

DISS. ETH No. 25190

Engineering of programmable anti-infective gene circuits in mammalian cells

A dissertation submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCE of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

FERDINAND SEDLMAYER

Master of Science in Molecular Biotechnology, Technische Universität München
(TUM)

born on 05.03.1988

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Fussenegger, examiner

Prof. Sai Reddy, co-examiner

Prof. Randall Platt, co-examiner

2018

SUMMARY

The fusion between cell biology and engineering disciplines founded the field of synthetic biology, which aims to functionalize cells with desirable non-natural capabilities. Resulting engineered cells have served unmet medical or biotechnological needs and first applications of living therapeutics for cancer immunotherapy are revolutionizing clinical practice. In the introduction of this thesis, we therefore give an overview of available genetic circuits that tackle major disorders by autonomously correcting disease states.

The spread of serious bacterial infections due to the evolution of antibiotic resistance jeopardizes the safety of patients and underscores the need for next-generation infection control strategies. Treatment failures are worsened by antibiotic tolerance caused by dormant, non-dividing persisters escaping elimination by antimicrobials. The misuse of antibiotics not only kills bacteria, but also selects for resistant as well as tolerant populations and has thus significantly increased the risk of a global health threat by multi-drug-resistant bacteria. Antibiotic resistance arises from spontaneous genetic mutations or from transfer of resistance genes between microbes and can be intensified by bacterial communication that synchronizes bacterial population behavior like biofilm formation. Antiinfectives that circumvent the selection for resistant clones and simultaneously silence bacterial communication are expected to mitigate the risk of resistance.

Here we have focused on the design of anti-infective genetic programs operated in human cells and made the concept a reality. In the first approach, we demonstrated that microbial infections caused by diverse human pathogens can be attenuated with mammalian designer cells. The strategy used in this study was inspired by living therapeutics made from mammalian cells, currently being examined for a diverse range of metabolic and oncological disorders. To this end, cells were genetically equipped with infection-specific sensors that recognize by-products of bacterial protein translation, anaerobic metabolism or bacterial communication signals.

The implemented broad range anti-infective genetic circuit detected bacterial or fungal pathogens and subsequently modulated microbial communication known as quorum sensing (QS) by timing the production of a universal bacterial signal molecule autoinducer-2 (AI-2). The synthetic sensor system recognized microbial signal peptides as a proxy signal for infection and activated the intended signaling cascade. This, in turn, resulted in the adjusted expression of AI-2 biosynthetic enzymes and hence the production of AI-2 to interfere with QS-controlled virulence or biofilm formation of responsive pathogens.

Because bacteria can alternatively be tackled by small molecule quorum sensing inhibitors, AI-2-engineered human cell lines were subsequently employed to identify and

characterize antiviral compounds. After benchmarking the assay with known inhibitors of AI-2 biosynthesis and miniaturizing the assay to the nanoliter scale, we challenged cells with a library of natural products and chemical compounds in an automated screen and discovered compounds that block AI-2 activity with nanomolar affinity. Among those, the antineoplastic nucleoside analogue 5-Fluorouracil (5-FU) substantially decreased cellular AI-2 production, while lacking observable cytotoxicity or antibiotic activity. This discovery helped to explain how 5-FU and antibiotics accomplish synergism.

For tackling *Pseudomonas aeruginosa*, a major source of healthcare-associated infections, human cells were instead equipped with a cytosolic autoinducer-inducible transcription factor to monitor bacterial intra-species communication. The biosensor was able to coordinate quorum-quenching via the release of an anti-infective triad, which accomplished hydrolysis of acyl-homoserine lactones (autoinducers) and biofilm disruption. Since the programmable therapeutic payload comprises engineered secreted catalytic effectors to silence bacterial communication, it led to reduced virulence. Noteworthy, the secretion-engineered effectors dissolved glycosidic biofilm shields of *P. aeruginosa*, thereby potentiating the killing efficacy of a traditional antibiotic. Efficient cell-based prevention and dispersal of notoriously difficult-to-treat biofilms was observed around the developed quorum-quencher cells.

Last, we introduced the design and implementation of a mammalian lactate-responsive transgene control network that could serve as a sensor for sepsis as well as to score accumulation of this metabolite under hypoxic conditions. By rerouting a lactate sensor derived from human adipocytes with a synthetic adapter protein for the activation of transgene expression, we could link environmental lactate levels to a stable diagnostic readout. Beyond this, the genetic circuit might potentially monitor serious metabolic imbalances or could be exploited for control of bioprocessing of difficult-to-produce proteins.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verschmelzung von Zellbiologie mit Ingenieursdisziplinen begründete das Feld der Synthetischen Biologie, das sich zum Ziel gesetzt hat Zellen mit gewünschten, nicht natürlich vorkommenden Funktionen zu versehen. Daraus hervorgegangene maßgeschneiderte zelluläre Systeme haben komplexe medizinische und biotechnologische Bedürfnisse bedient und erste Anwendungen in der Krebsimmuntherapie mit lebenden Therapeutika revolutionieren gerade die klinische Praxis. In der Einführung dieser Theses geben wir deshalb einen Überblick über vorhandene genetische Netzwerke, die schwerwiegende Krankheiten angehen, indem sie Krankheitszustände automatisch korrigieren.

Die Ausbreitung von ernsthaften bakteriellen Infektionen durch die Evolution von Antibiotikaresistenzen setzt die Patientensicherheit auf das Spiel und unterstreicht die Dringlichkeit von alternativen Strategien zur Infektionskontrolle. Behandlungsmisserfolge werden durch Toleranzen gegenüber Antibiotika verschlimmert, die von ruhenden und ausharrenden Bakterien ohne Zellteilung ausgelöst werden, welche der Auslöschung durch antimikrobielle Substanzen entgehen. Falsch verwendete Antibiotika, die Bakterien töten, selektionieren resistente und tolerante Populationen und riskieren eine globale Gesundheitskrise durch multiresistente Keime. Antibiotikaresistenzen entstehen durch spontane genetische Mutationen oder durch den Transfer von Resistenzgenen zwischen Mikroben und werden verstärkt mittels bakterieller Kommunikation, die das Verhalten bakterieller Populationen wie beispielsweise in Biofilmen synchronisiert. Von Antiinfektiva, die die Selektion auf resistente Klone umgehen und gleichzeitig die mikrobielle bakterielle Kommunikation ausschalten wird hingegen erwartet, dass sie das Resistenzrisiko abschwächen.

In der vorliegenden Dissertation haben wir uns auf das Design von antiinfektiven genetischen Programmen in menschlichen Zellen fokussiert und dieses Konzept verwirklicht. Im ersten Ansatz haben wir gezeigt, dass mikrobielle Infektionen mit diversen Humanpathogenen durch maßgeschneiderte Säugerzellen abgeschwächt werden können. Die Strategie der vorliegenden Arbeit wurde von aus menschlichen Zellen geschaffenen lebendigen Therapeutika inspiriert, die derzeit für eine Vielzahl an metabolischen und onkologischen Erkrankungen verfolgt wird. Diese wurden genetisch mit einem infektionsspezifischen Sensor ausgestattet, der bakterielle Nebenprodukte der Proteintranslation erkennt, des anaeroben Stoffwechsels oder bakterielle Kommunikationssignale.

Der gebaute genetische Regelkreis mit breitem Einsatzspektrum erkannte mikrobielle Pathogene und modulierte die als Quorum Sensing (QS) bekannte bakterielle Kommunikation, wofür es die Produktion eines universellen bakteriellen Signalmoleküls Autoinducer-2 (AI-2) zeitlich steuert. Das synthetische Sensorsystem erkannte mikrobielle Signalpeptide als

Infektionssignal und aktivierte die vorgesehene Signalkaskade. Das wiederum führte zur Expression von Enzymen für die AI-2 Biosynthese somit zu enzymatische AI-2 Produktion, um mit QS-gesteuerter Virulenz und Biofilmformierung bestimmter Arten zu interferieren.

Menschliche Zelllinien, die so verändert wurden, dass sie AI-2 produzieren wurden anschließend dazu benutzt antivirulente Substanzen zu identifizieren und zu charakterisieren. Nachdem wir Spezifikation für den Assay mit bekannten Inhibitoren der AI-2 Biosynthese gesetzt und den Assay auf den Nanoliter Maßstab reduziert hatten, haben wir Zellen mit einer Sammlung von Naturstoffen und chemischen Substanzen in einem automatisierten Screen behandelt und Substanzen gefunden, die die AI-2 Aktivität mit nanomolarer Affinität blockieren. Darunter befand sich das antineoplastische Nukleosidanalogen 5-Fluorouracil (5-FU), das die zelluläre AI-2 Produktion erheblich verringerte ohne dabei sichtbare zytotoxische oder antibiotische Aktivität aufzuweisen. Dieser Fund half zu erklären, wieso 5-FU synergistisch zusammen mit Antibiotika wirkt.

Um *Pseudomonas aeruginosa* entgegenzuwirken, ein Hauptverursacher von Krankenhausinfektionen, wurden menschliche Zellen dagegen mit einem zytosolischen Autoinducer-induzierbaren Transkriptionsfaktor ausgestattet, der die innerartliche bakterielle Kommunikation verfolgt. Der Biosensor war durch die Freisetzung einer antiinfektiösen Tirade, die wiederum die Hydrolyse von Acyl-Homoserine Lactonen (Autoinducern) und die Zersetzung von Biofilmen durch bewerkstelligte, im Stande Quorum-Quenching zu koordinieren. Da die programmierbare therapeutische Ladung zugeschnittene sekretierte katalytische Effektoren beinhaltet, die freigesetzt werden um die bakterielle Kommunikation auszuschalten, konnte letztendlich die Virulenz minimiert werden.

Bemerkenswerterweise haben die sekretierbaren Effektoren den glykosidischen Biofilmschutz um *P. aeruginosa* aufgelöst und so die Tötungseffizienz eines traditionellen Antibiotikums potenziert. Effiziente zellbasierte Prävention und Beseitigung notorisch widerstandsfähiger Biofilme rund um Quorum-Quencher Zellen wurde beobachtet.

Zuletzt wurde das Design eines auf Laktat zugeschnittenen Genkontrollnetzwerks für Säugetierzellen und dessen Umsetzung behandelt, das einerseits als Sensor für Sepsis dienen könnte, andererseits um die Metabolitanhäufung unter sauerstofflimitierten Bedingungen zu quantifizieren. Dadurch, dass wir einen aus menschlichen Fettzellen stammenden Laktatsensors mit einem synthetischen Adapterprotein umgelenkt haben, um so die Aktivierung von Transgenexpression zu ermöglichen, konnten wir die Laktatkonzentration in der zellulären Umgebung mit einem diagnostischen Reporter bestimmen. Darüber hinaus ermöglicht der genetische Regelkreis möglicherweise ernstzunehmende metabolische Ungleichgewichte zu überwachen oder die Herstellung schwer zu produzierender Biologika zu kontrollieren.