



Doctoral Thesis

Identification of functional elements in the promoters of two type VI collagen genes

Author(s):

Willimann, Thomas

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001371704> →

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](#).

Identification of Functional Elements in the Promoters of two Type VI Collagen Genes



A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Thomas Willimann

Dipl. phil. II of the University of Zürich
born 13.9.63
citizen of Zürich (ZH) and Wettingen (AG)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. K. H. Winterhalter, examiner
PD Dr. B. Trüb, co-examiner
Prof. Dr. P. Sonderegger, co-examiner

2. Zusammenfassung

Typ VI Kollagen ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix mesenchymaler Zellen. Es besteht aus den Polypeptidketten: $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ und $\alpha 3(VI)$. Jede dieser drei Untereinheiten wird durch ein eigenes Gen kodiert. Fibroblasten produzieren viel Kollagen VI. Sind diese Fibroblasten durch Onkogene transformiert, so wird die Produktion der $\alpha 1(VI)$ und $\alpha 2(VI)$ Kette drastisch vermindert. Denselben Effekt beobachtet man in spontan entstandenen mesenchymalen Tumoren. Diese Herunter-regulierung findet auf der Stufe der Transkription statt. Die Promotoren der $\alpha 1(VI)$ und $\alpha 2(VI)$ Gene haben eine ähnliche Struktur wie Promotoren von "Housekeeping" Genen: sie enthalten keine TATA box, sind G/C reich und die Transkription beginnt an mehreren Stellen.

Um die Regulation dieser TATA-losen Promotoren zu verstehen, wurden die aktivierenden Elemente der $\alpha 1(VI)$ und $\alpha 2(VI)$ Kollagen Promotoren untersucht. Der $\alpha 1(VI)$ Promotor wurde zuerst anhand von DNase I-Footprinting-Experimenten mit Zellkern-Extrakten aus Hühnerembryonen analysiert. Diese Versuche offenbarten drei von einem DNase I Verdau geschützte Stellen, welche A, B und C genannt wurden. Die Transkriptionsfaktoren, die mit den drei Stellen interagieren, wurden mit Gel-Retardations-Experimenten charakterisiert. Dabei wurde die Hilfe von diversen DNA Oligonukleotiden und von Antikörpern, die spezifisch für bereits bekannte Faktoren sind, zugezogen. Diese Versuche belegen, dass die Stelle A vom Transkriptionsfaktor AP1 erkannt wird. Die Stellen B und C werden beide von zwei Faktoren gebunden, die der Familie der Sp1-ähnlichen Proteine angehören. Um zu belegen, dass die Stellen A, B und C alleine für die Aktivität des $\alpha 1(VI)$ Gens notwendig sind, wurden Minipromotoren hergestellt, bei denen die DNA Sequenzen der drei Stellen hintereinander vor ein Reportergen ligiert wurden. Wenn diese Minipromotoren in Hühnerfibroblasten transfektiert wurden, zeigten sie eine hohe Promotoraktivität im Vergleich zu einem genomischen Fragment, welches das Kernstück des $\alpha 1(VI)$ Promotors enthält. Demnach genügen die drei Stellen A, B und C vollauf, um die Transkription des $\alpha 1(VI)$ Gens zu induzieren.

Der $\alpha 2(VI)$ Promotor wurde ebenfalls mit DNase I-Footprinting-Analysen untersucht. Es wurde aber nur eine Stelle (S1 genannt) entdeckt, die vom DNase I Verdau geschützt war. Um weitere mögliche Stellen zu finden, wurden stufenweise Deletionen des Promotor-Kernstücks angefertigt. Diese verkürzten Fragmente wurden in Gel Retardations Experimenten eingesetzt,

um weitere Bindungsstellen für nukleäre Faktoren zu finden. Diese Analyse ergab total vier Bindungsstellen: wiederum die Stelle S1, eine Stelle S2, X und S3. Die Transkriptionsfaktoren, welche an diese Stellen binden, wurden in Gel-Retardations-Experimenten mit diversen Oligonukleotiden identifiziert. Die Stellen S1, S2 und S3 werden alle von je zwei Proteinen erkannt, die identisch mit den zwei Sp1 ähnlichen Faktoren sind, welche im $\alpha 1(VI)$ Promotor an die Stellen B und C binden. Das Protein, das die Stelle X erkennt, zeigte kein typisches Verhalten von bisher bekannten Transkriptionsfaktoren. In UV-Crosslinking-Versuchen schien dieses unidentifizierte Protein ein Molekulargewicht von 43 kDa zu haben. Die Stellen S1, S2, X und S3 belegen grosse Teile des Kernstücks des $\alpha 2(VI)$ Promotors. Um zu bestimmen, welche Stellen für die transkriptionelle Aktivität wichtig sind, wurden die verkürzten Fragmente vor ein Reporter-gen ligiert. Wenn diese Konstrukte in Hühnerfibroblasten transfektiert wurden, zeigten Fragmente mit kleinen Deletionen bereits eine mehr als zweifache Reduktion der Promotoraktivität. Diese unerwartete Beobachtung führte zur Hypothese, dass das $\alpha 2(VI)$ Promotor Kernstück nach Bindung der entsprechenden Faktoren eine genau vorgegebene dreidimensionale Struktur einnimmt. Jegliche Änderungen an der Länge der DNA stört oder verhindert offenbar die Bildung dieser räumlichen Struktur, was zu einem Verlust der transkriptionellen Aktivität führt.

Die beiden untersuchten Promotoren gehören zu verschiedenen Klassen: der $\alpha 1(VI)$ Promotor besteht aus drei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, aus denen Minipromotoren gebildet werden können. Diese Minipromotoren zeigen eine hohe transkriptionelle Aktivität in Reporter-Gen-Versuchen. Der $\alpha 2(VI)$ Promotor hingegen bildet nach der Bindung der Faktoren eine genau definierte Struktur aus, die empfindlich auf jegliche Änderungen der DNA Länge reagiert. Obwohl die beiden Promotoren verschieden aufgebaut sind, ist ihre Aktivität in Reporter-Gen-Versuchen ähnlich hoch. Im menschlichen Genom liegen beide Gene in derselben Bande auf Chromosom 21. Falls die Gene für die $\alpha 1(VI)$ und $\alpha 2(VI)$ Kette des Huhns ebenfalls auf demselben Chromosom liegen, könnten Mechanismen wie die Ausbildung von höheren Chromatinstrukturen oder DNA Methylierung für die Herunterregulierung der Transkription in transformierten Zellen verantwortlich sein.

3. Summary

Collagen VI is a major component of the extracellular matrix of most mesenchymal cells. It is composed of three distinct polypeptides, $\alpha 1(\text{VI})$, $\alpha 2(\text{VI})$ and $\alpha 3(\text{VI})$, each of which is encoded by a single gene. Collagen VI is highly expressed in fibroblasts. The $\alpha 1(\text{VI})$ and $\alpha 2(\text{VI})$ genes are coordinately downregulated in cells transformed by oncogenes or in cells derived from spontaneous mesenchymal tumors. This inhibition of biosynthesis occurs at the transcriptional level. The promoters of the $\alpha 1(\text{VI})$ and $\alpha 2(\text{VI})$ genes have features characteristic for housekeeping gene promoters: they contain no TATA box, transcription is initiated at several start sites and the promoter region is rich in G and C. To study the regulation of these TATA less promoters, the activating elements of the $\alpha 1(\text{VI})$ and $\alpha 2(\text{VI})$ collagen promoters were characterized.

The $\alpha 1(\text{VI})$ promoter was first investigated by DNase I Footprinting analyses with nuclear extracts from chicken embryos. A fragment containing the basic promoter harboured three distinct elements, termed A, B and C, which were protected from DNase I digestion. The nuclear proteins that interact with these three sites were identified by gel retardation assays in combination with the use of various oligonucleotide competitors as well as specific antibodies raised against well-characterized transcription factors. Site A was a target for the transcriptional activator AP1, whereas sites B and C were recognized each by two distinct nuclear proteins belonging to the Sp1 multigene family. To address the question whether the three sites alone are able to direct transcription, a minipromoter construct was created in which the sequences of sites A, B and C were placed in front of a reporter gene. After transfection into chicken fibroblasts, this construct exhibited a high relative promoter activity when compared to a large genomic fragment containing the basic $\alpha 1(\text{VI})$ collagen promoter. Thus, the three sites are sufficient to induce transcription of this gene.

The $\alpha 2(\text{VI})$ promoter was analyzed by DNase I footprinting analyses using nuclear extracts from chicken embryos. However, only one site (termed S1) was protected from DNase I digestion. To detect other sites, nested deletions were performed from a fragment containing the basic $\alpha 2(\text{VI})$ promoter. These shortened fragments were used in gel retardation assays to investigate their ability for binding nuclear factors. These experiments revealed four nuclear factor binding sites: site S1 (again), S2, X and S3. The nuclear factors that interact with these four sites were identified by gel retardation assays in combination with the use of various oligonucleotide

competitors. Sites S1, S2 and S3 were recognized by two distinct nuclear proteins identical to the Sp1 related proteins binding to the $\alpha 1(\text{VI})$ promoter. The nuclear factor binding to element X could not be related to a characterized factor. In preliminary UV crosslinking assays this factor migrated as a protein with a molecular mass of 43 kDa. Since sites S1, S2, X and S3 comprise large portions of the $\alpha 2(\text{VI})$ promoter, the deleted fragments were ligated in front of a reporter gene. These constructs were transfected into chicken tendon fibroblasts and tested for their ability to activate transcription. Surprisingly, even short deletions reduced transcriptional activity at least two-fold. This led to the suggestion that the $\alpha 2(\text{VI})$ collagen promoter represents a type of promoter which forms a well defined three-dimensional structure when recognized by its nuclear proteins. It is possible that even minor changes in DNA length interfere with the formation of the distinct architectural complex and therefore reduce the transcriptional activity of the basic promoter element.

The two promoters described in this study seem to belong to two different classes: the $\alpha 1(\text{VI})$ collagen promoter contains three sites to which nuclear factors bind. These three sites can be combined to minipromoters with full promoter activity in reporter gene assays. The $\alpha 2(\text{VI})$ collagen promoter forms a distinct complex when bound by its nuclear factors. Minor changes in DNA length of the basic promoter element disturbs the formation of the complex and leads to a dramatic reduction in transcriptional activity. However, the $\alpha 1(\text{VI})$ and $\alpha 2(\text{VI})$ promoters exhibit a comparably high activity in reporter gene assays. The human $\alpha 1(\text{VI})$ and $\alpha 2(\text{VI})$ genes are located in the same band on chromosome 21. If in the chicken genome the $\alpha 1(\text{VI})$ and $\alpha 2(\text{VI})$ genes are located as well syntenic on the same chromosome, other mechanisms like higher orders of chromatin or DNA methylation may account for the down-regulation observed in transformed fibroblasts.