

Development of adenoviral vectors for regulated gene expression

Doctoral thesis Florian Puls, Hamburg University 2004

Abstract:

The ability to regulate gene expression externally after adenoviral gene transfer is a desirable goal in investigating gene functions as well as in gene therapy. During this thesis all components of the tetracycline-regulated systems for gene expression were to integrate into a single adenoviral vector. Its capacity of regulation of gene expression was to be investigated. An autoregulated configuration of the tetracycline-inducible (Tet-ON) as well as of the tetracycline-suppressive (Tet-OFF) system were chosen for integration into the E1 region of E1/E3 deleted adenoviral vectors. Gene expression of generated adenoviral vectors Ad.3i-luc (Tet-ON) and Ad.3r-luc (Tet-OFF) was shown to be regulated 132-fold and 2352-fold respectively in human HT-29 colon carcinoma cells. The capacity of regulated gene expression of Ad.3r-luc was further characterized in various human cancer cell lines. Luciferase expression could be downregulated 16532-fold in SkCo-1 cells. A 242-fold higher gene expression of the non-suppressed autoregulated system was measured in comparison to adenoviral gene expression driven by the human CMV-promoter. The contribution of the autoregulated configuration to regulation was investigated in HELA cells. In comparison to constitutional transactivator expression the autoregulated configuration exhibited less leakiness but also a lower maximal level of gene expression.

A regulated gene expression of interleukin-12 (IL-12), a cytokine with strong antitumor potency but potentially lethal side effects, is a desirable goal in an anticancer gene therapeutic approach. The generated adenoviral vector Ad.3r-scmIL-12 expresses a fusion protein of both murine IL-12 subunits under control of the autoregulated Tet-OFF system. Expression of the fusion protein could be downregulated 6069-fold in human cancer cell lines. In comparison to Ad.CMV-p40.IRES.p35, an adenoviral vector expressing the heterodimeric murine IL-12 driven by the CMV promoter, the Ad.3r-scmIL-12 was more efficient regarding expression and bioactivity. The efficiency of expression and regulation of this new adenoviral vector allow a reduction of vector dose in a gene therapeutic setting. The ability to control gene expression further contributes to safety of an IL-12 gene therapeutic approach. The characterized tetracyclin-regulated gene expression system allows controlled expression of other adenoviral transduced genes in experimental or therapeutic settings.

Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierten Genexpression

Medizinische Dissertation Florian Puls, Hamburg 2004

Zusammenfassung:

Eine regulierbare Expression nach dem Transfer von Genen stellt sowohl für die Erforschung von Genfunktionen als auch für die Gentherapie einen großen Nutzen dar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Möglichkeit der Integration aller Komponenten des Tetracyclin-regulierbaren Expressionssystems in einen adenoviralen Vektor getestet und auf ihre Regulationskapazität untersucht werden. Es wurde eine autoregulative Konfiguration sowohl des durch Tetracycline induzierbaren (Tet-ON) als auch des durch Tetracycline supprimierbaren Systems (Tet-OFF) zur Insertion in die E1 Region von E1/E3 deletierten adenoviralen Vektoren gewählt. Die generierten Adenoviren Ad.3i-luc (Tet-ON) und Ad.3r-luc (Tet-OFF) zeigten eine Regulationskapazität für die Expression des Reportergens Luciferase von bis zu 132fach bzw. 2352fach in humanen HT-29 Kolonkarzinomzellen. Die Regulationseigenschaften des Adenovirus Ad.3r-luc wurden weiterhin in verschiedenen transformierten humanen Zelllinien bestimmt und der Einfluss der autoregulativen Konfiguration auf die Expressionseigenschaften untersucht. Hierbei konnte eine Suppression der Luciferaseexpression um den Faktor 16532 in SkCo-1 Zellen nachgewiesen werden. Im nicht-supprimierten Zustand zeigte sich der regulierbare Promotor gegenüber dem humanen CMV Promotor um bis zu 242fach überlegen. Verglichen mit einer konstitutiven Transaktivatorexpression bedingt die autoregulative Anordnung der Expressionskassette in HELA Zellen eine niedrigere Basalexpression im supprimierten, jedoch auch eine niedrigere Maximalexpression im angeschalteten Zustand.

Aufgrund seiner potentiell letalen Nebenwirkungen wäre eine Regulierbarkeit der Expression des stark antitumoral wirkenden IL-12 in einem gentherapeutischen Ansatz wünschenswert. Das konstruierte Adenovirus Ad.3r-scmlIL-12 codiert ein Fusionsprotein aus beiden Untereinheiten des murinen IL-12 unter Kontrolle des Tet-OFF Systems, dessen Expression in humanen Karzinomzelllinien sich bis um den Faktor 6069 supprimieren ließ. Im Vergleich zu dem Adenovirus Ad.CMV-p40.IRES.p35, das das murine heterodimere IL-12 unter Kontrolle des CMV Promotors exprimiert, zeigte sich das Fusionszytokin in Expression und Bioaktivität um ein Vielfaches effizienter. Die Expressionseffizienz und Regulierbarkeit des neu konstruierten adenoviralen Vektors erlauben eine Reduktion der Vektordosis und tragen durch die Expressionskontrolle zur Sicherheit eines gentherapeutischen Ansatzes unter Verwendung des IL-12 bei. Das charakterisierte Tetracyclin-abhängige autoregulative Expressionssystem bietet die Möglichkeit der Expressionskontrolle anderer adenoviral transduzierter Gene in Forschung und experimentellen therapeutischen Ansätzen.