

DISS. ETH NO. 21533

**Design and engineering of programmable genetic circuits in
mammalian cells**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
SIMON AUSLÄNDER

Master of Science in Life Science, University of Konstanz

born on the 23rd of February, 1985
citizen of Germany

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

2013

Summary

Synthetic biology applies engineering principles to biology and facilitates the development of mammalian cell products, which perform desired tasks in a controllable manner. Trigger-inducible gene expression systems are key building blocks for the development of biological designer circuits that are multi-component networks of sensors controlling cellular functions. Such programmable cells may find their applications in future cell implants to coordinate therapeutic activities within human bodies or in the production of valuable biomolecules in the chemical and biotechnological industry. In this work, we provide a comprehensive overview of basic building blocks necessary for the engineering of complex mammalian gene circuits. In addition, we focus on the employment of RNA-binding proteins for the construction of gene switches and explore their potential for the engineering of mammalian gene circuits. Furthermore, we describe how an interdisciplinary approach combining synthetic biology and cell microencapsulation may push cell-based therapeutics towards the development of ‘smart’ cell implants.

In order to implement artificial functions into mammalian cells, bioengineers develop synthetic gene circuits that encode for programmable instructions reminiscent to digital circuits in electronics. Gene switches detect and bind to intra- and extracellular signals and transmit the information through the circuit. In this work, we provide a novel concept for the targeted engineering of RNA-based gene switches that are made out of hammerhead ribozymes. In principle, a combination of rational design and a bacterial cell-based selection strategy resulted in hybrid ribozymes that assimilate a naturally occurring peptide-binding RNA motif into their structures. Implemented into mammalian mRNA transcripts, the high-speed self-cleavage activity of the ribozyme could specifically control target gene expression levels depending on the peptide ligand and hence, serves as a powerful RNA-based molecular gene switch.

So far, post-transcriptional gene switches that are based on RNA-binding proteins imply naturally occurring RNA motifs for their design. Here, we focus on an exciting family of RNA-binding proteins, the Pumilio proteins, which consists of a modular RNA-binding scaffold (PUM-HD) that can be programmed to recognize any eight nucleotide RNA sequence stretch. In order to determine PUM-HD’s specificity and binding affinity, we established an *in vitro* assay and extended an existing intracellular assay based on split fluorescent protein complementation. Moreover, we engineered a novel PUM-HD that is able to discriminate between a mutated and wildtype form of KRAS mRNA sequence and could

serve as a starting point to design novel therapeutic proteins that target mRNA transcripts of interest based on their primary RNA sequence.

We further present a design concept for the construction of complex biocomputing circuits in single mammalian cells that are programmable by external cues. Assemblies of modular transcriptional and translational controllers encode for basic logic gates that were further connected to combinatorial circuits encoding for binary arithmetic circuits. Programming of circuit-transfected mammalian cells enables the execution of basic molecular arithmetic that could in future coordinate metabolic activities in a predictable, precise and robust manner and may advance new treatment strategies in the bio-electronic interfaces of gene- and cell-based therapies.

Zusammenfassung

Die Synthetische Biologie setzt verschiedene Prinzipien des Ingenieurwesens ein, um biologische Systeme zu abstrahieren und zu konstruieren. Dies ermöglicht die Produktion maßgeschneiderter tierischer Zellen, welche gewünschte Aufgaben steuerbar ausführen können. Für den Aufbau biologischer Schaltkreise sind Trigger-induzierbare Genexpressionssysteme essentielle Bausteine, denn sie stellen konfigurierbare Sensor-Netzwerke für die Steuerung zellulärer Prozesse dar. In Zukunft könnten solche programmierbaren Zellen als Implantate eingesetzt werden, um in Patienten therapeutische Aktivitäten zu kontrollieren oder um wertvolle biologische Stoffe für die chemische und biotechnologische Industrie herzustellen. In dieser Arbeit geben wir einen umfassenden Überblick über die elementaren Bausteine, welche für die Konstruktion von komplexen Gennetzwerken in tierischen Zellen erforderlich sind. Außerdem beschreiben wir, wie das Zusammenspiel zweier Forschungsfelder, der Synthetischen Biologie und der Zell-Mikroenkapsulierung, zu einer neuartigen Behandlungsmethode führen könnte, die auf therapeutischen Zellimplantaten beruht.

Um künstliche Funktionen in tierische Zellen implementieren zu können, entwickeln Bioingenieure Gennetzwerke, die programmierbare Instruktionen kodieren und somit an digitale Schaltkreise aus der Elektronik erinnern. Dabei detektieren und binden Genschalter Signale inner- und außerhalb der Zelle und verknüpfen die Information innerhalb eines Schaltkreises. In dieser Arbeit stellen wir zudem auch ein neues Konzept für die Konstruktion RNA-basierter Schalter vor, welches auf einer zielgerichteten Entwicklung von Hammerhead Ribozymen basiert. Im Prinzip werden hier ein rationales Design und ein bakterielles Selektionsverfahren kombiniert, um Hybridribozyme zu entwickeln, welche ein natürlich vorkommendes Peptid-bindendes RNA Motif in ihre Struktur einbinden. Wenn man das sich selbst schneidende Ribozym in tierische mRNA Transkripte integriert, kann es dazu verwendet werden die Genproduktion in Abhängigkeit des Peptidliganden zu steuern.

Existierende post-transkriptionelle Genschalter, welche auf RNA-bindenden Proteinen basieren, benutzen für das Schalter-Design natürlich vorkommende RNA Motife. In diesem Teil der Arbeit fokussieren wir uns auf eine Gruppe von RNA-bindenden Proteinen, der sogenannten Pumilio Familie, welche eine modulare RNA-bindende Domäne (PUM-HD) besitzt, die so verändert werden kann, dass sie alle möglichen acht Nukleotid-langen RNA Sequenzen binden kann. Wir etablieren einen zellulären und *in vitro* Assay, welcher erlaubt die Spezifität und Affinität von PUM-HDs zu messen. Ausserdem konstruieren wir einen

neuen PUM-HD, welcher zwischen einer mutierten und einer natürlich vorkommenden KRAS mRNA Sequenz unterscheiden kann. Dieses neue PUM-KRAS Protein könnte dazu verwendet werden neue therapeutische Proteine zu entwickeln, welche Sequenz-spezifisch mRNA Transkripte angreifen könnte.

Des Weiteren stellen wir ein Designkonzept vor, welches die Konstruktion komplexer Schaltkreise beschreibt, die biologische Berechnungen in tierischen Zellen ausführen können. Um einfache logische Gatter zu erzeugen, wurden Transkriptions- und Translationsschalter vernetzt, welche von externen Signalen gesteuert werden können. Verknüpfungen mehrerer Gatter führen zu Kombinationsschaltungen, welche einfache binäre Berechnungen in tierischen Zellen ausführen. Basierend auf der unterschiedlichen Kombination externer Signale produzieren die Zellen einen fluoreszierenden Output. In Zukunft könnten solche Biocomputer metabolische Aktivitäten in Patienten steuern und damit neue Behandlungsmethoden im Bereich der Gen- und Zelltherapie voranbringen.