

**David OYEN**

## **SAMENVATTING**

Eiwitfuncties worden vaak *in vivo* gereguleerd door onderlinge eiwitinteracties. Antilichamen zijn een belangrijke subgroep van eiwit-gebaseerde modulators die recent meer en meer toegepast worden in de ontwikkeling van nieuwe en succesvolle geneesmiddelen (bijv. tegen kanker). Onze kennis over de manier waarop antilichamen de eiwitstructuur en functies verstoren is echter arm vergeleken met de uitgebreide kennis betreffende kleine moleculen die eiwitfunctie beïnvloeden. Het testen van mechanistische modellen, ontwikkeld om de verschillende effecten van antilichamen te verklaren, wordt gehinderd door de grootte en complexiteit van de meeste antilichaam-antigen systemen. In deze thesis beschrijf ik, hoe de eerder genoemde problemen vermeden kunnen worden door de ontwikkeling van een nieuw antilichaam-antigen eenheid, het *nanobody*-dihydrofolaat reductase systeem. Dit hebben we in de praktijk toegepast om antilichaam modulatie op atomair en moleculair vlak te bestuderen.

DHFR katalyseert de nicotinamide-adenine-dinucleotide fosfaat (NADPH)-afhankelijke reductie van dihydrofolaat (DHF) naar tetrahydrofolaat (THF). DHFR ondergaat een cyclus van vijf verschillende DHFR-ligandcomplexen gedurende *steady-state* condities, waarbij de vorming van apoDHFR vermeden wordt. De katalyse wordt gedreven door veranderingen van conformatie en dynamische effecten. We hebben 35 antilichaam fragmenten van zware-keten antilichamen geïsoleerd (*nanobodies*) die zich specifiek binden aan DHFR. Drie selectiemethoden werden toegepast om de *nanobody* diversiteit (het aantal verschillende epitopen) te verhogen. De *nanobodies* konden worden verdeeld in twee groepen, gebaseerd op hun bindingseigenschappen, epitopen en kinetische effecten. In totaal werden vijf *nanobodies* in detail bestudeerd: Nb216, Nb113, Nb179, ca1697 en ca1698.

Nb216 bindt zich rechtstreeks aan de actieve site-lus (de Met20-lus), waarbij het de lus in een obstructieve conformatie dwingt. Nb216 bindt zich wel in de actieve site-regio, toch wordt het geclassificeerd als een allosterisch antilichaam. Het bindt zich namelijk aan andere chemische groepen van de actieve site-lus dan degenen die het ligand zullen binden. De gedwongen, obstructieve vorm van de Met20-lus verhindert dat de nicotinamide functionele groep van NADPH zich bindt in de actieve site. Hierdoor zal de snelheid van de DHFR katalyse drastisch verminderd worden. Toch is het Nb216-complex in staat om, weliswaar in geringe mate, een structuur aan te nemen waarin de nicotinamide functionele groep van NADPH zich kan binden.

We identificeerden ook een gedeeltelijke inhibitor die zich ver van de actieve site bindt, namelijk Nb113. De kristalstructuur van het DHFR:Nb113:folaat complex toont aan dat er geen grote veranderingen plaatsvinden in de structuur van DHFR. De kristalstructuur van DHFR:Nb113:NADP<sup>+</sup>:folaat daarentegen vertoont wel enkele wijzigingen, met name in de Met20-lus is een nieuwe conformatie zichtbaar. Hoe Nb113 de informatie voor deze veranderingen overbrengt van zijn epitop naar de Met20-lus zonder grote conformationele veranderingen van de epitopstructuur, blijft onduidelijk. We veronderstellen dat DHFR-dynamica een cruciale rol speelt in allosterische communicatie. Het epitop is verrassend genoeg geen indicatie voor

het teweeggebrachte kinetisch effect. Namelijk, Nb179 is een allosterische stimulator die het merendeel van zijn epitoom deelt met Nb113. Inspanningen om het mechanisme van de stimulatie te achterhalen waren jammer genoeg niet succesvol.

Ca1697 bindt zich net als Nb216 in de actieve site-regio. Maar in plaats van zich net langs de Met20-lus te binden, zal ca1697 zich recht op de actieve site binden. Ca1697 zal hierbij interacties aangaan met zowel DHFR als de het gebonden substraat. R104 van ca1697 zal DHF in een nieuwe conformatie dwingen en zal bovendien zijn bindingseigenschappen determineren. Voor zover onze kennis reikt, is dit het eerste voorbeeld van een antilichaam dat bindt op het antigen en het antigensubstraat tegelijkertijd. Een andere actieve site-binder, ca1698, plaatst 1 van zijn hypervariabele lussen (CDR3) in de actieve site. Ca1698 geeft aanleiding tot niet-competitieve inhibitie. Een gelijkaardig inhibitie gedrag was tot dusver enkel waargenomen bij kleine moleculen die binden in de actieve site. Deze niet-competitieve inhibitie van ca1698 kan worden verklaard door een twee-staps bindingsmechanisme.

Ik heb kunnen aantonen dat het nanobody-DHFR systeem een goed model is om onze kennis over antilichaammodulatie van eiwitfuncties uit te breiden. Toekomstige studies van dit model kunnen ons bovendien helpen om het paradigma van allosterie te ontrafelen.

## SUMMARY

Protein function is frequently modulated via protein-protein interactions in vivo. Antibodies are an important subclass of protein-based modulator that have been exploited recently for the development of novel and successful therapeutic treatments (e.g. against cancer). However, our basic understanding of how antibodies can perturb protein structure and function is poor in comparison to our knowledge of small molecule modulators of protein function. The experimental testing of mechanistic models invoked to explain diverse antibody effects, such as allosteric activation of protein function and hyperbolic inhibition of enzyme activity by antibodies, has been hindered by the large size and complexity of most antibody-antigen systems. In this thesis, I describe how we overcome this problem by developing a novel, model experimental system, the nanobody-dihydrofolate reductase (DHFR) system, which we then use to explore antibody modulator mechanisms at the atomic and molecular level.

DHFR catalyzes the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) dependent reduction of dihydrofolate (DHF) to tetrahydrofolate (THF). Under steady-state conditions it cycles through 5 intermediates, avoiding formation of apoDHFR. DHFR catalysis is governed by conformational changes (closed to occluded transition) and dynamics. We have isolated a set of 35 single domain antibodies (nanobodies), which bind to DHFR. Three different phage-panning methods were used in order to increase the nanobody (Nb) library diversity (i.e. epitopes recognized). The nanobodies fell into two distinct groups based on their binding kinetics, epitopes and effect on DHFR kinetics. Five nanobodies were studied in greater detail: Nb216, Nb113, Nb179, ca1697 and ca1698.

Nb216 binds directly to the active site loop (Met20 loop), constraining it in the occluded conformation. Although Nb216 binds in the active site area, it still classifies as an allosteric inhibitor since it does not compete directly with chemical groups that normally bind to ligand. The constrained, occluded Met20 loop sterically prevents binding of the nicotinamide moiety of NADPH, leading to inhibition of turnover. Surprisingly, the Nb216 complex is still able to transiently assume a conformation that is competent to bind the nicotinamide moiety.

We also identified a partial inhibitor, which binds remotely from the active site, namely Nb113. The crystal structure of the DHFR:Nb113:folate complex shows no major changes in the backbone structure of DHFR. However, the crystal structure of the DHFR:Nb113:NADP<sup>+</sup>:folate complex indicates that Nb113 forces the Met20 loop in a novel conformation. How Nb113 is transmitting this information from the epitope to the active site loop without the epitope experiencing large conformational changes remains unclear. We suggest that DHFR dynamics might play a crucial role in allosteric effector communications. Surprisingly, the epitope does not necessarily determine the elicited kinetic effect. For example, an allosteric stimulator of DHFR, Nb179, shares most of its epitope with Nb113. However, efforts to dissect the nature of stimulation were unsuccessful.

Ca1697 binds, just as Nb216, the active site region. However, instead of binding adjacent to the active site, ca1697 binds head on. Interestingly, it makes interactions with DHFR as well with the bound substrate and analogues. R104 of the nanobody

restrains DHF in a novel conformation and determines its binding properties. To our knowledge such behavior has never been reported for antibody modulators. Another active site binder, ca1698, inserts its complementary determining region 3 (CDR3) inside the active site. Kinetic analyses show non-competitive behavior for ca1698 modulation. Such inhibition was only observed before to rise from small-molecule active site directed inhibitors. This novel inhibition mode for an active site binding antibody fragment could be readily explained by a two-step binding mechanism.

Overall, I showed that the nanobody-DHFR system is a good model to expand our understanding of antibody modulation of protein function. Furthermore, future studies of this model might help us to unravel the paradigm of allostery