



WETENSCHAPPEN &
BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

De Onderzoeksgroep
Structurele Biologie Brussel

nodigt U graag uit op de openbare verdediging van het proefschrift van

Chenyao Li

ter behaling van de graad van Doctor in de bio-ingenieurswetenschappen

Titel van het proefschrift:

**Cryo-EM studies of ryanodine receptors:
rapid purification and regulation of gating**

Curriculum vitae

Chenyao Li behaalde haar B.S. in Farmacie aan de NanChang University, Nanchang, China, in 2016. Ze behaalde haar M.S. in Farmacie aan het Shanghai Institute of Materia Medica (SIMM), Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai, China, in 2019. In 2020 begon ze aan haar PhD aan het VIB-VUB Centrum voor Structurele Biologie. Haar onderzoek resulteerde in twee publicaties als eerste auteur, waarvan er één is gepubliceerd en de andere nog in beoordeling is.

Promotor:
Prof. dr. Rouslan Efremov

De verdediging heeft plaats op
**Dinsdag 17 december 2024 om 16u in
auditorium D.0.08**

Samenstelling van de jury

Prof. dr. Eveline Peeters (VUB, voorzitter)
Prof. dr. Janine Brunner (VUB, secretaris)
Prof. dr. Wen-Juan Ma (VUB)
Prof. dr. Savvas Savvides (UGent)
Prof. dr. Chris Ulens (KULeuven)

Abstract van het doctoraatsonderzoek

Ryanodine receptoren (RyRs) zijn ionkanalen met een moleculair gewicht van 2,2 MDa, gelegen in het sarcoplasmatisch reticulum (SR)-membraan. Ze spelen een cruciale rol in excitatie-contrastiekoppeling en calciumhomeostase. Disfunctie van RyRs wordt geassocieerd met een spectrum van ziektes, waaronder maligne hyperthermie (MH) en hartfalen (HF), die beide levensbedreigend kunnen zijn.

Vanwege hun grote omvang en de locatie in het SR-membraan zijn RyRs moeilijk om tot expressie te brengen in heterologe systemen. Daarom worden RyRs meestal gezuiverd uit native bronnen, waarbij traditionele methoden aanzienlijke hoeveelheden weefsel vereisen. Deze beperkingen hebben de structurele studies van RyRs belemmerd en de ontwikkeling van RyR-gerichte geneesmiddelen vertraagd. Een efficiëntere zuiveringsmethode is nodig om structurele analyses te versnellen en de rationele ontwikkeling van medicatie die zich richten op RyRs te vergemakkelijken.

De opening van RyRs wordt nauwkeurig gereguleerd door zowel modulatoren als de membraanomgeving. Zelfs subtiele veranderingen kunnen leiden tot disfunctie en ziekte, dus het is van cruciaal belang om te begrijpen hoe individuele factoren, inclusief membraanmimetica, de kans voor opening van RyRs kunnen verfijnen.

In mijn proefschrift heb ik een snelle, kleinschalige nanobody-geassisteerde zuiveringsmethode voor ryanodine receptoren ontwikkeld, geoptimaliseerd voor cryo-EM. Deze methode vereist slechts 5 mg totaal eiwit als beginmateriaal. Het volledige zuiveringsproces, startende van geïsoleerde membranen, kan in slechts 4 uur op het labo worden voltooid, wat eiwit oplevert dat geschikt is voor cryo-EM analyse. Ik heb deze methode gevalideerd door de structuren van konijn RyR1, en muis en rund RyR2 op te lossen. De nanobody-bindingsplaats werd gelokaliseerd door cryo-EM en de analyse toont aan dat deze sterk geconserveerd is over alle drie de zoogdierisoformen. Dit suggereert dat deze methode kan worden toegepast om elke gewenste RyR-isovorm te zuiveren, inclusief menselijke RyR1 en RyR3, waarvan de structuren nog niet zijn opgelost. Deze aanpak kan ook worden gebruikt voor het screenen van kleine moleculen die zich richten op RyRs voor structurele farmacologie.

Daarnaast werd de ontwikkelde RyR-zuiveringsmethode toegepast om de invloed van lipidemimetica op de opening van RyR1 te bestuderen. Met behulp van de snelle en kleinschalige nanobody-gebaseerde zuiveringsmethode werd RyR1 gezuiverd in verschillende lipidemimetische omgevingen, waaronder nanodiscs, micellen met verschillende lipidenconcentraties, en liposomen. Ik ontdekte dat nanodiscs het kanaal verhinderden om te openen, terwijl het verhogen van de lipidenconcentratie in micellen (van 0,001% tot 0,05%) de kans op opening verhoogde van 16% naar 84%. RyR1 in liposomen toonde een kans op opening van 62%. Deze bevindingen tonen aan dat de kans op opening van RyR1 zeer gevoelig is voor lipidemimetica en kan worden afgestemd voor structurele studies van de opening van RyR1.