

# **Autoreferat**

**dr Andonis Karachitos**

Zakład Bioenergetyki

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Poznań 2023

## 1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Andonis Karachitos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7684-1549>

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**2008** – Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; magister biologii, specjalność: biologia molekularna.

**2013** – Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; doktor nauk biologicznych, specjalność: biologia molekularna.

Tytuł pracy: „Mechanizm działania minocykliny w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Efekt cytoprotekcyjny.”.

Promotor: prof. dr hab. Hanna Kmita

## 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

**10.2013 – obecnie** – Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii; Zakład Bioenergetyki; stanowisko: adiunkt na stanowisku badawczo-dydaktycznym.

## 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Mechanizmy działania i funkcje paralogów VDAC: analiza VDAC3 człowieka i VDAC2 drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”

## 4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

**C1. Karachitos A**, Grobys D, Antoniewicz M, Jedut S, Jordan J, Kmita H. (2016) Human VDAC isoforms differ in their capability to interact with minocycline and to contribute to its cytoprotective activity. *Mitochondrion*. 28: 38-48. doi: 10.1016/j.mito.2016.03.004.

IF<sub>2016</sub>: 3,704, IF<sub>2022</sub>: 4,4

punktacja MNiSW<sub>2016</sub>: 30 (A), punktacja MEiN<sub>2023</sub>: 100

*Udział własny: współautorstwo koncepcji pracy, transformacja szczepów drożdży, testy przeżywalności komórek drożdży, izolacja mitochondriów, pomiary oksygraficzne, oczyszczanie białek VDAC, pomiary przewodnictwa kanałów VDAC w sztucznych błonach lipidowych, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie rycin, współudział w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy.*

**C2. Karachitos A**, Jordan J, Kmita H. VDAC-Targeted Drugs Affecting Cytoprotection and Mitochondrial Physiology in Cerebrovascular and Cardiovascular Diseases. 2017 *Curr Med Chem*. 24: 4419-4434. doi: 10.2174/0929867324666170530073238. Praca przeglądowa.

IF<sub>2017</sub>: 3,479, IF<sub>2022</sub>: 4,1

punktacja MNiSW<sub>2017</sub>: 40 (A), punktacja MEiN<sub>2023</sub>: 100

*Udział własny: współtworzenie koncepcji pracy, selekcja literatury, analiza i synteza zgromadzonych danych, przygotowanie rysunków, współudział w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy.*

**C3.** Guardiani C\*, Magri A\*, **Karachitos A\***, Di Rosa MC, Reina S, Bodrenko I, Messina A, Kmita H, Ceccarelli M, De Pinto V. (2018) yVDAC2, the second mitochondrial porin isoform of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 1859: 270-279. doi: 10.1016/j.bbabi.2018.01.008. \*Równy udział.

IF<sub>2018</sub>: 4,441, IF<sub>2022</sub>: 4,3

punktacja MNiSW<sub>2018</sub>: 40 (A), punktacja MEiN<sub>2023</sub>: 100

*Udział własny: przygotowanie planu badań dotyczących analizy elektrofizjologicznej, konstrukcja systemu do nadekspresji białka yVDAC2 w drożdżach, opracowanie protokołu do oczyszczania kanału yVDAC2, pomiary przewodnictwa kanału yVDAC2 w sztucznych błonach*

*lipidowych, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie rycin, współudział w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu i jego końcowej wersji.*

**C4. Karachitos A**, Kmita H. (2019) Voltage-dependent anion channel isoform 3 as a potential male contraceptive drug target. *Future Med Chem.* 11: 857-867. doi: 10.4155/fmc-2018-0328. Praca przeglądowa.

IF<sub>2019</sub>: 3,607, IF<sub>2022</sub>: 4,2

punktacja MNiSW<sub>2019</sub>: 100, punktacja MEiN<sub>2023</sub>: 100

*Udział własny: autorstwo koncepcji pracy, selekcja literatury, analiza i synteza zgromadzonych danych, przygotowanie rysunków, przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu i jego końcowej wersji.*

**C5. Magri A\***, **Karachitos A\***, Di Rosa MC, Reina S, Conti Nibali S, Messina A, Kmita H, De Pinto V. (2019) Recombinant yeast VDAC2: a comparison of electrophysiological features with the native form. *FEBS Open Bio.* 9: 1184-1193. doi: 10.1002/2211-5463.12574. \*Równy udział.

IF<sub>2019</sub>: 2,231, IF<sub>2022</sub>: 2,6

punktacja MNiSW<sub>2019</sub>: 70, punktacja MEiN<sub>2023</sub>: 70

*Udział własny: przygotowanie planu analizy elektrofizjologicznej, pomiary przewodnictwa kanału yVDAC2 w sztucznych błonach lipidowych, współudział w opracowaniu i interpretacji wyników dotyczących parametrów elektrofizjologicznych kanałów VDAC, współudział w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu i jego wersji końcowej.*

**C6. Karachitos A\***, Grabiński W, Baranek M, Kmita H. (2021) Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis. *Front Physiol.* 12: 750627. doi: 10.3389/fphys.2021.750627. \*Autor korespondencyjny.

IF<sub>2021</sub>: 4,755, IF<sub>2023</sub>: 4,0

punktacja MNiSW<sub>2021</sub>: 100, punktacja MEiN<sub>2023</sub>: 100

*Udział własny: autorstwo koncepcji pracy, opracowanie struktury i metodyki badań, bioinformatyczne analizy danych, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie rycin i ilustracji, uczestnictwo w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu oraz końcowej pracy.*

### **4.3. Omówienie celu naukowego prac stanowiących osiągnięcie naukowe i otrzymanych wyników**

#### **4.3.1. Wstęp**

Zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej (ang. *voltage-dependent anion channel*, VDAC) jest jednym z najbardziej zbadanych białek zewnętrznej błony mitochondrialnej, odgrywającym kluczową rolę w energetyce komórkowej. Kanały VDAC stanowią główną drogę dla wymiany metabolitów i jonów nieorganicznych między mitochondriami a cytoplazmą<sup>1</sup>. Ich funkcje są nie tylko związane z podstawowym metabolizmem energetycznym, ale również z takimi procesami jak regulowana śmierć komórki, sygnalizacja komórkowa i homeostaza wapniowa<sup>2,3</sup>.

Strukturalnie VDAC jest białkiem tworzącym  $\beta$ -beczułkę, złożoną z 19 segmentów o strukturze  $\beta$ , tworzących hydrofilowy kanał, przez który mogą przechodzić różne transportowane cząsteczki i N-końcowego segmentu o strukturze helisy- $\alpha$ , która znajduje się wewnątrz poru<sup>4-7</sup>. Otwarcie i zamknięcie kanału jest zależne od napięcia błonowego, co pozwala na precyzyjną kontrolę przepływu jonów nieorganicznych i metabolitów<sup>8,9</sup>. W zależności od warunków środowiskowych i sygnałów komórkowych, w tym oddziaływań z szeregiem białek komórkowych<sup>10</sup>, kanały VDAC mogą przechodzić przez różne stany konformacyjne, co wpływa na ich selektywność i przepuszczalność<sup>1</sup>.

W toku ewolucji gen kodujący VDAC u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* uległ duplikacji i różnicowaniu, co doprowadziło do powstania dwóch paralogów: VDAC1 i VDAC2<sup>11</sup>. Podobne procesy zaszły również w innych organizmach, co skutkuje różną liczbą paralogów VDAC. Na przykład, w mitochondriach człowieka występują trzy paralogi białka VDAC (VDAC1-VDAC3)<sup>11</sup>. Ich ekspresja jest różna w poszczególnych tkankach i organach, a ich dysfunkcja wiąże się z różnymi stanami patofizjologicznymi<sup>12-15</sup>.

Biorąc pod uwagę związek kanału VDAC z różnymi szlakami regulowanej śmierci komórki, jest on doskonałym celem ukierunkowanej strategii terapeutycznej, mającej charakter cytotoksyczny lub cytoprotekcyjny. Selekttywne oddziaływanie różnych substancji z

poszczególnymi paralogami VDAC, to jedna ze strategii o ogromnym potencjale w terapii nowotworów<sup>16</sup>, chorób sercowo-naczyniowych i chorób naczyniowych mózgu<sup>17</sup>, toczenia rumienowatego lub zespołów toczniopodobnych<sup>18</sup>, jak również potencjalna strategia znalezienia substancji wykazujących właściwości antykoncepcyjne u mężczyzn<sup>19</sup>.

Wprowadzenie to ma na celu podkreślenie złożoności i plejotropizmu białek VDAC, które nie tylko transportują jony nieorganiczne i metabolity, ale również uczestniczą w szerokim spektrum procesów biologicznych i patologicznych. Badania obejmujące cykl prac (od **C1** do **C6**), dostarczają nowych i kluczowych informacji na temat funkcjonalnego zróżnicowania białek VDAC, w tym ludzkiego VDAC3 i drożdżowego VDAC2, co ma kluczowe znaczenie dla przyszłych badań w tej dynamicznie rozwijającej się dziedzinie.

#### **4.3.2. Cel pracy**

Celem wykonanych badań było lepsze zrozumienie roli i funkcji wybranych paralogów VDAC, konkretnie VDAC3 u człowieka i VDAC2 u drożdży *S. cerevisiae*, z wyjątkowym naciskiem na odkrycie ich funkcji kanałowej, która była negowana do momentu podjęcia tych badań. Pierwszym etapem badań było zrozumienie mechanizmów działania tych kanałów w komórkach drożdży, wykorzystanych powszechnie jako model komórki eukariotycznej. Komórki drożdży służyły również jako platforma do nadprodukcji i izolacji ludzkich białek VDAC, co stanowiło drugi etap badań. W ramach badań zastosowano zaawansowaną technikę pomiaru aktywności kanałowej w sztucznych błonach lipidowych, znaną jako metodę czarnych błonek (ang. *black lipid membrane*, BLM). Ta metoda pozwoliła na scharakteryzowanie cech elektrofizjologicznych badanych kanałów. Do tych cech należą: selektywność jonowa, zależność od potencjału oraz dynamika otwierania i zamykania. Ostatecznym celem badań było określenie roli biologicznej i zaproponowanie potencjalnych zastosowań biomedycznych ludzkiego białka VDAC3, w tym dotyczących jego udziału w patogenezie chorób naczyniowych i neurodegeneracyjnych oraz męskiej niepłodności.

### 4.3.3. Uzyskane wyniki

#### 4.3.3.1. Ludzki VDAC3 tworzy funkcjonalny kanał i może być celem działania różnych leków

Przepuszczalność błon mitochondrialnych odgrywa kluczową rolę w regulacji wymiany metabolitów pomiędzy mitochondriami a cytoplazmą. Kanał VDAC, będący głównym białkiem zewnętrznej błony mitochondrialnej, zarządza przepływem małych jonów i substancji rozpuszczalnych w wodzie, takich jak substraty oddechowe. Nieprawidłowości w tej wymianie mogą skutkować różnymi zaburzeniami funkcji mitochondriów<sup>15</sup>.

U ssaków występują trzy paralogi VDAC, każdy kodowany przez inny gen. Struktury 3D VDAC1 i VDAC2 są bardzo dobrze poznane i wykazują duże podobieństwo<sup>4-7</sup>. Dzięki wysokiemu stopniowi zgodności sekwencji aminokwasowej, można również zbudować wiarygodny model VDAC3<sup>20</sup>. Mimo strukturalnych podobieństw, różnice w sekwencjach aminokwasowych sugerują specyficzne znaczenie funkcjonalne dla każdego z tych paralogów<sup>21,22</sup>.

Przepuszczalność kanałów VDAC może być mierzona w izolowanych mitochondriach i w układach rekonstruowanych<sup>23</sup>. Przepuszczalność VDAC w izolowanych mitochondriach wymaga skomplikowanych pomiarów, a także oceny ciągłości mitochondrialnej błony zewnętrznej, ponieważ izolacja mitochondriów może prowadzić do jej uszkodzenia<sup>24</sup>. Dlatego, najpopularniejszą i najbardziej wiarygodną metodą są pomiary elektrofizjologiczne izolowanych i oczyszczonych kanałów, rekonstruowanych w sztucznych w błonach fosfolipidowych, w tym metoda BLM.

Właściwości kanału VDAC poddanego rekonstrukcji zostały po raz pierwszy opisane w 1976 roku<sup>25</sup> i od tego czasu zostały bardzo dokładnie zbadane<sup>1,26</sup>. W skrócie, VDAC tworzy tylko jeden otwarty stan, w którym wykazuje przewodnictwo elektryczne około 4 nS w 1 M KCl i selektywność dla anionów. Ze względu na zależność od napięcia, przy wyższych potencjałach (30 mV lub więcej), kanał VDAC przechodzi w jeden ze stanów zamkniętych, w przypadku których jego przewodnictwo maleje a selektywność zmienia się w kierunku kationowej, co uniemożliwia transport metabolitów będących anionami<sup>23</sup>.

Po rekonstrukcji w sztucznych błonach lipidowych, ludzkie VDAC1 i VDAC2 wykazują kanoniczne właściwości elektrofizjologiczne rekonstruowanego białka VDAC: wysokie przewodnictwo i selektywność anionową oraz zdolność do przejścia z otwartego stanu o

wysokim przewodnictwie do jednego ze stanów zamkniętych o zmienionej selektywności i niższym przewodnictwie, w zależności od przyłożonego napięcia<sup>1,8,9,26</sup>. Natomiast ludzki VDAC3 długo pozostawał słabo scharakteryzowany, głównie ze względu na trudności związane z izolacją białka, a ograniczone opublikowane wyniki dostarczały sprzecznych danych elektrofizjologicznych. Inne renomowane laboratoria zgłaszały, że VDAC3 tworzy kanały o małym i niestabilnym przewodnictwie, które nie wykazują zależności od potencjału elektrycznego, z wartością przewodnictwa około 0,09 nS w 1 M KCl<sup>27,28</sup>. W związku z tym VDAC3 był powszechnie uważany za białko regulatorowe, a nie kanał transportowy<sup>29,30</sup>, w przeciwieństwie do jednoznacznej roli VDAC1 i VDAC2 w przepuszczalności mitochondrialnej błony zewnętrznej<sup>1</sup>.

Praca **Karachitos i in. 2016 (C1)** stanowi rozwinięcie wcześniejszych badań, które zostały opublikowane w 2012 roku jako część mojej pracy doktorskiej. Wyniki tych badań wskazywały na istotne znaczenie VDAC w cytoprotekcyjnym działaniu minocykliny (półsyntetycznego antybiotyku z grupy tetracyklin) na komórki drożdży w warunkach stresu oksydacyjnego<sup>31</sup>. Zatem, celem badań było stwierdzenie, czy cytoprotekcyjny efekt minocykliny w kontekście stresu oksydacyjnego indukowanego w komórkach drożdży przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> może zależeć od obecności danego paralogu ludzkiego VDAC. W wyniku tych badań dokonaliśmy istotnego odkrycia, mianowicie że paralog VDAC3 wykazuje cechy funkcjonalne typowe dla kanałów VDAC.

Obserwacja ta była skutkiem zastosowania różnorodnych metod badawczych, w tym testów komplementacji w komórkach drożdży, pomiarów oksygraficznych oraz analizy funkcji kanału po jego rekonstytucji w sztucznych błonach lipidowych. Mimo solidnego potwierdzenia kanonicznej aktywności kanałowej VDAC3 człowieka, napotkaliśmy na trudności w opublikowaniu otrzymanych wyników. Wynikało to z powszechnie przyjętego przekonania, że ludzki VDAC3 nie pełni funkcji kanału.

W tym kontekście kluczową rolę odegrała praca opublikowana przez Okazaki i współpracowników w 2015 roku<sup>32</sup>. W tej pracy autorzy wykazali, że ludzki paralog VDAC3 oczyszczony z bakterii wykazuje różne właściwości, w tym niższe wartości przewodnictwa i brak zależności od potencjału. Co więcej, zdołali oni przywrócić zależność od potencjału po dodaniu czynników redukujących, co wskazuje na istotną rolę reszt cysteiny w aktywności kanałowej VDAC3. Ta praca otworzyła nam możliwość publikacji naszych wyników.

W efekcie, w pracy **C1**, mogliśmy jako pierwsi przedstawić dowody na to, że ludzki VDAC3, poddany heterologicznej ekspresji w komórkach drożdży i izolowany z mitochondriów



drożdży, posiada właściwości kanałowe bardzo zbliżone do tych obserwowanych dla VDAC1. Co więcej, nasze badania wykazały, że to właśnie paralog VDAC3 jest kluczowy dla cytoprotekcyjnych właściwości minocykliny w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Te wyniki dostarczają pierwszych wskazówek do zrozumienia różnic w funkcjach VDAC3 i pozostałych paralogów.

Nasze odkrycia zyskały uznanie w środowisku naukowym i wpłynęły na trwającą dyskusję dotyczącą roli różnych paralogów VDAC w funkcjonowaniu mitochondriów i komórek. W 2020 roku zespół biofizyków z USA, odwołując się do naszej pracy, jednoznacznie potwierdził, że ludzki VDAC3 może tworzyć kanały, które transportują jony nieorganiczne i metabolity w sposób porównywalny do VDAC1<sup>33</sup>.

To otwiera nowe możliwości terapeutyczne, zwłaszcza w kontekście chorób naczyniowo-mózgowych i sercowo-naczyniowych, co było głównym tematem pracy przeglądowej **Karachitos i in., 2017 C2**. W artykule tym podkreśliliśmy również potencjalne zastosowanie leków wpływających na VDAC jako leków cytoprotekcyjnych. W tym kontekście, nasze wcześniejsze ustalenia dotyczące unikatowych właściwości kanałowych paralogu VDAC3 stają się szczególnie istotne. Ustaliliśmy, że to właśnie VDAC3, a nie inne paralogi VDAC, jest kluczowy dla cytoprotekcyjnych właściwości minocykliny w sytuacjach stresu oksydacyjnego.

W pracy przeglądowej **Karachitos i Kmita, 2019 C4** skupiliśmy się na roli ludzkiego paralogu VDAC3 w motoryce i morfologii plemników ludzkich. Celem było zbadanie możliwości wykorzystania VDAC3 jako potencjalnego celu dla męskich środków antykoncepcyjnych. W pracy podkreśliliśmy, że VDAC3 odgrywa kluczową rolę w regulacji transportu ATP i homeostazy Ca<sup>2+</sup>, co jest istotne dla ruchliwości plemników. Opisałiśmy zidentyfikowane mutacje w genie kodującym VDAC3 u pacjentów z niską ruchliwością plemników, co sugeruje, że te mutacje mogą wpływać na strukturę i funkcję kanału VDAC3.

W pracy tej zwróciliśmy także uwagę na to, że brak lub nieprawidłowe funkcjonowanie VDAC3 może prowadzić do niepłodności. VDAC3 jest również związany z procesami takimi jak reakcja akrosomalna, która jest kluczowa dla funkcji plemników. W związku z tym zasugerowaliśmy, że zrozumienie roli VDAC3 w motoryce plemników może otworzyć nowe możliwości w dziedzinie antykoncepcji męskiej. Praca **C4** stanowi zatem ważny krok w zrozumieniu roli VDAC3 w funkcjonowaniu plemników, co ma istotne znaczenie dla potencjalnych zastosowań tego kanału jako celu dla nowych form męskiej antykoncepcji.

Podsumowując, obie prace przeglądowe podkreślają, że VDAC3 jest kluczowym elementem różnych aspektów funkcjonowania komórek, od mechanizmów ochrony przed stresem oksydacyjnym do ruchliwości plemników. To z kolei otwiera nowe ścieżki dla badań i terapii.

#### **4.3.3.2. Drożdżowy VDAC2 jest białkiem kanałowym i charakteryzuje się kanonicznymi właściwościami elektrofizjologicznymi.**

Chociaż mechanizmy działania VDAC u ssaków są dobrze zrozumiane, ich drożdżowe odpowiedniki nie były tak dokładnie badane. Do niedawna uważano, że drożdże *S. cerevisiae* posiadają tylko jeden gen kodujący VDAC (VDAC1), znany jako *POR1*. Jednakże, obserwacje zawarte w pracy opublikowanej w 1997 roku<sup>34</sup> wskazały, że drożdże z usuniętym genem *POR1* (mutanty  $\Delta por1$ ) mogą przetrwać na pożywce z niefermentującym źródłem węgla (pożywka ta wymaga metabolizmu tlenowego) w niższych temperaturach, co sugeruje istnienie alternatywnego mechanizmu transportu metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną<sup>34</sup>. Badania te ujawniły drugi gen VDAC w drożdżach, oznaczony jako *POR2*, który koduje białko VDAC2. Gen *POR2* może kompensować defekty wzrostu mutantów  $\Delta por1$ , ale tylko po nadekspresji. Podwójny mutant  $\Delta por1/\Delta por2$  charakteryzuje się bardzo ograniczonym wzrostem w porównaniu do mutantu  $\Delta por1$ <sup>34</sup>. Co więcej, mutanty  $\Delta por2$  nie wykazywały żadnych fenotypowych zaburzeń, co sugerowało, że w mitochondriach drożdży VDAC2 jest mniej istotnym białkiem niż VDAC1, uczestniczącym jednak w transporcie przez zewnętrzną błonę mitochondrialną i prawdopodobnie posiadającym funkcje kanałowe.

W pracy **Guardiani i in., 2018 (C3)**, skupiliśmy się na dokładnej charakterystyce strukturalnej i funkcjonalnej VDAC2, drugiego białka VDAC w drożdżach *S. cerevisiae*. Do realizacji tego ambitnego projektu zaangażowane były międzynarodowe zespoły badawcze. Nad eksperymentami elektrofizjologicznymi pracował nasz zespół (pod kierunkiem prof. Hanny Kmity) oraz zespół z Uniwersytetu w Katanii (Włochy) prowadzony przez prof. Vito De Pinto, który jest uznawany za wybitnego eksperta w dziedzinie kanałów VDAC. Symulacje dynamiki molekularnej były realizowane przez zespół kierowany przez prof. Matteo Ceccarelli z Uniwersytetu w Cagliari (Włochy).

Wykorzystując zaawansowane metody, takie jak symulacje dynamiki molekularnej oraz pomiary elektrofizjologiczne (metoda BLM), mogliśmy zbudować modele homologiczne drożdżowych białek VDAC1 i VDAC2. Te modele pozwoliły nam na analizę cech kanału, w tym ścieżek transportu  $K^+$  i  $Cl^-$ . Ze względu na niski poziom ekspresji genu kodującego VDAC2

w komórkach drożdży, zdecydowaliśmy się na nadekspresję tego genu w komórkach z usuniętym genem *POR1* ( $\Delta por1$ ) i pod kontrolą promotora tego genu. Następnie opracowaliśmy skuteczną metodę oczyszczania białka z izolowanych mitochondriów przy użyciu detergentu LDAO. Dzięki tej strategii mogliśmy przeprowadzić szczegółową analizę elektrofizjologiczną VDAC2 metodą BLM.

Wykazaliśmy, że drożdżowy VDAC2 ma zdolność tworzenia kanału. Jego przewodnictwo, zależność od napięcia i selektywność jonowa były podobne do wartości otrzymywanych dla drożdżowego VDAC1 i białek VDAC innych organizmów. Zatem w pracy tej po raz pierwszy wykryto i scharakteryzowano cechy kanału VDAC2.

Po zidentyfikowaniu i opisaniu właściwości VDAC2 drożdży w pracy **C3**, kolejna praca, tj., **Magri i in., 2019 (C5)**, dotyczyła porównania elektrofizjologicznych cech VDAC2 uzyskiwanego przy zastosowaniu różnych metod. Porównano VDAC2 oczyszczony po nadekspresji w komórkach bakterii (VDAC2 rekombinowany) i VDAC2 otrzymany metodą opisaną w pracy **C3** (VDAC2 natywny), co pozwoliło na głębsze zrozumienie mechanizmów regulujących jego aktywność. Analiza wykazała, że rekombinowany VDAC2, podobnie jak jego natywna forma, może tworzyć kanały zależne od napięcia, a jego średnie przewodnictwo może być podobne do tego wykazywanego przez natywną formę. Jednakże rekombinowany VDAC2 charakteryzował się mniejszą wrażliwością na zmiany napięcia w porównaniu z jego natywnym odpowiednikiem. Wymagał ponadto zastosowania wyższych napięć, aby możliwe było zamknięcie kanału. Zauważono również różnice w selektywności względem jonów między natywną a rekombinowaną formą.

Badania te potwierdziły, że VDAC2 drożdży ma zdolność tworzenia kanałów, co zaprzeczało wcześniejszym doniesieniom. Sugerowały również, że modyfikacje potranslacyjne w komórkach eukariotycznych mogą wpływać na zależność od napięcia i selektywność jonową VDAC2, podobnie jak w przypadku ludzkiego białka VDAC3.

Dzięki międzynarodowej współpracy i zastosowaniu zaawansowanych technik badawczych, udało nam się dokładnie opisać aktywność elektrofizjologiczną VDAC2. Jest to ważny krok w zrozumieniu jego roli w biologii komórki drożdży *S. cerevisiae* i wykorzystania tych komórek w badaniu funkcjonalnego zróżnicowania paralogów ludzkiego VDAC, co jest podejściem. ważnym dla zrozumienia funkcji VDAC w komórkach ssaków.

#### 4.3.3.3. Pełniący funkcje czujnika redoks ludzki VDAC3 i jego analogi u innych organizmów dostarczają kluczowych informacji o ewolucyjnie zachowanych mechanizmach odpowiedzi na stres środowiskowy.

Reszty cysteiny wchodzące w skład VDAC3 mogą ulegać utlenieniu pod wpływem reaktywnych form tlenu (RFT), co może wpływać na funkcje tego kanału<sup>32,35</sup>. Utlenienie reszt cysteiny może prowadzić do zmian konformacyjnych w strukturze białka, co z kolei może wpływać na jego aktywność jako kanału<sup>32</sup>. W kontekście stresu oksydacyjnego, takie zmiany mogą mieć znaczenie dla regulacji przepływu jonów nieorganicznych i metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną.

Praca **Karachitos i in., 2021 (C6)** zakłada, że stres oksydacyjny, wynikający z braku równowagi między produkcją RFT a zdolnościami antyoksydacyjnymi komórek, może wpływać na funkcje kanału VDAC w mitochondriach. Skupiliśmy się na analizie sekwencji aminokwasowych VDAC w różnych organizmach, aby zidentyfikować potencjalne miejsca, w których reszty cysteiny mogą ulegać utlenieniu, co z kolei mogłoby wpływać na właściwości kanału.

Zauważyliśmy, że w organizmach, które mają tylko jeden gen kodujący VDAC często brakuje tzw. "wrażliwego na redoks" VDAC, reprezentowanego przez ludzki VDAC3. Kanał VDAC wrażliwy na redoks jest specyficznym typem kanału, który posiada zdolność do modyfikacji swojej struktury i funkcji w odpowiedzi na zmiany w stanie redoks komórki. Kluczową cechą tego kanału jest obecność reszt cysteiny, które mogą ulegać utlenieniu lub redukcji. Tworzone przez te reszty cysteiny wiązania dwusiarczkowe są kluczowe dla właściwości kanału, takich jak przewodnictwo i selektywność dla jonów. Tymczasem w organizmach z wieloma paralogami VDAC, takich jak *Drosophila melanogaster* czy ludzie, istnieją paralogi VDAC, które są wrażliwe na redoks, a ich geny ulegają ekspresji w specyficznych tkankach. Ludzki VDAC1 jest wszechobecny w ludzkich tkankach i charakteryzuje się najwyższym poziomem ekspresji<sup>36</sup>. W przeciwieństwie do VDAC1, VDAC3 ulega ekspresji na szczególnie wysokim poziomie w jądrach, a jego nokaut w modelu mysim prowadzi do niepłodności samców<sup>37</sup>, co podkreśla jego znaczenie w biologii rozrodu.

*D. melanogaster* posiada cztery paralogi VDAC: Dmel/porin, Dmel/porin2, Dmel/CG17140 i Dmel/CG17139. Jeden z nich, Dmel/porin, jest wszechobecny w różnych tkankach, natomiast pozostałe trzy są specyficzne dla męskiego narządu rozrodczego<sup>38</sup>. Nokaut wszystkich genów

kodujących paralogi VDAC u *D. melanogaster* prowadzi do defektów w oddychaniu tlenowym, nieprawidłowej morfologii mitochondriów w mięśniach, dysfunkcji synaptycznej oraz powoduje niepłodność u samców<sup>39</sup>. Co ciekawe, paralogi Dmel/CG17140 i Dmel/CG17139, charakteryzują się obecnością kilku reszt cysteiny, z których jedna znajduje się w ich N-końcu. Ta cecha jest bardzo podobna do ludzkiego VDAC3, który również posiada resztę cysteiny w regionie N-końca. Chociaż geny kodujące te białka ewoluowały niezależnie, podobne cechy strukturalne Dmel/CG17140 i Dmel/CG17139 oraz VDAC3 sugerują, że mogą one stanowić funkcjonalne analogi, pełniące specyficzne funkcje w mechanizmach odpowiedzi na stres oksydacyjny lub inne warunki środowiskowe.

Nasze obserwacje sugerują również, że pasożyty często mają tylko jeden wariant VDAC, który jest wrażliwy na redoks. To prowadzi do hipotezy, że ewolucja VDAC może być uwarunkowana przez stres środowiskowy i że kanał ten może odgrywać rolę w adaptacji organizmów do różnych warunków środowiskowych. Zarówno pasożyty, jak i plemniki są narażone na podobne warunki środowiskowe, takie jak stres oksydacyjny. Pasożyty, będąc w organizmach gospodarzy, są narażone na różne mechanizmy obronne, w tym na RFT. Podobnie plemniki są "obce" zarówno dla mężczyzny, który je produkuje, jak i dla kobiety, która je otrzymuje. Narządy układu rozrodczego kobiety są narażone na kolonizację przez patogeny i dlatego rozwijają różne mechanizmy obronne, w tym produkcję RFT, które mogą potencjalnie uszkodzić plemniki. W związku z tym, zarówno pasożyty, jak i plemniki mogą wymagać silniejszych czujników redoks, aby przetrwać w tych warunkach.

Praca **C6** wnosi istotny wkład do zrozumienia roli i funkcji kanałów VDAC w kontekście stresu oksydacyjnego i adaptacji do różnych warunków środowiskowych. Przedstawione ustalenia mogą znacząco wpłynąć na przyszłe badania nad komórkowymi mechanizmami odporności na stres oraz otwierają nowe możliwości w zakresie leczenia chorób związanych z dysfunkcją mitochondriów i niepłodnością.

**4.4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych, których wyniki umieszczone są w pracach naukowych** (Publikacje stanowiące pozostałe osiągnięcia naukowe wskazano w załączonym dokumencie „Załącznik 4a - Wykaz osiągnięć naukowych”)

#### 4.4.1. Tytuł pozostałego osiągnięcia naukowego

„Mitochondrialne podłoże anhydrobiozy niesporczaków”

#### 4.4.2. Wstęp

W ciągu ostatnich lat uczestniczyłem w badaniach nad zjawiskiem anhydrobiozy niesporczaków. Anhydrobioza to fascynująca adaptacja, która pozwala pewnym organizmom przetrwać w skrajnie niekorzystnych warunkach, wynikających z niedoboru wody<sup>40</sup>. Zjawisko to jest obserwowane nie tylko wśród mikroorganizmów, ale także wśród roślin oraz pewnych gatunków małych bezkręgowców. Szczególnie interesującym przykładem organizmów zdolnych do anhydrobiozy są niesporczaki, zaliczane do bezkręgowców. Moje zaangażowanie w te badania wynikało z zainteresowania zagadnieniem funkcjonowania mitochondriów w warunkach stresowych, co znajduje także odzwierciedlenie w publikacjach zaliczonych do monotematycznego cyklu publikacji (P21-P24).

Proces anhydrobiozy u niesporczaków można podzielić na trzy główne etapy: dehydratacja (odwodnienie), w którym tworzy się charakterystyczna "baryłka", następnie faza baryłki, a na końcu etap rehydratacji (nawodnienia)<sup>41</sup>. W trakcie fazy baryłki, niesporczak traci znaczną ilość wody (nawet powyżej 90%), co skutkuje zmniejszeniem jego objętości o około 70%. Organizm przyjmuje wtedy kształt przypominający beczkę, co jest wynikiem obkurczania się wzdłuż osi ciała, wciągnięcia głowy i cofnięcia się nóg oraz reorganizacji narządów wewnętrznych i komórek<sup>42</sup>. Jednak te zmiany nie są trwałe. W momencie, gdy warunki stają się bardziej korzystne i następuje rehydratacja, niesporczak "ożywa", czemu towarzyszy przywrócenie wyjściowej formy i funkcji<sup>42</sup>.

Na poziomie morfologii organizmu, anhydrobioza jest zjawiskiem dobrze zbadanym i stanowi ciekawy przykład adaptacji organizmów do przetrwania w ekstremalnych warunkach. Jednakże, odpowiednie mechanizmy komórkowe wciąż wymagają wyjaśnienia. Badania nad tym zjawiskiem ujawniły kilka wspólnych elementów u bezkręgowców. Wśród nich należy wspomnieć białka późnej embriogenezy (LEA) oraz białka szoku cieplnego (HSP). Niemniej jednak, niektóre mechanizmy są bardziej charakterystyczne dla pewnych gatunków bezkręgowców niż dla innych, co wskazuje na złożoność tego procesu na poziomie komórkowym<sup>43</sup>.

Jednakże wspólną płaszczyzną w rozpatrywaniu mechanizmów komórkowych związanych z anhydrobiozą u różnych organizmów wydaje się być funkcjonowanie mitochondriów. Anhydrobioza jest bowiem procesem uporządkowanym, wymagającym zasilania energetycznego. Na przykład, w przypadku niesporczaków zauważono, że rozprężenie mitochondriów zakłóca proces tworzenia się baryłki, co jest kluczowym etapem anhydrobiozy<sup>44</sup>. Co więcej, mitochondria mogą odgrywać ważną rolę w procesie rehydratacji po okresie anhydrobiozy<sup>45</sup>. Mimo tych obserwacji, dokładna rola mitochondriów w anhydrobiozie, w tym niesporczaków, nadal nie została wyjaśniona, chociaż badania nad białkami mitochondrialnymi, które są zaangażowane w reakcje na warunki stresowe, mogą dostarczyć kluczowych informacji na temat komórkowego podłoża anhydrobiozy. Wynika to prawdopodobnie z braku odpowiednich rozwiązań metodycznych.

Moje badania, przeprowadzone w ramach projektu kierowanego przez prof. Hannę Kmitę, dostarczyły kluczowych informacji dotyczących roli mitochondrialnej alternatywnej oksydazy (AOX) u niesporczaków. AOX to specyficzne białko zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, które nie jest hamowane przez cyjanek i wiąże jony żelaza<sup>46-48</sup>. Co istotne, wprowadza ono alternatywną ścieżkę w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym na poziomie koenzymu Q. Dzięki temu, AOX umożliwia bezpośredni transfer elektronów z kompleksu I i/lub II przez koenzym Q do tlenu, omijając tradycyjny szlak cytochromowy, który składa się z kompleksu III i IV. Współpracując z zespołem prof. Kmity, uczestniczyłem w wykazaniu funkcjonalności AOX u niesporczaków. To odkrycie rzuca nowe światło na zrozumienie funkcjonowania mitochondriów niesporczaków, zwłaszcza w kontekście ich zdolności do przetrwania w ekstremalnych warunkach, dzięki procesom takim jak anhydrobioza.

#### 4.4.3. Uzyskane wyniki

Publikacja **Kaczmarek i in., 2019 (P21)** to praca przeglądowa, zawierająca między innymi aktualne informacje dotyczące komórkowego podłoża anhydrobiozy. W pracy tej przedstawiono także dwa modele wyjaśniające wpływ anhydrobiozy na proces starzenia się: "Śpiąca Królowna" i „Portret Dorianą Graya”. Zgodnie z modelem „Śpiącej Królowny”, organizmy w trakcie anhydrobiozy nie starzeją się, podczas gdy model „Portret Dorianą Graya” przewiduje, że w trakcie anhydrobiozy organizm starzeje się, przynajmniej na początkowych jej etapach. Eksperymentalna weryfikacja tych modeli może mieć kluczowe znaczenie dla wykorzystania anhydrobiozy w hamowaniu procesu starzenia się organizmów. Wymaga to

jednak najpierw wyjaśnienia komórkowych mechanizmów anhydrobiozy, w tym udziału białek mitochondrialnych.

Mój udział w publikacji polegał na aktywnym udziale w dyskusjach zespołu nad interpretacją zgromadzonych danych oraz w kształtowaniu końcowych wniosków pracy. Moje doświadczenie w zakresie biologii molekularnej i biochemii pozwoliło na głębsze zrozumienie omawianych zagadnień oraz wskazanie potencjalnych kierunków dalszych badań w tej dziedzinie. Ponadto uczestniczyłem w przygotowaniu maszynopisu i jego końcowej wersji, uwzględniającej uwagi recenzentów

Publikacja **Wojciechowska i in., 2021a (P22)** dotyczy roli AOX w anhydrobiozie niesporczaka *Milnesium inceptum*. Kluczowe znaczenie dla prowadzonych badań miało potwierdzenie funkcjonalności AOX tego gatunku niesporczaka. Potwierdzenie to uzasadniało zastosowanie inhibitora AOX (BHAM; kwas benzohydroksamowy) podczas eksperymentalnie przeprowadzonej anhydrobiozy. Na tej podstawie stwierdzono, że znaczenie AOX wzrasta wraz z czasem trwania fazy baryłki, ale enzym ten nie jest istotny w etapie rehydratacji.

W pracy wykorzystano model drożdżowy *S. cerevisiae* do heterologicznej ekspresji genu AOX niesporczaka. Dzięki temu, po raz pierwszy, udało się potwierdzić funkcjonalność AOX niesporczaka. Eksperymenty wykazały, że ekspresja AOX *M. inceptum* w komórkach drożdży prowadziła do wrażliwości ich oddychania na BHAM i zmniejszała wrażliwość tego oddychania na KCN.

Moje zaangażowanie w pracę polegało na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów z wykorzystaniem modelu drożdżowego. Opracowałem i stworzyłem model drożdżowy z ekspresją AOX niesporczaka, a następnie wykonałem badania oksygraficzne, które potwierdziły funkcjonalność AOX w mitochondriach drożdży. Mój udział w publikacji polegał również na wykonaniu analiz bioinformatycznych, które pozwoliły na stworzenie modelu 3D oraz porównanie sekwencji AOX niesporczaków. Ponadto uczestniczyłem w opracowaniu koncepcji publikacji oraz w przygotowaniu maszynopisu i jego końcowej wersji, uwzględniającej uwagi recenzentów.

Kolejna publikacja **Wojciechowska i in., 2021b (P23)** dotyczy potwierdzenia funkcjonalności AOX w nienaruszonych osobnikach reprezentujących inny gatunek niesporczaka, tj. *Hypsibius exemplaris*. Miało to kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia wyników testu toksyczności *in vivo*, badającego wpływ KCN (inhibitor drogi cytochromowej) i BHAM (inhibitor AOX) na aktywność niesporczaków (określaną na podstawie ich ruchliwości). Wyniki tego testu



wskazały między innymi, że wyeliminowanie aktywności osobników w obecności KCN wymagało podania BHAM. Pozostawało to w zgodzie z odpowiednimi zmianami potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi$ ) wykrywanymi w nienaruszonych osobnikach oraz ich oddychaniem czyli szybkością zużycia tlenu. Zgodność tych danych pozwala także na wniosek, że aktywność AOX w niesporczakach może być monitorowana zarówno przez obserwację zachowania zwierząt, jak i przez pomiar oddychania nienaruszonych osobników i detekcję  $\Delta\Psi$  w ich mitochondriach.

Mój udział w publikacji polegał na opracowaniu metody monitorowania  $\Delta\Psi$  w nienaruszonych osobnikach i wykonaniu eksperymentów wykorzystujących tę metodę. Ponadto, współpracując z zespołem, brałem udział w analizie i interpretacji uzyskanych danych oraz w przygotowaniu maszynopisu i jego końcowej wersji, uwzględniającej uwagi recenzentów.

W publikacji **Poprawa i in., 2022 (P24)** zweryfikowano możliwość stosowania *Hypsibius exemplaris* jako modelu w badaniu anhydrobiozy niesporczaków. Ten gatunek niesporczaka jest jednym z najlepiej przebadanych i często używanych jako model laboratoryjny do różnych badań. Jednak dostępne dane sugerowały, że zdolność tego gatunku do anhydrobiozy może być przeceniana. W ramach przeprowadzonych badań przetestowano różne protokoły anhydrobiozy w warunkach laboratoryjnych, różniące się poziomem jej przeżywalności, i wykonano analizę strukturalną komórek w obrębie baryłek, za pomocą mikroskopii elektronowej. Stwierdzono, że nawet w prawidłowo uformowanych baryłkach dochodzić może do procesów degeneracyjnych, obejmujących także mitochondria. Zmiany degeneracyjne w mitochondriach wskazywały na upośledzenie procesu fosforylacji oksydacyjnej, co współwystępowało ze zmniejszoną przeżywalnością anhydrobiozy. Wyniki te wskazują, że *H. exemplaris* nie jest dobrym modelem do badań nad anhydrobiozą ze względu na wysokie prawdopodobieństwo upośledzenia zasilania energetycznego procesów komórkowych.

Mój udział polegał na opracowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, które miały na celu ocenę przeżywalności anhydrobiozy w różnych warunkach. Ponadto uczestniczyłem w opracowaniu koncepcji publikacji oraz w przygotowaniu maszynopisu i jego końcowej wersji, uwzględniającej uwagi recenzentów.

Podsumowując, moje badania dostarczyły skuteczne rozwiązania metodyczne, pozwalające na wgląd w stan funkcjonalny mitochondriów niesporczaków oraz przyczyniły się do sformułowania istotnych wniosków dotyczących znaczenia obecności AOX w mitochondriach niesporczaków, w tym również dla przebiegu anhydrobiozy.

## 4.5. Literatura

- (1) Colombini, M. VDAC: The Channel at the Interface between Mitochondria and the Cytosol. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 256–257 (1–2), 107–115. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009862.17396.8d>.
- (2) Shoshan-Barmatz, V.; Anand, U.; Nahon-Crystal, E.; Di Carlo, M.; Shteinifer-Kuzmine, A. Adverse Effects of Metformin From Diabetes to COVID-19, Cancer, Neurodegenerative Diseases, and Aging: Is VDAC1 a Common Target? *Front. Physiol.* **2021**, 12, 730048. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.730048>.
- (3) Rosencrans, W. M.; Rajendran, M.; Bezrukov, S. M.; Rostovtseva, T. K. VDAC Regulation of Mitochondrial Calcium Flux: From Channel Biophysics to Disease. *Cell Calcium* **2021**, 94, 102356. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102356>.
- (4) Bayrhuber, M.; Meins, T.; Habeck, M.; Becker, S.; Giller, K.; Villinger, S.; Vonrhein, C.; Griesinger, C.; Zweckstetter, M.; Zeth, K. Structure of the Human Voltage-Dependent Anion Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (40), 15370–15375. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808115105>.
- (5) Hiller, S.; Garces, R. G.; Malia, T. J.; Orekhov, V. Y.; Colombini, M.; Wagner, G. Solution Structure of the Integral Human Membrane Protein VDAC-1 in Detergent Micelles. *Science* **2008**, 321 (5893), 1206–1210. <https://doi.org/10.1126/science.1161302>.
- (6) Ujwal, R.; Cascio, D.; Colletier, J.-P.; Faham, S.; Zhang, J.; Toro, L.; Ping, P.; Abramson, J. The Crystal Structure of Mouse VDAC1 at 2.3 Å Resolution Reveals Mechanistic Insights into Metabolite Gating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (46), 17742–17747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809634105>.
- (7) Schredelseker, J.; Paz, A.; López, C. J.; Altenbach, C.; Leung, C. S.; Drexler, M. K.; Chen, J.-N.; Hubbell, W. L.; Abramson, J. High Resolution Structure and Double Electron-Electron Resonance of the Zebrafish Voltage-Dependent Anion Channel 2 Reveal an Oligomeric Population. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289 (18), 12566–12577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.497438>.
- (8) Hodge, T.; Colombini, M. Regulation of Metabolite Flux through Voltage-Gating of VDAC Channels. *J. Membr. Biol.* **1997**, 157 (3), 271–279. <https://doi.org/10.1007/s002329900235>.
- (9) Maurya, S. R.; Mahalakshmi, R. N-Helix and Cysteines Inter-Regulate Human Mitochondrial VDAC-2 Function and Biochemistry. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290 (51), 30240–30252. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.693978>.
- (10) Caterino, M.; Ruoppolo, M.; Mandola, A.; Costanzo, M.; Orrù, S.; Imperlini, E. Protein-Protein Interaction Networks as a New Perspective to Evaluate Distinct Functional Roles of Voltage-Dependent Anion Channel Isoforms. *Mol. Biosyst.* **2017**, 13 (12), 2466–2476. <https://doi.org/10.1039/c7mb00434f>.
- (11) Young, M. J.; Bay, D. C.; Hausner, G.; Court, D. A. The Evolutionary History of Mitochondrial Porins. *BMC Evol. Biol.* **2007**, 7 (1), 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-31>.
- (12) Homblé, F.; Krammer, E.-M.; Prévost, M. Plant VDAC: Facts and Speculations. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1818 (6), 1486–1501. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.028>.
- (13) Messina, A.; Reina, S.; Guarino, F.; De Pinto, V. VDAC Isoforms in Mammals. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1818 (6), 1466–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.005>.
- (14) Rahmani, Z.; Maunoury, C.; Siddiqui, A. Isolation of a Novel Human Voltage-Dependent Anion Channel Gene. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **1998**, 6 (4), 337–340. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200198>.

- (15) Camara, A. K. S.; Zhou, Y.; Wen, P.-C.; Tajkhorshid, E.; Kwok, W.-M. Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 460. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00460>.
- (16) Rostovtseva, T. K.; Queralt-Martín, M.; Rosencrans, W. M.; Bezrukov, S. M. Targeting the Multiple Physiologic Roles of VDAC With Steroids and Hydrophobic Drugs. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 446. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00446>.
- (17) Karachitos, A.; Jordan, J.; Kmita, H. VDAC-Targeted Drugs Affecting Cytoprotection and Mitochondrial Physiology in Cerebrovascular and Cardiovascular Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24* (40), 4419–4434. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170530073238>.
- (18) Kim, J.; Gupta, R.; Blanco, L. P.; Yang, S.; Shteinfer-Kuzmine, A.; Wang, K.; Zhu, J.; Yoon, H. E.; Wang, X.; Kerkhofs, M.; Kang, H.; Brown, A. L.; Park, S.-J.; Xu, X.; Zandee van Rilland, E.; Kim, M. K.; Cohen, J. I.; Kaplan, M. J.; Shoshan-Barmatz, V.; Chung, J. H. VDAC Oligomers Form Mitochondrial Pores to Release mtDNA Fragments and Promote Lupus-like Disease. *Science* **2019**, *366* (6472), 1531–1536. <https://doi.org/10.1126/science.aav4011>.
- (19) Karachitos, A.; Kmita, H. Voltage-Dependent Anion Channel Isoform 3 as a Potential Male Contraceptive Drug Target. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (8), 857–867. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0328>.
- (20) Amodeo, G. F.; Scorciapino, M. A.; Messina, A.; Pinto, V. D.; Ceccarelli, M. Charged Residues Distribution Modulates Selectivity of the Open State of Human Isoforms of the Voltage Dependent Anion-Selective Channel. *PLOS ONE* **2014**, *9* (8), e103879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103879>.
- (21) Bergdoll, L. A.; Lerch, M. T.; Patrick, J. W.; Belardo, K.; Altenbach, C.; Bisignano, P.; Laganowsky, A.; Grabe, M.; Hubbell, W. L.; Abramson, J. Protonation State of Glutamate 73 Regulates the Formation of a Specific Dimeric Association of mVDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (2), E172–E179. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715464115>.
- (22) De Pinto, V.; Reina, S.; Gupta, A.; Messina, A.; Mahalakshmi, R. Role of Cysteines in Mammalian VDAC Isoforms' Function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2016**, *1857* (8), 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.020>.
- (23) Colombini, M. Measurement of VDAC Permeability in Intact Mitochondria and in Reconstituted Systems. *Methods Cell Biol.* **2007**, *80*, 241–260. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80012-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80012-9).
- (24) Lee, A. C.; Xu, X.; Blachly-Dyson, E.; Forte, M.; Colombini, M. The Role of Yeast VDAC Genes on the Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane. *J. Membr. Biol.* **1998**, *161* (2), 173–181. <https://doi.org/10.1007/s002329900324>.
- (25) Schein, S. J.; Colombini, M.; Finkelstein, A. Reconstitution in Planar Lipid Bilayers of a Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Obtained from Paramecium Mitochondria. *J. Membr. Biol.* **1976**, *30* (2), 99–120. <https://doi.org/10.1007/BF01869662>.
- (26) Shoshan-Barmatz, V.; De Pinto, V.; Zweckstetter, M.; Raviv, Z.; Keinan, N.; Arbel, N. VDAC, a Multi-Functional Mitochondrial Protein Regulating Cell Life and Death. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31* (3), 227–285. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>.
- (27) Checchetto, V.; Reina, S.; Magri, A.; Szabo, I.; De Pinto, V. Recombinant Human Voltage Dependent Anion Selective Channel Isoform 3 (hVDAC3) Forms Pores with a Very Small Conductance. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2014**, *34* (3), 842–853. <https://doi.org/10.1159/000363047>.
- (28) Reina, S.; Checchetto, V.; Saletti, R.; Gupta, A.; Chaturvedi, D.; Guardiani, C.; Guarino, F.; Scorciapino, M. A.; Magri, A.; Foti, S.; Ceccarelli, M.; Messina, A. A.; Mahalakshmi, R.; Szabo, I.; De Pinto, V. VDAC3 as a

Sensor of Oxidative State of the Intermembrane Space of Mitochondria: The Putative Role of Cysteine Residue Modifications. *Oncotarget* **2016**, 7 (3), 2249–2268. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6850>.

(29) Ponnalagu, D.; Singh, H. Anion Channels of Mitochondria. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2017**, 240, 71–101. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_39](https://doi.org/10.1007/164_2016_39).

(30) Han, J.-H.; Park, J.; Myung, S.-H.; Lee, S. H.; Kim, H.-Y.; Kim, K. S.; Seo, Y.-W.; Kim, T.-H. Noxa Mitochondrial Targeting Domain Induces Necrosis via VDAC2 and Mitochondrial Catastrophe. *Cell Death Dis.* **2019**, 10 (7), 519. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1753-4>.

(31) Karachitos, A.; Jordan, J.; Kmita, H. Cytoprotective Activity of Minocycline Includes Improvement of Mitochondrial Coupling: The Importance of Minocycline Concentration and the Presence of VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2012**, 44 (3), 297–307. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9441-4>.

(32) Okazaki, M.; Kurabayashi, K.; Asanuma, M.; Saito, Y.; Dodo, K.; Sodeoka, M. VDAC3 Gating Is Activated by Suppression of Disulfide-Bond Formation between the N-Terminal Region and the Bottom of the Pore. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2015**, 1848 (12), 3188–3196. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.017>.

(33) Queralt-Martín, M.; Bergdoll, L.; Tejjido, O.; Munshi, N.; Jacobs, D.; Kuszak, A. J.; Protchenko, O.; Reina, S.; Magri, A.; De Pinto, V.; Bezrukov, S. M.; Abramson, J.; Rostovtseva, T. K. A Lower Affinity to Cytosolic Proteins Reveals VDAC3 Isoform-Specific Role in Mitochondrial Biology. *J. Gen. Physiol.* **2020**, 152 (2), e201912501. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912501>.

(34) Blachly-Dyson, E.; Song, J.; Wolfgang, W. J.; Colombini, M.; Forte, M. Multicopy Suppressors of Phenotypes Resulting from the Absence of Yeast VDAC Encode a VDAC-like Protein. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17 (10), 5727–5738. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.10.5727>.

(35) Reina, S.; Palermo, V.; Guarnera, A.; Guarino, F.; Messina, A.; Mazzoni, C.; De Pinto, V. Swapping of the N-Terminus of VDAC1 with VDAC3 Restores Full Activity of the Channel and Confers Anti-Aging Features to the Cell. *FEBS Lett.* **2010**, 584 (13), 2837–2844. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.066>.

(36) Yamamoto, T.; Yamada, A.; Watanabe, M.; Yoshimura, Y.; Yamazaki, N.; Yoshimura, Y.; Yamauchi, T.; Kataoka, M.; Nagata, T.; Terada, H.; Shinohara, Y. VDAC1, Having a Shorter N-Terminus Than VDAC2 but Showing the Same Migration in an SDS–Polyacrylamide Gel, Is the Predominant Form Expressed in Mitochondria of Various Tissues. *J. Proteome Res.* **2006**, 5 (12), 3336–3344. <https://doi.org/10.1021/pr060291w>.

(37) Sampson, M. J.; Decker, W. K.; Beaudet, A. L.; Ruitenbeek, W.; Armstrong, D.; Hicks, M. J.; Craigen, W. J. Immobile Sperm and Infertility in Mice Lacking Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel Type 3. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (42), 39206–39212. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104724200>.

(38) Graham, B. H.; Craigen, W. J. Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel Gene Family in *Drosophila Melanogaster*: Complex Patterns of Evolution, Genomic Organization, and Developmental Expression. *Mol. Genet. Metab.* **2005**, 85 (4), 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.03.009>.

(39) Graham, B. H.; Li, Z.; Alesii, E. P.; Versteken, P.; Lee, C.; Wang, J.; Craigen, W. J. Neurologic Dysfunction and Male Infertility in *Drosophila* Porin Mutants: A NEW MODEL FOR MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND DISEASE \*. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (15), 11143–11153. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080317>.

(40) Alpert, P. Constraints of Tolerance: Why Are Desiccation-Tolerant Organisms so Small or Rare? *J. Exp. Biol.* **2006**, 209 (9), 1575–1584. <https://doi.org/10.1242/jeb.02179>.

(41) Rebecchi, L.; Altiero, T.; Guidetti, R. Anhydrobiosis: The Extreme Limit of Desiccation Tolerance. *Invertebr. Surviv. J.* **2007**, 4 (2), 65–81.

- (42) Nelson, D. R.; Guidetti, R.; Rebecchi, L. Chapter 17 - Phylum Tardigrada. In *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates (Fourth Edition)*; Thorp, J. H., Rogers, D. C., Eds.; Academic Press: Boston, 2015; pp 347–380. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00017-6>.
- (43) Jd, H.; Js, C.; B, G. Mechanisms of Desiccation Tolerance: Themes and Variations in Brine Shrimp, Roundworms, and Tardigrades. *Front. Physiol.* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.592016>.
- (44) Ka, H.; A, J.; N, M. Desiccation Tolerance in the Tardigrade *Richtersius Coronifer* Relies on Muscle Mediated Structural Reorganization. *PloS One* **2013**, *8* (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085091>.
- (45) Pigoń, A.; Weglarska, B. Rate of Metabolism in Tardigrades during Active Life and Anabiosis. *Nature* **1955**, *176* (4472), 121–122. <https://doi.org/10.1038/176121b0>.
- (46) Rogov, A. G.; Zvyagilskaya, R. A. Physiological Role of Alternative Oxidase (from Yeasts to Plants). *Biochem. Mosc.* **2015**, *80* (4), 400–407. <https://doi.org/10.1134/S0006297915040021>.
- (47) Weaver, R. J. Hypothesized Evolutionary Consequences of the Alternative Oxidase (AOX) in Animal Mitochondria. *Integr. Comp. Biol.* **2019**, *59* (4), 994–1004. <https://doi.org/10.1093/icb/icz015>.
- (48) Moore, A. L.; Albury, M. S. Further Insights into the Structure of the Alternative Oxidase: From Plants to Parasites. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36* (5), 1022–1026. <https://doi.org/10.1042/BST0361022>.

**5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

**18 czerwca – 30 lipca 2012 - Staż naukowo-badawczy w Laboratorium Neurofarmakologii na Uniwersytecie Medycznym Kastylli-La Mancha w Albacete w Hiszpanii.** Pod kierunkiem prof. Joaquina Jordana miałem okazję przeprowadzić badania nad wpływem różnych leków na mitochondria. Moje badania koncentrowały się głównie na analizie trzech substancji: minocykliny, Mdivi-1 oraz metadonu.

Jako materiał biologiczny wykorzystywałem myszy oraz linie komórkowe ludzkiej neuroblastomy (linia SH-SY5Y). Jednym z kluczowych elementów mojego stażu było izolowanie mitochondriów z wątroby myszy, co pozwoliło na dokładniejsze badania ich funkcji i reakcji na wprowadzone substancje. Wykonywałem pomiary oksygraficzne, zarówno z użyciem izolowanych mitochondriów, jak i całych komórek SH-SY5Y, aby zrozumieć bioenergetyczne mechanizmy działania leków.

Dodatkowo, zastosowałem techniki biologii molekularnej, takie jak transfekcja ludzkich komórek konstruktami umożliwiającymi znakowanie fluorescencyjne mitochondriów (mitoDsRed). Dzięki temu miałem możliwość obrazowania struktur komórkowych za pomocą

mikroskopii konfokalnej, co znacząco wzbogaciło moje badania. Efektem tego stażu są prace opublikowane wspólnie z prof. Joaquinem Jordanem, oznaczone jako **C1, C2, P17** (Załącznik 4a).

**15 – 21 września 2014 – staż naukowo-badawczy w Zakładzie Struktury i Funkcji Błon Biologicznych na Wydziale Biologii Strukturalnej i Bioinformatyki, Wolnego Uniwersytetu Brukselskiego w Belgii, finansowany przez polsko-belgijski projekt badawczy w ramach porozumienia o współpracy naukowej między PAN i FRS-FNRS pt. “Molekularne uwarunkowania transportu nukleotydów przez kanał VDAC”, koordynowany przez prof. Hannę Kmitę (strona polska) i prof. Fabrice’a Homble (strona belgijska).** Projekt ten zakładał międzynarodową wymianę pracowników naukowych, a ja miałem przyjemność być jednym z kilku uczestników z polskiego zespołu.

W ramach tego projektu do Polski przyjeżdżali również belgijscy naukowcy, w tym wybitny i doświadczony fizjolog Prof. Fabrice Homble, specjalizujący się w technikach pomiarów elektrofizjologicznych kanałów VDAC. Profesor Homble pełnił rolę mojego mentora, przekazując mi niezbędną wiedzę teoretyczną i praktyczną. Dzięki jego wsparciu nauczyłem się, jak prawidłowo konfigurować sprzęt, optymalizować pomiary i przeprowadzać analizy metodą BLM.

Podczas mojego stażu skoncentrowałem się na nauce wykonywania pomiarów w sztucznych błonach lipidowych, co było kluczowym elementem dla osiągnięcia celów badawczych w ramach całego cyklu prac dotyczących pomiarów aktywności kanałowych VDAC (**C1, C3, C5, P20**, załącznik 4a). Wiedza i doświadczenie, które zdobyłem podczas tego stażu, znacząco przyczyniły się do realizacji moich badań.

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

### **6.1. Działalność dydaktyczna**

Prowadzę zajęcia dydaktyczne na Wydziale Psychologii oraz Biologii UAM, obejmując różnorodne kursy i przedmioty. W ciągu mojej kariery akademickiej miałem przyjemność współpracować przy wielu pracach dyplomowych. Byłem promotorem 14 prac licencjackich, 3 prac magisterskich oraz pełniłem funkcję promotora pomocniczego w 3 pracach doktorskich,

z których jedna została już zakończona. Moje doświadczenie w pracy dydaktycznej oraz współpracy z młodymi naukowcami jest dla mnie źródłem wielkiej satysfakcji.

### **6.1.1. Prowadzone zajęcia dydaktyczne**

Od roku 2009 prowadzę zajęcia dydaktyczne zarówno na Wydziale Psychologii UAM, jak i na Wydziale Biologii UAM. Na Wydziale Psychologii prowadzę zajęcia z przedmiotu o nazwie "Wprowadzenie do psychologii biologicznej", który ma na celu zorientowanie studentów w podstawowych mechanizmach i teoriach leżących u podstaw opisu człowieka jako istoty biologicznej

W ramach Wydziału Biologii, prowadziłem szereg kursów eksperymentalnych, w tym "Inżynieria białek", "Enzymologia" oraz "Biochemia". Jestem prowadzącymi i koordynatorem najnowszej wersji przedmiotu "Systemy eukariotyczne w inżynierii białek". Opracowałem nie tylko jego aktualną wersję, ale również znacząco przyczyniłem się do kształtu pierwotnej edycji tego kursu. Jestem jednym z prowadzących oraz koordynatorów przedmiotu dla studentów kierunku biotechnologia o nazwie "Wykorzystanie organizmów modyfikowanych genetycznie w procesach produkcyjnych". Dodatkowo, prowadzę również część zajęć laboratoryjnych na przedmiocie "Hodowla organizmów modelowych wykorzystywanych w biotechnologii". W tej części skupiamy się przede wszystkim na drożdżach jako jednym z kluczowych organizmów modelowych w biotechnologii. Studenci uczą się, jak hodować drożdże, jakie są ich właściwości i jak można je wykorzystać w badaniach naukowych oraz w produkcji przemysłowej. Moje doświadczenie w pracy z drożdżami pozwala mi przekazać studentom praktyczną wiedzę na temat tego ważnego organizmu modelowego.

Prowadzę dwa przedmioty w języku angielskim: "Basic Molecular Methods" oraz "Molecular Basis of Cytoprotection", dla studentów anglojęzycznych.

Jestem również zaangażowany w działalność mentoringową i tutoringową. W ramach programu "Kierowanie rozwojem aktywności badawczej – WILK (Wsparcie i Lokowanie Kompetencji)" miałem okazję prowadzić indywidualne sesje tutoringowe z dwoma studentami, a także pełniłem rolę mentora dla czterech innych uczestników programu.

W kontekście dodatkowych zadań dydaktycznych, sporządziłem część protokołów laboratoryjnych dla przedmiotu "Podstawy biogerontologii", oferowanego na kierunku "Neurobiologia".

## 6.1.2. Promotorstwo prac licencjackich, magisterskich i doktorskich

Rodzaj pracy	Liczba prac
Prace licencjackie	14
Prace magisterskie	3
Prace doktorskie (promotor pomocniczy)	1 (zakończony) + 2 (trwające)

### 6.1.2.1. Prace licencjackie

1. Temat pracy: „Analiza funkcjonalna białka kanałowego Tom40, po jego nadekspresji w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*”.

Autor: Kamil Swędrowski

Data egzaminu: 15 lipca 2015

2. Temat pracy: „Wykorzystanie metody MTT do oceny przeżywalności komórek szczurzego modelu choroby Huntingtona w warunkach hamowania fragmentacji mitochondriów”.

Autor: Adrian Sobusiak

Data egzaminu: 15 lipca 2015

3. Temat pracy: „Konstrukcja szczepów *Saccharomyces cerevisiae* z nadekspresją białka YVDAC2”.

Autor: Michał Paruzel

Data egzaminu: 20 lipca 2016

4. Temat pracy: „Ocena statusu energetycznego komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych funkcjonalnego białka VDAC2”.

Autor: Paweł Pawelczak

Data egzaminu: 20 września 2016

5. Temat pracy: „Energetyka męskich komórek rozrodczych i jej znaczenie w niepłodności”.

Autor: Monika Kaczorowska

Data egzaminu: 11 lipca 2017

6. Temat pracy: „Zaburzenia dynamiki mitochondriów w chorobie Alzheimera”.

Autor: Katarzyna Kurek

Data egzaminu: 19 września 2017



7. Temat pracy: „Heterologiczna ekspresja białka VDAC niesporczaka *Hypsibius dujardini* w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”.  
Autor: Agnieszka Walkowiak  
Data egzaminu: 12 lipca 2018
8. Temat pracy: „Mutacje w genie VDAC3 u pacjentów z małą ruchliwością plemników”.  
Autor: Joanna Budzik  
Data egzaminu: 22 lipca 2019
9. Temat pracy: „Alternatywne warianty splicingowe genu VDAC3 w plemnikach człowieka”.  
Autor: Ewelina Hejenkowska  
Data egzaminu: 20 sierpnia 2019
10. Temat pracy: „Rola białka VDAC3 w patogenezie chorób człowieka”.  
Autor: Anna Wierzbicka  
Data egzaminu: 10 października 2019
11. Temat pracy: „Konstrukcja transgenicznego szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zawierającego gen pcVDAC z fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus* L.)”.  
Autor: Paulina Śliska  
Data egzaminu: 14 września 2020
12. Temat pracy: „Ekspresja rekombinowanego ludzkiego białka ACE2 wbudowanego w ścianę komórkową drożdży”.  
Autor: Weronika Śliwińska  
Data egzaminu: 15 lipca 2022
13. Temat pracy: „Ekspresja hybrydowego białka hVDAC2-hVDAC3 i jej wpływ na fenotyp drożdży”.  
Autor: Katarzyna Krawczyk  
Data egzaminu: 5 września 2022
14. Temat pracy: „Konstrukcja oraz analiza fenotypu drożdży z ekspresją genu kodującego ludzkie białko Tom70”.  
Autor: Varvara Vonsovyh  
Data egzaminu: 18 lipca 2023

#### **6.1.2.2. Prace magisterskie**

1. Temat pracy: „Wpływ delekcji genu kodującego dysmutazę anionorodnika ponadtlenkowego (CuZn-SOD) na funkcjonowanie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z ekspresją izoform ludzkiego białka VDAC”  
Autor: Martyna Baranek-Grabińska  
Data egzaminu: 26 lipca 2019
2. Temat pracy: Analiza funkcjonalna mutacji w genie kodującym ludzkie białko VDAC3  
Autor: Agnieszka Walkowiak  
Data egzaminu: 15 października 2020
3. Temat pracy: “Analysis of functional differences between human VDAC3 isoforms”  
(praca w j. angielskim)  
Autor: Ewelina Hejenkowska  
Data egzaminu: 14 września 2022

### 6.1.2.3. Prace doktorskie

**1 zakończony przewód doktorski, w którym pełniłem funkcję promotora pomocniczego.**

**imię i nazwisko doktora:** Daria Grobys; tytuł rozprawy doktorskiej: „Udział kanału VDAC w patogenezie choroby Huntingtona w oparciu o badania modeli komórkowych”; afiliacja przewodu doktorskiego: Wydział Biologii UAM, IBMiB, Zakład Bioenergetyki; data wszczęcia przewodu: styczeń 2017; data nadania stopnia naukowego: 23 marca 2018.

Obecnie - promotor pomocniczy w dwóch realizowanych prac doktorskich:

1. **Imię i nazwiska doktorantki:** mgr Martyna Baranek-Grabińska  
**Temat:** „Udział ludzkich paralogów białka VDAC w przeciwdziałaniu skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem dysmutaz wewnątrzkomórkowych”.  
**Promotor:** prof. Hanna Kmita
2. **Imię i nazwisko doktoranta:** mgr Wojciech Grabiński  
**Temat:** „System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2”.  
**Promotor:** prof. Hanna Kmita

### 6.1.3. Recenzowanie prac dyplomowych

Rodzaj recenzowanej pracy	Liczba prac
Prace licencjackie	8
Prace magisterskie	3
Prace doktorskie	1

#### 6.1.3.1. Recenzowanie prac licencjackich

1. Temat pracy: „Subkomórkowa lokalizacja przetwarzania małych jąderkowych RNA (snoRNA) do krótkich RNA”  
Autor: Anna Wasilewska  
Promotor: Kamilla Grzywacz  
Data egzaminu: 7 lipca 2017
2. Temat pracy: „Ocena przeżywalności komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych dysmutazy ponadtlenkowej 1 ( $\Delta$ SOD1) i z ekspresją białka rozprzęgającego ameby *Acanthamoeba castellanii*”  
Autor: Katarzyna Jasiewicz  
Promotor: Nina Antos-Krzemińska  
Data egzaminu: 19 września 2017
3. Temat pracy: „Analiza przeżywalności komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych dysmutazy ponadtlenkowej 2 ( $\Delta$ SOD2) i z ekspresją białka rozprzęgającego ameby *Acanthamoeba castellanii*”  
Autor: Klaudia Grądzka  
Promotor: Nina Antos-Krzemińska  
Data egzaminu: 19 września 2017
4. Temat pracy: „Ekspresja alternatywnej oksydazy w kontekście dysfunkcji mitochondrialnych, perspektywy terapeutyczne”  
Autor: Karolina Kulesza  
Promotor: Nina Antos-Krzemińska  
Data egzaminu: 30 października 2017

5. Temat pracy: „Znaczenie hamowania aktywności kinazy difosforanów nukleozydów (NDPK) dla oddychania komórek ameby *Acanthamoeba castellanii*”  
Autor: Oliwia Kozakiewicz  
Promotor: Andrzej Woyda-Płoszczyca  
Data egzaminu: 23 lipca 2018
6. Temat pracy: „Analiza oddziaływania białka HNRNP UL1 z cząsteczką U7 snRNA z zastosowaniem techniki immunoprecypitacji RNA”  
Autor: Izabela Szcześniak  
Promotor: Katarzyna Raczyńska  
Data egzaminu: 20 sierpnia 2019
7. Temat pracy: „Analiza oddziaływań genetycznych pomiędzy roślinnymi homologami podjednostek acetylotransferazy NuA4 i wybranymi czynnikami transkrypcyjnymi kontrolującymi rozwój aparatu fotosyntetycznego”  
Autor: Katarzyna Hubert  
Promotor: Tomasz Bieluszewski  
Data egzaminu: 20 września 2019
8. Temat pracy: „Rola mitochondriów w patomechanizmie oraz terapii dystrofii mięśniowej Duchenne’a”  
Autor: Aleksandra Karzycka  
Promotor: Patryk Konieczny  
Data egzaminu: 20 października 2021

#### **6.1.3.2. Recenzowanie prac magisterskich**

1. Temat pracy: “Biotechnological production of the major latex protein from *Chelidonium majus* L. for biomedical purposes” (praca w j. angielskim)  
Autor: Oliwia Mazur  
Promotor: Robert Nawrot  
Data egzaminu: 19 lipca 2021
2. Temat pracy: “Purification of the recombinant glycine-rich protein from *Chelidonium majus* L. for its potential biomedical use”  
Autor: Aleksy Krasicki  
Promotor: Robert Nawrot  
Data egzaminu: 30 września 2022

3. Temat pracy: "Purification of the recombinant major latex protein (CmMLP) with antiviral potential from *Chelidonium majus* L."

Autor: Konrad Dziura

Promotor: Robert Nawrot

Data egzaminu: 18 lipca 2023

### 6.1.3.3. Recenzowanie pracy doktorskiej

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Molecular study of VDAC1 of *Saccharomyces cerevisiae*: Functional characterisation of the effect of lipids and of the addition of a 6xHistidine-tag on yeast VDAC1"

Autor pracy: Gaëlle Massart

Promotor: Fabrice Homblé

Kopromotor: Martine Prévost

Data obrony pracy doktorskiej: 05 października 2017

Afiliacja przewodu doktorskiego: Wolny Uniwersytet Brukselski, Wydział Chemii

### 6.1.4. Inne osiągnięcia dydaktyczne

- Tłumaczenie dwóch rozdziałów: „Węglowodany” oraz „Kanały i pompy błonowe” w podręczniku Berg i in. (2018) *Biochemia*. PWN Warszawa, wydanie V.
- Tłumaczenie rozdziału: „Transport przez błony” w podręczniku Alberts i in. (2019) *Podstawy biologii komórki*. PWN Warszawa, wydanie III.
- 19-30.08.2019 - opieka nad stażystą w programie Staży Badawczo-Rozwojowych E(x)plory 2019 realizowanych przez Fundację Zaawansowanych Technologii.
- Od 2022 – obecnie - opiekun naukowy lic. Weroniki Śliwińskiej – laureatki grantu badawczego „Study@research”, realizowanego w ramach Programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”, UAM.

## 6.2. Działalność organizacyjna

- 2015 – opiekun I roku Biotechnologii na Wydziale Biologii UAM

- 2017 - członek komitetu organizacyjnego konferencji naukowej „6th Mitochondrion”
- 2020 - obecnie – członek Zespołu Oceniającego na Wydziale Biologii UAM.

### **6.3. Działalność popularyzatorska**

- 2015 r. prowadzenie pokazów laboratoryjnych pt. „Kolorowa kuchnia biochemiczna u biologów” na Poznańskim Festiwalu Nauki i Sztuki
- 2017 – przygotowanie i prowadzenie warsztatów/laboratoriów pt. „Z wizytą u śluzowca” w ramach IV Edycji Dni Akademickich zorganizowanych dla uczniów klas patronackich Wydziału Biologii UAM.
- 2018 - przygotowanie i prowadzenie warsztatów pt. „Niesporczaki - wodne cwaniaki” w ramach Nocy Naukowców.
- 2021 – wykład pt. „Mikrobohaterowie w akcji, czyli jak drożdże pomagają nam w badaniach naukowych” na Dniach Kandydata UAM.

## **7. Inne informacje, dotyczące kariery zawodowej.**

### **7.1. Uzyskane nagrody i wyróżnienia**

- 2010 - stypendium w ramach projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.
- 2010 - grant wyjazdowy na 16 Europejską Konferencję Bioenergetyczną – EBEC w Warszawie.
- 2010 - stypendium wyjazdowe „10th Young Scientist Forum” w Göteborg (Szwecja), organizowane przez Europejską Federację Towarzystw Biochemicznych (FEBS).
- 2012 - stypendium Fundacji Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza.
- 2012 - wyróżnienie Dziekana Wydziału Biologii za osiągnięcia naukowe uzyskane w czasie studiów doktoranckich na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w roku akademickim 2011/2012.
- 2012 - stypendium Miasta Poznania dla młodych badaczy.
- 2013 - wyróżnienie pracy doktorskiej przez Radę Wydziału Biologii.

- 2014 - wyróżnienie za plakat prezentowany podczas III Konferencji Naukowo-Dydaktycznej Wydziału Biologii UAM.
- 2017 - nagroda Zespołowa III stopnia Rektora UAM za osiągnięcia w pracy naukowej.

## **7.2. Ukończone kursy i szkolenia**

- 5 – 7 lutego 2015 – szkolenie dla pracowników Wydziału Biologii, UAM w Poznaniu, uprawniające do korzystania z metod e-learningu i b-learningu w kształceniu studentów.
- 10-14 września 2018 – ukończony kurs „Programowanie w języku Python dla początkujących”, organizowany przez Zintegrowane Centrum Podnoszenia Kompetencji WNGiG UAM Poznań.
- 11 maja 2022 – ukończone zaawansowane szkolenie ze spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS).
- 7 września – 9 grudnia 2022 – ukończenie Szkoły Tutorów Akademickich i uzyskanie certyfikatu tutora I stopnia.

.....

(podpis wnioskodawcy)