

De onderzoeksgroep
Structurele Biologie Brussel

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

Giacomo Pedrelli

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

Titel van het proefschrift:

**Biofysisch onderzoek naar vouwing en
assemblage van *de novo* ontworpen transmembraan β -barrels**

Promotor:

Prof. dr. Anastassia Vorobieva (VUB)

Co-promotor:

Prof. dr. Han Remaut (VUB)

De verdediging heeft plaats op

vrijdag 25 september 2026 om 16u

Campus Etterbeek VUB, Pleinlaan 2, Elsene,
Auditorium D.O.08

Samenstelling van de jury

Prof. dr. Joris Messens (VUB, voorzitter)

Prof. dr. Charlotte Martin (VUB)

Prof. dr. Peter Tompa (VUB)

Prof. dr. Charles Van der Henst (VUB)

Dr. Chloé Martens (ULB)

Dr. Robert Jefferson (King's College London, UK)

Curriculum vitae

Na zijn studie Moleculaire en Industriële Biotechnologie aan de Universiteit van Bologna, met een masterproef over eiwitontwerp aan de Universiteit van Bristol, begon Giacomo aan zijn doctoraat in de Bio-ingenieurswetenschappen aan het VIB-VUB Center for Structural Biology. Zijn onderzoek richt zich op de vouwing en assemblage van *de novo* ontworpen transmembraan- β -barreleiwitten. Zijn werk leidde tot een publicatie als eerste auteur in PNAS en werd gepresenteerd op de Gordon Research Conference in Barcelona. Tijdens zijn doctoraat begeleidde hij ook een masterstudent.

Abstract van het doctoraatsonderzoek

Transmembraan- β -barreleiwitten (TMB's) vormen een belangrijke klasse van membraaneiwitten met een aanzienlijke biologische en biotechnologische relevantie. De moleculaire principes die hun vouwing en membraanassemblage bepalen, zijn echter nog slechts gedeeltelijk begrepen. Dit geldt ook voor *de novo* ontworpen TMB's, waarvan succesvolle assemblage moeilijk te voorspellen is op basis van de sequentie alleen. Een belangrijke beperking is het gebrek aan experimentele methoden die zowel betrouwbaar genoeg zijn om natief-achtige vouwing te beoordelen als schaalbaar genoeg zijn om meerdere varianten te onderzoeken.

Deze thesis ging deze uitdagingen aan door de vouwing van TMB's in membraannabootsende omgevingen te onderzoeken en experimentele strategieën voor hun karakterisering te ontwikkelen. Eerst werd een workflow opgezet waarin complementaire biochemische en biofysische assays werden gecombineerd om TMB's in detergentmicellen en liposomen te karakteriseren. De resultaten toonden aan dat geen enkele assay op zichzelf in alle gevallen voldoende is om natief-achtige vouwing vast te stellen, en identificeerden 1H-NMR als een bijzonder informatieve methode voor snelle screening. Daarnaast werd een verkennende fluorescentie-assay op basis van split-GFP geëvalueerd als mogelijke high-throughput read-out van membraanassemblage.

Vervolgens werd celvrije expressie in aanwezigheid van lipidevesikels gebruikt om te onderzoeken hoe sequentiekenmerken de assemblage van TMB's beïnvloeden. Ontwerpen die voornamelijk waren geoptimaliseerd voor stabiliteit van de natieve toestand bleken te falen door misvouwing of aggregatie vóór productieve membraaninsertie. Lokale destabilisatie van β -strengen door middel van negative design verbeterde de vouwing en assemblage aanzienlijk. Dit principe werd verder onderzocht in het *de novo* ontworpen TMB2.17, waarbij geselecteerde naar buiten gerichte polaire substituties compatibel bleken met de β -barrelvouwing en in sommige gevallen de kwaliteit van de NMR-spectra verbeterden.

Over het geheel genomen toont deze thesis aan dat succesvolle assemblage van *de novo* TMB's niet alleen afhangt van de stabiliteit van de natieve toestand, maar ook van kinetische factoren, waaronder aggregatie, de vorming van off-pathway-intermediären en membraaninsertie. Door een experimenteel kader voor de karakterisering van TMB's op te stellen en negative design en positieafhankelijke oppervlaktechemie te identificeren als bepalende factoren voor vouwing, biedt dit werk nieuwe inzichten in de sequentie-structuurrelaties die de assemblage van TMB's bepalen en vormt het een basis voor betrouwbaardere computationele ontwerpstrategieën.