

VU Research Portal

Nanobodies targeting and modulating CXCR4 and ACKR3

Bobkov, V.

2021

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Bobkov, V. (2021). *Nanobodies targeting and modulating CXCR4 and ACKR3*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

G eiwit-gekoppelde receptoren (GPCRs) vormen een belangrijke klasse van transmembraan eiwitten die betrokken zijn bij een veelvoud aan ziektes. Dit is dan ook de reden dat deze transmembraan eiwitten worden beschouwd als prominente aangrijpingspunten voor medicijnen. Ongeveer 35% van alle verkrijgbare medicijnen zijn gericht tegen GPCRs. Chemokine receptoren behoren ook tot de GPCR superfamilie en zijn betrokken bij het reguleren en in stand houden van het immuun systeem. Het chemokine-chemokine receptor netwerk bestaat uit ongeveer 24 receptoren en er zijn tot op heden 44 chemokine liganden bekend. Waar conventionele of typische chemokine receptoren functioneren via de activatie/activering van G eiwitten, signaleren atypische chemokine receptoren (ACKR) slechts enkel via β -arrestin eiwitten. CXCR4 en ACKR3 zijn twee types chemokine receptoren die eenzelfde chemokine ligand delen, namelijk CXCL12, en die een breed spectrum aan biologische processen reguleren. Ontregeling van CXCR4 en ACKR3 wordt in verband gebracht met een groot aantal ernstige en levensbedreigende aandoeningen zoals kanker, auto-immuun ziektes en HIV infectie. In tegenstelling tot andere leden van de GPCR superfamilie zijn er tegen chemokine receptoren slechts enkele medicijnen goedgekeurd voor klinisch gebruik. Monoklonale antilichamen, en afgeleiden daarvan, zouden in potentie een geheel nieuwe klasse medicijnen tegen GPCRs en chemokine receptoren in het bijzonder kunnen vertegenwoordigen. Een interessante categorie hierin zijn de antilichaam-fragmenten van een speciaal soort zware keten-antilichamen welke van nature voorkomen in kameelachtigen, ook wel nanobodies[®] genoemd. Hun unieke structurele eigenschappen maken het ontwikkelen van specifieke en potente GPCRs binders en modulatoren mogelijk. Op dit moment zijn er geen antilichamen of nanobodies tegen CXCR4 of ACKR3 op de markt die goedgekeurd zijn voor klinisch gebruik.

In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van een nieuw panel van specifieke en potente nanobodies tegen de extracellulaire domeinen van humane en muizen CXCR4 en ACKR3 omschreven. Deze nanobodies werden gebruikt om een beter inzicht te genereren in de organisatie van CXCR4 en ACKR3 oligomeren in het membraan. Daarnaast werd de potentie van deze receptoren als therapeutisch doelwit met deze moleculen onderzocht en uitgebreid. In **Hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven over het chemokine-chemokine receptor netwerk en de nanobody moleculen. Het huidige landschap van CXCR4- en ACKR3-gerichte monoklonale antilichamen, nanobodies en andere fragmenten, alsmede hun voordelige eigenschappen en analyse van hun bindings epitopen, worden besproken **Hoofdstuk 2**. Een efficiënte methode voor een snelle isolatie van specifieke nanobodies wordt beschreven in **Hoofdstuk 3**. In **Hoofdstuk 4** worden nieuwe ligand-competerende anti-CXCR4 nanobodies gekarakteriseerd op hun potentie om CXCR4 signalering en HIV co-receptor activiteit te blokkeren. Door middel van directionele fluorescente labeling van nanobodies in **Hoofdstuk 5** werden nieuwe, veelzijdige en gevoelige detectiemiddelen ontwikkeld teneinde CXCR4 en ACKR3 oligomeren aan te tonen middels TR-FRET. Deze innovatieve hulpmiddelen maakten het voor het eerst mogelijk om endogene CXCR4 oligomeren op kanker cellen te detecteren. In **Hoofdstuk 6** worden de geïdentificeerde CXCR4 nanobodies door middel van fusie aan een functioneel IgG Fc domein omgevormd naar bivalente constructen, hierna aangeduid als nanobody-Fc. Deze nieuwe nanobody-Fc constructen lieten superieure potenties zien in de remming van CXCR4 signalering en toonden een additioneel werkingsmechanisme door kanker cellen te vernietigen via antilichaam-gemedieerde effector functies. Daarnaast wordt in **Hoofdstuk 7** de therapeutische potentie van vergelijkbare, tegen muizen CXCR4 en ACKR3 gerichte, nanobody-Fc constructen geëvalueerd op hun effectiviteit in een syngene *in vivo* darmkanker model in muizen. Tenslotte wordt in **Hoofdstuk 8** de belangrijkste bevindingen van deze thesis en mogelijke toekomstperspectieven samengevat en bediscussieerd.

Samengevat toont deze thesis de bruikbaarheid van nanobodies en afgeleiden hiervan voor diagnostiek en therapeutische toepassingen gericht tegen de GPCRs CXCR4 en ACKR3. De veelzijdigheid van nanobodies maakt dat ze breed toepasbaar zijn om fundamentele onderzoeksvragen met betrekking tot functionele modulering en structurele organisatie van GPCRs te beantwoorden.