

Investigation of the expanded clientele of HSP47

or: finding your match(es) in the cell

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Elena Theres Abraham

aus Holzminden

Köln, 2022

I. Abstract

Heat shock proteins (HSPs) are a family of proteins employed by cells to deal with various sources of stressors. As the name implies, they were first related to heat stress, but are now known to serve different functions. One member of the HSP family that has been described to be expressed under heat stress is HSP47. For the longest time, HSP47 has been proclaimed to function only as a chaperone during collagen biosynthesis with detrimental effects upon deletion or mutations. However, recently, more and more additional tasks have been attributed to HSP47, although they are still poorly understood. This also broadens the interest of HSP47 as a target in drug development, since it is linked to various tissue related diseases.

While the binding interface of HSP47/collagen has been thoroughly studied, two newly discovered motifs including a leucine or a phenylalanine residue on the collagen were tested using ELISA style assay and found to positively effect binding. This happens by forming a hydrophobic pocket in HSP47. Furthermore, X-ray crystallographic structure analysis of HSP47 in complex with collagen model peptides containing these motifs show a change in stoichiometry. The usual head-to-head fashion in which HSP47 was previously observed to bind collagen in a 2:1 stoichiometry, is disrupted and only one HSP47 molecule is able to bind to a trimeric collagen model peptide. This finding has been confirmed by in-solution techniques such as negative stain EM and analytical ultracentrifugation. This new result strongly implies that the primary sequence of collagen influences the binding of HSP47.

In addition to being a chaperone during collagen folding, HSP47 has been described to facilitate and support collagen transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus by binding simultaneously to the SH3 domain of the ER transmembrane protein TANGO1 and collagen. In this case, the binding has not been analyzed on a structural level and thus a purification routine of different SH3 and HSP47 constructs was established. Various interaction studies using ELISA style assays, analytical SEC and BLI showed only weak binding contrary to the literature. While first co-crystallization attempts resulted in only poorly diffracting crystals, further optimization promises a crystal structure of the HSP47/SH3 complex. Additionally, a computer-based approach using a model by AlphaFold2 was analyzed to propose a binding interface.

Furthermore, after HSP47's role in the 'unfolded protein response' (UPR) by binding to IRE1 α was recently described in the literature, a routine of purification of the N-terminal luminal domain of IRE1 α was established. To test for binding, ELISA style assays, analytical SEC and

BLI were employed. As in the case of SH3, only weak binding was detected. Although first co-crystallization trials were set up, the binding interface is still elusive and is not further described.

As a last interaction partner within the scope of this thesis and a connection of HSP47 to cell signaling, the expression of human DDR2 in HEK cells was established. Although first co-immunoprecipitation experiments were unsuccessful, the optimization of the employed assay is still underway.

Additionally, HSP47 crystallization was optimized by using an N-terminally elongated construct. Up to ~ 3 Å diffracting crystals could be grown. The structure was not solvable due to translational non-crystallographic symmetry which led to the establishment of nanobodies as a crystallization chaperone. A nanobody displaying yeast library was used for successful selection rounds against HSP47. As a first attempt to find inhibitors of the HSP47/collagen interaction, a compound library provided by Atomwise (Drug Development Company, San Francisco, CA, USA) was employed and a medium throughput screen using bio-layer interferometry was established. Although none of the compounds in this collection turned out to be a successful inhibitor, a useful assay for further candidates is now readily available.

I. Zusammenfassung

Hitzeschockproteine (HSP) sind eine Familie von Proteinen, die in Zellen für verschiedene Stressfaktoren zuständig sind. Wie der Name bereits impliziert, wurden sie zunächst mit Hitzestress in Verbindung gebracht, aber inzwischen ist bekannt, dass sie auch andere Funktionen übernehmen. Ein Mitglied der HSP-Familie, von dem ebenfalls erstmals beschrieben wurde, dass es unter Hitzestress exprimiert wird, ist HSP47. Lange Zeit wurde behauptet, dass HSP47 nur als Chaperon bei der Kollagenbiosynthese fungiert und sich bei Deletion oder Mutation nachteilig auswirkt. Neuerdings werden HSP47 jedoch immer mehr zusätzliche Aufgaben zugeschrieben, die allerdings nur unzureichend verstanden werden. Dies erweitert auch das Interesse an HSP47 als Ziel in der Medikamentenentwicklung, da es mit verschiedenen gewebebezogenen Krankheiten in Verbindung gebracht wird.

Während die Bindung zwischen HSP47 und Kollagen bereits gründlich untersucht wurde, wurden zwei neue Motive, welche ein Leucin bzw. Phenylalanin auf dem Kollagen enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit dieser hydrophoben Aminosäuren sich positiv auf die Bindung auswirken. Dies geschieht, indem sie eine hydrophobe Tasche in HSP47 besetzen. Darüber hinaus zeigen röntgenkristallographische Strukturanalysen von HSP47 im Komplex mit Kollagenmodellpeptiden, die diese Motive enthalten, eine Veränderung der Stöchiometrie. Die übliche Kopf-an-Kopf-Bindung von HSP47 an Kollagen mit einer 2:1 Stöchiometrie ist gestört und nur ein HSP47-Molekül ist in der Lage, an ein trimeres Kollagen-Modellpeptid zu binden. Dies deutet stark darauf hin, dass die Primärsequenz des Kollagens die Bindung von HSP47 beeinflusst.

Zusätzlich zu seiner Funktion als Chaperon während der Kollagenfaltung wurde beschrieben, dass HSP47 den Transport von Kollagen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat bewerkstelligt, indem es gleichzeitig an die SH3-Domäne von TANGO1 und Kollagen bindet. In diesem Fall wurde die Bindung nicht auf molekularer Ebene analysiert, weshalb eine Aufreinigungsroutine für verschiedene SH3- und HSP47-Konstrukte eingeführt wurde. Verschiedene Interaktionsstudien mit ELISA-ähnlichen Assays, analytischer SEC und BLI zeigten eine schwache Bindung, die sich von den veröffentlichten Ergebnissen unterscheidet. Während erste Co-Kristallisationsversuche nur schlecht streuende Kristalle ergaben, versprechen weitere Optimierungen eine Kristallstruktur des HSP47/SH3-Komplexes. Zusätzlich wird ein computergestützter Ansatz unter Verwendung eines Modells von AlphaFold2 analysiert, um ein Bindungsinterface vorzuschlagen.

Nachdem kürzlich die Rolle von HSP47 in der ‚unfolded protein response‘ (UPR) durch Bindung an IRE1 α beschrieben wurde, wurde eine Routine zur Aufreinigung der N-terminalen luminalen Domäne von IRE1 α entwickelt. Um die Bindung zu testen, wurden ELISA-ähnliche Assays, analytische SEC und BLI eingesetzt, aber wie im Fall von SH3 wurde nur eine schwache Bindung gemessen. Obwohl erste Co-Kristallisationsversuche durchgeführt wurden, ist das Bindungsinterface immer noch nicht klar und wird hier nicht weiter beschrieben.

Als letzter Interaktionspartner im Rahmen dieser Arbeit und als Verbindung von HSP47 zur Zellsignalisierung wurde die Expression von humanem DDR2 in HEK-Zellen etabliert. Obwohl erste Co-Immunpräzipitationsexperimente erfolglos waren, ist die Optimierung des verwendeten Assays noch im Gange.

Darüber hinaus wurde die Kristallisation von HSP47 durch die Verwendung eines N-terminal verlängerten Konstrukts optimiert. Es konnten bis zu ~ 3 Å streuende Kristalle gezüchtet werden. Die Struktur war aufgrund der translatorischen nicht-kristallographischen Symmetrie nicht lösbar, was zur Einführung von Nanobodies als Kristallisations-Chaperon führte. Eine Hefebibliothek mit Nanobodies wurde für erfolgreiche Selektionsrunden gegen HSP47 verwendet. Als erster Versuch, Inhibitoren der HSP47/Collagen-Interaktion zu finden, wurde eine von Atomwise (Drug Development Company, San Francisco, CA, USA) bereitgestellte Substanzbibliothek verwendet und ein Screening mit Bio-Layer-Interferometrie durchgeführt. Obwohl die Hemmung nicht erfolgreich war, steht ein nützlicher Test für weitere Kandidaten bereit.