



Doctoral Thesis

Charakterisierung der $\alpha 1(VI)$ und $\alpha 2(VI)$ Kollagen Promotoren

Author(s):

Koller, Erich

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000643386> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

CHARAKTERISIERUNG DER $\alpha 1(VI)$
UND $\alpha 2(VI)$ KOLLAGEN PROMOTOREN

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der

**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE
ZÜRICH**

vorgelegt von

ERICH KOLLER

DIPL. NATW. ETH
GEBOREN AM 6. APRIL 1963
VON MEIERSKAPPEL LU

Angenommen auf Antrag von:

PROF. K.H. WINTERHALTER, REFERENT
PD DR. B. TRÜEB, KORREFERENT
PROF. J.C. PERRIARD, KORREFERENT

1992



7. Zusammenfassung

Typ VI Kollagen, das aus drei genetisch unterschiedlichen Polypeptidketten besteht, stellt einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix dar. Durch cDNA Klonierung wurde die Primärstruktur der drei Ketten aufgeklärt. Dabei wurde bestätigt, dass Typ VI Kollagen aus einer kurzen Tripelhelix besteht, die von zwei grossen globulären Domänen flankiert wird. Diese Domänen sind aus Subdomänen zusammengesetzt, welche grosse Ähnlichkeit mit den Kollagen bindenden Domänen des von Willebrand Faktors aufweisen. Die Tripelhelix enthält mehrere Arg-Gly-Asp Tripeptidsequenzen, die als Zellbindungsstellen benutzt werden können. Auf Grund seiner Struktur kann Typ VI Kollagen als Verbindungsmolekül dienen: Zellen können mit ihren Integrinrezeptoren an die Tripelhelix von Typ VI Kollagen binden, und dieses wiederum bindet mit seinen globulären Domänen an die interstitiellen Kollagenfibrillen. Die Synthese von Typ VI Kollagen ist in Fibroblasten, die mit DNA oder RNA Tumor Viren transformiert wurden, stark reduziert.

Um die Regulation von Typ VI Kollagen zu erforschen, haben wir die Promotoren der Gene für $\alpha 1(\text{VI})$ und $\alpha 2(\text{VI})$ Kollagen isoliert. Beide Promotoren weisen mehrere charakteristische Merkmale von "house keeping genes" und von Protoonkogenen auf: sie besitzen nämlich weder eine TATAA noch eine CAAT Box, und sie enthalten mehrere GC-Boxen, die als Erkennungsstellen für den Transkriptionsfaktor ETF dienen können. Der $\alpha 1(\text{VI})$ Promotor besitzt eine SP1 Erkennungsstelle, während der $\alpha 2(\text{VI})$ Promotor zwei von diesen Erkennungsstellen enthält. Im $\alpha 1(\text{VI})$ Promotor haben wir zusätzlich eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP1 lokalisiert. Die beiden Gene benutzen mehrere Transkriptionsstartstellen, welche über ca. 80 bp genomischer DNA verteilt sind. Promotoren ohne TATAA Box enthalten oft mehrere Transkriptionsstartstellen. Die Promotorregionen des $\alpha 1(\text{VI})$ und des $\alpha 2(\text{VI})$ Gens besitzen einen relativ hohen GC-Gehalt von 65% bzw. 67%. Beide Promotoren formen zudem typische CpG Inseln, in denen das Dinukleotid CpG im Vergleich zum Rest des Genoms relativ häufig auftritt .

Transfektionsstudien hat man mit Promotorfragmenten durchgeführt, welche vor ein Reporter-Gen gekoppelt worden sind. Diese Transfektionsstudien zeigen, dass die Promotoren beider Gene sowohl in normalen Fibroblasten als auch in myc transformierten Wachtelfibroblasten transkriptionell aktiv sind. Ein Fragment von 207 bp, welches alle Transkriptionsstartstellen des $\alpha 2(\text{VI})$ Gens, einschliesslich der CpG Insel

beinhaltet, zeigt volle Promotoraktivität, während man im $\alpha 1(\text{VI})$ Gen ein längeres Fragment (615 bp) benötigt, um volle Promotoraktivität zu erhalten. Durch Methylierung der aktivsten Promotorfragmente sinkt die Aktivität auf 20% bzw. 5% ihres ursprünglichen Wertes.

Oberhalb des $\alpha 2(\text{VI})$ Promotors befindet sich ein Homopurin-Element (403 bp), welches S1 Nuklease sensitiv ist. Dieses Element kann eine intramolekulare Triplexstruktur formen. Mit Transfektions-Experimenten hat man gezeigt, dass dieses Element die Promotoraktivität nicht beeinflusst; hingegen ist seine genaue Bedeutung noch nicht aufgeklärt worden.

Mit Footprint-Experimenten kann im $\alpha 2(\text{VI})$ Promotor, oberhalb der distalen SP1 Stelle, eine Bindungsstelle für ein DNA bindendes Protein identifiziert werden, welche eine GC-Box enthält. Möglicherweise bindet der Transkriptionsfaktor ETF an diese Sequenz. Trotz der Anwesenheit von zwei Sp1 Erkennungsstellen kann keine andere Bindungsstelle im $\alpha 2(\text{VI})$ Promotor identifiziert werden.

Die Struktur der beiden Typ VI Kollagen Promotoren unterscheidet sich somit stark von allen anderen bisher untersuchten Kollagen Promotoren.