

Expanding the genetic toolbox for engineering commensal clostridia as live bio-therapeutics

Citation for published version (APA):

Zhang, Y. (2024). *Expanding the genetic toolbox for engineering commensal clostridia as live bio-therapeutics*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20241031yz>

Document status and date:

Published: 01/01/2024

DOI:

[10.26481/dis.20241031yz](https://doi.org/10.26481/dis.20241031yz)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Addendum

Summary

Live bio-therapeutics, derived from living cells such as mammalian cells and microbes, which aim to treat and prevent diseases, are at the cutting edge of medical innovation. Unlike traditional therapies, live bio-therapeutics can modulate host physiological processes. Synthetic biology has further enhanced this field by enabling the engineering of cells to perform specific therapeutic functions. Notably, engineered CAR and TCR T cells have shown significant clinical success in cancer treatment. Engineered microbial cells, particularly bacteria, also present promising avenues due to their simplicity and robustness. These microbes can colonize the human microbiome, offering potential benefits in immune function, metabolism, and inflammation.

Clostridia, a diverse genus of anaerobic, gram-positive, spore-forming bacteria, inhabit various environments, including the human intestine. While some species of clostridia are pathogenic, most are benign and have potential for industrial and therapeutic applications. Clostridia have been investigated for cancer therapy since the early 19th century, with recent advances in using engineered *Clostridium* strains for tumor-specific gene delivery and immunotherapy. Notable strains like *C. novyi*-NT and *C. sporogenes* have shown potential in preclinical and clinical settings. Beyond oncology, clostridia's role in the microbiome makes them suitable for treating intestinal diseases and developing oral vaccines.

The thesis aims to expand the genetic toolbox for engineering commensal clostridia, focusing on stable therapeutic protein production and delivery. Key objectives include developing molecular vectors, gene regulation libraries, and CRISPR-based genome engineering systems. The thesis is structured into nine chapters detailing the creation and application of these tools in *C. sporogenes* and *C. butyricum*, highlighting their potential in cancer therapy, vaccination, and probiotic treatments.

Gene regulation in clostridia involves promoters that initiate transcription, with previous research focusing on a few constitutive promoters. This thesis advances by creating promoter libraries, enabling variable gene expression for therapeutic applications. Inducible promoters offer refined control, which is crucial for developing CRISPR systems for genome engineering. Despite the challenges of heterologous protein expression, including poorly characterized genetic mechanisms in clostridia and cloning issues in *E. coli*, advances in libraries of gene regulation elements facilitate efficient protein secretion in

clostridia. Future research should explore orthogonal control mechanisms across species and further characterization of protein delivery methods for *Clostridium* bio-therapeutics, including extracellular vesicles and spore surface display.

Efficient genome manipulation in clostridia has been enhanced by CRISPR technology, enabling precise gene disruptions and integrations. This thesis introduces refined CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cas12a systems tailored for clostridia, demonstrating their capability in large-gene deletions and integrations for stable therapeutic protein production. The use of native-cryptic plasmids in *C. butyricum* provides an antibiotic-free method for gene overexpression, ensuring stability across generations. The expansion of CRISPR tools will accelerate the development of *Clostridium* bio-therapeutics, allowing for sophisticated genetic circuits and efficient therapeutic protein delivery.

This thesis significantly expands the genetic toolkit for *C. sporogenes* and *C. butyricum*, facilitating advanced gene regulation and genome manipulation for bio-therapeutics. The creation of promoter and start codon libraries, CRISPR systems, and utilization of native-cryptic plasmids highlights the potential of clostridia in disease treatments. Continued research in this field has the potential to unlock new therapeutic possibilities, leveraging clostridia's full potential in biomedicine.

Nederlandse Samenvatting

Levende biotherapeutica, ontwikkeld uit levende cellen zoals die van zoogdieren en microben, spelen een cruciale rol in de medische innovatie door ziekten te behandelen en te voorkomen. Deze therapieën kunnen, in tegenstelling tot traditionele methoden, de fysiologische processen van het lichaam aanpassen. Door synthetische biologie is het mogelijk om cellen zo te ontwerpen dat ze specifieke therapeutische functies vervullen. Zo hebben CAR- en TCR-T-cellen al aanzienlijk succes in de kliniek behaald, vooral in de behandeling van kanker. Ook gemodificeerde microbiële cellen, vooral bacteriën, zijn veelbelovend vanwege hun eenvoud en robuustheid. Deze bacteriën kunnen het menselijke microbiom koloniseren en positief bijdragen aan de immunofunctie, het metabolisme en het verminderen van ontstekingen.

Clostridia, een gevarieerde groep anaerobe, Gram-positieve, sporenvormende bacteriën, komen voor in diverse omgevingen, waaronder de menselijke darm. Hoewel sommige clostridia pathogeen zijn, zijn de meeste onschadelijk en bruikbaar voor industriële en therapeutische toepassingen. Al sinds de vroege 19e eeuw worden clostridia onderzocht voor kankertherapie, met recente vooruitgang in het gebruik van aangepaste stammen voor de behandeling van kanker. Stammen zoals *C. sporogenes* en *C. novyi-NT* hebben al veelbelovende resultaten laten zien in zowel preklinische als klinische settings. Naast oncologische toepassingen zijn clostridia door hun natuurlijke aanwezigheid in het microbiom ook geschikt voor het behandelen van darmziekten en het ontwikkelen van orale vaccins.

Het proefschrift richt zich op het uitbreiden van de genetische gereedschapskist voor het aanpassen van commensale clostridia, met een focus op de stabiele productie en afgifte van therapeutische eiwitten. De belangrijkste doelen omvatten het ontwikkelen van moleculaire vectoren, genregulatiebibliotheken en CRISPR-gebaseerde genoom-engineeringsystemen. Het proefschrift is verdeeld in negen hoofdstukken die de ontwikkeling en toepassing van deze tools in *C. sporogenes* en *C. butyricum* beschrijven, met nadruk op hun potentieel voor kankertherapie, vaccinatie en probiotische behandelingen. Genregulatie in clostridia omvat promotors die de transcriptie starten, waarbij eerder onderzoek zich beperkte tot enkele constitutieve promotors. Dit onderzoek heeft geleid tot de opzet van een uitgebreide bibliotheek van promotors, inclusief induceerbare promotors die essentieel zijn

voor de ontwikkeling van CRISPR-gemedieerde systemen voor variabele genexpressie en effectieve eiwitsecretie in therapeutische toepassingen.

Toekomstig onderzoek zou orthogonale controlemechanismen in clostridia moeten onderzoeken en verder moeten inzetten op de karakterisering van methoden voor eiwitlevering, zoals extracellulaire vesicles en sporenoppervlaktedisplay, om de ontwikkeling van geavanceerde *Clostridium*-gebaseerde leveringssystemen te bevorderen. Dit proefschrift introduceert verfijnde CRISPR-Cas9- en CRISPR-Cas12a-systemen speciaal voor clostridia, die grote-gendeleties en -integraties voor stabiele eiwitproductie mogelijk maken. De uitbreiding van CRISPR-tools zal de ontwikkeling van *Clostridium*-biotherapeutica versnellen, waardoor geavanceerde genetische circuits en efficiënte levering van therapeutische eiwitten mogelijk worden. Het gebruik van native-cryptische plasmiden in *C. butyricum* biedt een antibioticavrije methode voor genoverexpressie, wat stabiliteit over generaties verzekert.

Dit proefschrift breidt de genetische gereedschapskist voor *C. sporogenes* en *C. butyricum* aanzienlijk uit, wat geavanceerde genregulatie en genommanipulatie voor biotherapeutica mogelijk maakt. De creatie van promotor- en startcodonbibliotheken, CRISPR-systemen en het gebruik van native-cryptische plasmiden tonen het potentieel van clostridia in ziektebehandelingen aan. Voortgezet onderzoek in dit veld heeft het potentieel om nieuwe therapeutische mogelijkheden te ontsluiten, waarbij hopelijk het volledige potentieel van clostridia in de biogeneeskunde wordt benut.