

DISS. ETH NO. 29408

***Design of synthetic promoter-based gene circuits  
for the surveillance of cellular state transitions***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

*Philip Wolfgang Müller-Thümen*

*M.Sc., University of Regensburg*

born on *28.07.1992*

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Yaakov Benenson*

*Prof. Dr. Jörg Stelling*

*Prof. Dr. Barbara Di Ventura*

2023

## Abstract

In recent years, synthetic biology and biomolecular computing have joined forces to create programmable synthetic gene networks resembling naturally occurring signaling or regulatory pathways. Among them, ‘cell classifiers’ autonomously assess the presence or absence of multiple endogenous bimolecular inputs, integrate them according to user-defined logic programs and elicit customizable responses in a cell state-specific manner. Several *in vivo* studies have demonstrated that such devices hold great potential to herald a new era of gene-therapeutic modalities that will eventually replace the prevalent ‘one-target – one-drug’ paradigm and revolutionize the treatment of complex multifactorial diseases, such as cancer. However, despite considerable progress in the design and clinical translation of gene circuits, the dynamic nature of cellular states has not yet received adequate attention. Conventional classifiers have primarily been employed for distinguishing between static ‘state snapshots’ of different cells, e.g., healthy vs. cancerous. Conversely, the use of multi-input biomolecular computing systems for monitoring and, if necessary, manipulating dynamic cell state transitions, a process otherwise known as surveillance, remains unexplored. In this thesis, I describe the rational design and implementation of a synthetic surveillance gene circuit capable of continuously monitoring the state of an individual cell and triggering a programmable response only when the cell transitions to another predefined state. As a prototypical state transition, I use the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a reversible and evolutionarily conserved developmental program with major physiological and pathological relevance. To recapitulate EMT *in vitro*, I employ a well-established cell culture model, wherein A-549 lung adenocarcinoma cells are treated with transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). Starting from global RNA-sequencing (RNA-seq) analysis, I devise an unbiased systematic approach for constructing and testing promoter-based state detectors that utilize endogenous gene expression levels as inputs. Further, I show that two state detectors with opposing state specificity can readily be combined in multi-input gene circuits implementing ‘M-state’ AND NOT (‘E-state’) logic. This circuit architecture significantly enhances targeting precision and, given its high modularity, facilitates tunable control over output expression strength. Upon lentiviral integration,

the surveillance circuit robustly responds to EMT induction with minimal false positive activation in epithelial cells and maintains stable expression over extended periods of time. Finally, substituting the fluorescent output with a suicide gene, commonly used for cancer gene therapy, enables the highly selective killing of cells that undergo EMT. These findings demonstrate that the circuit's surveillance capacity can effectively be translated into a biologically relevant effect, providing the opportunity to purposefully interfere with cellular behavior. Ultimately, I discuss how the current circuit design could be further optimized and propose potential future clinical applications for the EMT surveillance gene circuit developed in this thesis.

## Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben synthetische Biologie und biomolekulares Computing ihre Kräfte gebündelt, um programmierbare synthetische Genschaltkreise zu schaffen, die natürlich vorkommenden Signal- oder Regulationswegen nachempfunden sind. Hierzu gehören 'Zell-Klassifikatoren', die autonom das Vorhandensein oder Fehlen mehrerer endogener biomolekularer Inputs bewerten, diese gemäß benutzerdefinierten Logikprogrammen integrieren und anpassbare Reaktionen in einer zellstatusspezifischen Weise auslösen. Mehrere *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass solche Genschaltkreise ein großes Potenzial besitzen, eine neue Ära genbasierter Therapien einzuläuten, die letztendlich das vorherrschende Paradigma 'ein Ziel – ein Medikament' ersetzen und die Behandlung komplexer multifaktorieller Krankheiten wie Krebs revolutionieren werden. Trotz beträchtlicher Fortschritte bei der Entwicklung und klinischen Umsetzung von Genschaltkreisen wurde der Dynamik zellulärer Zustände bislang nicht genügend Aufmerksamkeit gewidmet. Herkömmliche Klassifikatoren wurden in erster Linie zur Unterscheidung zwischen statischen 'Zustands-Momentaufnahmen' verschiedener Zellen, z.B. gesund oder krebsartig, verwendet. Der Einsatz biomolekularer multi-Input Computersysteme zur Kontrolle und gegebenenfalls Manipulation dynamischer Zellzustandsübergänge, ein Prozess, der auch als 'Überwachung' bezeichnet wird, ist dagegen noch unerforscht. In dieser Arbeit beschreibe ich das rationale Design und die Implementierung eines synthetischen Überwachungsgenschaltkreises, der dazu in der Lage ist, den Zustand einer einzelnen Zelle kontinuierlich zu überwachen und nur dann eine programmierbare Reaktion auszulösen, wenn die Zelle in einen anderen vordefinierten Zustand übergeht. Als prototypischen Zustandsübergang verwende ich die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), ein reversibles und evolutionär konserviertes Entwicklungsprogramm mit großer physiologischer und pathologischer Bedeutung. Um EMT *in vitro* nachzustellen, nutze ich ein etabliertes Zellkulturmodell, bei dem A-549-Lungenadenokarzinomzellen mit Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) behandelt werden. Ausgehend von einer globalen RNA-Sequenzierungsanalyse (RNA-seq) entwickle ich einen unabhängigen systematischen Ansatz zur Konstruktion und Testung Promotor-basierter Zustandsdetektoren, die endogene Genexpressionslevel

als Inputs verwenden. Darüber hinaus zeige ich, dass zwei Detektoren mit entgegengesetzter Zustandsspezifität problemlos zu multi-Input Genschaltkreisen kombiniert werden können, welche die Logik 'M-Zustand' UND NICHT ('E-Zustand') implementieren. Diese Schaltkreisarchitektur verbessert die Zielgenauigkeit erheblich und ermöglicht aufgrund ihrer hohen Modularität eine einstellbare Kontrolle über die Stärke der Output-Expression. Nach lentiviraler Integration reagiert der Überwachungsgenschaltkreis robust auf EMT-Induktion mit minimal falsch-positiver Aktivierung in Epithelzellen und behält darüber hinaus eine stabile Expression über längere Zeiträume hinweg aufrecht. Der Ersatz des fluoreszierenden Outputs durch ein Suizidgen, welches häufig Anwendung in der Krebsgentherapie findet, ermöglicht die hoch selektive Abtötung von Zellen, die EMT durchlaufen. Diese Ergebnisse belegen, dass die Fähigkeit des Genschaltkreises zur Überwachung effektiv in einen biologisch relevanten Effekt übersetzt werden kann und somit die Möglichkeit besteht, gezielt in das zelluläre Verhalten einzugreifen. Abschließend erörtere ich, wie das bestehende Design des Genschaltkreises weiter optimiert werden könnte, und schlage potenzielle zukünftige klinische Anwendungen für den in dieser Arbeit entwickelten EMT-Überwachungsgenschaltkreis vor.