



Doctoral Thesis

Engineering of synthetic gene networks for restoring homeostasis in experimental chronic diseases and their validation in patient-derived whole blood cultures

Author(s):

Schukur, Lina

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010784922> →

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. 23367

Engineering of synthetic gene networks for restoring
homeostasis in experimental chronic diseases and their
validation in patient-derived whole blood cultures

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCE of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

LINA SCHUKUR

Master of Science in Life Science, RWTH Aachen University

born on 13.11.1987

citizen of
Iraq and Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Fussenegger, examiner
Prof. Dr. Sven Panke, co-examiner
Prof. Dr. Sai Reddy, co-examiner

2016

SUMMARY

Synthetic biology is a promising multidisciplinary field, bringing together experts from a broad scientific area, ranging from cell biology to engineering with the ambition to build naturally non-existing elements for various applications, including the development of novel approaches for a better healthcare management in the future. Currently, disease treatment strategies are typically based on diagnosis of phenotypic changes, which are often the result of an accumulation of asymptomatic metabolic defects in the human body. These defects occur when the tight regulation of physiological processes in cells and tissues is disturbed, which can be caused by genetic alterations, loss of protein functions, or changes in the environment. Such disturbances may result in the development of serious disorders that are often associated with aberrant physiological levels of certain biomolecules (e.g. metabolites, cytokines, growth factors) that lead to the typical pathogenic states, however, simultaneously serve as biomarkers for precise detection and specification of disease types. Clinical interventions often occur at late stages of disease pathogenesis due to the lack of early recognition of these physiological disturbances, resulting in disease treatment rather than prevention.

Hence, there is an essential need in developing advanced therapeutic tools that are able to couple therapeutic intervention to early diagnosis. For this purpose, advances in the synthetic biology field have recently enabled the design of complex gene circuits in mammalian cells that can functionally integrate and interface with the host metabolism to autonomously detect disease-specific biomarkers and coordinate the production and delivery of therapeutic(s) in a self-sufficient and automatic fashion, thereby restoring the physiological balance and preventing disease progression. In this thesis, we provide a comprehensive overview of currently available synthetic gene networks that have been designed for restoring physiological balance in chronic diseases. In addition, we focus on the design of a sophisticated synthetic gene circuit that was developed for the treatment of psoriasis.

Psoriasis is a chronic, recurrent autoimmune skin disease, associated with increased serum levels of proinflammatory cytokines and reduced levels of anti-inflammatory mediators, resulting in excessive inflammation that causes skin-tissue damage. The synthetic gene circuit operates as a cytokine converter by detecting two psoriasis-associated proinflammatory cytokines using sequentially linked receptor-

Summary

based synthetic signaling cascades, processing their level with AND-gate logic, and triggering the corresponding expression of anti-inflammatory cytokines. The cell-based cytokine converter device specifically prevents disease progression and successfully treats established psoriasis, thereby restoring skin tissue morphology in mice with psoriasis-like skin inflammation. In addition, these implants were tested for their ability to sense and respond to pathophysiological levels of the proinflammatory cytokines in patient's whole blood samples.

Furthermore, we present the characterization of the whole blood culture system (WhBC-system) for the validation of cell-based synthetic gene networks. In a co-culture setting using encapsulated designer cells and human whole blood, we demonstrate that upon microencapsulation transgenic mammalian cells retain their viability and ability to integrate and interfere with signals in the blood microenvironment without affecting primary immune cells contained in whole blood.

The WhBC-system can therefore be used as a valuable complementary assay to animal models, providing patient-centered assessments that may speed up preclinical research and advance personalized cell-based therapies.

ZUSAMMENFASSUNG

Die synthetische Biologie ist ein vielversprechendes und interdisziplinäres Gebiet, welches Experten aus einem breiten wissenschaftlichen Spektrum zusammenbringt. Das gemeinsame Ziel ist es, neue, natürlich nicht existierende Elemente für verschiedene Anwendungen, einschließlich der Entwicklung innovativer Methoden für verbesserte klinische Behandlungen, zu erstellen. Die derzeitig gängigen Strategien zur Behandlung von Krankheiten basieren auf der Diagnose phänotypischer Veränderungen, die oft aus der Akkumulation asymptomatischer physiologischer Defekte im menschlichen Körper resultieren. Diese Defekte treten auf, wenn die präzise regulierten physiologischen Prozesse menschlicher Zellen und Gewebe gestört werden. Solche Störungen können durch genetische Veränderungen, Verlust von Proteinfunktionalitäten oder durch Umwelteinflüsse verursacht werden. Oft führt dies zu anomalen physiologischen Werten bestimmter biologischer Moleküle (wie z.B. Stoffwechselprodukte, Zytokine und Wachstumsfaktoren), die typischen pathogenen Zuständen zugeordnet werden können und folglich als messbare biologische Parameter (Biomarker) für die genaue Erfassung und Beschreibung von Krankheitsarten dienen. Klinische Eingriffe finden aufgrund mangelnder Früherkennung physiologischer Störungen allerdings häufig in fortgeschrittenen Stadien des Krankheitsverlaufs statt. Somit müssen Krankheiten behandelt anstatt vorgebeut werden.

Daher besteht großer Bedarf an der Entwicklung fortschrittlicher Methoden, die es ermöglichen, therapeutische Eingriffe direkt an die Früherkennung von Erkrankungen zu koppeln. Fortschritte in der synthetischen Biologie haben in jüngerer Zeit die Konzeption von komplexen biologischen Schaltkreisen in Säugerzellen ermöglicht. Diese können funktional integriert werden und als Schnittstelle mit dem Stoffwechsel des Wirtes fungieren, um autonom krankheitsspezifische Biomarker zu erkennen und die Produktion und Bereitstellung von therapeutischen Faktoren in einer autarken und automatisierten Art und Weise zu koordinieren. Das Ziel dabei ist, schließlich das physiologische Gleichgewicht des Trägers wiederherzustellen und das Fortschreiten von Erkrankungen zu verhindern. In dieser Arbeit stellen wir einen umfassenden Überblick über die derzeit verfügbaren synthetischen Gennetzwerke vor, die für die Wiederherstellung des physiologischen Gleichgewichts bei chronischen Krankheiten entwickelt wurden. Ferner konzentrieren wir uns auf das Design eines

anspruchsvollen synthetisch-biologischen Schaltkreises, der für die Behandlung von Schuppenflechten konstruiert wurde.

Schuppenflechte (Psoriasis) ist eine chronisch wiederkehrende Autoimmunerkrankung der Haut, die mit erhöhten Blutkonzentrationen von entzündungsfördernden (proinflammatorischen) Zytokinen und einem Mangel an entzündungshemmenden (anti-inflammatorischen) Zytokinen verbunden ist, welche zu übermäßiger Entzündung führt, die schließlich die charakteristischen Schäden im Hautgewebe verursacht. Der in dieser Arbeit gezeigte synthetische Schaltkreis agiert hierbei als Zytokin-Wandler. Durch das Detektieren zweier Psoriasis-assoziiertes proinflammatorischer Zytokine mit nacheinander verknüpften, rezeptorbasierten synthetischen Signalkaskaden wird der Krankheitszustand wahrgenommen. Diese verarbeiten die Zytokinwerte mittels einer UND-Gatter Logik, und leiten schließlich die entsprechende Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen ein. Die genetischen Komponenten des Zytokin-Wandlers, die in verkapselten Säugerzellen eingebaut und in Mäusen mit einer Psoriasis-ähnlichen Hautentzündung implantiert wurden, konnten sowohl die Entwicklung der Krankheit verhindern als auch bereits etablierte Schuppenflechte erfolgreich behandeln und damit die Gewebestruktur der Haut wiederherstellen. Darüber hinaus wurden diese Implantate auf ihre Fähigkeit geprüft, pathophysiologische Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in Blutproben von Patienten zu erfassen und darauf zu reagieren.

Zusätzlich stellen wir die Charakterisierung von Blutkultursystemen (whole blood culture system, WhBC-system) als Mittel zur Validierung von synthetischen, zellbasierten Schaltkreisen vor. In dieser Studie zeigen wir, dass genetisch veränderte Zellen, die mit Blutproben zusammen kultiviert wurden, durch eine Verkapselung überleben und in der Lage bleiben mit der Blutumgebung zu interagieren ohne dabei primäre Immunzellen im Blut zu beeinträchtigen.

Das hier entwickelte Blutkultursystem kann somit als wertvolle Ergänzung zu herkömmlichen Tiermodellen herangezogen werden, um patientenbezogene Einschätzungen zu ermöglichen, mit denen die präklinische Forschung beschleunigt und das Entwickeln individueller, zellbasierter Therapien voran getrieben werden kann.