

Doctoral Thesis ETH No. 16648

Transcriptional and Posttranscriptional Mammalian Gene Regulation

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
Laetitia Malphettes
Ing. ENSTA
born 05.11.1978
citizen of France

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Martin Fussenegger, examiner
Prof. Dr. Sabine Werner, co-examiner
Zurich, 2006

Summary

A wide variety of basic and applied biological research, including gene therapy, biopharmaceutical production and functional genomics require controlled expression of heterologous genes. In this work, we have developed artificial mammalian gene regulation systems to control the amount and timing of appearance of the functional product of transgenes with the following trend-setting projects:

- We have designed and characterized 6-hydroxy-nicotine (6HNic)-adjustable transgene expression (NICE) systems engineered for lentiviral transduction and *in vivo* modulation of angiogenic responses. The NICE systems regulate gene expression at the transcriptional level. They may also serve as versatile building blocks for complex gene networks.
- We have pioneered macrolide- and tetracycline-responsive short interfering RNA (siRNA) expression for conditional target gene fine-tuning at the posttranscriptional level based on modified RNA polymerase II promoters.
- Capitalizing on heterologous transcriptional gene regulation systems and on artificial siRNA-mediated target transcript degradation, we engineered a generic transcription-translation network. This transcription-translation network revealed transgene mRNA depletion to be dependent on siRNA and mRNA levels and that translation control was able to eliminate basal expression inherent to current transcription control modalities.
- We have developed a computational model to provide (semi-) quantitative insight into the molecular events managing siRNA-mediated gene expression silencing in native and synthetic gene networks. Based on mechanistic details of synthetic transactivator operation, we wired this model into a transcription control circuitry in which the siRNA and its target mRNA are independently regulated at the transcriptional level by macrolide and tetracycline antibiotics. Our model may improve our understanding of how complex regulatory gene networks are impacted by small endogenous RNAs.

Résumé

Un large panel de la recherche biologique, tant appliquée que fondamentale, comme la thérapie génique, la production biopharmaceutique et la génomique fonctionnelle, requiert l'expression contrôlée de gènes hétérologues. Dans cette thèse, nous avons développé des systèmes artificiels de régulation de l'expression génétique pour les cellules de mammifères, permettant ainsi le contrôle de la quantité, du moment et de la dynamique d'apparition des produits fonctionnels de transgènes :

- Nous avons conçu et caractérisé des systèmes d'expression de transgènes contrôlables par un dérivé de la nicotine: la 6-hydroxy-nicotine. Nous avons intégré ces systèmes dans des vecteurs lentiviraux permettant ainsi leur transduction et la modulation *in vivo* de l'angiogénèse.
- Nous avons mis au point la régulation par les macrolides et la tetracycline de l'expression des ARN double-brin inhibiteurs (ARNi). Ainsi, nous pouvons accorder très précisément l'expression du gène cible au niveau post-transcriptionnel grâce à une panoplie de promoteurs à l'ARN polymérase II.
- Capitalisant sur les systèmes hétérologues de régulation génétique au niveau transcriptionnel et les mécanismes d'interférence génétique ciblée par un ARN double-brin artificiel, nous avons construit un réseau générique de transcription-traduction. Ce réseau a permis de mettre en évidence quelques propriétés phare de l'interférence génétique, dont le fait que le degré de dégradation de l'ARNm cible dépend des concentrations d'ARNi et d'ARNm. Il a aussi permis d'éliminer l'expression basale résiduelle inhérente aux modalités actuelles de régulation de la transcription.
- Nous avons développé un modèle informatique pour appréhender de façon semi-quantitative la chaîne de réactions moléculaires de l'interférence génétique par ARN double-brin dans les réseaux génétiques naturels et synthétiques. En nous basant sur les mécanismes d'action des transactivateurs synthétiques, nous avons branché ce modèle dans un circuit de contrôle transcriptionnel. Dans ce circuit, l'ARN double-brin artificiel et son ARNm cible sont régulés indépendamment au niveau de la transcription par les antibiotiques macrolide et tetracycline. Ce modèle permet de mieux comprendre l'impact des petits ARNs endogènes sur les réseaux génétiques complexes.