

DISS. ETH NO. 20001

# **Time- and Space-resolved Expression and Delivery of Biopharmaceuticals**

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

For the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**MICHAEL MARKUS KÄMPF**

Diplom Biologe, University of Regensburg

born on April 20<sup>th</sup>, 1982

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Fussenegger / examiner  
Prof. Dr. Wilfried Weber / co-examiner

Zurich, 2011

## Summary

Recent developments in the field of biology include the engineering of novel synthetic parts, devices and systems with functional and predictable properties resulting in the novel discipline of synthetic biology. On the one hand these approaches enable the entry to “uncharted” biological territories and facilitate the understanding of a variety of biological processes and on the other hand they may also contribute to innovative administration of biopharmaceuticals in biomedical scenarios.

The first chapter provides insights how synthetic strategies are applied to elucidate natural and pathological signaling pathways and how signaling systems can be rewired to reprogram cellular functions for biotechnological applications. Taking advantage of the potential to study individual parts in an orthologous host without interfering with endogenous proteins a genetically encoded intracellular biosensor for the plant hormone auxin was developed and optimized in mammalian cells and subsequently re-implemented and applied in plant cells (chapter II). This sensor exploits the fundamental mechanism of specific protein degradation in the presence of auxin in plants. A minimized degradation signal was fused to the reporter gene firefly luciferase which will be ubiquitinated and degraded in the presence of auxin in a dose-dependent manner. In chapter III we hierarchically rewired three synthetic signaling layers in human cells for achieving complex spatial gene expression patterns. In doing so we interconnected plant hormone signaling by overexpression of the auxin co-receptor TIR1 with transcriptional regulators in a synthetic gene circuit to sense and interpret a continuous auxin gradient with band-detect characteristics. Through integration and direct interconnection of an inducible protein biotinylation system in this topology, different expression patterns performing band-detect and mathematical operations could be achieved. The last two chapters (chapter IV and V) describe how biological sensors like the human  $F_M$  protein (a derivative of FKBP12) can readily be transferred from mammalian cell synthetic biology to materials sciences and enable the design and construction of a trigger-inducible drug depot. The drug depot is composed of polyacrylamide crosslinked by the homodimeric  $F_M$  protein forming a stable three dimensional gel structure.  $F_M$  dimers are dissociated by the addition of the small molecule drug FK506 resulting in hydrogel dissolution and the adjustable release of a previously embedded biopharmaceutical *in vitro* and in mice. This biohybrid hydrogel enabled for the first time the small molecule-inducible release of a biopharmaceutical within a mammal and will contribute to advances in innovative drug delivery and tissue engineering.

## **Zusammenfassung**

Neueste Entwicklungen im Bereich der Synthetischen Biologie beinhalten das Design und die Konstruktion von neuen synthetischen, biologischen Bauelementen, Werkzeugen und Systemen mit vorhersagbaren, gewünschten Eigenschaften, die so in der Natur nicht vorkommen. Durch diese neuartige Herangehensweise kann auf der einen Seite bislang noch unerforschtes biologisches Neuland betreten werden und dadurch neue Einblicke in eine Vielzahl von biologischen Prozessen gewonnen werden und auf der anderen Seite neue Strategien beispielsweise zur patienten-verträglichen Verabreichung von Medikamenten entwickelt werden.

Das erste Kapitel beschreibt neueste Erkenntnisse wie durch Rekonstruktion natürlich vorkommende und pathologische Signalwege aufgeklärt und neu zusammengesetzt werden können um bestimmte zelluläre Funktionen für biotechnologische Anwendungen nutzbar zu machen. Durch die Expression von Proteinen in orthologen Organismen kann man diese ohne Beeinflussung von endogenen Proteinen erforschen. In Kapitel II wurde nach diesem Prinzip ein genetisch codierter, intrazellulärer Biosensor für das Pflanzenhormon Auxin in Säugerzellen entwickelt und optimiert um ihn danach in pflanzlichen Zellen zur quantitativen Analyse anzuwenden. Die Idee dieses Sensors beruht auf dem spezifischen Abbau von bestimmten Proteinen in Anwesenheit von Auxin in Pflanzen. Eine optimierte Abbausequenz wurde an das Reportergen Firefly Luciferase fusioniert, die dadurch auxinabhängig ubiquitiniert und abgebaut wird. Die Abnahme dieses Signals erlaubt quantitative Aussagen über die vorhandene Auxinmenge. Durch die hierarchische Verknüpfung von drei verschiedenen Signalebenen konnten in Kapitel III zusammengesetzte, räumlich aufgetrennte Genexpressionsmuster erzielt werden. Dabei konstruierte man einen synthetischen, genetischen Schaltkreis, der Elemente des Auxinsignalwegs mit bestimmten Transkriptionsfaktoren koppelt und dadurch einen kontinuierlichen Auxingradienten in ein Expressionsmuster übersetzt, das nur bei mittleren Auxinkonzentrationen erhöhte Genexpression aufweist. Durch die Eingliederung und direkte Verknüpfung einer weiteren Signalebene in Form eines induzierbaren Protein-Biotinylierungssystems konnten sehr anspruchsvolle Genexpressionsmuster erzielt werden, die u.a. durch die Verknüpfung mathematischer Funktionen entstehen. Die Kapitel IV und V beschreiben, wie biologische Sensoren wie das humane  $F_M$  Protein (ein Derivat des FKBP12 Proteins) ohne Weiteres von der synthetischen Biologie in die Materialwissenschaften übertragen werden können und dort in intelligenten Biohybridmaterialien, wie beispielsweise in einem induzierbaren Medikamentendepot, Verwendung finden. Dieses Medikamentendepot besteht aus einem

funktionalisierten Polyacrylamid, das über  $F_M$  Homodimere quervernetzt wird und so eine dreidimensionale Gelstruktur ausbildet. Durch die Zugabe des klinisch lizenzierten Stimulusmoleküls FK506 dissoziieren die Homodimere und die Gelstruktur löst sich folglich auf und setzt ein vorher eingeschlossenes Medikament dosisabhängig *in vitro* und in Mäusen frei. Dadurch konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein Wirkstoff durch ein extern verabreichtes Signalmolekül auf Verlangen freigesetzt werden kann und dadurch neue Möglichkeiten in der Patienten-verträglichen Verabreichung von Arzneimitteln und in der Gewebezüchtung eröffnet werden.