

DISS. ETH NO. 29866

Advanced Biomolecular Controllers for Inflammation Regulation in Mammalian Systems

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Ching-Hsiang Chang

M.Sc. National Taiwan University

born on 29.04.1993

citizen of Taiwan

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Mustafa Khammash (examiner)

Prof. Dr. Sai Reddy (co-examiner)

Prof. Dr. Marc Donath (co-examiner)

2024

Abstract

Homeostasis, a critical physiological process, enables living organisms to sustain stable internal environments, thereby ensuring their survival and optimal functioning amidst fluctuating external conditions. At its core, this dynamic equilibrium is crucially governed by the immune system, which deploys an extensive array of cellular and molecular entities to safeguard the organism from pathogenic threats, while concurrently maintaining internal stability. Cytokines, as central mediators, exemplify the intricate homeostatic balance, where their regulatory missteps can incite conditions ranging from detrimental systemic inflammations, as seen in cytokine storms to immune deficiencies that potentially pave the way for malignancies. Thus, they necessitate therapeutic interventions that carefully balance their dual-natured physiological impacts.

Exploring the intersection of synthetic biology and control theory, this dissertation illuminates the critical role of negative feedback in maintaining stability and homeostasis in biological systems. Leveraging insights from previous work, which established the Antithetic Integral Controller (AIC) in bacteria to mitigate disturbances from protease-induced degradation and achieve Robust Perfect Adaptation (RPA), this study seeks to translate these findings to a mammalian context. This transition unlocks potential applications, notably in cell-based therapy. Comprehensive design, engineering, and optimization of both RNA and protein-based AICs are undertaken to regulate cytokine levels, thoroughly examining the promising opportunities and considerable challenges encountered.

In Chapter 2, this work carefully dissects and evaluates sensor and actuator mechanisms that could regulate crucial immune mediators, spotlighting the STAT3 sensor mechanism for IL-6 and the NF- κ B for IL-1 β and TNF- α , along with rigorous exploration and assessment of various actuator mechanisms like Adalimumab and IL-1Ra. The ensuing chapters meticulously explore designs ranging from the RNA-based Controllers (Chapter 3 and 4), which hold the potential for robust adaptation amidst network perturbations, to protein-based

AICs (Chapter 5 and 6) exploiting mechanisms such as protease mutual degradation and intein splicing, each unveiling its unique potentialities and challenges in practical biological systems. Chapter 7 marks a significant stride towards real-world applications, with a controller designed to regulate the crucial cytokine TNF- α , moving beyond merely modulating synthetic factors within the cell. Managing extracellular molecules added a layer of complexity, demanding the development of stable cell lines and a continuous multicell-type co-culture platform for a six-day testing period. Nevertheless, the successful regulation of TNF- α by cells utilizing the AIC signifies a pivotal initial step towards more expansive therapeutic applications.

In conclusion, this dissertation navigates through the comprehensive and complex domain of cytokine control, encompassing sensor and actuator mechanisms, RNA-based control, and protein-based control approaches, all set against the vast backdrop of synthetic biology and immune modulation. It seeks to unravel, design, and manipulate the regulatory networks of the immune system, promising not just to illuminate cytokine control mechanisms but also to serve as a foundational piece in the wide-reaching field of synthetic biology and immunotherapeutics. This detailed exploration, aimed at connecting synthetic biology and clinical applications, possesses the potential to both decipher and harness the intricate regulatory networks within biology, steering us toward a future where medical therapeutics are intricately designed and controlled, paving the way for innovative treatments and potential cures.

Zusammenfassung

Homeostase, ein kritischer physiologischer Prozess, ermöglicht es lebenden Organismen, stabile interne Umgebungen aufrechtzuerhalten und so ihr Überleben und optimales Funktionieren trotz schwankender externer Bedingungen zu gewährleisten. Im Kern wird dieses dynamische Gleichgewicht entscheidend vom Immunsystem gesteuert, welches eine umfangreiche Palette zellulärer und molekularer Einheiten einsetzt, um den Organismus vor pathogenen Bedrohungen zu schützen und gleichzeitig die interne Stabilität aufrechtzuerhalten. Zytokine, als zentrale Vermittler, veranschaulichen das komplexe homeostatische Gleichgewicht, bei dem ihre regulatorischen Fehlritte Zustände von schädlichen systemischen Entzündungen, wie sie bei Zytokinstürmen zu sehen sind, bis hin zu Immundefiziten, die möglicherweise den Weg für Malignome ebnen, hervorrufen können. Daher erfordern sie therapeutische Eingriffe, die ihre dual-natürlichen physiologischen Auswirkungen geschickt ausbalancieren.

Auf der Schnittstelle von synthetischer Biologie und Kontrolltheorie beleuchtet diese Dissertation die kritische Rolle der negativen Rückmeldung bei der Aufrechterhaltung von Stabilität und Homeostase in biologischen Systemen. Unter Nutzung von Erkenntnissen aus vorherigen Arbeiten, die den Antithetic Integral Controller (AIC) in Bakterien etablierten, um Störungen durch Protease-induzierten Abbau zu mildern und die Robust Perfect Adaptation (RPA) zu bestätigen, strebt diese Studie an, diese Erkenntnisse auf einen Säugetierkontext zu übertragen. Dieser Übergang erschließt potenzielle Anwendungen, insbesondere bei der zellbasierten Therapie. Umfassende Design-, Engineering- und Optimierungsansätze sowohl für RNA- als auch für Protein-basierte AICs werden durchgeführt, um Zytokinspiegel zu regulieren, und die vielversprechenden Möglichkeiten und beträchtlichen Herausforderungen werden gründlich untersucht.

In Chapter 2 zergliedert und bewertet diese Arbeit sorgfältig Sensor- und Aktuatormechanismen, die entscheidende Immunmediatoren regulieren könnten, mit einem Fokus auf den STAT3-Sensormechanismus für IL-6 und den NF-

κ B für IL-1 β und TNF- α , zusammen mit einer rigorosen Erforschung und Bewertung verschiedener Aktuormechanismen wie Adalimumab und IL-1Ra. Die nachfolgenden Kapitel erforschen sorgfältig, von den RNA-basierten Reglern (Chapter 3 und 4), welche das Potenzial für robuste Anpassung trotz Netzwerkstörungen besitzen, bis zu Protein-basierten AICs (Chapter 5 und 6), die Mechanismen wie Proteasen-gegenseitigen Abbau und Intein-Splicing ausnutzen, jeweils mit einzigartigen Potenzialen und Herausforderungen in praktischen biologischen Systemen. Chapter 7 markiert einen bedeutenden Schritt hin zu realweltlichen Anwendungen, mit einem Regler, der darauf ausgelegt ist, das entscheidende Zytokin TNF- α zu regulieren, und geht über die bloße Modulation synthetischer Faktoren innerhalb der Zelle hinaus. Die Handhabung extrazellulärer Moleküle fügte eine Schicht an Komplexität hinzu, welche die Entwicklung stabiler Zelllinien und einer kontinuierlichen Mehrzelltypen-Ko-Kulturplattform für einen sechstägigen Testzeitraum erforderte. Nichtsdestotrotz bedeutet die erfolgreiche Regulation von TNF- α durch Zellen, die den AIC nutzen, einen entscheidenden ersten Schritt in Richtung umfassenderer therapeutischer Anwendungen.

Abschließend navigiert diese Dissertation durch das umfassende und komplexe Gebiet der Zytokinkontrolle, das Sensor- und Aktuormechanismen, RNA-basierte Steuerung und Protein-basierte Steuerungsansätze umfasst, alles vor dem weitreichenden Hintergrund der synthetischen Biologie und Immunmodulation. Sie sucht nach Wegen, die regulatorischen Netzwerke des Immunsystems zu entwirren, zu entwerfen und zu manipulieren, nicht nur um Zytokin-kontrollmechanismen zu beleuchten, sondern auch um als Grundlage im weitreichenden Feld der synthetischen Biologie und Immuntherapeutika zu dienen. Diese detaillierte Untersuchung, die darauf abzielt, synthetische Biologie und klinische Anwendungen zu verbinden, besitzt das Potenzial, die komplexen regulatorischen Netzwerke innerhalb der Biologie sowohl zu entschlüsseln als auch zu nutzen, uns in Richtung einer Zukunft zu lenken, in der medizinische Therapeutika fein abgestimmt und kontrolliert sind, und den Weg für innovative Behandlungen und potenzielle Heilmittel ebnet.