



Doctoral Thesis

Engineering of synthetic mammalian gene-networks for cell-based therapies

Author(s):

Kemmer, Christian

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006233430> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 19101

**Engineering of Synthetic Mammalian Gene-Networks
for Cell-Based Therapies**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

CHRISTIAN KEMMER

Diplom Biologe, University of Göttingen (M.Sc.)

born 20th June, 1979

citizen of Mühlhausen, Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Fussenegger / Examiner
Prof. Dr. Sabine Werner / Co-Examiner
Prof. Dr. Annette Oxenius / MLS Thesis Committee

Zürich, 2010

Summary

Biological research fields such as synthetic biology and functional genomics as well as biopharmaceutical manufacturing require a wide range of technologies to control and regulate the expression of specific genes. Moreover, the successful implementation of transgene control systems into gene therapy depends on tight control and precise dosage of genes of interest according to the physiological and pathological requirements of the patient. The aim of this work was the design of two synthetic gene-control circuits and their implementation into innovative therapeutic strategies.

Taking advantage of the oxidative stress response regulator HucR of *Deinococcus radiodurans*, the highly specific human urate anion transporter 1 (URAT1) and an *Aspergillus flavus*-derived secretion-engineered variant of a cofactor-independent urate oxidase, we have established the UREX-system, a synthetic mammalian gene regulation network that is able to respond to uric acid, the end product of the human purine metabolism. Using hyperuricemia as a model metabolic disturbance we showed for the first time a successful experimental implementation of a synthetic gene circuitry in therapy providing self-sufficient capture of pathologic serum urate-levels and enzymatic reduction to sub-pathological concentrations that are known to provide oxidative stress protection.

Beside the autonomous regulation of disease-associated metabolites the level of endogenous signals that regulate specific physiological states of the organism may be a target of interest for a coordinated therapeutic intervention. In a second project we designed a mammalian cell-based microcapsule degradation system for ovulation-coordinated discharge of the capsule cargo. Implantation of microcapsules into superovulated cows released entrapped spermatozoa in response to luteinizing hormone, a pituitary hormone that induces mammalian ovulation, and resulted in successful fertilization of ova and the production of embryos. An ovulation-triggered sperm release may increase the efficiency of artificial insemination in modern stock farming by protection of sperm from the unfavorable environment of the uterus while mobilizing the sperm reservoir when a mature ovum is accessible for fertilization.

Zusammenfassung

Synthetische Biologie, Proteom- und Genomanalysen, sowie die Produktion von Biopharmazeutika benötigen eine Vielzahl von Anwendungen für eine kontrollierte und regulierbare Genexpression. Die erfolgreiche Implementierung künstlicher Genregulations-Systeme in der Gentherapie erfordert zudem eine akkurate Dosierung der Genexpression entsprechend des physiologischen und pathologischen Bedarfs des Patienten. Diese Arbeit befasst sich mit dem Design von künstlichen Genregulations-Systemen und deren Implementierung in innovative therapeutische Strategien.

Durch funktionelle Kombination einer Variante des transkriptionellen Regulatorproteins HucR von *Deinococcus radiodurans*, des menschlichen Harnsäure-Transporters URAT1, und einer für die Sekretion aus Säugerzellen modifizierten Form der Uratoxidase von *Aspergillus flavus* haben wir ein neues Urat-reguliertes Expressions (UREX)-System für Säugerzellen etabliert. Dieses synthetische Gen-Netzwerk detektiert Veränderungen der externen Harnsäure-Konzentration, einem Endprodukt des menschlichen Purin-Stoffwechsels, und reguliert daraufhin die Expression eines Zielgenes. Anhand der Krankheit Hyperurikämie, welche durch eine Erhöhung des Harnsäurespiegels im Blut gekennzeichnet ist und zu Erkrankungen wie Gicht führen kann, konnte zum ersten Mal die erfolgreiche Implementierung eines synthetischen Gen-Netzwerkes in einer Therapie gezeigt werden. Das UREX-System detektierte automatisch pathologische Harnsäurelevel und reduzierte diese zu sub-pathologischen Konzentrationen, welche für den antioxidativen Schutz des Organismus bekannt sind.

Neben der autonomen Adaption von krankheitsassoziierten Metabolit-Leveln ermöglicht die Erkennung von endogenen Signalen die gezielte Detektion von physiologischen Prozessen im Organismus. In einem zweiten Ansatz haben wir ein Säugerzellen-basierendes Mikrokapsel-Degradationssystem entwickelt, welches das Eisprung-induzierende Luteinisierende Hormon detektiert und daraufhin den Kapselinhalt freisetzen kann. Neben der Charakterisierung im Labor konnten wir zudem die erfolgreiche Befruchtung von Eizellen durch eine koordinierte Spermienfreisetzung in superovulierten Kühen demonstrieren.