



Doctoral Thesis

Engineering of synthetic gene circuits for the treatment of metabolic diseases

Author(s):

Rössger, Katrin

Publication Date:

2013

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010080191> →

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 N° 21499

**ENGINEERING OF SYNTHETIC GENE CIRCUITS
FOR THE TREATMENT OF METABOLIC DISEASES**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Katrin Rössger
Diplom-Ingenieur (Verfahrenstechnik), Technische Universität Dresden

born on the 1st of May, 1984
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Martin Fussenegger, examiner
Prof. Dr. Sven Panke, co-examiner

2013

SUMMARY

Biomedical science is aiming towards the development of customized therapies against multifactorial chronic diseases, such as diabetes, hypercholesterolemia and obesity. Synthetic biology is a novel discipline in this scientific community focusing on reprogramming cells that are able to sense and process external signals with almost computer-like precisions. This work collectively illustrates the potential of clinical applications in synthetic biology, where the detection of specific disease markers can be directly linked to the timely production of a therapeutic protein.

In the first project we have developed a gene regulation network able to sense various fatty acids derived from plants or animals. The regulatory core of this device is the hybrid protein LSR (lipid-sensing receptor) consisting of the peroxisome proliferator-activated receptor PPAR α (a key mammalian regulator of lipid metabolism) and the *Pseudomonas putida* DOT-TE1 derived transcription factor TtgR. Taking advantage of LSR's sequence-specific binding ability to chimeric TtgR promoters, this hybrid protein was able to translate the lipid levels in the cellular environment to tightly regulated gene transcription. The overall gene regulation network showed excellent performance in several mammalian cell types as well as in animal experiments. To test the clinical utility of this network, we expressed the clinically licensed anorectic drug pramlintide in diet-induced obese mice that showed increased blood fat levels, which caused a change in food intake, decreasing blood fat levels and weight reduction.

Similarly, the gene regulation circuit developed in the second project could be implemented as a biosensor for physiological bile acid concentrations. Abnormal bile acid levels in the blood can damage the liver, thereby representing a potential source of different metabolic disorders. By transferring the bile acid multidrug efflux pump CmeR-O_{CmeABC} of the bacteria *Campylobacter jejuni* into mammalian cells, we were able to design the precise, robust and adjustable bile acid sensors BEAR_{OFF} and BEAR_{ON}, which interact with several bile acids to regulate gene expression *in vitro*. Furthermore, BEAR_{ON} was able to sense bile acids in mice indicating its potential for future gene- and cell-based therapies.

In nature activation of stimuli-specific cell-surface receptors is an adapted response of cells upon changing environmental conditions. When activated by a specific trigger molecule, the receptor protein initiates a biochemical signal cascade that is eventually transduced into the nucleus where the expression of response-specific genes is initiated. In the third project we focused on the development of a synthetic brain-dopamine interface by establishing a cell-surface receptor-based gene regulation system activated by dopamine as a trigger molecule. Dopamine is a neurotransmitter in the brain that achieves several functions in the central and peripheral nervous

system (movement, emotional responses etc.) and also functions outside the nervous system as a chemical messenger. It is released into the blood by sympathetic nerves that enmeshing blood vessels throughout the body and correlates with brain dopamine produced in reward situations. By rewiring the human dopamine receptor D1 with a response-specific promoter (P_{CRE}), we have designed a gene regulation network that was functional in several mammalian cell lines with high expression levels and tight regulatory control *in vitro*. In mice experiments this engineered system could be activated via direct dopamine administration or in an auto-regulated fashion by dopamine released in response to pleasure-associated situations. Furthermore, we were able to use the circuit for the expression of a vasodilator to reduce blood pressure in hypertensive mice. The designed synthetic circuit is versatile and highly flexible and further provides new gene- and cell-based strategies that require seamless and self-sufficient drug dosing.

ZUSAMMENFASSUNG

Die biomedizinische Wissenschaft zielt auf die Entwicklung maßgeschneiderter Therapien gegen multifaktorielle chronischen Krankheiten, wie z.B. Diabetes, Hypercholesterinämie und Fettleibigkeit, ab. Synthetische Biologie ist ein neuer Bereich dieser Wissenschaft, welche sich auf die Neuprogrammierung von Zellen fokussiert, die in der Lage sind externe Signale mit beinahe Computer-ähnlicher Genauigkeit zu erfassen und zu verarbeiten. Die vorliegende Arbeit gibt einen zusammenfassenden Überblick über das Potential klinischer Anwendungen in der synthetischen Biologie, in der die Detektion von spezifischen Krankheitsmarkern direkt mit der zeitnahen Produktion eines therapeutischen Proteins verknüpft werden kann.

In dem ersten Projekt haben wir ein Genregulationsnetzwerk entwickelt, das verschiedene Fettsäuren aus Pflanzen und Tieren erkennen kann. Der regulatorische Kern dieser Baugruppe ist das Hybrid-Protein LSR (Lipid-erkennender Rezeptor) bestehend aus dem Peroxisomproliferator-aktivierten Rezeptor PPAR α (ein wichtiger Säugerzellen-Regulator des Fettstoffwechsel) und dem aus *Pseudomonas putida* DOT -TE1 stammenden Transkriptionsfaktors TtgR. Dieses Hybrid-Protein war fähig, unter Verwendung der LSR' Sequenz-spezifischen Bindefähigkeit zu chimärischen TtgR Promotoren, Blutfettwerte der zellulären Umgebung in eine genau regulierte Gentranskription zu übersetzen. Das gesamte Genregulationsnetzwerk zeigte eine hervorragende Funktionalität in verschiedenen Säuger- Zelltypen sowie im Tierversuch. Um die klinische Durchführbarkeit dieses Netzwerk zu testen haben wir einen klinisch lizenzierten Appetitzügler produziert, der in Diät-induzierte fettleibigen Mäusen mit erhöhten Blutfettwerten zur Appetitssättigung, sinkenden Blutfettwerten und Gewichtsreduzierung führte.

In ähnlicher Weise könnte die im zweiten Projekt entwickelte Genregulation als Biosensor für physiologische Gallensäure-Konzentrationen verwendet werden. Abnormale Gallensäurekonzentrationen im Blut können die Leber schädigen was die potentielle Quelle verschiedener Stoffwechselstörungen sein kann. Durch die Anwendung der Gallensäure „Multidrug-Efflux“ Pumpe CmeR-O_{CmeABC} von *Campylobacter jejuni* in Säugerzellen konnten wir die präzisen, robusten und einstellbaren Gallensäure-basierenden Biosensoren BEAR_{OFF} und BEAR_{ON} entwickeln, die mit verschiedenen Gallensäuren interagieren und die Expression von Genen *in vitro* realisieren können. Darüber hinaus war der BEAR_{ON} Sensor in der Lage, Gallensäuren in Mäusen wahrzunehmen, was dessen biomedizinischen Einsatzbereich darlegt.

In der Natur ist die Aktivierung von Stimuli-spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren eine angepasste Reaktion von Zellen gegenüber wechselnden Umgebungsbedingungen. Nach der Aktivierung durch ein bestimmtes Auslösermolekül stösst der Rezeptor eine biochemische

Signalkaskade an, die dem Zellkern übermittelt wird, wo die Expression der Ansprech-spezifischen Gene gestartet werden kann. Dieser Mechanismus stellt ein nützliches Werkzeug für die neuen Strategien zur Behandlung von Krankheiten in der synthetischen Biologie dar. Im dritten Projekt haben wir uns auf die Entwicklung einer Gehirn-Dopamin-Schnittstelle durch die Herstellung eines Zelloberflächen-Rezeptor-basierten Genregulationssystem konzentriert, das durch Dopamin als Auslösermolekül aktiviert wird. Dopamin ist ein Neurotransmitter im Gehirn, der mehrere Funktionen im zentralen und peripheren Nervensystem (Bewegung, emotionale Reaktionen) und Funktionen in mehreren Teilen außerhalb des Nervensystems als Botenstoff erfüllt. Es wird ins Blut über sympathische Nerven, welche die Blutgefäße im gesamten Körper umgeben, freigesetzt und korreliert mit Dopamin im Gehirn, das durch Belohnungssituationen produziert wurde. Durch die Kombination des humanen Dopamin-D1-Rezeptors mit einem Ansprech-Promotor (P_{CRE}), haben wir ein Genregulationsnetzwerk entwickelt, das in mehreren Säugetier-Zelllinien mit hoher Expression und enger regulatorischer Kontrolle *in vitro* funktionell war. In Mausexperimenten konnte das erstellte System direkt durch Administration von Dopamin oder auto-reguliert durch Dopamin, welches als Reaktion auf Genuss-assoziierte Situationen ausgeschüttet wurde, aktiviert werden. Darüber hinaus konnten wir mittels des entwickelten Systems erfolgreich einen Vasodilator zur Blutdrucksenkung in hypertonen Mäusen exprimieren. Das entworfene synthetische System ist vielseitig und sehr flexibel und stellt für die Zukunft neue Gen- und Zellbasierenden Strategien zur Verfügung, welche eine nahtlose und unabhängige Medikamentdosierung erfordern.