49.
- PENCHARZ, P. B., HSU, J. W. & BALL, R. O. 2007. Aromatic amino acid requirements in healthy human subjects. *J Nutr*, 137, 1576S-1578S; discussion 1597S-1598S.
- PEREZ-GARCIA, C. G., DIAZ-TRELLES, R., VEGA, J. B., BAO, Y., SABLAD, M., LIMPHONG, P., CHIKAMATSU, S., YU, H., TAYLOR, W., KARMALI, P. P., TACHIKAWA, K. & CHIVUKULA, P. 2022. Development of an mRNA replacement therapy for phenylketonuria. *Mol Ther Nucleic Acids*, 28, 87-98.
- PEY, A. L. & MARTINEZ, A. 2005. The activity of wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase and its regulation by phenylalanine and tetrahydrobiopterin at physiological and pathological concentrations: an isothermal titration calorimetry study. *Mol Genet Metab*, 86 Suppl 1, S43-53.
- PEY, A. L., PÉREZ, B., DESVIAT, L. R., MARTÍNEZ, M. A., AGUADO, C., ERLANDSEN, H., GÁMEZ, A., STEVENS, R. C., THÓRÓLFSSON, M. & UGARTE, M. 2004. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Human mutation*, 24, 388-399.
- PUCCI, B., KASTEN, M. & GIORDANO, A. 2000. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2, 291-9.
- REDER-HILZ, B., ULLRICH, M., RINGEL, M., HEWITT, N., UTESCH, D., OESCH, F. & HENGSTLER, J. 2004. Metabolism of propafenone and verapamil by cryopreserved human, rat, mouse and dog hepatocytes: comparison with metabolism in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369, 408-417.
- ROBERTS, K. M., KHAN, C. A., HINCK, C. S. & FITZPATRICK, P. F. 2014. Activation of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine does not require binding in the active site. *Biochemistry*, 53, 7846-7853.
- ROBERTS, R. A., GANEY, P. E., JU, C., KAMENDULIS, L. M., RUSYN, I. & KLAUNIG, J. E. 2007. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 96, 2-15.
- ROSS, J. & SULLIVAN, T. D. 1985. Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes. *Blood*, 66, 1149-54.
- ROSSI, L., PIERIGÈ, F., CARDUCCI, C., GABUCCI, C., PASCUCCI, T., CANONICO, B., BELL, S. M., FITZPATRICK, P. A., LEUZZI, V. & MAGNANI, M. 2014. Erythrocyte-mediated delivery of phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria in BTBR-Pah(enu2) mice. *J Control Release*, 194, 37-44.
- RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L. 1959. *The principles of humane experimental technique*, Methuen.
- SAHIN, U., KARIKÓ, K. & TÜRECI, Ö. 2014. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 759-80.
- SANFORD, M. & KEATING, G. M. 2009. Sapropterin: a review of its use in the treatment of primary hyperphenylalaninaemia. *Drugs*, 69, 461-76.
- SAWIN, E. A., DE WOLFE, T. J., AKTAS, B., STROUP, B. M., MURALI, S. G., STEELE, J. L. & NEY, D. M. 2015. Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 309, G590-G601.
- SCHLAEGER, T. M., DAHERON, L., BRICKLER, T. R., ENTWISLE, S., CHAN, K., CIANCI, A., DEVINE, A., ETTENGER, A., FITZGERALD, K., GODFREY, M., GUPTA, D., MCPHERSON, J., MALWADKAR, P., GUPTA, M., BELL, B., DOI, A., JUNG, N., LI, X., LYNES, M. S., BROOKES, E., CHERRY, A. B., DEMIRBAS, D., TSANKOV, A. M., ZON, L. I., RUBIN, L. L., FEINBERG, A. P., MEISSNER, A., COWAN, C. A. & DALEY, G. Q. 2015. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol*, 33, 58-63.

- SCHLAKE, T., THESS, A., FOTIN-MLECZEK, M. & KALLEN, K. J. 2012. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol*, 9, 1319-30.
- SCHWANHÄUSSER, B., BUSSE, D., LI, N., DITTMAR, G., SCHUCHHARDT, J., WOLF, J., CHEN, W. & SELBACH, M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473, 337-42.
- SCRIVER, C. R. 2007. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat*, 28, 831-45.
- SCRIVER CR, L. H., DONLON J. 2009. Metabolic and molecular bases of inherited disease.
- SCRIVER, C. R. & WATERS, P. J. 1999. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet*, 15, 267-72.
- SELMİ, A., VASCOTTO, F., KAUTZ-NEU, K., TÜRECI, Ö., SAHIN, U., VON STEBUT, E., DIKEN, M. & KREITER, S. 2016. Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. *Cancer Immunol Immunother*, 65, 1075-83.
- SHEDLOVSKY, A., MCDONALD, J. D., SYMULA, D. & DOVE, W. F. 1993. Mouse models of human phenylketonuria. *Genetics*, 134, 1205-10.
- SHIMAN, R., MORTIMORE, G. E., SCHWORER, C. M. & GRAY, D. W. 1982. Regulation of phenylalanine hydroxylase activity by phenylalanine in vivo, in vitro, and in perfused rat liver. *J Biol Chem*, 257, 11213-6.
- SMON, A., CUK, V., BRECELJ, J., MURKO, S., GROSELJ, U., ZERJAV TANSEK, M., BATTELINO, T. & REPIC LAMPRET, B. 2019. Comparison of liquid chromatography with tandem mass spectrometry and ion-exchange chromatography by post-column ninhydrin derivatization for amino acid monitoring. *Clin Chim Acta*, 495, 446-450.
- STAUDIGL, M. 2012. *Funktion und Fehlfunktion der Phenylalaninhydroxylase in Abhängigkeit von Genotyp, metabolischem Status und Therapie mit dem pharmakologischen Chaperon Tetrahydrobiopterin*. Imu.
- STAUDIGL, M., GERSTING, S. W., DANECKA, M. K., MESSING, D. D., WOJDY, M., PINKAS, D., KEMTER, K. F., BLAU, N. & MUNTAU, A. C. 2011. The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response. *Human Molecular Genetics*, 20, 2628-2641.
- STREKOWSKA, M., GRZELA, R., MAJEWSKI, M., WNEK, K., KOWALSKA, J., LUKASZEWICZ, M., ZUBEREK, J., DARZYNKIEWICZ, E., KUHN, A. N., SAHIN, U. & JEMIELITY, J. 2016. Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential. *Nucleic Acids Res*, 44, 9578-9590.
- STRISCIUGLIO, P. & CONCOLINO, D. 2014. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites*, 4, 1007-17.
- STUMP, W. T. & HALL, K. B. 1993. SP6 RNA polymerase efficiently synthesizes RNA from short double-stranded DNA templates. *Nucleic acids research*, 21, 5480-5484.
- TAKATSUKI, K., FUJIWARA, K., HAYASHI, S., OTA, Y., TORII, M., MISHIRO, S., OGATA, I., SAKUMA, A., OKA, H. & ODA, T. 1981. Acceleration of DNA synthesis in post-hepatectomized regenerating liver of normal rat by insulin and glucagon. *Life Sciences*, 29, 2609-2615.
- THESS, A., GRUND, S., MUI, B. L., HOPE, M. J., BAUMHOF, P., FOTIN-MLECZEK, M. & SCHLAKE, T. 2015. Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol Ther*, 23, 1456-64.
- THOMAS, J., LEVY, H., AMATO, S., VOCKLEY, J., ZORI, R., DIMMOCK, D., HARDING, C. O., BILDER, D. A., WENG, H. H., OLBERTZ, J., MERILAINEN, M., JIANG, J., LARIMORE, K., GUPTA, S., GU, Z., NORTHRUP, H. & INVESTIGATORS, P. 2018. Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: Results of a long-term phase 3 clinical trial program (PRISM). *Mol Genet Metab*, 124, 27-38.
- THONY, B., AUERBACH, G. & BLAU, N. 2000. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*, 347 Pt 1, 1-16.
- THÖNY, B., DING, Z., REBUFFAT, A. & VIECELLI, H. M. 2014. Phenotypic reversion of fair hair upon gene therapy of the phenylketonuria mice. *Hum Gene Ther*, 25, 573-4.

- THOROLFSSON, M., TEIGEN, K. & MARTINEZ, A. 2003. Activation of phenylalanine hydroxylase: effect of substitutions at Arg68 and Cys237. *Biochemistry*, 42, 3419-28.
- THRAN, M., MUKHERJEE, J., PONISCH, M., FIEDLER, K., THESS, A., MUI, B. L., HOPE, M. J., TAM, Y. K., HORSCROFT, N., HEIDENREICH, R., FOTIN-MLECZEK, M., SHOEMAKER, C. B. & SCHLAKE, T. 2017. mRNA mediates passive vaccination against infectious agents, toxins, and tumors. *EMBO Mol Med*, 9, 1434-1447.
- TOURIAN, A., GODDARD, J. & PUCK, T. T. 1969. Phenylalanine hydroxylase activity in mammalian cells. *J Cell Physiol*, 73, 159-70.
- TREPOTEC, Z., LICHTENEGGER, E., PLANK, C., ANEJA, M. K. & RUDOLPH, C. 2019. Delivery of mRNA Therapeutics for the Treatment of Hepatic Diseases. *Mol Ther*, 27, 794-802.
- TRUONG, B., ALLEGRI, G., LIU, X. B., BURKE, K. E., ZHU, X., CEDERBAUM, S. D., HÄBERLE, J., MARTINI, P. G. V. & LIPSHUTZ, G. S. 2019. Lipid nanoparticle-targeted mRNA therapy as a treatment for the inherited metabolic liver disorder arginase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 21150-21159.
- UDENFRIEND, S. & COOPER, J. R. 1952. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J Biol Chem*, 194, 503-11.
- ULLRICH, A., STOLZ, D. B., ELLIS, E. C., STROM, S. C., MICHALOPOULOS, G. K., HENGSTLER, J. G. & RUNGE, D. 2009. Long term cultures of primary human hepatocytes as an alternative to drug testing in animals. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 26, 295-302.
- VAN SPRONSEN, F. J., BLAU, N., HARDING, C., BURLINA, A., LONGO, N. & BOSCH, A. M. 2021. Phenylketonuria. *Nat Rev Dis Primers*, 7, 36.
- VILLIGER, L., GRISCH-CHAN, H. M., LINDSAY, H., RINGNALDA, F., POGLIANO, C. B., ALLEGRI, G., FINGERHUT, R., HÄBERLE, J., MATOS, J., ROBINSON, M. D., THÖNY, B. & SCHWANK, G. 2018. Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. *Nat Med*, 24, 1519-1525.
- VIVINUS, S., BAULANDE, S., VAN ZANTEN, M., CAMPBELL, F., TOPLEY, P., ELLIS, J. H., DESSEN, P. & COSTE, H. 2001. An element within the 5' untranslated region of human Hsp70 mRNA which acts as a general enhancer of mRNA translation. *Eur J Biochem*, 268, 1908-17.
- WALSH, C. 2006. *Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory*, Roberts and Company Publishers.
- WEGLAGE, J., PIETSCH, M., FELDMANN, R., KOCH, H. G., ZSCHOCKE, J., HOFFMANN, G., MUNTAU-HEGER, A., DENECKE, J., GULDBERG, P., GUTTLER, F., MOLLER, H., WENDEL, U., ULLRICH, K. & HARMS, E. 2001. Normal clinical outcome in untreated subjects with mild hyperphenylalaninemia. *Pediatr Res*, 49, 532-6.
- WEISSMAN, D. & KARIKÓ, K. 2015. mRNA: Fulfilling the Promise of Gene Therapy. *Mol Ther*, 23, 1416-7.
- WENG, Y., LI, C., YANG, T., HU, B., ZHANG, M., GUO, S., XIAO, H., LIANG, X. J. & HUANG, Y. 2020. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnol Adv*, 40, 107534.
- WERNER, E. R., BLAU, N. & THONY, B. 2011. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J*, 438, 397-414.
- WILKENING, S., STAHL, F. & BADER, A. 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*, 31, 1035-42.
- WOLFF, J. A., MALONE, R. W., WILLIAMS, P., CHONG, W., ACSADI, G., JANI, A. & FELGNER, P. L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247, 1465-8.
- WU, X. & BREWER, G. 2012. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*, 500, 10-21.
- YAGI, H., OGURA, T., MIZUKAMI, H., URABE, M., HAMADA, H., YOSHIKAWA, H., OZAWA, K. & KUME, A. 2011. Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J Gene Med*, 13, 114-22.

- YAKUBOV, E., RECHAVI, G., ROZENBLATT, S. & GIVOL, D. 2010. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 394, 189-93.
- YANEZ ARTETA, M., KJELLMAN, T., BARTESAGHI, S., WALLIN, S., WU, X., KVIST, A. J., DABKOWSKA, A., SZÉKELY, N., RADULESCU, A., BERGENHOLTZ, J. & LINDFORS, L. 2018. Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E3351-e3360.
- YANG, L., DUFF, M. O., GRAVELEY, B. R., CARMICHAEL, G. G. & CHEN, L.-L. 2011. Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. *Genome Biology*, 12, R16.
- YIKRAZUUL 2007. Hydroxylierung von Phe zu Tyrosin. https://de.wikipedia.org/wiki/Phenylalanin#/media/Datei:Phe_to_Tyr.png.
- ZHU, X., YIN, L., THEISEN, M., ZHUO, J., SIDDIQUI, S., LEVY, B., PRESNYAK, V., FRASSETTO, A., MILTON, J., SALERNO, T., BENENATO, K. E., MILANO, J., LYNN, A., SABNIS, S., BURKE, K., BESIN, G., LUKACS, C. M., GUEY, L. T., FINN, P. F. & MARTINI, P. G. V. 2019. Systemic mRNA Therapy for the Treatment of Fabry Disease: Preclinical Studies in Wild-Type Mice, Fabry Mouse Model, and Wild-Type Non-human Primates. *Am J Hum Genet*, 104, 625-637.
- ZINCKGRAF, J. W. & SILBART, L. K. 2003. Modulating gene expression using DNA vaccines with different 3'-UTRs influences antibody titer, seroconversion and cytokine profiles. *Vaccine*, 21, 1640-9.
- ZSCHOCKE, J. 2003. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat*, 21, 345-56.

9 Anhang

Reaktionszeit	10min		1h		3h	
L-Phen[mmol/l]	PHE[mg/dl]	TYR	PHE	TYR	PHE	TYR
0,1	0,69	0,33	0,32	0,75	0,85	0,24
	0,063	0,26	0,91	0,35	0,98	1,82
1	13,26	0,31	9,77	0,22	13,91	1,84
	8,5	0,22	11,78	0,3	12,44	0,17
10	115,44	0,2	114	0	121,15	1,54
	121,68	0,08	120	0	121,34	0,12
0,1	0,91	0	0,85	0,03	1,39	0,03
	0,7	0	0,8	0	1,36	0
1	11,25	0	11,73	0	12,71	0
	8,5	0	9,25	0	11,83	0
10	98,55	0,05	85,07	0,05	118,92	1,4
	113	0	106	0	100,56	0,05

Tabelle 9: Initialer L-Phen Assay

HeLa Zelllysate (obere Tabellenhälfte) 24h nach Transfektion bei verschiedenen Substratkonzentrationen, Kontrolle (untere Tabellenhälfte)

BH4 Konz. (µmol/ml)	TYR [mg/dl]	PHE [mg/dl]	BH4 Konz. (µmol/ml)	TYR [mg/dl]	PHE [mg/dl]	BH4 Konz. (µmol/ml)	TYR [mg/dl]	PHE [mg/dl]
200	5,77	2,48	400	5,57	2,26	600	5,98	2,96
	6,35	2,76		5,84	1,87		5,97	2,47
	5,54	2,93		5,74	2,76		4,24	2,34
	5,26	3,1		4,87	2,57		5,58	2,83
Kontrolle	0,96	6,75	Kontrolle	0,84	7,37	Kontrolle	0,93	6,69

Tabelle 10: Verschiedene BH₄-Konzentrationen

L-Phenylalanin Assay mit 0,5mM Substrat und 200, 400 und 600 µmol/l Kofaktor Konzentrationen

10 Danksagung

Ich möchte vor allem meiner wunderbaren Frau [REDACTED] danken, die mir den Rücken freigehalten und das ganze Projekt trotz der vielen Stunden im Labor und am Schreibtisch mitgetragen hat. Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater [REDACTED], der mir diese Arbeit ermöglicht hat und mir in jeder Herausforderung in Rat und Tat zur Seite stand. Danke auch an meinen Betreuer und Freund [REDACTED], ohne dessen Expertise und praktische Unterstützung ich diese Arbeit nicht hätte meistern können. Vielen Dank an die [REDACTED] für die gute Zusammenarbeit und das Bereitstellen der mRNA-Konstrukte. Weiterhin möchte ich mich bei [REDACTED] für die konstruktiven Anregungen zu dieser Dissertationsschrift bedanken. Ich möchte meinen liebevollen Eltern und meinen Geschwistern für ihre andauernde Unterstützung danken, ohne die nichts möglich wäre. Besonders meinem Bruder [REDACTED] danke ich an dieser Stelle für den andauernden fachlichen und persönlichen Austausch, der auch in diesem Kontext immer hilfreich war. Vielen Dank an meine kleine Tochter [REDACTED], deren Lachen mich immer wieder ermutigt.

So möchte ich mich bei allen Lesern dieser Arbeit von ganzem Herzen für die investierte Zeit bedanken und abschließend dem die Ehre geben, dem alle Ehre gebührt: Gott, der Himmel und Erde gemacht hat und dem ich mein ganzes Sein verdanke.

11 Tabellarischer Lebenslauf

