

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

**Wydział Biologii**

**Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii**

**Zakład Bioenergetyki**



**Rozprawa doktorska**

**Udział ludzkich paralogów białka VDAC w przeciwdziałaniu  
skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem  
dysmutaz wewnątrzkomórkowych**

**Martyna Baranek-Grabińska**

**Promotor: prof. dr hab. Hanna Kmita**

**Promotor pomocniczy: dr hab. Andonis Karachitos**

**Poznań, 2024**

**Adam Mickiewicz University in Poznań**  
**Faculty of Biology**  
**Institute of Molecular Biology and Biotechnology**  
**Department of Bioenergetics**



**Doctoral thesis**

**The role of human VDAC protein paralogs in counteracting the effects of oxidative stress induced by the lack of intracellular superoxide dismutases**

**Martyna Baranek-Grabińska**

**Supervisor: prof. dr hab. Hanna Kmita**

**Assistant supervisor: dr hab. Andonis Karachitos**

**Poznań, 2024**

Podziękowania dla:

prof. dr hab. Hanny Kmity za pomoc, wsparcie  
i gotowość do rozwiązywania pojawiających się problemów

dr. hab. Andonisa Karachitosa za wspólną pracę,  
zaangażowanie, cenne wskazówki i wsparcie na każdym etapie

pracowników i doktorantów Zakładu Bioenergetyki  
za wspólnie spędzone chwile podczas prowadzenia badań

mojego męża Wojtka za wspólną pracę, cierpliwość  
i nieocenione wsparcie pod każdym względem

rodziny i przyjaciół,  
którzy wspierali mnie w trudnych chwilach

## Spis treści

Spis treści .....	4
Spis używanych skrótów .....	5
Streszczenie .....	6
Życiorys .....	8
1. Aktywność naukowa i osiągnięcia doktorantki.....	9
2. Lista powiązanych tematycznie publikacji naukowych składających się na rozprawę doktorską .....	12
2.1. Osiągnięcia w ramach rozprawy doktorskiej .....	12
3. Opis wyników rozprawy doktorskiej .....	13
3.1. Cel rozprawy .....	13
3.2. Wstęp.....	14
3.3. Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej.....	17
3.4. Podsumowanie .....	25
3.5. Finansowanie badań w ramach rozprawy doktorskiej.....	27
3.6. Bibliografia.....	28
4. Załączane publikacje oraz oświadczenia doktorantki i współautorów .....	34

## **Spis używanych skrótów**

VDAC – voltage dependent anion-selective channel (*pol.* zależny od napięcia kanał o selektywności anionowej)

ROS – reactive oxygen species (*pol.* reaktywne formy tlenu)

rsVDAC – redox-sensitive VDAC (*pol.* VDAC wrażliwy na stan redukcyjno-oksydacyjny)

SOD – superoxide dismutase (*pol.* dysmutaza ponadtlenkowa)

## Streszczenie

W mitochondriach zachodzi proces oddychania komórkowego, którego substraty i metabolity są transportowane przez kanał VDAC zlokalizowany w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. To białko kanałowe transportuje również drobne cząsteczki i jony nieorganiczne oraz oddziałuje z wieloma białkami mitochondrialnymi i komórkowymi, dzięki czemu pośredniczy w regulacji funkcjonowania mitochondriów i całej komórki. VDAC może występować w postaci paralogów, np. u drożdży występują 2 paralogi (yVDAC1 i yVDAC2), a u człowieka występują 3 (hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3), podobnie jak u innych ssaków i kręgowców.

Podczas procesu oddychania komórkowego, oprócz cząsteczek „niosących” energię, powstają także reaktywne formy tlenu (ROS, *ang.* reactive oxygen species), których nadmiar w komórce zwiększa ryzyko uszkodzeń i mutacji. Naturalnie nadmiar ROS usuwają enzymy antyoksydacyjne, wśród których kluczową rolę pełni dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), występująca w komórkach w postaci dwóch form. SOD1 (CuZnSOD) występuje w różnych strukturach komórkowych, także w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej, natomiast SOD2 (MnSOD) zlokalizowana jest w macierzy mitochondrialnej. Zwiększony poziom ROS stanowi wskaźnik stresu oksydacyjnego, któremu z kolei komórka może przeciwdziałać uruchamiając odpowiednie mechanizmy obronne. Dostępne dane wskazują, że w odpowiedzi komórek człowieka na stres oksydacyjny istotną rolę może odgrywać hVDAC3, któremu przypisuje się funkcję czujnika stanu redukcyjno-oksydacyjnego (stan redoks; *ang.* redox sensitive VDAC; rsVDAC), co z kolei wynikać może z liczby oraz swoistej lokalizacji reszt cysteiny w sekwencji tego białka.

W związku z tym, celem niniejszej pracy było określenie częstości występowania rsVDAC poza grupą kręgowców oraz skonstruowanie modelu drożdżowego pozwalającego na analizę funkcjonalności poszczególnych paralogów VDAC człowieka w warunkach stresu oksydacyjnego. W realizacji tego celu wykorzystano narzędzia do przewidywania struktur drugorzędowych badanych białek, a następnie rozmieszczenia reszt cysteiny, w celu określenia częstości występowania rsVDAC w zależności od liczby paralogów VDAC oraz poziomu złożoności organizmów, ich środowiska życia i ich trybu życia oraz technikę CRISPR/Cas9 dla otrzymania modelu opartego na komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, w których dokonano heterologicznej ekspresji genów kodujących hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3 (hVDAC3 także w wariantcie pozbawionym reszt cysteiny - hVDAC3ΔCys) w warunkach nieobecności genów kodujących yVDAC1 i yVDAC2 oraz usunięto geny kodujące SOD1 i SOD2.

Uzyskane wyniki wskazują, że: (1) rsVDAC może być jedynym wariantem VDAC w mitochondriach, a jego obecność może korelować z warunkami siedliskowymi, ponieważ rsVDAC wydaje się być powszechny u pasożytów, co z kolei sugeruje, że kanał ten może pośredniczyć w wykrywaniu i adaptacji do warunków środowiskowych; (2) genotyp komórek drożdży *S. cerevisiae* może mieć istotne znaczenie dla ich wykorzystania w badaniach hVDAC, w tym szczególnie hVDAC3, ze względu na jego wpływ na wewnątrzkomórkowy stan redoks i (3) hVDAC3 może chronić komórkę w warunkach stresu oksydacyjnego w sposób nie wymagający obecności dysmutaz ponadtlenkowych i prowadzący się do uruchomienia swojego stanu bioenergetycznego mitochondriów związanego z intensywną syntezą ATP, co z kolei wymaga obecności w tym białku reszt cysteiny. Wyniki te poszerzają wiedzę na temat rozpowszechnienia występowania rsVDAC w mitochondriach zwierząt oraz swoistej roli hVDAC3 w warunkach stresu oksydacyjnego.

The process of cellular respiration takes place in the mitochondria, whose substrates and metabolites are transported through the VDAC channel located in the outer mitochondrial membrane. This channel protein also transports small molecules and inorganic ions and interacts with many mitochondrial and cellular proteins, thus mediating the regulation of mitochondrial and whole cell function. VDAC can exist in the form of paralogs, e.g. in yeast there are 2 paralogs (yVDAC1 and yVDAC2), and in humans there are 3 (hVDAC1, hVDAC2 and hVDAC3), as in other mammals and vertebrates.

During the process of cellular respiration, in addition to molecules "carrying" energy, reactive oxygen species (ROS) are also produced, the excess of which in the cell increases the risk of damage and mutations. Naturally, the excess of ROS is removed by antioxidant enzymes, among which the key role is played by superoxide dismutase (SOD), which occurs in cells in the form of two forms. SOD1 (CuZnSOD) is found in various cellular structures, including the mitochondrial intermembrane space, while SOD2 (MnSOD) is localized in the mitochondrial matrix. Increased ROS levels are an indicator of oxidative stress, which in turn can be counteracted by the cell by activating appropriate defense mechanisms. Available data indicate that hVDAC3 may play an important role in the response of human cells to oxidative stress, which is attributed to the function of a sensor of the reduction-oxidation state (redox state; redox sensitive VDAC; rsVDAC), which in turn may be due to the number and specific location of cysteine residues in the sequence of this protein.

Therefore, the aim of this study was to determine the frequency of rsVDAC occurrence outside the vertebrate group and to construct a yeast model to analyze the functionality of individual human VDAC paralogs under oxidative stress conditions. In pursuit of this goal, tools were used to predict the secondary structures of the studied proteins, followed by the distribution of cysteine residues, in order to determine the frequency of rsVDACs depending on the number of VDAC paralogs and the level of complexity of the organisms, their living environment and their lifestyle, and the CRISPR/Cas9 technique to obtain a model based on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells, in which the genes encoding hVDAC1, hVDAC2 and hVDAC3 (hVDAC3 also in a variant devoid of cysteine residues - hVDAC3 $\Delta$ Cys) were heterologously expressed in the absence of the genes encoding yVDAC1 and yVDAC2 and the genes encoding SOD1 and SOD2 were deleted.

The obtained results indicate that: (1) rsVDAC may be the only VDAC variant in mitochondria and its presence may correlate with habitat conditions, as rsVDAC seems to be common in parasites, which in turn suggests that this channel may mediate sensing and adaptation to environmental conditions; (2) the genotype of *S. cerevisiae* yeast cells may be important for their use in hVDAC studies, including hVDAC3 in particular, due to its effect on the intracellular redox state and (3) hVDAC3 may protect the cell under oxidative stress conditions in a way that does not require the presence of superoxide dismutases and comes down to the activation of a specific bioenergetic state of mitochondria associated with intensive ATP synthesis, which in turn requires the presence of cysteine residues in this protein. These results expand the knowledge on the prevalence of rsVDAC in animal mitochondria and the specific role of hVDAC3 under oxidative stress conditions.

## Życiorys

W 2014 roku rozpoczęłam studia licencjackie na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na kierunku biotechnologia, a lipcu 2017 zakończyłam ten etap studiów obroną pracy dyplomowej zrealizowanej w Zakładzie Bioenergetyki zatytułowanej „Detekcja ekspresji izoform ludzkiego białka VDAC w komórkach drożdżowego modelu choroby Huntingtona metodą "Western blot"” której promotorem była prof. dr. hab. Hanna Kmita. Następnie kontynuowałam naukę na studiach magisterskich na tym samym kierunku i pozostając w Zakładzie Bioenergetyki wykonałam badania do pracy magisterskiej pod opieką dr. hab. Andonisa Karachitosa pt. „Wpływ delekcji genu kodującego dysmutazę anionorodnika ponadtlenkowego (CuZn-SOD) na funkcjonowanie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z ekspresją izoform ludzkiego białka VDAC”, którą obroniłam w 2019 roku uzyskując tytuł magistra biotechnologii. W trakcie studiów magisterskich wzięłam udział w programie Erasmus+, w ramach którego spędziłam semestr na Uniwersytecie Jaen w Hiszpanii i studiowałam na kierunku biotechnologia i biomedycyna (*hiszp.* Biotecnología y Biomedicina).

Podczas całego okresu studiów działałam także aktywnie w Kole Naukowym Przyrodników UAM w ramach Sekcji Medycyny Regeneracyjnej i Badań nad Nowotworami, biorąc udział w organizacji warsztatów popularnonaukowych w ramach corocznych wydarzeń popularyzujących naukę takich jak Noc Naukowców, Noc Biologów czy Poznański Festiwal Nauki i Sztuki.

Ponadto, po ukończeniu studiów magisterskich odbyłam trzymiesięczny staż w Zespole Genomiki Porównawczej Roślin Strączkowych Instytutu Genetyki Roślin PAN (VII 2019 - IX 2019), finansowany z projektu Unii Europejskiej „Bądź konkurencyjny na rynku pracy - wysokiej jakości programy stażowe dla studentów Wydziału Biologii UAM w Poznaniu” nr POWR.03.01.00-00-S145/17.

W październiku 2019 rozpoczęłam kształcenie w ówczesnej Szkole Doktorskiej UAM (po reorganizacji jest to Szkoła Doktorska Nauk Przyrodniczych UAM) realizując projekt doktorski pt. „Udział ludzkich paralogów białka VDAC w przeciwdziałaniu skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem dysmutaz wewnątrzkomórkowych”, której promotorem jest prof. dr. hab. Hanna Kmita, a promotorem pomocniczym dr. hab. Andonis Karachitos.

W latach 2020-2023 brałam udział w projekcie badawczym nr 6/2020 „System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2”, w ramach konkursu na badania nad COVID-19 finansowanego przez Rektora Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, którego kierownikiem był dr. hab. Andonis Karachitos.

W czasie pracy nad rozprawą doktorską brałam udział w wielu konferencjach naukowych, na których miałam okazję prezentować wyniki mojej pracy, zarówno w postaci wystąpień ustnych jak i plakatów konferencyjnych. W sumie, byłam pierwszą autorką 6 posterów konferencyjnych oraz 2 wystąpień ustnych. Dodatkowo, byłam współautorką 7 posterów konferencyjnych oraz 2 wystąpień ustnych. Szczegółowe informacje na ten temat przedstawiono w rozdziale 1.2. Prezentacja wyników na konferencjach naukowych.



# 1. Aktywność naukowa i osiągnięcia doktorantki

## 1.1. Projekty badawcze

### 1.1.1. Projekty badawcze własne

Grant 017/02/SNP/0008 w konkursie ID-UB 017 Minigranty Doktoranckie „Analiza fluorescencyjna obecności anionorodnika ponadtlenkowego oraz stanu funkcjonalnego mitochondriów w komórkach modelu drożdżowego do badania udziału paralogów ludzkiego białka VDAC w przeciwdziałaniu skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem wewnątrzkomórkowych dysmutaz ponadtlenkowych”

### 1.1.2. Udział w realizacji projektów badawczych

- „System drożdżowy do przeszukiwania inhibitorów głównej proteazy SARS-CoV-2”, nr 6/2020, w ramach konkursu na badania nad COVID-19 finansowanego przez Rektora Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, kierownik dr hab. Andonis Karachitos

Przeprowadzanie testów przeżywalności komórek drożdży wykorzystywanych w stworzonym systemie drożdżowym. Badania skoncentrowane były na systemie drożdżowym, w którym zachodziła ekspresja głównej proteazy SARS-CoV-2 (Mpro). Celem było przesiewowe poszukiwanie inhibitorów Mpro. Testy przeprowadzono przy użyciu techniki płytek dyfuzyjnych. Procedura obejmowała wysianie komórek drożdży na szalki z pożywką stałą, a następnie nanoszenie filtrów nasączonych badanymi lekami. Po inkubacji analizowano różnice w wzroście drożdży, co pozwoliło na identyfikację potencjalnych inhibitorów Mpro.

- „Mitochondrialne markery skutecznej anhydrobiozy u przedstawicieli niesporczaków wodnych i lądowych” (NCN 2016/21/B/NZ4/00131), kierownik prof. dr hab. Hanna Kmita

Pomoc w prowadzeniu hodowli niesporczaków.

- „Kanał VDAC jako cel działania huntingtyny w rozwoju choroby Huntingtona,” (NCN2011/01/B/NZ3/00359), kierownik prof. dr hab. Hanna Kmita

Realizacja pracy licencjackiej pt. „Detekcja ekspresji izoform ludzkiego białka VDAC w komórkach drożdżowego modelu choroby Huntingtona metodą „Western blot””

## 1.2. Prezentacja wyników na konferencjach naukowych:

### 1.2.1. Prezentacje ustne

- **Baranek-Grabińska M.**, Karachitos A., Grabiński W., Skrzypczak T., Kmita H., „The role of human VDAC paralogs under oxidative stress induced by the absence of superoxide dismutases“, V Kongres BIO 2023, 13-16.09.2023, Szczecin
- Grabiński W., Kicińska A., Kosicka E., **Baranek-Grabińska M.**, Hejenkowska E., Budzik J., Śliska P., Śliwińska W., Karachitos A., „An Effective Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease Revealed by Yeast System“, V Kongres BIO 2023, 13-16.09.2023, Szczecin
- **Baranek M.**, Walkowiak A., Hejenkowska E., Grabiński W., Kmita H., Karachitos A., „Functional analysis of mutation in VDAC3 encoding gene“, 9th Mitochondrion 2021, 27.01.2021 (On-line)
- Grabiński W., **Baranek M.**, Karachitos A., Kmita H., „The yeast *Saccharomyces cerevisiae* VDAC depleted mutants – phenotype update“, 9th Mitochondrion 2021, 27.01.2021 (On-line)

### 1.2.2. Plakaty konferencyjne

- Grabiński W., Kosicka E., Kicińska A., **Baranek-Grabińska M.**, Śliska P., Hejenkowska E., Budzik J., Śliwińska W., Karachitos A. „Identification of novel inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2 using a yeast-based system“, 10. Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne „Symbioza“, 12-14.05.2023, Warszawa
- Hejenkowska E., **Baranek M.**, Grabiński W., Kmita H., Karachitos A., „Analysis of functional differences between human VDAC3 isoforms“, 18th Congress of the Polish Biophysical Society (PTBF), 6-9.09.2022, Warszawa
- **Baranek M.**, Karachitos A., Grabiński W., Kmita H., „Filial worms and mammalian spermatozoa are likely to sense environmental stress in a similar way“, The Biochemistry Global Summit, 9-14.07.2022 Lizbona, Portugalia.
- **Baranek M.**, Karachitos A., Grabiński W., Kmita H., „Filial worms and mammalian spermatozoa are likely to sense environmental stress in a similar way“, IUBMB-FEBS-PABMB Young Scientists' Forum (YSF 2022), 6-9.07.2022 Vimeiro, Portugalia.
- Grabiński W., Kosicka E., **Baranek M.**, Śliska P., Hejenkowska E., Budzik J., Karachitos A., „A yeast-based screening assay identifies drug that inhibit SARS-CoV-2 main protease“, The Biochemistry Global Summit, 9-14.07.2022 Lizbona, Portugalia,
- Grabiński W., Kosicka E., **Baranek M.**, Śliska P., Hejenkowska E., Budzik J.,

Karachitos A., „A yeast-based screening assay identifies drug that inhibit SARS-CoV-2 main protease”, IUBMB-FEBS-PABMB Young Scientists' Forum (YSF 2022), 6-9.07.2022 Vimeiro, Portugalia.

-**Baranek M.**, Grabiński W., Kmita H., Karachitos A., „ $\Delta sod1\Delta por1$  *Saccharomyces cerevisiae* double mutant phenotype and human VDAC isoforms”, 8th Mitochondrion 2020, 05.02.2020, Warszawa

#### **Plakaty konferencyjne przed rozpoczęciem kształcenia w szkole doktorskiej:**

- **Baranek M.**, Grabiński W., Kmita H., Karachitos A., „Is the  $\Delta sod1\Delta por1$  *Saccharomyces cerevisiae* double mutant phenotype suppressed by human VDAC isoforms?”, V International Conference on Research and Education Challenges for Contemporary Live Sciences, 8-13.04.2019, Poznań

- **Baranek M.**, Grabiński W., Kmita H., Karachitos A., „The phenotype of yeast *Saccharomyces cerevisiae* double mutants depleted of the copper-and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD) and voltage dependent anion channel (VDAC) encoding genes”, Kongres BIO 2018, 18-21.09.2018, Gdańsk

- Grobys D., Karachitos A., Grabiński W., **Baranek M.**, Kmita H., „The role of human VDAC1 in Huntington Disease pathogenesis: conclusions from the yeast model studies”, International Conference Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application, 15-18.05.2018, Rzeszów.

- Grobys D., Karachitos A., Grabiński W., **Baranek M.**, Kmita H., „Human VDAC1 and Huntington disease pathogenesis: conclusions from the yeast model studies”, 6th Mitochondrion – Bioenergetics Update, 08.12.2017, Poznań – POSTER WYRÓŻNIONY

- Grabiński W., **Baranek M.**, Grobys D., Karachitos A., Kmita H., „Wpływ znacznika auktroficznego *LEU2* na przeżywalność komórek drożdżowego modelu choroby Huntingtona”, „Zrozumieć naukę”, 30.09.2017, Łódź

- **Baranek M.**, Grabiński W., Grobys D., Karachitos A., Kmita H., „Weryfikacja funkcjonalna komórek *Saccharomyces cerevisiae* stanowiących model drożdżowy choroby Huntingtona”, „Zrozumieć naukę”, 30.09.2017, Łódź

## 2. Lista powiązanych tematycznie publikacji naukowych składających się na rozprawę doktorską

- Karachitos A, Grabiński W, **Baranek M**, Kmita H. Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis. *Front Physiol.* 2021 Dec 13;12:750627. doi: 10.3389/fphys.2021.750627.
- **Baranek-Grabińska M.**, Grabiński W., Musso D., Karachitos A., Kmita H. (2024) Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research. W trakcie recenzji w *International Journal of Molecular Sciences* (zeszyt tematyczny „Stress Response Research: Yeast as Models: 2nd Edition”)
- **Baranek-Grabińska M.**, Skrzypczak T., Kmita H., Karachitos A. Human VDAC3 as a sensor of intracellular redox state: contribution to cytoprotection mechanisms in oxidative stress. Manuskrypt przygotowany do wystania do *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*

### 2. 1. Osiągnięcia w ramach rozprawy doktorskiej

- Współtworzenie koncepcji i założeń badań, formułowanie pytań badawczych dotyczących cech strukturalnych białek oraz częstości występowania rsVDAC u zwierząt.
- Otrzymanie modelu drożdżowego wykorzystującego heterologiczną ekspresję ludzkich genów kodujących poszczególne paralogi VDAC (hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3 i wariantu hVDAC3 pozbawionego reszt cysteiny, tj. hVDAC3ΔCys) w komórkach *S. cerevisiae*, w tym w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego równoczesną delecją genów kodujących SOD1 i SOD2.
- Określenie przeżywalności komórek otrzymanego modelu przy wykorzystaniu testów płytkowych.
- Określenie stanu funkcjonalnego mitochondriów i poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach modelu zawierających białka hVDAC3 i hVDAC3ΔCys.

### 3. Opis wyników rozprawy doktorskiej

#### 3.1. Cel rozprawy

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy wariantu białka VDAC wrażliwego na wewnątrzkomórkowy stan redukcyjno-oksydacyjny (rsVDAC, *ang.* redox-sensitive VDAC), z czym wiąże się możliwość jego działania jako czujnik stanu redoks o istotnym znaczeniu w funkcjonowaniu mechanizmów cytoprotekcyjnych w warunkach stresu oksydacyjnego. Białko VDAC występuje u ludzi, podobnie jak u innych ssaków oraz kręgowców, w postaci trzech paralogów (hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3), w przypadku których w komórkach człowieka rolę czujnika stanu redoks przypisuje się paralogowi hVDAC3. Natomiast informacje na temat występowania takiego wariantu VDAC u bezkręgowców praktycznie nie istnieją. Nie są także dostępne dane dotyczące znaczenia genotypu komórek drożdży wykorzystywanych do badań funkcjonalnych paralogów hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3 w wyniku ich heterologicznej ekspresji oraz znaczenia usunięcia w tych komórkach dysmutaz ponadtlenkowych dla funkcjonalności hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3. W związku z tym, w ramach niniejszej rozprawy zostały sformułowane następujące cele:

- określenie występowania u bezkręgowców wariantu VDAC spełniającego definicję rsVDAC, z uwzględnieniem liczby paralogów oraz poziomu złożoności organizmów, ich środowiska życia i ich trybu życia,
- poznanie znaczenia genotypu komórek drożdży *S. cerevisiae* dla ich przeżywalności w warunkach heterologicznej ekspresji hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3, przy wykorzystaniu nowo skonstruowanego modelu drożdżowego pozbawionego obu paralogów drożdżowego białka VDAC,
- określenie wpływu eliminacji obu dysmutaz ponadtlenkowych na przeżywalność komórek skonstruowanego modelu drożdżowego w warunkach heterologicznej ekspresji hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3 oraz poziomu anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ), stanowiącego marker poziomu stresu oksydacyjnego, i stanu funkcjonalnego mitochondriów w tych komórkach.

### 3.2. Wstęp

Mitochondria są organellami niezbędnymi komórkom eukariotycznym do życia. Ich najbardziej znaną funkcją jest oddychanie komórkowe dające komórkom energię. Jednakże mitochondria uczestniczą także w regulacji wielu procesów zachodzących w komórkach, łącznie z tymi, które związane są ze śmiercią komórek<sup>1,2</sup>. Podczas oddychania komórkowego, w wyniku „wycieku” elektronów z łańcucha oddechowego, generowane są reaktywne formy tlenu (ROS-*ang.* reactive oxygen species) których mitochondria są głównym źródłem w komórce<sup>3,4</sup>. ROS są ważnymi cząsteczkami sygnałowymi w komórkach, lecz ich nadmiar, poprzez wysoką reaktywność tych cząsteczek, stwarza zagrożenie dla struktur i procesów komórkowych, co zaburza funkcjonowanie komórek<sup>5,6</sup>. Naturalnie procesy powstawania i usuwania ROS pozostają w równowadze, jednakże pod wpływem różnych wewnętrznych i zewnętrznych czynników stresowych może dochodzić do nierównowagi w produkcji i usuwaniu ROS oraz powstania stanu stresu oksydacyjnego<sup>4,7</sup>. Nadmiar ROS w komórce stanowi zagrożenie dla kwasów nukleinowych zwiększając ryzyko występowania mutacji, a także dla białek i tłuszczu<sup>3,4</sup>. W przypadku różnych chorób u ludzi, stres oksydacyjny może stanowić zarówno ich przyczynę jak i ich skutek<sup>8,9</sup>. Komórkami szczególnie narażonymi na negatywny wpływ stresu oksydacyjnego są komórki nerwowe i mięśniowe, gdyż mają duże zapotrzebowanie energetyczne i posiadają większą liczbę mitochondriów. Dysfunkcje mitochondrialne są więc ściśle związane ze stanem stresu oksydacyjnego w komórkach<sup>7,10</sup>.

Warunki środowiska, w którym znajduje się komórka czy też cały organizm wielokomórkowy wpływają na ich funkcjonowanie. Niezależnie od tego czy jest to organizm jedno- czy wielokomórkowy, jego odpowiedź na stres polega przede wszystkim na uruchomieniu podstawowych komórkowych mechanizmów obronnych. Działanie różnych typów stresu środowiskowego często sprowadza się ostatecznie do wywołania w komórce stresu oksydacyjnego, zatem reakcja komórek organizmu na stres środowiskowy polegać może między innymi na aktywacji enzymów antyoksydacyjnych<sup>11,12</sup>.

Jednym z kluczowych elementów obrony antyoksydacyjnej w komórce jest enzym z rodziny oksydoreduktaz - dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, *ang.* superoxide dismutase). Aktywność SOD polega na neutralizacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ), który w następnym kroku rozkładany jest przez katalazę<sup>13</sup>. Wewnątrz komórek eukariotycznych znajdują się dwie formy SOD: zależna od miedzi i cynku (SOD1, Cu-ZnSOD) zlokalizowana w różnych strukturach wewnątrzkomórkowych, w tym także w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej<sup>14-16</sup> i zależna od manganu (SOD2, MnSOD) zlokalizowana w macierzy mitochondrialnej<sup>16</sup>. Lokalizacja SOD1 i SOD2 umożliwia eliminację  $O_2^{\cdot-}$  powstającego po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej<sup>17</sup>. Co więcej, SOD1 może skutecznie przeciwdziałać uwalnianiu  $O_2^{\cdot-}$  z mitochondriów w wyniku jego transportu przez zewnętrzną błonę mitochondrialną<sup>18</sup>. Ponadto, biorąc pod uwagę lokalizację SOD1 w różnych przedziałach komórkowych, jak i proponowany ostatnio dla tego enzymu udział w regulacji transkrypcji (np. <sup>19</sup>), można stwierdzić, że deficyt aktywności SOD1 czy też całkowity brak tej aktywności w komórce bezpośrednio przyczyniają się do nasilenia stresu oksydacyjnego i zwiększają ryzyko jego negatywnego wpływu na funkcjonowanie komórek (np. <sup>20</sup>).

Kluczową rolę w transporcie przez zewnętrzną błonę mitochondrialną odgrywa białko VDAC (*ang.* voltage-dependent anion selective channel), które tworzy kanał transportujący jony

nieorganiczne i różnego rodzaju cząsteczki biorące udział w procesie oddychania komórkowego i innych procesach metabolicznych oraz w komunikacji między mitochondriami i komórką<sup>21-28</sup>. Jednym z metabolitów transportowanych przez kanał VDAC jest anionorodnik ponadtlenkowy, co wskazuje na udział tego kanału w regulacji stanu redukcyjno-oksydacyjnego (redoks) komórki u samego źródła powstawania ROS<sup>18,29</sup>. Kanał VDAC oddziałuje także z szeregiem białek mitochondrialnych i komórkowych, dzięki czemu pośredniczy i uczestniczy w integracji funkcji mitochondriów z aktywnością komórki<sup>30,31</sup>. W związku z tym, kanał VDAC uznawany jest za kluczowy dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów, jak i całej komórki<sup>24,32</sup>.

Co ciekawe, organizmy eukariotyczne mogą posiadać jeden lub więcej paralogów VDAC, a dostępne dane wskazują, że pojawianie się w toku ewolucji duplikacji genów kodujących białko VDAC występowało niezależnie od siebie w różnych liniach rozwojowych<sup>33,34</sup>. Paralogi VDAC różnią się poziomem ekspresji, sekwencją aminokwasową, aktywnością kanałową i udziałem w procesach komórkowych, co wskazuje na ich funkcjonalne i tkankowe zróżnicowanie, które nadal jest przedmiotem badań<sup>32,35-38</sup>. Najczęściej badanymi paralogami VDAC są paralogi ssaków, w tym człowieka<sup>32,37,39,40</sup>. Ludzie, podobnie jak inne ssaki, posiadają trzy paralogi białka VDAC, określane skrótami hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3<sup>35</sup>. Ich zróżnicowanie funkcjonalne jest związane z różnicami w poziomie ekspresji i aktywności kanałowej<sup>22</sup>, wynikających z niewielkich różnic w sekwencjach aminokwasowych, które skutkują niewielkimi różnicami w strukturze przestrzennej i oddziaływaniu z innymi białkami<sup>32,41</sup>. Geny kodujące hVDAC1 i hVDAC2 wykazują generalnie wyższy poziom ekspresji niż gen kodujący hVDAC3, jednakże w niektórych tkankach, takich jak jądra, mózg, nerki, serce i mięśnie szkieletowe, także hVDAC3 występuje w większej ilości<sup>36</sup>. Jedną ze zmiennych w sekwencji paralogów VDAC człowieka, podobnie jak innych organizmów, jest liczba i lokalizacja reszt cysteiny<sup>11,35</sup>. Białka te zawierają w swoich sekwencjach reszty cysteiny w różnym położeniu, jednak w niektórych przypadkach znajdują się one także w regionie końca N, co daje możliwość formowania mostków dwusiarczkowych utrzymujących koniec N w świetle kanału VDAC<sup>11,32,36</sup>, co z kolei uznawane jest za istotny element regulacji aktywności kanału<sup>36,42,43</sup>. W przypadku człowieka, paralog hVDAC1 zawiera 2 cysteiny, hVDAC2 ma ich 9, a hVDAC3 posiada 6, z czego przynajmniej dwie zlokalizowane są właśnie w regionie końca N białka<sup>42</sup>.

W zmiennych warunkach redoks w komórce reszty cysteiny są utleniane i redukowane, co uznaje się za istotny mechanizm regulacji bramkowania kanału VDAC i jego przepuszczalności, ale także „buforowania” poziomu ROS w mitochondriach<sup>32,36,42</sup>. Warto zaznaczyć, że utlenianie reszt cysteiny jest cechą charakterystyczną dla VDAC, niespotykaną wśród innych białek zewnętrznej błony mitochondrialnej<sup>44</sup>. Jest to kluczowa obserwacja dla definiowania niektórych paralogów VDAC jako czujników stanu redoks<sup>22,38</sup>, co niewątpliwie ma podstawowe znaczenie w regulacji funkcjonowania mitochondriów, w tym odpowiedzi na stres oksydacyjny<sup>32,36</sup>. Dostępne dane wskazują, że rolę czujnika stanu redoks w komórkach człowieka może odgrywać paralog VDAC3<sup>29,36,42</sup>.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są szeroko wykorzystywanym organizmem modelowym do badań w biologii molekularnej i biologii komórki. Stanowią prosty i stosunkowo łatwy w hodowli model komórek eukariotycznych, a w dodatku wykazują duże podobieństwo genetyczne do komórek ludzkich, co sprawia, że są chętnie używane do badań nad ludzkimi białkami<sup>45</sup>. Kolejną ważną cechą *S. cerevisiae*, która sprawia, że stanowią dobry model badawczy

jest wprowadzanie odpowiednich modyfikacji potranslacyjnych ważnych dla dobrego odwzorowania funkcjonalności wprowadzanych sztucznie do komórek drożdży ludzkich białek<sup>46,47</sup> oraz dostępne metody ich genetycznej modyfikacji umożliwiające heterologiczną ekspresję białek w kontrolowanych warunkach<sup>48-50</sup>.

Jedną z podstawowych metod w badaniach skutków heterologicznej ekspresji białek w komórkach *S. cerevisiae* jest test komplementacji, polegający na sprawdzeniu zdolności wprowadzonego heterologicznie białka do przywrócenia fenotypu wzrostowego komórek szczepu drożdży pozbawionego ekspresji genu kodującego drożdżowy odpowiednik tego białka. Testy komplementacji często wykorzystywane są w badaniach nad białkiem VDAC człowieka<sup>35,51</sup>. Co istotne, dostępne dane wskazują, że *S. cerevisiae* stanowią dogodny model do badania zależności funkcjonalnej pomiędzy VDAC i wewnątrzkomórkowym stanem redoks<sup>23</sup>. Wykazano również, że na wewnątrzkomórkowe stany redoks wyraźnie wpływają oba paralogi VDAC drożdży<sup>23</sup> tworzące kanały o porównywalnych właściwościach elektrofizjologicznych, ale zapewniające różną przepuszczalność przez zewnętrzną błonę mitochondrialną<sup>52</sup>.

Drożdże *S. cerevisiae* posiadają dwa paralogi białka VDAC, tj., yVDAC1 i yVDAC2. Ekspresja genu kodującego yVDAC2 (*POR2*) zachodzi na bardzo niskim poziomie i jest 5 rzędów wielkości niższa niż genu kodującego yVDAC1 (*POR1*), i to zarówno w obecności fermentującego (glukoza), jak i niefermentującego (glicerol) źródła węgla<sup>53-55</sup>. Uważa się, że około 90% przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej wynika z aktywności yVDAC1<sup>54</sup>. Otrzymane do tej pory dane wskazują, że *POR2* nie może kompensować braku *POR1*, chyba że zostanie poddany ekspresji pod kontrolą promotora *POR1*<sup>53,56</sup>. W badaniach paralogów VDAC człowieka w oparciu o heterologiczną ekspresję w komórkach *S. cerevisiae* stosuje się zwykle pojedyncze mutanty pozbawione jedynie yVDAC1 tj. mutanty  $\Delta por1$ . Zatem, kwestia dokładnego wpływu obecności yVDAC2 na wynik heterologicznej ekspresji paralogów ludzkiego białka VDAC w komórkach drożdży pozostaje nadal otwarta. Dlatego ciekawą kwestią byłyby badania obejmujące podwójne mutanty pozbawione zarówno yVDAC1, jak i yVDAC2 ( $\Delta por1\Delta por2$ ). W badaniach nie wykorzystano dotychczas także szczepu umożliwiającego zbadanie wpływu siarkowodoru ( $H_2S$ ), który jest gazową cząsteczką sygnalizacyjną, której przypisuje się podstawowe znaczenie w regulacji homeostazy redoks w komórkach eukariotycznych<sup>6</sup>. Proponowany udział  $H_2S$  w regulacji szlaków antyoksydacyjnych i poziomu ROS<sup>57</sup> wydaje się szczególnie interesujący w kontekście wrażliwości VDAC na stan redoks, jednak ten aspekt nie był nigdy rozważany. W przypadku *S. cerevisiae* uzyskanie wysokiego poziomu  $H_2S$  można uzyskać poprzez eliminację genu kodującego sulfhydrylazę O-acetylohomoseryny/O-acetyloseryny (*MET15* lub *MET17*), która jest odpowiedzialna za wykorzystanie siarczku w syntezie homocysteiny/cysteiny<sup>58-60</sup>. Szczepy z taką modyfikacją są dostępne komercyjnie, np. BY4741.

W niniejszej pracy zbadano następujące zagadnienia dotyczące funkcjonalnego związku kanału VDAC i wewnątrzkomórkowego stanu redoks: (1) występowanie wariantu VDAC spełniającego definicję czujnika stanu redoks (rsVDAC) w zależności od liczby paralogów VDAC oraz poziomu złożoności organizmów, ich środowiska życia i ich trybu życia; (2) znaczenie genotypu komórek drożdży *S. cerevisiae* dla ich przeżywalności w warunkach heterologicznej ekspresji hVDAC1-hVDAC3, przy wykorzystaniu nowo skonstruowanego modelu drożdżowego pozbawionego obu paralogów drożdżowego białka VDAC i (3) wpływ eliminacji obu dysmutaz ponadtlenkowych na przeżywalność komórek nowo skonstruowanego modelu drożdżowego



z heterologiczną ekspresją hVDAC1-hVDAC3 oraz poziom  $O_2^{\cdot-}$  i stan funkcjonalny mitochondriów w tych komórkach. W przypadku zagadnień (2) i (3) zweryfikowano także znaczenie reszt cysteiny występujących w hVDAC3 (zaliczanego na podstawie dostępnych danych do rsVDAC), stosując wariant tego białka, w którym reszty cysteiny zastąpiono resztami alaniny (hVDAC3 $\Delta$ Cys).

Uzyskane wyniki dostarczają istotne dane dotyczące wykorzystania modelu drożdżowego w badaniach funkcjonalnych paralogów ludzkiego białka VDAC oraz cytoprotekcyjnego działania hVDAC3 jako rsVDAC w warunkach stresu oksydacyjnego.

### 3.3. Główne tezy i osiągnięcia rozprawy doktorskiej

#### 1. Wrażliwość kanału VDAC na stan redukcyjno-oksydacyjny (rsVDAC; *ang.* redox-sensitive VDAC) może być związana z funkcją czujnika stresu środowiskowego: analiza bioinformatyczna

Publikacja 1: Andonis Karachitos, Wojciech Grabiński, Martyna Baranek, Hanna Kmita (2021) Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis. *Front Physiol.* 2021 Dec 13;12:750627.  
doi: 10.3389/fphys.2021.750627.

Dostępne dane wskazują, że kanał VDAC może pełnić funkcję czujnika wewnątrzkomórkowego stanu redukcyjno-oksydacyjnego (redoks), co jest kluczowe dla odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny. Ma to ścisły związek z obecnością reszt cysteiny w określonych miejscach sekwencji aminokwasowej, podlegających modyfikacjom oksydacyjnym, których bardzo ważną konsekwencją jest tworzenie wiązań dwusiarczkowych<sup>36,56,61</sup>. Tę formę VDAC na potrzeby analizy nazwaliśmy kanałem VDAC wrażliwym na stan redoks (*ang.* rsVDAC), co oznacza kanał VDAC, którego aktywność jest modulowana przez stan redoks komórki, co z kolei sprawia, że kanał ten może funkcjonować jako czujnik stanu redoks, w tym stresu oksydacyjnego. Jednak kwestia częstości występowania takiej funkcji kanału VDAC nie została do tej pory zbadana. W związku z tym postanowiliśmy odpowiedzieć na następujące pytania: (1) czy funkcja czujnika stanu redoks (rsVDAC) jest możliwa, gdy w mitochondriach występuje tylko jeden wariant VDAC, oraz (2) czy funkcja czujnika stanu redoks (rsVDAC) jest możliwa dla wszystkich paralogów VDAC obecnych w mitochondriach danego organizmu? Udzielenie odpowiedzi na to pytanie wymagało stworzenia bazy danych sekwencji białek VDAC, do której wybrano organizmy bezkręgowce, niebędące roślinami, których sekwencje były kompletne i rozpoczynały się od metioniny. Następnie wykorzystano narzędzia bioinformatyczne pozwalające na przewidywanie struktury białka (patrz Materiały i Metody w Publikacji 1). Wyniki analizy bioinformatycznej zestawiono z ekologią badanych gatunków, tj. wzięto pod uwagę typ zamieszkiwanego środowiska i tryb życia analizowanych organizmów.

Modelowym przykładem rsVDAC jest paralog Dmel/CG17140 *Drosophila melanogaster* i paralog hVDAC3 człowieka, opisane w Publikacji 1. Cechą charakterystyczną tych wariantów VDAC są reszty cysteiny, które znajdują się w określonych miejscach: (1) w regionie końca N, (2) w harmonijce  $\beta$  oznaczonej symbolem  $\beta 1$ , (3) w regionie obejmującym harmonijki  $\beta$  oznaczone symbolami  $\beta 7$  i  $\beta 8$  oraz (4) w okolicach harmonijki  $\beta 15$  i końca C (Rysunek 3 i Rysunek 5A w Publikacji 1). Obecność reszt cysteiny w tych lokalizacjach oraz ich utlenienie pozwala na

tworzenie wiązań dwusiarczkowych, co zmienia właściwości elektrofizjologiczne kanału, umożliwiając mu reakcję na zmienne warunki redoks w komórce. Szczególne znaczenie ma tworzenie tych wiązań między resztami cysteiny z końca N białka i resztami cysteiny znajdującymi się w dalszych rejonach białka. Dzięki tym wiązaniom dwusiarczkowym koniec N zostaje skierowany do wnętrza kanału i pozostaje w jego świetle, co zmienia przepuszczalność kanału<sup>36</sup>.

#### **a. Występowanie rsVDAC w zależności od poziomu złożoności organizmów, ich środowiska życia i liczby posiadanych paralogów VDAC**

Analizie poddano sekwencje VDAC dostępne dla 122 wybranych gatunków organizmów, które podzielono pod względem poziomu złożoności organizmu (organizmy proste lub złożone, przy czym założono, że złożony organizm zawiera wiele układów narządów o różnych funkcjach), rodzaju zamieszkiwanego środowiska (lądowe lub wodne) i liczby paralogów VDAC oraz liczby reszt cysteiny (mało lub dużo) i ich lokalizacji w obrębie struktury drugorzędowej (brak lub obecność na końcu N). Stwierdzono, że większość analizowanych gatunków, niezależnie od poziomu złożoności i środowiska życia dysponuje tylko jednym wariantem VDAC (Rysunek 1A). W analizie liczby i lokalizacji reszt cysteiny przyjęto następujące kryteria klasyfikacji: (1) mało reszt cysteiny (*ang.* Cys-poor): występuje tylko jeden wariant VDAC lub co najmniej jeden paralog VDAC (jeśli jest obecny), który zawiera mniej niż dwie reszty cysteiny w strukturze pierwszorzędowej; (2) dużo reszt cysteiny (*ang.* Cys-rich): występuje tylko jeden wariant VDAC lub paralogi VDAC (jeśli są obecne), który zawiera lub które wszystkie zawierają więcej niż dwie reszty cysteiny w strukturze pierwszorzędowej; (3) obecność reszt cysteiny na końcu N (*ang.* N-Cys): występuje tylko jeden wariant VDAC lub paralogi VDAC (jeśli obecne), który zawiera lub które wszystkie zawierają co najmniej jedną resztę cysteiny na końcu N; brak reszt cysteiny na końcu N (*ang.* N-Cys free): występuje co najmniej jeden wariant VDAC bez reszty cysteiny na końcu N (Rysunek 1B). Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że warianty VDAC w przypadku których istnieje możliwość tworzenia wiązań dwusiarczkowych przy udziale reszt cysteiny z końca N występują częściej w organizmach złożonych niż w organizmach prostych.

Powyższe kryteria klasyfikacji przyjęto także w analizie służącej wskazaniu możliwych rsVDAC. W tym celu zbadano związek między liczbą reszt cysteiny, ich umiejscowieniem w strukturze drugorzędowej oraz liczbą paralogów VDAC obecnych w mitochondriach badanych organizmów (Rysunek 2). Stwierdzono, że istnieją organizmy, u których istnieje tylko jeden wariant VDAC, przy czym wariant ten spełnia kryteria rsVDAC (Rysunek 3 i Rysunek 5A w Publikacji 1).

#### **b. Występowanie rsVDAC w zależności od trybu życia organizmów**

Organizmy w przypadku których wskazano obecność tylko jednego wariantu VDAC będącego prawdopodobnie równocześnie rsVDAC zebrano w Tabeli 1 w Publikacji 1. Co ciekawe, w tej grupie organizmów dominują pasożyty. Ilustruje to także Rysunek 4 w Publikacji 1 przedstawiający częstość występowania rsVDAC u pasożytów i organizmów wolnożyjących. W Tabeli 1 w Publikacji 1 zebrano także informacje dotyczące lokalizacji reszt cysteiny w obrębie struktury drugorzędowej sugerowanych rsVDAC. Ich analiza ilościowa (Rysunek 5B w Publikacji 1) wskazuje, że poza wspólną lokalizacją reszt cysteiny w obszarze końca N oraz harmonijek  $\beta$  oznaczonych symbolem  $\beta 1$  i  $\beta 15$ , pasożyty wewnętrzne i zewnętrzne różnią się częstością występowania reszt cysteiny w obrębie końca C i regionu obejmującego harmonijkę  $\beta$  oznaczone symbolem  $\beta 7$  i  $\beta 8$ , który wydaje się być charakterystyczny dla pasożytów wewnętrznych. Region

ten jest uznawany za kluczowy w tworzeniu wiązań dwusiarczkowych z resztami cysteiny z końca N, co jest istotną częścią definicji rsVDAC.

Podsumowując, można założyć, że metabolizm i warunki środowiskowe typowe dla organizmów pasożytniczych mogą wspierać obecność tylko jednego wariantu VDAC, który może być czujnikiem redoks (rsVDAC). W przypadku organizmów wolnożyjących stwierdzono obecność co najmniej jednego paralogu VDAC, który charakteryzował się wyjątkowo niskim prawdopodobieństwem zaliczenia do rsVDAC. Na podstawie danych dotyczących paralogów VDAC człowieka i *D. melanogaster*, można założyć, że taki wariant VDAC uległ utrwaleniu i rozpowszechnieniu wśród organizmów wolnożyjących. Pasożyty, szczególnie wewnętrzne, są narażone na stres oksydacyjny wywołany przez reakcje obronne gospodarza, w tym produkcję ROS. Podobnie jak pasożyty, plemniki, charakteryzujące się wysokim poziomem ekspresji rsVDAC (hVDAC3), funkcjonują w środowisku innego, obcego organizmu – w układzie rozrodczym samicy, gdzie są narażone na reakcje obronne, w tym stres oksydacyjny. Zarówno pasożyty, jak i plemniki muszą przystosować się do stresu generowanego przez gospodarza, co może tłumaczyć wykorzystanie rsVDAC jako mechanizmu obronnego i adaptacyjnego. Ponadto, pasożyty mierzą się z drastycznymi zmianami środowiska podczas etapu życia poza organizmem gospodarza. Potrzebują zatem sprawnego systemu obrony przez niekorzystnymi czynnikami stresowymi skutkującymi nadmiarem ROS. Zatem, obecność rsVDAC w pasożytach sugeruje, że kanał ten może pełnić kluczową rolę w detekcji i adaptacji do stresu oksydacyjnego generowanego przez środowisko życia.

## **2. Nowy model drożdżowy do badań nad paralogami ludzkiego białka VDAC wskazuje na elementy istotne w analizie paralogu hVDAC3 zaliczanego do rsVDAC**

Publikacja 2: Martyna Baranek-Grabińska, Wojciech Grabiński and Deborah Musso, Andonis Karachitos, Hanna Kmita (2024) Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research, w trakcie recenzji w International Journal of Molecular Sciences

Komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* są powszechnie stosowane w badaniach funkcjonalnych białek człowieka, w tym paralogów białka VDAC, łącznie z hVDAC3, który jest zaliczany do rsVDAC (Publikacja 1). W badaniach tych do tej pory nie zwrócono uwagi na dwie kwestie: (1) wpływ obecności yVDAC2, którą pomijano ze względu na niski poziom ekspresji i aktywności yVDAC2 w komórkach oraz (2) wpływ genotypu wykorzystywanych szczepów drożdży, który może być związany z obecnością lub brakiem metabolitu o działaniu antyoksydacyjnym. Dlatego w przeprowadzonych badaniach wykorzystano podwójne mutanty drożdży pozbawione obu genów kodujących drożdżowe paralogi białka VDAC, tj. *POR1* kodującego yVDAC1 i *POR2* kodującego yVDAC2 (mutanty  $\Delta por1\Delta por2$ ) oraz dwa szczepy drożdży, różniące się obecnością genu *MET15*, tj. szczep M3 i szczep BY 4741.

Do tej pory w funkcjonalnych badaniach paralogów białek VDAC człowieka, opartych na heterologicznej ekspresji w komórkach drożdży, wykorzystywano pojedyncze mutanty  $\Delta por1$  wyprowadzone z powszechnie stosowanych szczepów drożdży, tj., M3 i BY4742. Mutant M3- $\Delta por1$ , znany także jako mutant M22-2, został otrzymany przez Blachly-Dyson i in. (1997) w wyniku delecji większości genu *POR1* poprzez insercję markera auksotroficznego *LEU2*. Mutant BY4742-

$\Delta por1$  jest komercyjnie dostępny (Euroscarf, Frankfurt, Niemcy) i uzyskano go przez zastosowanie kasety oporności G418 (KanMX4) w celu delekcji genu *POR1*. Dostępny jest także mutant BY4741- $\Delta por1$  uzyskany w analogiczny sposób, ale nie był on dotychczas wykorzystany w funkcjonalnych badaniach paralogów ludzkiego białka VDAC. Jedną z cech tego szczepu jest brak markera auksotroficznego *MET15* (znany także jako *MET17*), czyli genu kodującego enzym (sulfhydrylaza O-acetylohomoseryny/O-acetyloseryny) odpowiedzialny za tworzenie homocysteiny/cysteiny. Brak tego enzymu powoduje nagromadzenie H<sub>2</sub>S (Rysunek 4A w Publikacji 2). Efektu tego nie obserwuje się w komórkach szczepów BY4742 i M3, które dysponują markerem *MET15*. Przeprowadzone badania obejmowały: (1) otrzymanie pojedynczego mutantu BY4741- $\Delta por1$  i podwójnego mutantu BY4741- $\Delta por1\Delta por2$  na bazie BY4741- $\Delta por2$  (Euroscarf) za pomocą CRISPR/Cas9 oraz wprowadzenie danego paralogu VDAC człowieka, w tym wariantu hVDAC3 pozbawionego reszt cysteiny (hVDAC3 $\Delta$ Cys, w którym reszty cysteiny zastąpiono resztami alaniny) do komórek badanych podwójnych mutantów przy wykorzystaniu CRISPR/Cas9 (Rysunek 1 i Tabela 3 w Publikacji 2), (2) komplementację braku *MET15* w komórkach linii BY4741 przy wykorzystaniu plazmidu pUM (Rysunek 4A-B w Publikacji 2) i (3) przeprowadzenie płytkowych testów wzrostu. Wykorzystane plazmidy oraz szczegółowe informacje dotyczące wykorzystanych szczepów zebrano odpowiednio w Tabeli 1 i Tabeli 2 zawartych w Publikacji 2.

#### **a. Znaczenie genotypu szczepu drożdży**

Wzorce wzrostu komórek obu podwójnych mutantów  $\Delta por1\Delta por2$ , wraz z komórkami odpowiednich pojedynczych mutantów ( $\Delta por1$  i  $\Delta por2$ ) oraz komórkami odpowiedniego izogenicznego szczepu typu dzikiego, oceniano przy wykorzystaniu płytkowych testów wzrostu w warunkach optymalnych (temperatura 28°C i obecność glukozy w pożywce – pożywka YPD) i restrykcyjnych (temperatura 37°C i pożywka zawierająca glicerol – pożywka YPG) oraz w warunkach pośrednich, tj. YPD w 37°C i YPG w 28°C. Ilościowa analiza wyników tego testu (Rysunek 2 w Publikacji 2) wykazała, że ani mutanty  $\Delta por1$ , ani mutanty  $\Delta por1\Delta por2$  nie rosły w warunkach restrykcyjnych, co jest zgodne z dostępnymi danymi uzyskanymi dla mutantów M3- $\Delta por1$  i M3- $\Delta por1\Delta por2$ <sup>53</sup>. Co więcej, oba pojedyncze mutanty  $\Delta por2$  wykazywały poziom wzrostu podobny do komórek odpowiedniego izogenicznego szczepu typu dzikiego. Podobieństwo wzrostu zaobserwowano także dla mutantów  $\Delta por1$  obu szczepów. Zaobserwowano także różnice w poziomie wzrostu, tj., mutant BY4741- $\Delta por1\Delta por2$  wykazywał wyraźny wzrost na pożywce YPG w temperaturze optymalnej i słaby wzrost na pożywce YPD w temperaturze restrykcyjnej, czego nie zaobserwowano w przypadku mutantu M3- $\Delta por1\Delta por2$ . Zaobserwowane różnice wynikają zapewne z wyjściowych genotypów szczepów. Niemniej jednak, brak wzrostu obu mutantów  $\Delta por1\Delta por2$  w warunkach restrykcyjnych, uznawanych za diagnostyczne w analizie fenotypowej skutków braku aktywności białka VDAC w komórkach drożdży umożliwił zastosowanie komórek obu mutantów do heterologicznej ekspresji ludzkich paralogów VDAC.

Aby sprawdzić, czy identyczny fenotyp komórek obu mutantów  $\Delta por1\Delta por2$  w warunkach restrykcyjnych spowoduje podobne skutki heterologicznej ekspresji w tych komórkach ludzkich paralogów VDAC (hVDAC1-hVDAC3), przeprowadzono płytkowe testy wzrostu (Rysunek 3 w Publikacji 2). Stwierdzono, że w przypadku komórek mutantu BY4741- $\Delta por1\Delta por2$ , niezależnie od zastosowanych warunków, obecność hVDAC1 lub hVDAC2 lub hVDAC3 skutecznie komplementowała fenotyp mutantu, przy czym wzrost badanych komórek zachodził na

podobnym poziomie. Natomiast w przypadku komórek mutantu M3-  $\Delta por1\Delta por2$ , najsilniejsza komplementacja fenotypu zachodziła w przypadku hVDAC2, a heterologiczna ekspresja hVDAC3 wiązała się z najstabszą komplementacją, przy czym w temperaturze restrykcyjnej, niezależnie od zastosowania YPD lub YPG, obserwowano całkowity brak wzrostu komórek. Ponieważ heterologiczna ekspresja hVDAC2 najbardziej znacząco poprawiła wzrost komórek mutantu M3-  $\Delta por1\Delta por2$ , ale dostępne dane wskazują, że w przypadku mutantu M3- $\Delta por1$  najbardziej skuteczna była heterologiczna ekspresja hVDAC1<sup>51</sup>, można założyć, że obecność lub brak yVDAC2 może mieć znaczenie dla uzyskiwanych wyników. Ponadto obserwowane różnice w możliwości komplementacji fenotypu mutantów BY4741- $\Delta por1\Delta por2$  i M3- $\Delta por1\Delta por2$  przez hVDAC3 mogą wynikać z: (1) niestabilności termicznej hVDAC3<sup>38</sup>, która występuje w komórkach linii M3, ale nie w komórkach linii BY4741; i/lub (2) stanu utlenienia reszt cysteiny, który, jak stwierdzono w eksperymentach polegających na rekonstytucji hVDAC w sztuczne błony lipidowe, jest krytyczny dla bramkowania hVDAC3<sup>42</sup>.

#### **b. Znaczenie obecności reszt cysteiny w hVDAC3**

Aby zweryfikować dostępne dane, wskazujące na istotną rolę reszt cysteiny w aktywności hVDAC3<sup>29,36,38</sup>, zbadano także zdolność komplementacji fenotypu mutantów BY4741- $\Delta por1\Delta por2$  i M3- $\Delta por1\Delta por2$  przez hVDAC3 $\Delta$ Cys, tj. wariant hVDAC3, w którym wszystkie reszty cysteiny zastąpiono resztami alaniny (Rysunek 3 w Publikacji 2). Stwierdzono, że heterologiczna ekspresja hVDAC3 $\Delta$ Cys zasadniczo osłabiła możliwość komplementacji fenotypu komórek mutantu BY4741- $\Delta por1\Delta por2$ , ale zwiększa tę możliwość w przypadku mutantu komórek M3- $\Delta por1\Delta por2$ . Redukcja wzrostu była najbardziej widoczna w temperaturze restrykcyjnej, natomiast zwiększony wzrost był najbardziej widoczny w temperaturze optymalnej. W obu przypadkach efekty te były widoczne niezależnie od źródła węgla zawartego w pożywce.

Ponieważ wykazano różnice w możliwości komplementacji fenotypu komórek mutantów M3- $\Delta por1\Delta por2$  i BY4741- $\Delta por1\Delta por2$  w wyniku heterologicznej ekspresji hVDAC3 i hVDAC3 $\Delta$ Cys, nie ulega wątpliwości, że reszty cysteiny odgrywają ważną rolę w efekcie komplementacji hVDAC3. Nie można jednak wykluczyć, że efekt ten zależy od warunków wewnątrzkomórkowych związanych z genotypem komórek drożdży. Dlatego przeprowadzono eksperyment polegający na wprowadzeniu do komórek podwójnego mutantu BY4741- $\Delta por1\Delta por2$  z heterologiczną ekspresją hVDAC3 lub hVDAC3 $\Delta$ Cys plazmidu pUM, co umożliwiło ekspresję *MET15* w tych komórkach (Rysunek 4A-B w Publikacji 2) i porównano wzrost tych komórek z odpowiadającymi im komórkami linii M3, która wyjściowo zawiera *MET15* w swoim genotypie (Rysunek 4C-D w Publikacji 2). Przyjęto założenie, że jeśli brak *MET15* jest związany z możliwością komplementacji przez hVDAC3 i hVDAC3 $\Delta$ Cys fenotypu komórek BY4741- $\Delta por1\Delta por2$ , wówczas ekspresja *MET15* powinna wpływać na zdolność tych białek do tej komplementacji. Stwierdzono, że obecność *MET15* w komórkach BY4741- $\Delta por1\Delta por2$  obniżyła zdolność hVDAC3 do komplementacji fenotypu tego mutantu. Jednocześnie złagodziła negatywny wpływ hVDAC3 $\Delta$ Cys na wzrost tych komórek, co było szczególnie widoczne podczas hodowli w temperaturze restrykcyjnej i na obu typach pożywek.

Zatem, w komórkach BY4741- $\Delta por1\Delta por2$ , w których ze względu na brak *MET15* powinien powstać H<sub>2</sub>S, hVDAC3 wykazywał lepszą zdolność komplementacji fenotypu mutantu w porównaniu z hVDAC3 $\Delta$ Cys. Ekspresja *MET15* w tych komórkach upodobniła je do komórek linii M3- $\Delta por1\Delta por2$ , w których poziom H<sub>2</sub>S ze względu na obecność *MET15* powinien być niski,

a wariant hVDAC3 $\Delta$ Cys lepiej przywracał wzrost komórek w porównaniu z hVDAC3. Sugeruje to, że w obecności MET15, reszty cysteiny w hVDAC3 mogą w sprzyjających warunkach ulec utlenieniu, co może utrudniać bramkowanie kanału tworzonego przez to białko. Bramkowanie to wymaga obecności reszt cysteiny w stanie zredukowanym, co z kolei jest możliwe przy braku MET15 (Rysunek 5 w Publikacji 2).

Podsumowując, uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że genotyp komórek drożdży może mieć decydujące znaczenie dla skutków heterologicznej ekspresji ludzkich paralogów VDAC. W szczególności efekt ten obserwowano dla paralogu hVDAC3 i jego wariantu, w którym reszty cysteiny zostały zastąpione resztami alaniny (hVDAC3 $\Delta$ Cys). Zatem, różnica w zestawie markerów auksotroficznych w komórkach drożdży może tworzyć różne tło dla modyfikacji reszt cysteiny w hVDAC3, a tym samym wyjaśniać różne skutki usunięcia reszt cysteiny w hVDAC3 w komórkach M3- $\Delta$ por1 $\Delta$ por2 i BY4741- $\Delta$ por1 $\Delta$ por2. Różne fenotypy wykazywane przez komórki BY4741- $\Delta$ por1 $\Delta$ por2 i M3- $\Delta$ por1 $\Delta$ por2 po heterologicznej ekspresji paralogów VDAC człowieka sprawiają, że można je uznać za cenne modele do badania ludzkich białek VDAC, zwłaszcza hVDAC3 jako przedstawiciela rsVDAC.

### **3. Ludzki paralog hVDAC3 zapewnia skuteczne przystosowanie komórek drożdży pozbawionych natywnych białek VDAC do stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem CuZnSOD i MnSOD**

Publikacja 3: Martyna Baranek-Grabińska, Tomasz Skrzypczak, Hanna Kmita, Andonis Karachitos. Human VDAC3 as a sensor of intracellular redox state: contribution to cytoprotection mechanisms in oxidative stress. Manuskrypt przygotowany do wystąpienia do *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*

Ponieważ w ramach Publikacji 2 stwierdzono, że komórki mutantu BY4741- $\Delta$ por1 $\Delta$ por2 można wykorzystać do badania działania hVDAC3 jako rsVDAC, postanowiono uzupełnić otrzymany model drożdżowy o komórki funkcjonujące w warunkach stresu oksydacyjnego, który otrzymano w wyniku eliminacji obu wewnątrzkomórkowych form dysmutazy ponadtlenkowej; tj. CuZnSOD (SOD1) i MnSOD (SOD2). W celu usunięcia genów kodujących obie dysmutazy zastosowano CRISPR/Cas9. Należy jednak zaznaczyć, że wszystkie próby usunięcia genów *SOD1* i *SOD2* w tle  $\Delta$ por1 $\Delta$ por2, czyli otrzymanie poczwórnego mutantu BY4741- $\Delta$ por1 $\Delta$ por2 $\Delta$ sod1 $\Delta$ sod2, zakończyły się niepowodzeniem. Zatem, eliminację *SOD1* i *SOD2* przeprowadzono w obecności yVDAC1 lub obecności danego paralogu hVDAC, co sugeruje, że obecność VDAC jest konieczna w sytuacji stresu oksydacyjnego. W badaniach wykorzystano także wariant hVDAC3 $\Delta$ Cys, w którym reszty cysteiny zastąpiono resztami alaniny (Publikacja 2). Przeprowadzone badania obejmowały: (1) płytkowe testy wzrostu oraz pomiar wzrostu komórek w płynnej pożywce; (2) wyznaczenie poziomu  $O_2^{\cdot-}$  przy wykorzystaniu swoistej sondy fluorescencyjnej MitoSOX Red; (3) mikroskopową analizę potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej i morfologii mitochondriów w oparciu o „system podwójnego raportowania” (ang. dual-reporter system) MitoLoc i (4) określenie stanu funkcjonalnego mitochondriów w oparciu o pomiar zużycia tlenu przez nienaruszone komórki przy wykorzystaniu oksygrafu. Szczegółowe informacje dotyczące otrzymania podwójnych mutantów  $\Delta$ sod1 $\Delta$ sod2 oraz wykorzystanych

metod przedstawiono na Rysunku 1 i 4A-B oraz w części Materiały i Metody w Publikacji 3.

#### **a. Znaczenie reszt cysteiny w hVDAC3**

Wzorce wzrostu komórek linii BY4741, tj. szczepów  $\Delta por1\Delta por2$ ,  $\Delta por2(yVDAC1)$  oraz  $hVDAC1-hVDAC3\Delta por1\Delta por2$  przy wykorzystaniu płytkowych testów wzrostu w warunkach optymalnych (temperatura 28°C i obecność glukozy w pożywce – pożywka YPD) i restrykcyjnych (temperatura 37°C i pożywka zawierająca glicerol – pożywka YPG) oraz w warunkach pośrednich, tj. YPD w 37°C i YPG w 28°C były zgodne z wynikami przedstawionymi w ramach Publikacji 2; patrz także Rysunek 2A w Publikacji 3. W przypadku ich odpowiedników pozbawionych obu dysmutaz ( $\Delta sod1\Delta sod2$ ) stwierdzono, że w przypadku pożywki YPG, i to niezależnie od zastosowania temperatury optymalnej lub restrykcyjnej, tylko heterologiczna ekspresja hVDAC3 była w stanie umożliwić komórkom wydajny wzrost na tym podłożu, wymagającym funkcjonalności mitochondriów (Rysunek 2A w Publikacji 3). Znajduje to potwierdzenie w wyniku pomiaru szybkości wzrostu hodowli komórek  $hVDAC1-hVDAC3\Delta por1\Delta por2$  i ich odpowiedników  $\Delta sod1\Delta sod2$  w płynnej pożywce YPG (28 °C) pokazanym na Rysunku 2B w Publikacji 3. W przypadku obecności obu dysmutaz wzrost ten jest bardzo podobny dla komórek z heterologiczną ekspresją poszczególnych paralogów hVDAC. Jednak w przypadku komórek  $\Delta sod1\Delta sod2$ , w przypadku komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC1 lub hVDAC2 jest on zasadniczo słabszy niż w przypadku komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC3. Warto zaznaczyć, że w tych warunkach wzrostu, poziom  $O_2^{\cdot-}$  w komórkach zawierających obie dysmutazy i z heterologiczną ekspresją paralogów hVDAC był porównywalny, podczas gdy w komórkach  $sod1\Delta sod2\Delta$  i heterologiczną ekspresją hVDAC3 obserwowano wyraźnie niższy poziom  $O_2^{\cdot-}$  niż w komórkach z heterologiczną ekspresją hVDAC1 i hVDAC2, w których był on porównywalny (Rysunek 3 w Publikacji 3). Co istotne, heterologiczna ekspresja wariantu hVDAC3 pozbawionego reszt cysteiny ( $hVDAC3\Delta Cys$ ) w komórkach  $sod1\Delta sod2\Delta$  nie umożliwiała tym komórkom wzrostu w badanych warunkach (Rysunek 7 w Publikacji 3), co wykluczyło te komórki z dalszych analiz.

Podsumowując, w warunkach stresu oksydacyjnego (tło  $\Delta sod1\Delta sod2$ ) komórki z heterologiczną ekspresją hVDAC3 wykazują lepszą adaptację w warunkach wymagających metabolizmu tlenowego niż komórki z heterologiczną ekspresją hVDAC1 lub hVDAC2. Adaptacja ta znajduje swój wyraz w poziomie  $O_2^{\cdot-}$  zbliżonym do poziomu obserwowanego dla komórek zawierających obie dysmutazy. Co istotne, efekt ten jest zależny od obecności w białku hVDAC3 reszt cysteiny.

#### **b. Znaczenie stanu funkcjonalnego mitochondriów**

System MitoLoc umożliwia jednocześnie obrazowanie morfologii sieci mitochondrialnej oraz analizę potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ( $\Delta\psi$ ) w pojedynczych komórkach (np. <sup>62</sup> i Rysunek 4A w Publikacji 3). System ten działa poprzez oznakowanie mitochondriów dwoma białkami fluorescencyjnymi: jednym, którego import zależy od  $\Delta\psi$  oraz drugim, którego import jest niezależny od tego potencjału. Otrzymane wyniki wskazują, że brak obu paralogów yVDAC w komórkach drożdży zmieniał morfologię mitochondriów w kierunku bardziej tubularnych, przy czym zostaje zachowany wysoki  $\Delta\psi$ . Ponadto usunięcie obu dysmutaz w obecności yVDAC1 prowadziło do obniżenia  $\Delta\psi$ , któremu towarzyszyła większa fragmentacja mitochondriów (Rysunek 4B w Publikacji 3). W obecności obu dysmutaz, komórki drożdży z heterologiczną ekspresją yVDAC1 (Rysunek 4B w Publikacji 3) lub z którymkolwiek z trzech paralogów hVDAC (Rysunek 4C w Publikacji 3) zawierały mitochondria o nienaruszonej morfologii i stabilnej wartości

$\Delta\psi$ . Natomiast przy braku dysmutaz, pojawiły się wyraźne różnice między komórkami z heterologiczną ekspresją paralogów hVDAC (Rysunek 4D w Publikacji 3). Komórki z heterologiczną ekspresją hVDAC1 i hVDAC2 zawierały pofragmentowane mitochondria z obniżoną wartością  $\Delta\psi$ . Natomiast w przypadku komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC3 obserwowano wyraźnie mniej nasiloną fragmentację mitochondriów i wyższą wartość  $\Delta\psi$ . Ilościowe pomiary  $\Delta\psi$  w komórkach z heterologiczną ekspresją paralogów hVDAC zawierających obie dysmutazy, jak i w odpowiadających im mutantom *sod1 $\Delta$ sod2 $\Delta$* , oparte na pomiarze fluorescencji sondy TMRM (Rysunek 5 w Publikacji 3), prowadzą do wniosku, że w warunkach stresu oksydacyjnego w przypadku komórek *sod1 $\Delta$ sod2 $\Delta$*  z heterologiczną ekspresją hVDAC2  $\Delta\psi$  praktycznie się nie zmienia, podczas gdy w komórkach z heterologiczną ekspresją hVDAC1 i hVDAC3 wartość  $\Delta\psi$  ulega obniżeniu. W związku z tym, w warunkach stresu oksydacyjnego, wartość  $\Delta\psi$  dla komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC2 i hVDAC3 była porównywalna, ale niższa niż w przypadku komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC1. Sugeruje to, że w warunkach stresu oksydacyjnego komórki z heterologiczną ekspresją hVDAC2 i hVDAC3 mają porównywalną zdolność do podtrzymywania  $\Delta\psi$ . Biorąc pod uwagę, że wcześniej stwierdzono, że heterologiczna ekspresja hVDAC3 ma działanie ochronne (Rysunek 2 i 3 w Publikacji 3), można założyć, że pomiary  $\Delta\psi$  mogą nie w pełni uchwycić funkcjonalne różnice między mitochondriami komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC2 i hVDAC3.

W związku z tym dla komórek hVDAC2 $\Delta$ *por1 $\Delta$ por2* i hVDAC3 $\Delta$ *por1 $\Delta$ por2* w tle  *$\Delta$ sod1 $\Delta$ sod2* przeprowadzono pomiary szybkości zużycia tlenu przez całe komórki inkubowane w analogicznych warunkach (YPG, 28°C). Otrzymane wartości zużycia tlenu wykorzystano do obliczenia wartości podstawowych parametrów określających funkcjonalność mitochondriów w komórkach. Są to: (1) zdolność rozprężania przez FCCP (*ang.* FCCP uncoupling capacity) odpowiadająca ilorazowi maksymalnej szybkości zużycia tlenu w obecności rozprzegacza FCCP i szybkości zużycia tlenu w stanie 4 (wynikającym z przecieku protonów); (2) „zapasowa” pojemność oddechowa (*ang.* spare respiratory capacity) odpowiadająca różnicy między bazowym oddychaniem komórek (*ang.* basal respiration) a oddychaniem maksymalnym wywoływanym przez podanie rozprzegacza, np. FCCP; (3) udział stanu 4 w bazowym oddychaniu komórek i (4) udział stanu 3 (wynikającego z syntezy ATP) w bazowym oddychaniu komórek<sup>(63,64)</sup>. Wyznaczone wartości tych parametrów przedstawiono odpowiednio na Rysunku 6B, 6C, 6D i 6E w Publikacji 3. Stwierdzono, że chociaż bazowe oddychanie komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC2 i hVDAC3 jest porównywalne (Rysunek 6A w Publikacji 3), to w obecności heterologicznej ekspresji hVDAC3 udział stanu 3 w bazowym oddychaniu komórek jest około trzykrotnie większy niż w przypadku komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC2 (Rysunek 6A, 6D-E w Publikacji 3). Można więc założyć, że komórki z heterologiczną ekspresją hVDAC3 mają większe zapotrzebowanie na ATP niż komórki z heterologiczną ekspresją hVDAC2. Z drugiej strony, oddychanie komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC2 było przyspieszane przez FCCP, podczas gdy efektu tego nie obserwowano dla komórek z heterologiczną ekspresją hVDAC3, co pozostaje w zgodzie z obliczonymi wartościami zapasowej pojemności oddechowej tj., jest ona praktycznie bliska zeru w komórkach z heterologiczną ekspresją hVDAC3 i dużo większa w komórkach z heterologiczną ekspresją hVDAC2 (Rysunek 6B-C w Publikacji 3). Można więc założyć, że w przypadku heterologicznej ekspresji hVDAC3 w komórkach  *$\Delta$ por1 $\Delta$ por2* w tle  *$\Delta$ sod1 $\Delta$ sod2* dochodzi do ograniczeń w dostępności substratów do mitochondrialnego łańcucha oddechowego, które nie mają miejsca w przypadku heterologicznej ekspresji hVDAC2.



Ograniczenia takie mogą prowadzić, do braku możliwości przyspieszenia oddychania mitochondrialnego<sup>63-65</sup>.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że protekcyjne działanie hVDAC3 w obecności stresu oksydacyjnego, zależne od obecnych w tym białku reszt cysteiny, nie wymaga obecności dysmutaz ponadtlenkowych i może sprowadzać się do uruchomienia swoistego stanu bioenergetycznego mitochondriów, opierającego się na intensywnej syntezie ATP, której towarzyszy wysoka szybkość oddychania, i której zwiększenie nie jest możliwe ze względu na ograniczenia dostępności substratów do mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Jak pokazano na Rysunku 8 w Publikacji 3, uzyskane wyniki pozwalają na sformułowanie następujących hipotez: (1) W przypadku komórek mutantów  $\Delta sod1\Delta sod2$ , poddane w nich heterologicznej ekspresji hVDAC1 i hVDAC2 wykazują osłabione bramkowanie, co prowadzi do stanu niskiej przepuszczalności, i w konsekwencji ograniczenia przechodzenia metabolitów przez kanał. W tych warunkach hVDAC3 pozostaje w stanie otwartym, co umożliwia ciągłe przechodzenie metabolitów. (2) W przypadku heterologicznej ekspresji hVDAC1 i hVDAC2 w komórkach  $\Delta sod1\Delta sod2$  synteza  $O_2^{\cdot-}$  i akumulacja ROS wzrasta. Ograniczona przepuszczalność hVDAC1 i hVDAC2 w tych warunkach ogranicza dostęp metabolitów, co z kolei prowadzi do zwiększonej produkcji  $O_2^{\cdot-}$  i nasila stres oksydacyjny. Natomiast hVDAC3 w tych warunkach pozostaje otwarty, co pozwala na skuteczny przepływ metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Pomaga to zmniejszyć akumulację ROS i przeciwdziałać dysfunkcji mitochondriów.

Ustalenia te pozostają w zgodzie z wnioskami dotyczącymi badań przeprowadzonych z wykorzystaniem ludzkich komórek HAP1, w których wykonano niezależny nokaut genu kodującego hVDAC1 i hVDAC3 (Reina i in., 2022). Należy jednak zaznaczyć, że rola hVDAC3 była ustalana w tle obecności pozostałych paralogów białka hVDAC i przy porównaniu z nokautem genu kodującego hVDAC1 oraz z wykorzystaniem innych czynników generujących stres oksydacyjny i metod służących ustaleniu stanu funkcjonalnego mitochondriów, co uniemożliwia bezpośrednie porównanie danych dotyczących funkcjonalności mitochondriów.

### 3.4. Podsumowanie

Moja rozprawa doktorska składa się z trzech publikacji: jednej opartej na analizie bioinformatycznej i dwóch prac eksperymentalnych. Pierwsza z nich została opublikowana w 2021 roku (Frontiers in Physiology), druga jest w trakcie recenzji w International Journal of Molecular Sciences, a ostatnia znajduje się na etapie przygotowania do wystąpienia do Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics. Publikacje te pozostają w zgodzie z zadaniami badawczymi i celami naukowymi przedstawionymi w ramach Indywidualnego Planu Badawczego. Dotyczą one bowiem funkcjonalności paralogów białka VDAC, w tym człowieka, które badano pojedynczo przy wykorzystaniu skonstruowanego modelu drożdżowego. Przeprowadzone badania są istotne dla zrozumienia funkcjonalnego zróżnicowania paralogów VDAC, w tym człowieka, co może mieć określenie skutki praktyczne, np. w opracowaniu strategii cytoprotekcyjnych.

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna dotycząca zróżnicowania liczby i sekwencji białek VDAC pod względem obecności reszt cysteiny, głównie u bezkręgowców, pozwoliła na istotne ustalenia dotyczące identyfikacji VDAC jako czujnika stanu redoks (*ang.* rsVDAC). Stwierdzono, że

w przypadku obecności kilku paralogów VDAC w mitochondriach jest mało prawdopodobne aby wszystkie spełniały definicję rsVDAC, ale rsVDAC może wystąpić, gdy tylko jeden wariant VDAC jest obecny w mitochondriach. Taki właśnie typ VDAC rozpowszechniony jest wśród organizmów pasożytniczych, co stanowi przesłankę do założenia, że rsVDAC może pośredniczyć w adaptacji do warunków środowiskowych. Z kolei skonstruowany przeze mnie model drożdżowy do badania paralogów VDAC człowieka pozwolił na uzyskanie istotnych danych dotyczących funkcjonowania tych paralogów przy różnym tle genetycznym zastosowanych szczepów drożdży, które może być istotne dla wewnątrzkomórkowego stanu redoks oraz w warunkach stresu oksydacyjnego. Stwierdzono, że tło genetyczne szczepu, w którym paralogi VDAC poddano heterologicznej ekspresji ma wpływ na ich funkcjonalność w komórkach. Natomiast część modelu obejmująca komórki drożdży z heterologiczną ekspresją ludzkich paralogów białka VDAC i pozbawione jednocześnie funkcjonalnych dysmutaz ponadtlennokowych pozwoliła na otrzymanie istotnych danych dotyczących funkcjonalności poszczególnych paralogów hVDAC w warunkach stresu oksydacyjnego. Stwierdzono, że białko hVDAC3 działa cytoprotekcyjnie w warunkach stresu oksydacyjnego przyczyniając się do utrzymania niskiego poziomu anionorodnika ponadtlennokowego, co pozostaje w związku ze zmianami funkcjonalności mitochondriów. Zatem, będąc paralogiem wrażliwym na stan redoks w komórce, hVDAC3 może także być elementem mechanizmu cytoprotekcyjnego w warunkach stresu oksydacyjnego, a kluczową rolę w tych procesach odgrywają reszty cysteiny.

Różnorodność funkcjonalna paralogów białka VDAC stanowi przedmiot badań wielu naukowców (np.<sup>32,40</sup>). Uzyskane w tej pracy wyniki uzupełniają wiedzę na ten temat nie tylko w przypadku paralogów VDAC człowieka, ale także w przypadku bezkręgowców i używanych jako model badawczy komórek drożdży. Potwierdzają także ważną rolę reszt cysteiny (ich liczby i lokalizacji) w białkach VDAC różnych organizmów, a w szczególności ludzkiego białka VDAC3, w funkcjonowaniu komórek, w tym ochronie przed stresem oksydacyjnym. Paralog hVDAC3 jest szczególnie licznie obecny w męskich komórkach rozrodczych, komórkach nerwowych i komórkach mięśniowych. Jednak wciąż pozostaje niedostatecznie poznanym paralogiem, co dostarcza pola do dalszych badań w ramach biologii i medycyny, w szczególności dotyczących lepszego poznania mechanizmu regulacji funkcjonalnej tego białka w zmiennych warunkach redoks, jak np. w przypadku męskich komórek rozrodczych i różnych zaburzeń płodności związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem mitochondriów.

### **3.5. Finansowanie badań w ramach rozprawy doktorskiej**

- Grant NCN 2017/26/D/NZ1/00075, Identyfikacja i analiza funkcjonalna mutacji w genie kodującym białko VDAC3 w plemnikach ze zmniejszoną ruchliwością, SONATA 13 (2018-2021), kierownik: dr hab. Andonis Karachitos
- Grant NCN 2016/21/B/NZ4/00131, Mitochondrial markers of successful anhydrobiosis for representatives of aquatic and terrestrial tardigrades, OPUS 11 (2017-2021), kierownik: prof. dr hab. Hanna Kmita (Grant przedłużony do 2022 przez kierownika ze względu na sytuację spowodowaną COVID-19)
- Grant ID-UB 017/02/SNP/0008, Analiza fluorescencyjna obecności anionorodnika ponadtlenkowego oraz stanu funkcjonalnego mitochondriów w komórkach modelu drożdżowego do badania udziału paralogów ludzkiego białka VDAC w przeciwdziałaniu skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego brakiem wewnątrzkomórkowych dysmutaz ponadtlenkowych, ID-UB 017 Minigranty doktoranckie, kierownik: mgr Martyna Baranek-Grabińska
- Subwencja badawcza Zakładu Bioenergetyki UAM

### 3.6. Bibliografia

1. Lemasters, J.J., and Holmuhamedov, E. (2006). Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor—Thinking outside the box. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1762, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.10.006>.
2. Bock, F.J., and Tait, S.W.G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 85–100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>.
3. Sinha, K., Das, J., Pal, P.B., and Sil, P.C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 87, 1157–1180. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4>.
4. Bhat, A.H., Dar, K.B., Anees, S., Zargar, M.A., Masood, A., Sofi, M.A., and Ganie, S.A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 74, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>.
5. Chung, W.-H. (2017). Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging. *J Microbiol.* 55, 409–416. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6647-5>.
6. Xu, S., Shieh, M., Paul, B.D., and Xian, M. Hydrogen sulfide: Recent development of its dual donors and hybrid drugs. *British Journal of Pharmacology* *n/a*. <https://doi.org/10.1111/bph.16211>.
7. Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97, 1634–1658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>.
8. Teleanu, D.M., Niculescu, A.-G., Lungu, I.I., Radu, C.I., Vladâcenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A.M., and Teleanu, R.I. (2022). An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 5938. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>.
9. Hajam, Y.A., Rani, R., Ganie, S.Y., Sheikh, T.A., Javaid, D., Qadri, S.S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M.F., Harakeh, S., et al. (2022). Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells* 11, 552. <https://doi.org/10.3390/cells11030552>.
10. Rocha, M., Esplugues, J.V., Hernandez-Mijares, A., and Victor, V.M. Mitochondrial-Targeted Antioxidants and Oxidative Stress: A Proteomic Prospective Study. *Current Pharmaceutical Design* 15, 3052–3062. <https://doi.org/10.2174/138161209789058138>.
11. Karachitos, A., Grabiński, W., Baranek, M., and Kmita, H. (2021). Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis. *Front. Physiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.750627>.

12. Samet, J.M., and Wages, P.A. (2018). Oxidative Stress from Environmental Exposures. *Curr Opin Toxicol* 7, 60–66.
13. Encyclopedia of Biological Chemistry ScienceDirect. <http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780124437104/encyclopedia-of-biological-chemistry>.
14. Budzinska, M., Galganska, H., Wojtkowska, M., Stobienia, O., and Kmita, H. (2007). Effects of VDAC isoforms on CuZn-superoxide dismutase activity in the intermembrane space of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357, 1065–1070. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.090>.
15. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology* 217, 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>.
16. Luk, E., Yang, M., Jensen, L.T., Bourbonnais, Y., and Culotta, V.C. (2005). Manganese Activation of Superoxide Dismutase 2 in the Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*\*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 22715–22720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504257200>.
17. Mailloux, R.J. (2020). An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants* 9, 472. <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>.
18. Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., and Cadenas, E. (2003). Voltage-dependent Anion Channels Control the Release of the Superoxide Anion from Mitochondria to Cytosol \*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 5557–5563. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210269200>.
19. Eleutherio, E.C.A., Silva Magalhães, R.S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J.R., and de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 697, 108701. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>.
20. Park, J.H., Nordström, U., Tsiakas, K., Keskin, I., Elpers, C., Mannil, M., Heller, R., Nolan, M., Alburaiky, S., Zetterström, P., et al. (2023). The motor system is exceptionally vulnerable to absence of the ubiquitously expressed superoxide dismutase-1. *Brain Communications* 5, fcd017. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcd017>.
21. Blachly-Dyson, E., and Forte, M. (2001). VDAC Channels. *IUBMB Life* 52, 113–118. <https://doi.org/10.1080/15216540152845902>.
22. Reina, S., and Checchetto, V. (2022). Voltage-Dependent Anion Selective Channel 3: Unraveling Structural and Functional Features of the Least Known Porin Isoform. *Front. Physiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.784867>.
23. Galganska, H., Karachitos, A., Wojtkowska, M., Stobienia, O., Budzinska, M., and Kmita, H. (2010). Communication between mitochondria and nucleus: Putative role for VDAC in reduction/oxidation mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 1276–1280. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.004>.

24. Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., and Arbel, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine* 31, 227–285. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>.
25. Shoshan-Barmatz, V., and Ben-Hail, D. (2012). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion* 12, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.04.001>.
26. Benz, R. (1994). Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1197, 167–196. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)90004-3).
27. Colombini, M., Blachly-Dyson, E., and Forte, M. (1996). VDAC, a Channel in the Outer Mitochondrial Membrane. In *Ion Channels*, T. Narahashi, ed. (Springer US), pp. 169–202. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1775-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1775-1_5).
28. Colombini, M. (2004). VDAC: The channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 256, 107–115. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000009862.17396.8d>.
29. Reina, S., Nibali, S.C., Tomasello, M.F., Magrì, A., Messina, A., and De Pinto, V. (2022). Voltage Dependent Anion Channel 3 (VDAC3) protects mitochondria from oxidative stress. *Redox Biology* 51, 102264. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102264>.
30. Shoshan-Barmatz, V., Ben-Hail, D., Admoni, L., Krelin, Y., and Tripathi, S.S. (2015). The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, 2547–2575. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.040>.
31. Ellenrieder, L., Dieterle, M.P., Doan, K.N., Mårtensson, C.U., Floerchinger, A., Campo, M.L., Pfanner, N., and Becker, T. (2019). Dual Role of Mitochondrial Porin in Metabolite Transport across the Outer Membrane and Protein Transfer to the Inner Membrane. *Molecular Cell* 73, 1056-1065.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.014>.
32. De Pinto, V. (2021). Renaissance of VDAC: New Insights on a Protein Family at the Interface between Mitochondria and Cytosol. *Biomolecules* 11, 107. <https://doi.org/10.3390/biom11010107>.
33. Sampson, M.J., Lovell, R.S., Davison, D.B., and Craigen, W.J. (1996). A Novel Mouse Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel Gene Localizes to Chromosome 8. *Genomics* 36, 192–196. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0445>.
34. Young, M.J., Bay, D.C., Hausner, G., and Court, D.A. (2007). The evolutionary history of mitochondrial porins. *BMC Evolutionary Biology* 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-31>.

35. De Pinto, V., Guarino, F., Guarnera, A., Messina, A., Reina, S., Tomasello, F.M., Palermo, V., and Mazzoni, C. (2010). Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar function for VDAC3? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 1268–1275. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.01.031>.
36. Okazaki, M., Kurabayashi, K., Asanuma, M., Saito, Y., Dodo, K., and Sodeoka, M. (2015). VDAC3 gating is activated by suppression of disulfide-bond formation between the N-terminal region and the bottom of the pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, 3188–3196. <https://doi.org/10.1016/j.bbammem.2015.09.017>.
37. Messina, A., Reina, S., Guarino, F., and De Pinto, V. (2012). VDAC isoforms in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 1466–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbammem.2011.10.005>.
38. Queralt-Martín, M., Bergdoll, L., Tejido, O., Munshi, N., Jacobs, D., Kuszak, A.J., Protchenko, O., Reina, S., Magrì, A., De Pinto, V., et al. (2020). A lower affinity to cytosolic proteins reveals VDAC3 isoform-specific role in mitochondrial biology. *J Gen Physiol* 152, e201912501. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912501>.
39. De Pinto, V., Reina, S., Gupta, A., Messina, A., and Mahalakshmi, R. (2016). Role of cysteines in mammalian VDAC isoforms' function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857, 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.02.020>.
40. Zinghirino, F., Pappalardo, X.G., Messina, A., Nicosia, G., De Pinto, V., and Guarino, F. (2021). VDAC Genes Expression and Regulation in Mammals. *Front. Physiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.708695>.
41. Saletti, R., Reina, S., Pittalà, M.G.G., Magrì, A., Cunsolo, V., Foti, S., and De Pinto, V. (2018). Post-translational modifications of VDAC1 and VDAC2 cysteines from rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859, 806–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2018.06.007>.
42. Reina, S., Checchetto, V., Saletti, R., Gupta, A., Chaturvedi, D., Guardiani, C., Guarino, F., Scorciapino, M.A., Magrì, A., Foti, S., et al. (2016). VDAC3 as a sensor of oxidative state of the intermembrane space of mitochondria: the putative role of cysteine residue modifications. *Oncotarget* 7, 2249–2268. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6850>.
43. Reina, S., Palermo, V., Guarnera, A., Guarino, F., Messina, A., Mazzoni, C., and De Pinto, V. (2010). Swapping of the N-terminus of VDAC1 with VDAC3 restores full activity of the channel and confers anti-aging features to the cell. *FEBS Letters* 584, 2837–2844. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.066>.
44. Reina, S., Pittalà, M.G.G., Guarino, F., Messina, A., De Pinto, V., Foti, S., and Saletti, R. (2020). Cysteine Oxidations in Mitochondrial Membrane Proteins: The Case of VDAC Isoforms in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.

45. Yu, R., and Nielsen, J. (2020). Yeast systems biology in understanding principles of physiology underlying complex human diseases. *Current Opinion in Biotechnology* 63, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.021>.
46. Wawrzycka, D. (2011). Yeast as a model for studying neurodegeneration. *Postepy Hig Med Dosw* 65, 328–337. <https://doi.org/10.5604/17322693.945767>.
47. Foury, F., and Kucej, M. (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* 6, 106–111. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(01\)00276-9](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(01)00276-9).
48. Çelik, E., and Çalık, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30, 1108–1118. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>.
49. Cho, J.S., Oh, H.J., Jang, Y.E., Kim, H.J., Kim, A., Song, J.-A., Lee, E.J., and Lee, J. (2022). Synthetic pro-peptide design to enhance the secretion of heterologous proteins by *Saccharomyces cerevisiae*. *MicrobiologyOpen* 11, e1300. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1300>.
50. Schindler, D. (2020). Genetic Engineering and Synthetic Genomics in Yeast to Understand Life and Boost Biotechnology. *Bioengineering (Basel)* 7, 137. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040137>.
51. Karachitos, A., Grobys, D., Antoniewicz, M., Jedut, S., Jordan, J., and 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. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.03.004>.
52. Guardiani, C., Magrì, A., Karachitos, A., Di Rosa, M.C., Reina, S., Bodrenko, I., Messina, A., Kmita, H., Ceccarelli, M., and De Pinto, V. (2018). yVDAC2, the second mitochondrial porin isoform of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2018.01.008>.
53. Blachly-Dyson, E., Song, J., Wolfgang, W.J., Colombini, M., and Forte, M. (1997). Multicopy Suppressors of Phenotypes Resulting from the Absence of Yeast VDAC Encode a VDAC-like Protein. *Molecular and Cellular Biology* 17, 5727–5738. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.10.5727>.
54. Magrì, A., Di Rosa, M.C., Orlandi, I., Guarino, F., Reina, S., Guarnaccia, M., Morello, G., Spampinato, A., Cavallaro, S., Messina, A., et al. (2020). Deletion of Voltage-Dependent Anion Channel 1 knocks mitochondria down triggering metabolic rewiring in yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 3195–3213. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03342-8>.
55. Morgenstern, M., Stiller, S.B., Lübbert, P., Peikert, C.D., Dannenmaier, S., Drepper, F., Weill, U., Höß, P., Feuerstein, R., Gebert, M., et al. (2017). Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Rep* 19, 2836–2852. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.014>.



56. Reina, S., Pittalà, M.G.G., Guarino, F., Messina, A., De Pinto, V., Foti, S., and Saletti, R. (2020). Cysteine Oxidations in Mitochondrial Membrane Proteins: The Case of VDAC Isoforms in Mammals. *Front. Cell Dev. Biol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00397>.
57. Kabil, O., Motl, N., and Banerjee, R. (2014). H<sub>2</sub>S and its role in redox signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1844, 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.01.002>.
58. Oss, S.B.V., Parikh, S.B., Coelho, N.C., Wacholder, A., Belashov, I., Zdancewicz, S., Michaca, M., Xu, J., Kang, Y.P., Ward, N.P., et al. (2022). On the illusion of auxotrophy: met15Δ yeast cells can grow on inorganic sulfur, thanks to the previously uncharacterized homocysteine synthase Yll058w. *Journal of Biological Chemistry* 298. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102697>.
59. Kim, J.-H., Rahman, M.H., Park, D., Jo, M., Kim, H.-J., and Suk, K. (2021). Identification of Genetic Modifiers of TDP-43: Inflammatory Activation of Astrocytes for Neuroinflammation. *Cells* 10, 676. <https://doi.org/10.3390/cells10030676>.
60. Yamagata, S. (1987). O-Acetyl-L-serine-O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase from *Saccharomyces cerevisiae*. In *Methods in Enzymology Sulfur and Sulfur Amino Acids*. (Academic Press), pp. 478–483. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43085-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43085-1).
61. Pittalà, M.G.G., Saletti, R., Reina, S., Cunsolo, V., De Pinto, V., and Foti, S. (2020). A High Resolution Mass Spectrometry Study Reveals the Potential of Disulfide Formation in Human Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Selective Channel Isoforms (hVDACs). *Int J Mol Sci* 21, 1468. <https://doi.org/10.3390/ijms21041468>.
62. Vowinckel, J., Hartl, J., Butler, R., and Ralser, M. (2015). MitoLoc: A method for the simultaneous quantification of mitochondrial network morphology and membrane potential in single cells. *Mitochondrion* 24, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.07.001>.
63. Mazur, M., Wojciechowska, D., Sitkiewicz, E., Malinowska, A., Świdarska, B., Kmita, H., and Wojtkowska, M. (2021). Mitochondrial Processes during Early Development of *Dictyostelium discoideum*: From Bioenergetic to Proteomic Studies. *Genes* 12, 638. <https://doi.org/10.3390/genes12050638>.
64. Brand, M.D., and Nicholls, D.G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* 435, 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>.
65. Kim, C., Patel, P., Gouvin, L.M., Brown, M.L., Khalil, A., Henchey, E.M., Heuck, A.P., and Yadava, N. (2014). Comparative Analysis of the Mitochondrial Physiology of Pancreatic β Cells. *Bioenergetics* 3, 110. <https://doi.org/10.4172/2167-7662.1000110>.

#### **4. Załączane publikacje oraz oświadczenia doktorantki i współautorów**

Karachitos A, Grabiński W, **Baranek M**, Kmita H. Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis. *Front Physiol.* 2021 Dec 13;12:750627.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.750627>


Martyna Baranek-Grabińska

Poznań, 29.10.2024

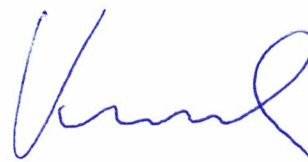
Zakład Bioenergetyki  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Biologii UAM  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w artykule pt. „Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis” Front Physiol. 2021 Dec 13;12:750627. doi: 10.3389/fphys.2021.750627, autorstwa: Karachitos A., Grabiński W., **Baranek M.**, Kmita H., który stanowi część mojej rozprawy doktorskiej, polegał na współtworzeniu hipotezy badawczej dotyczącej cech strukturalnych białek oraz częstotliwości występowania rsVDAC u zwierząt, pomocy w konstrukcji bazy danych, udziale w dyskusji wyników oraz napisaniu części manuskryptu.



Martyna Baranek-Grabińska



Promotor: prof. dr hab. Hanna Kmita



Promotor pomocniczy: dr hab. Andonis Karachitos



**dr hab. Andonis Karachitos**

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Zakład Bioenergetyki  
Wydział Biologii UAM  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

Poznań, 28. 10. 2024 r.

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji:

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, mój udział polegał na tworzeniu koncepcji i założeń badań, prowadzeniu analiz i badań, a także weryfikacji wyników badań, kontroli ich poprawności i spójności.

Z poważaniem,

Andonis Karachitos

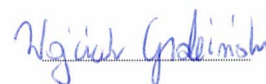
Wojciech Grabiński

Poznań, 28.10.2024

Zakład Bioenergetyki  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Biologii UAM  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w artykule pt. „Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis” Front Physiol. 2021 Dec 13;12:750627. doi: 10.3389/fphys.2021.750627, autorstwa: Karachitos A., Grabiński W., **Baranek M.**, Kmita H., który stanowi część rozprawy doktorskiej Martyny Baranek – Grabińskiej, polegał na stworzeniu bazy danych, pomocy w przeprowadzeniu analizy oraz napisaniu rozdziału manuskryptu.



Podpis



Poznań, 15.10.2024

Prof. dr hab. Hanna Kmita  
kmita@amu.edu.pl

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji:

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, mój udział polegał na uczestniczeniu w dyskusji dotyczącej planowanych analiz i otrzymanych wyników oraz w przygotowaniu maszynopisu publikacji i jej opublikowanej wersji.

Hanna Kmita



Article

# Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research

Martyna Baranek-Grabińska<sup>1</sup>, Wojciech Grabiński<sup>1</sup>, Deborah Musso<sup>2</sup>, Andonis Karachitos<sup>1\*</sup> and Hanna Kmita<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Bioenergetics, Faculty of Biology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland.

<sup>2</sup> Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy.

\* Correspondence: [andonis@amu.edu.pl](mailto:andonis@amu.edu.pl) (AK), [kmita@amu.edu.pl](mailto:kmita@amu.edu.pl) (HK)

**Abstract:** The voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) plays a crucial role in mitochondrial function, and VDAC paralogs are considered to ensure the differential integration of mitochondrial functions with cellular activities. Heterologous expression of VDAC paralogs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae por1Δ* mutant cells is often employed in studies of functional differentiation of human VDAC paralogs (hVDAC1-hVDAC3) regardless the presence of the yeast second VDAC paralog encoded by *POR2* gene. Here, we applied *por1Δpor2Δ* mutants derived from two *S. cerevisiae* strains commonly used for heterologous expression of hVDAC paralogs and addressed the possible relationship between differential ability of hVDAC3 to reverse the growth phenotype of the *por1Δpor2Δ* mutants and the presence of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). The results indicate the need to consider genotype background in application of yeast complementation assays in research on the complexity of human VDAC paralogs, particularly human VDAC3.

**Keywords:** human VDAC paralogs; *por1Δpor2Δ* mutants; yeast complementation assay; yeast strain genotype; *MET15*; cysteine-depleted variant of hVDAC3

## 1. Introduction

Voltage-dependent anion selective channel (VDAC) forms an omnipresent pathway for metabolite transport across the outer mitochondrial membrane [1–7]. The molecular mass cutoff for the pathway is approximately 4 kDa, and the transported molecules range from inorganic ions (e.g., K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>) to metabolites of different sizes and charges (e.g., large anions, such as ATP, AMP, NADH and glutamate; small anions, such as superoxide anion; and large cations, such as acetylcholine) and large macromolecules, such as tRNAs [7–9]. The magnitude of transport through VDAC can be limited when VDAC switches to lower conducting substates featuring less anion selectivity [3], and the process is influenced by the presence of VDAC paralogs [10,11] as well as their posttranslational modifications and interactions with different proteins [1,12].

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* complementation assay is a useful method for assessing the ability of heterologously expressed proteins to reverse the growth phenotype of the relevant mutant strain and has also been used for VDAC proteins from different organisms [13–16]. Yeast mitochondria contain two VDAC paralogs, yVDAC1 and yVDAC2, encoded by *POR1* and *POR2* gene, respectively [17,18]. These paralogs differ dramatically in their expression levels. Namely, yVDAC1 has been shown to be expressed at levels five orders of magnitude greater than yVDAC2, and the difference was observed in the presence of a fermentable or nonfermentable carbon source (glucose and glycerol, respectively, the latter being metabolized by respiration that requires functioning mitochondria) [19]. Accordingly, it has been estimated that yVDAC1 is responsible for approximately 90% of the permeability of a single mitochondrial outer membrane [20]. In

**Citation:** To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



**Copyright:** © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



addition, yVDAC2 cannot compensate for the lack of yVDAC1 unless it is expressed under the control of the yVDAC1 promoter as far as growth of relevant yeast cells is concerned [17]. Therefore, mutants depleted of only yVDAC1 are used in studies on VDAC paralogs based on heterologous expression in *S. cerevisiae* cells.

The single mutants are derived from commonly used *S. cerevisiae* strains (for the relevant genotypes, see Table 2) including M3 [12,14,18,21–24] as well as closely related BY4741 [19,21,25,26] and BY4742 [13,19,27,28]. The M3 strain is the isogenic strain for *por1*Δ mutant termed M22-2 and obtained by Blachly-Dyson et al. (1997) [17]. It was generated by deleting most of the *POR1* gene by the insertion of the *LEU2* auxotrophic marker. BY4741-Δ*por1* and BY4742-Δ*por1* mutants are commercially available (Euroscarf, Frankfurt, Germany) and were obtained by the application of a G418 resistance cassette (KanMX4) for the deletion of the *POR1* gene in BY4741 or BY4742 isogenic wild-type cells, respectively. To verify the functionality of human VDAC paralogs M3-Δ*por1* and BY4742-Δ*por1* mutant strains were used [13,14,27] but not BY4741-Δ*por1* one.

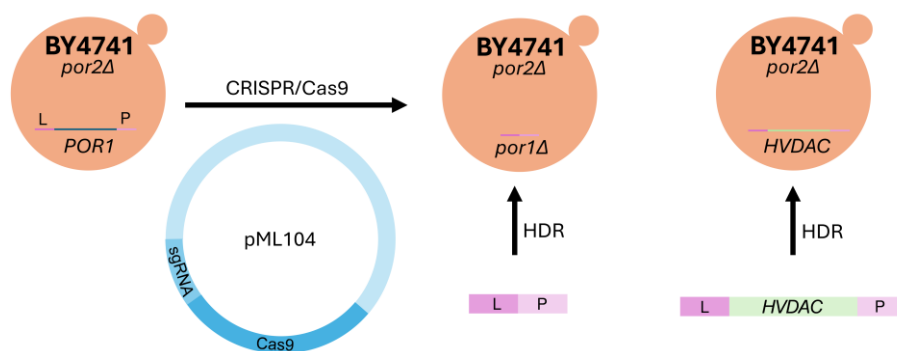
As reported in other mammals, three human VDAC paralogs (hVDAC1, hVDAC2 and hVDAC3) have been identified [4,11,29]. It is generally assumed that hVDAC1, hVDAC2 and hVDAC3 are structurally very similar, but subtle sequence changes may facilitate paralog-specific roles through yet unknown mechanisms [27]. Accordingly, hVDAC1 and hVDAC2 are expressed at higher levels than hVDAC3, which is far less abundant, with the exception of levels observed in the testis, kidney, brain, heart and skeletal muscle [30]. Nevertheless, heterologous expression of these paralogs in the mentioned M3-Δ*por1* and BY4742-Δ*por1* mutant cells using relevant pYX212 plasmid constructs [13,14,27] has indicated that hVDAC1, hVDAC2 and hVDAC3 form stable, highly conductive voltage-gated channels that are weakly anion selective and facilitate metabolite exchange [14,27]. However, it has also been shown that the gating of hVDAC3 requires the reduction of disulfide bonds formed by specifically localized cysteine residues and the linking of the N-terminal region of the protein to the bottom of the channel pore [31]. Thus, hVDAC3 channel activity in mitochondria is likely controlled by the protein functioning as redox sensor [4,31–33]. This particular property of hVDAC3 may explain why heterologous expression of hVDAC1 and hVDAC2 but not of hVDAC3 complements the growth defect of M3-Δ*por1* and BY4742-Δ*por1* mutant cells under restrictive conditions (37 °C in the presence of glycerol) [13,14,34] known to result in oxidative stress [e.g., 35,36].

The diverse content in cysteine residues is regarded as a distinctive feature of human VDAC paralogs; i.e., hVDAC1 has two, hVDAC2 has nine and hVDAC3 has six. The residues follow an evolutionarily conserved oxidative modification pattern, being oxidated or reduced probably depending on their location with respect to cytosol or the intermembrane space [32,37,38]. However, only in hVDAC3 the whole set of cysteine residues is never detected as totally oxidized [39]. This suggests that hVDAC3 cysteine residues may undergo continuous reduction-oxidation (redox) cycles that in turn strengthens the assumption that the residues are indispensable for the protein ability to counteract oxidative stress [e.g., 38,39]. This may correlate with changes in the protein channel activity [e.g., 38,40] possibly influenced by interactions with cytosolic proteins [27].

Accordingly, it has been shown that *S. cerevisiae* is a convenient model to investigate the functional relationship between VDAC, redox states of cell compartments and expression levels and/or activity of cellular proteins [41]. It has also been shown that the intracellular redox states are distinctly influenced by the both yeast VDAC paralogs [41] forming channels of comparable electrophysiological characteristics [22] but providing different permeability across the mitochondrial outer membrane [18]. It is also known that hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is an important gaseous signaling molecule that is critically involved in regulating redox homeostasis in eukaryotic cells [42]. The proposed mechanisms

include, among others, the regulation of antioxidative pathways and the attenuation of cellular ROS levels [43], but H<sub>2</sub>S has never been considered in the context of VDAC regulation. Importantly, *S. cerevisiae* BY4741 strain differ from the related BY4742 strain in only one auxotrophic marker, namely, *MET15* that is absent in BY4741 but present in BY4742 (Table 2). The gene *MET15* (also known as *MET17*) is also present in M3 cells and it encodes the enzyme O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase that is responsible for incorporating sulfide along with O-acetylhomoserine into homocysteine. Loss of this activity in *S. cerevisiae* cells results in the production of high H<sub>2</sub>S levels [44,45].

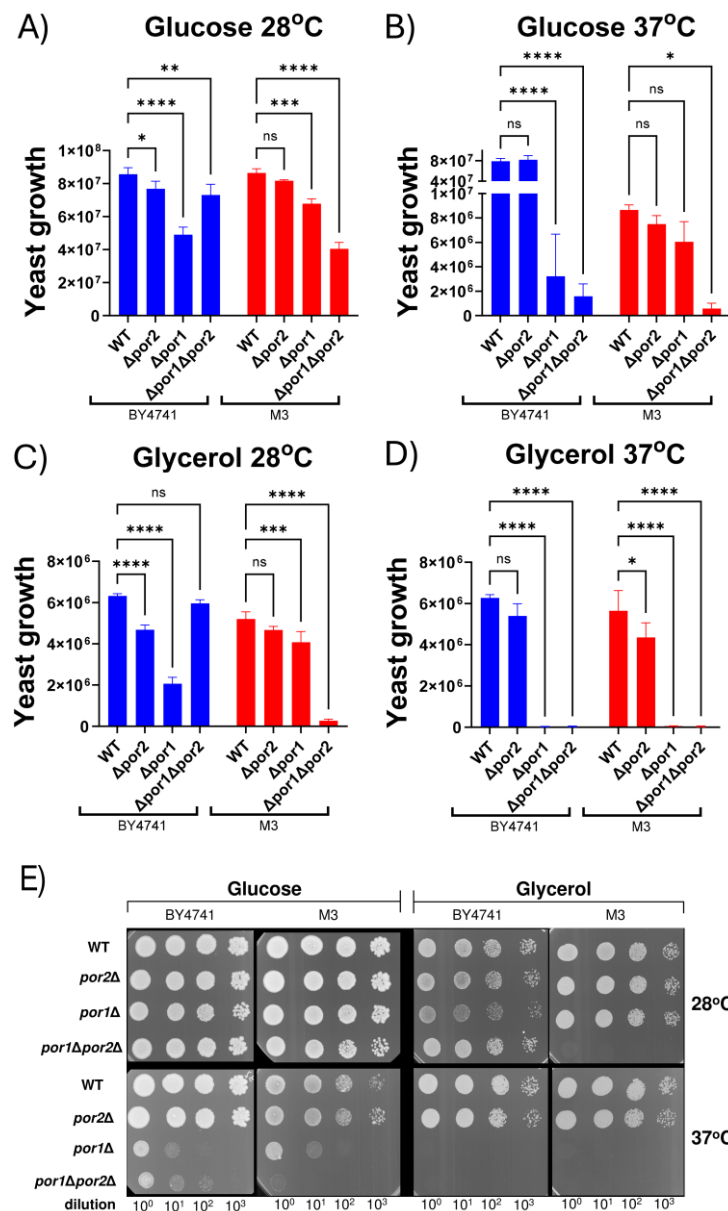
Thus, to check putative relationship between the absence of H<sub>2</sub>S and hVDAC3 inability to complement the growth defect of M3- $\Delta por1$  and BY4742- $\Delta por1$  mutant cells under restrictive conditions [13,14], we performed heterologous expression of hVDAC1-hVDAC3 in BY4741 cells in the presence or absence of *MET15*. Moreover, double *por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutants were used in the studies to eliminate possible effect of yVDAC2. The results demonstrate that the background of the yeast cell genotype can be decisive for complementation of the absence of yeast VDAC paralogs by human VDAC paralogs, which was clearly observed for hVDAC3. Moreover, the results indicate that cysteine residues contribute to hVDAC3-mediated complementation of *por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutant growth defect and this contribution may be partially related to *MET15* activity and resulting H<sub>2</sub>S level.



**Figure 1. Creating model for human VDAC expression using initially *por2* $\Delta$  mutants (derived from the BY4741 strain).** The vector pML104, containing Cas9 and sgRNA, is responsible for the CRISPR/Cas9 system. CRISPR/Cas9 creates a double-strand break (DSB) in the *POR1* locus. Subsequently, the repair DNA, through homologous recombination (HDR), uses homologous arms (L and P) to either generate a knockout (KO) mutant for the *POR1* gene (*por1* $\Delta$ ) or to introduce the human *HVDAC* gene (knock-in).

## 2. Results

### 2.1. The phenotypes of the *por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$ double mutants derived from the M3 and BY4741 strains are similar under restrictive conditions



**Figure 2. Results of the viability assay obtained for isogenic wild-type BY4741 and M3 strains as well as for cells of *por1Δ*, *por2Δ* and *por1Δpor2Δ* mutant strains.** Quantitative analysis of the growth of BY4741 and M3 cells and cells of the relevant mutants on media supplemented with glucose (A and B) or glycerol (C and D) at 28 °C (A and C) or 37 °C (B and D). The data are presented as the mean values ± standard deviations of three independent experiments. ns, not statistically significant; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ . (E) Representative growth of BY4741 and M3 cells and cells of the relevant mutants on media supplemented with glucose (fermentable carbon source) or glycerol (nonfermentable carbon source) for 3 days at 28 °C (permissive temperature) and 37 °C (restrictive temperature). Serial tenfold dilutions of each of the yeast cell suspensions were spotted from left to right. Three replicates of the assay were performed.

To determine whether M3- and BY4741-derived mutants depleted of both yVDAC paralogs (M3-*por1Δpor2Δ* and BY4741-*por1Δpor2Δ*, see Table 2) display the same phenotype under known restrictive conditions (37 °C and the presence of glycerol), the BY4741-derived double mutant was constructed using CRISPR/Cas9 (Figure 1) to eliminate *POR1* (see Materials and Methods). The growth patterns of the both double mutants, along with their respective single mutant equivalents and corresponding wild-type cells, were evaluated at permissive (28 °C) and restrictive (37 °C) temperatures in media containing either

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

glucose (YPD) or glycerol (YPG). This evaluation was performed by the cell viability assay after serial dilution and plating of the samples. Quantitative analysis of the assay (Figure 2A-D) indicated that neither the *por1Δ* mutants nor the *por1Δpor2Δ* mutants grew under the known restrictive conditions, which is in agreement with available data obtained for M3-*por1Δ* and M3-*por1Δpor2Δ* mutants [17] and confirmed in the study. Moreover, under the specified conditions, *por2Δ* mutant strains exhibited growth patterns similar to those of the relevant isogenic wild-type strain. The similarity in growth was also observed for the *por1Δ* mutants across both strains. However, BY4741-*por1Δpor2Δ* mutant displayed distinct growth on glycerol at permissive temperature and weak growth on glucose at restrictive temperature, which was not observed for M3-*por1Δpor2Δ* mutant. Representative results of the cell viability assay are shown in Figure 2E.

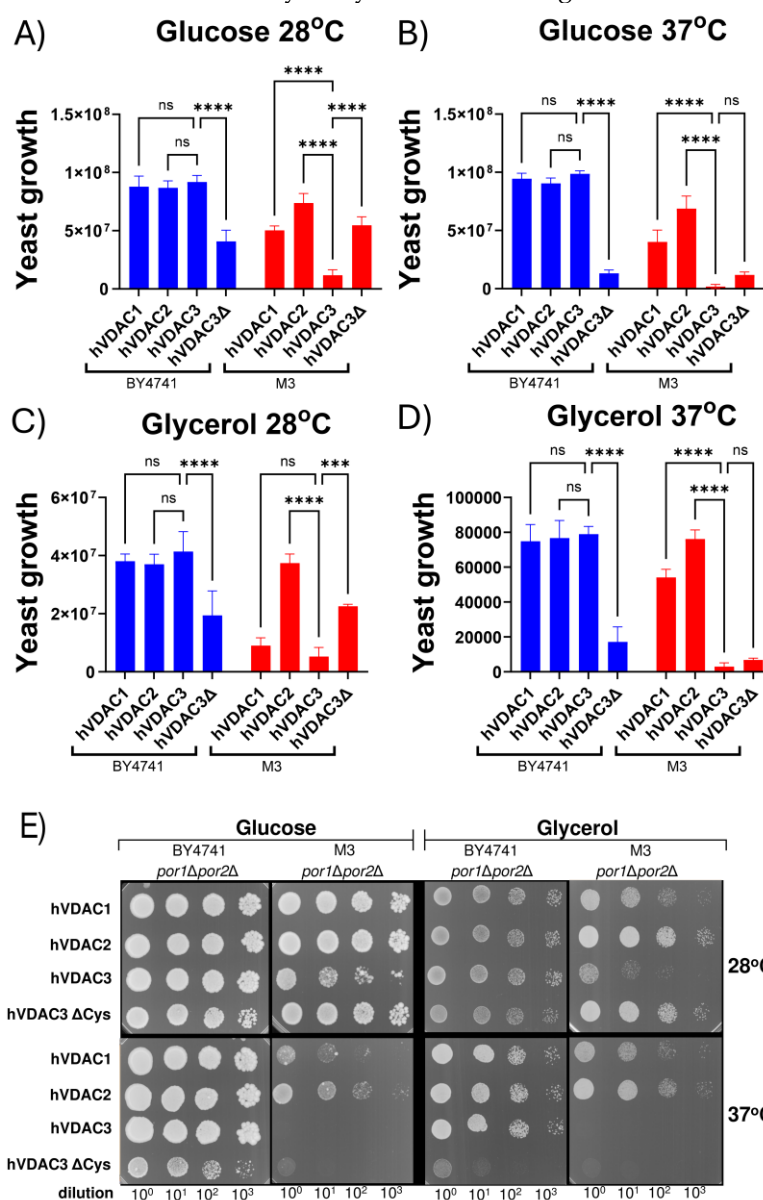


Figure 3. The effects of the heterologous expression of each human VDAC paralog or a cysteine-depleted variant of human VDAC3 on results of the viability assay performed for M3-*por1Δpor2Δ* and BY4741-*por1Δpor2Δ* mutant cells. Quantitative analysis of the growth of double mutant cells expressing human VDAC paralogs (hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3) or a cysteine-depleted variant of hVDAC3 (hVDAC3ΔCys). These cells were grown on media supplemented with glucose (A and B) or glycerol (C and D) at 28 °C (A and C) or 37 °C (B and D). The data are presented as the mean values ± standard deviations of three independent experiments. ns, not statistically significant; \*\*\*\*, p < 0.0001; \*\*\*, p < 0.001; \*\*, p < 0.01; \*, p < 0.05. (E) Representative growth of the

145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155

156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164

double mutant cells expressing human VDAC paralogs (hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3) or cysteine-depleted variant of hVDAC3 (hVDAC3 $\Delta$ Cys) on glucose (fermentable carbon source) or glycerol (non-fermentable carbon source) containing media for 3 days at 28°C (permissive temperature) and 37°C (restrictive temperature). Serial tenfold dilutions of each of the yeast cells' suspensions were spotted from the left to the right. Three repeats of the assay were performed.

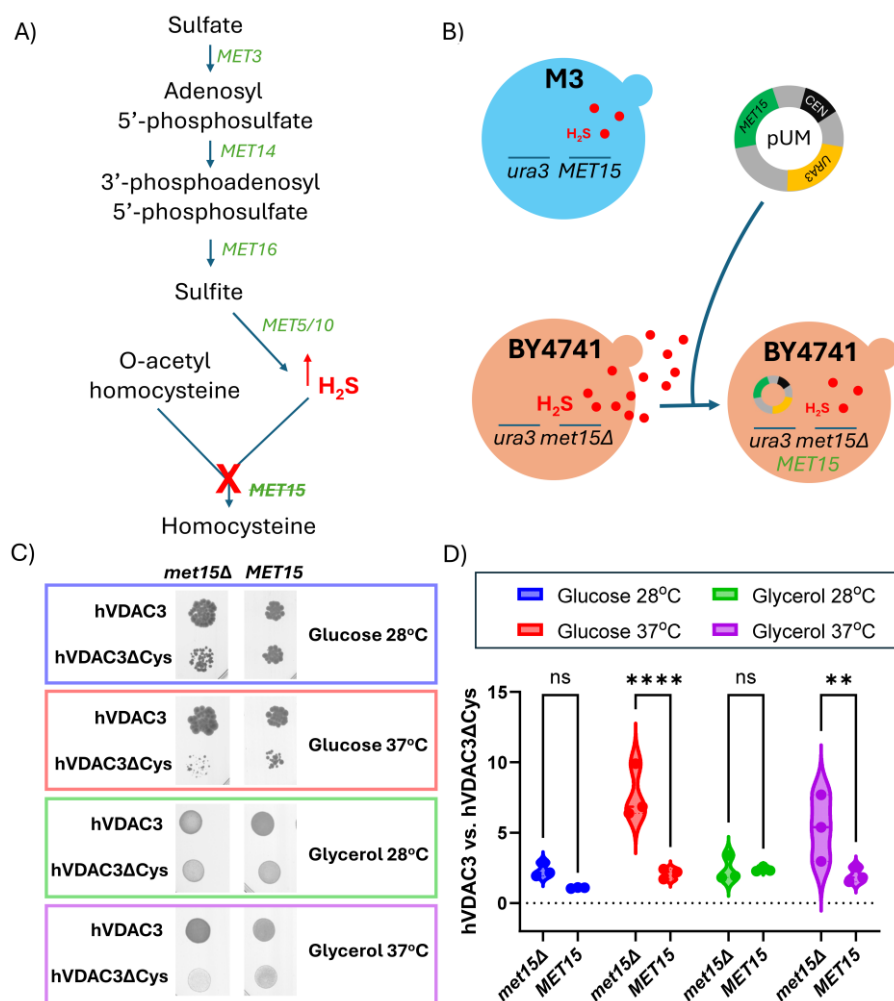
### 2.2. The *por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$ double mutants derived from the M3 and BY4741 strains differ in complementation upon heterologous expression of human VDAC paralogs

To investigate whether an identical phenotype under restrictive conditions would result in similar effects of heterologous expression of human VDAC paralogs in both *por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutants, we used the cell viability assay (Figure 3). As indicated by quantitative analysis of the performed viability assay (Figure 3A-D), the expression of the paralogs in BY4741-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutant cells enhanced growth to a very similar extent, and the conditions applied did not differentiate between the paralogs. Conversely, in M3-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutant, heterologous expression of hVDAC3 resulted in the weakest complementation, including a complete lack of yeast cell growth at restrictive temperature, regardless of the presence of glycerol or glucose. Moreover, hVDAC2 expression most significantly enhanced growth in M3-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutant.

Based on the assumption that hVDAC3 channel activity is dependent on its cysteine residues [27,31,40], we also examined the effect of heterologous expression of a cysteine-depleted variant of hVDAC3 (hVDAC3 $\Delta$ Cys). As shown in Figure 3, hVDAC3 $\Delta$ Cys reduced the growth of BY4741-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutant but increased the growth of M3-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutant under specific conditions of the cell viability assay. This reduction was most pronounced at restrictive temperature, regardless of the carbon source, whereas the increase was most pronounced at permissive temperature, regardless of the carbon source. Representative results of the cell viability assay are shown in Figure 3E.

### 2.3. The effect of cysteine depletion in hVDAC3 on yeast cell growth may be related to the activity of *Met15*

Inactivation of *MET15* (encoding O-acetyl-homoserine-O-acetyl-serine sulfhydrylase) in *S. cerevisiae* leads to increased H<sub>2</sub>S production [44], as schematically shown in Figure 4A. As mentioned in the Introduction, H<sub>2</sub>S plays a critical role in maintaining the intracellular redox balance and promotes cell growth [46]. Therefore, we aimed to restore *MET15* presence in BY4741-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  mutant expressing hVDAC3 or hVDAC3 $\Delta$ Cys and evaluate the effect of *MET15* presence on the cell growth. This was achieved by transforming BY4741-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$ -hVDAC3 and BY4741-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$ -hVDAC3- $\Delta$ Cys mutant cells with the pUM plasmid, which also provided the *URA3* marker for selection of subsequent transformants (Figure 4B). The presence of *MET15* decreased the ability of hVDAC3 to reverse BY4741-*por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  growth phenotype but also attenuated the effect of hVDAC3 $\Delta$ Cys on the mutant cells when compared to the effect of hVDAC3 (Figure 4C-D). Moreover, this attenuation was particularly pronounced at restrictive temperature for both glucose and glycerol.



**Figure 4.** The effect of cysteine residues in hVDAC3 on the results of the viability assay in the presence or absence of the *MET15* auxotrophic marker. (A) Schematic illustration of the disruption of the sulfate assimilation pathway in *S. cerevisiae* cells due to *MET15* deletion in BY4741 cells. When the pathway is functional, sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) is enzymatically reduced to hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), which is subsequently converted to homocysteine upon combination with O-acetyl homoserine. However, due to the *MET15* mutation, the pathway is interrupted, resulting in the accumulation of  $\text{H}_2\text{S}$ . (B) Schematic illustration of the increase in  $\text{H}_2\text{S}$  production in BY4741 cells caused by *MET15* deletion and the predicted decrease in  $\text{H}_2\text{S}$  concentration following *MET15* gene complementation using the pUM vector. (C) Growth analysis of BY4741-*por1Δpor2Δ* mutant cells expressing hVDAC3 or hVDAC3ΔCys in the background of *MET15* deletion (*met15Δ*) or *MET15* complemented with the pUM plasmid (*MET15*), based on the viability assay results. *MET15* cells were grown on uracil-free medium supplemented with glucose or glycerol as fermentable or nonfermentable carbon source, respectively, for 3 days at 28 °C (permissive temperature) or 37 °C (restrictive temperature). Three replicates of the assay were performed. The data for *met15Δ* cells are presented in Figure 3E. (D) Quantitative analysis of the growth of BY4741-*por1Δpor2Δ* mutant cells expressing hVDAC3 or hVDAC3ΔCys, focusing on the variation induced by the presence or absence of the *MET15* gene. The data are presented as violin plots of three independent experiments. ns, not statistically significant; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

### 3. Discussion

Here, we report for the first time the effects of heterologous expression of human VDAC paralogs in *S. cerevisiae* double *por1Δpor2Δ* mutants derived from two different yeast strains. The results show that identical phenotypes of mutants derived from different yeast strains under the specified conditions do not exclude significant differences in the effects of heterologous expression of a given protein. Furthermore, our results add to the ongoing discussion about the role of cysteine residues in hVDAC3 functionality and possible mechanism of the protein modulation.

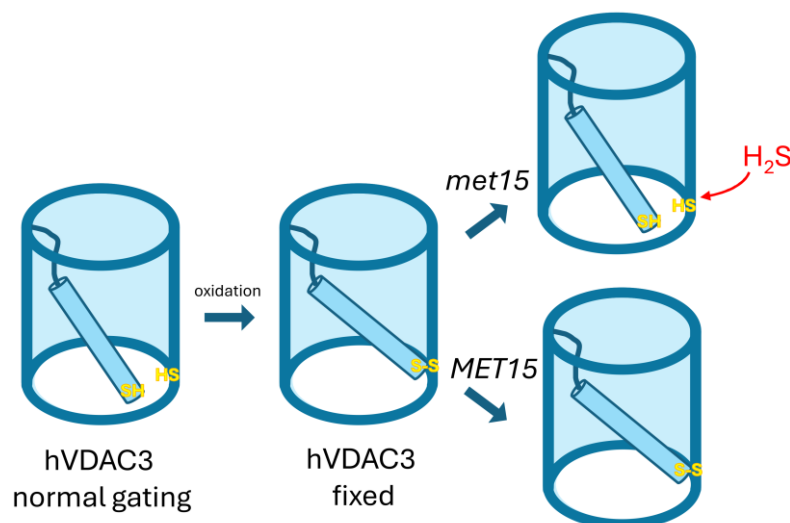
We focused on two different and commonly applied yeast strains, M3 [e.g., 12,14,18,21–24], and BY4741, as well as relevant *por1Δpor2Δ* mutants. The both mutants were not able to grow under diagnostic restrictive conditions (i.e., 37 °C, in the presence of glycerol) as reported previously for M3-*por1Δpor2Δ* [17]. However, despite the similar growth phenotype under diagnostic restrictive conditions, M3-*por1Δpor2Δ* and BY4741-*por1Δpor2Δ* differed in the growth at restrictive temperature in the presence of glucose and at permissive temperature (28 °C) in the presence of glycerol. The observed differences, namely, the growth of BY4741-*por1Δpor2Δ* mutant and the lack of the growth of M3-*por1Δpor2Δ* mutant, are likely due to the initial genotypes of the strains. Nevertheless, the lack of growth of both *por1Δpor2Δ* mutants under restrictive diagnostic conditions allowed the use of these cells for heterologous expression of human VDAC paralogs.

In the case of BY4741-*por1Δpor2Δ* mutant, heterologous expression of hVDAC1, hVDAC2 and hVDAC3 uniformly enhanced cell growth regardless of the applied environmental conditions. Conversely, for M3-*por1Δpor2Δ* mutant, heterologous expression of hVDAC3 exhibited the least effective complementation, including a complete absence of yeast cell growth at restrictive temperature, independent of the presence of glycerol or glucose. Because the double mutants were generated from M3 and BY4741 strains lacking *POR2* gene, the differential contribution of yVDAC2 can be excluded. The importance of the presence of yVDAC2 for the effect of human VDAC paralog heterologous expression may be illustrated by the observation that hVDAC2 expression most significantly enhanced growth of M3-*por1Δpor2Δ* mutant (this study) but expression of hVDAC1 is the most effective in the case of M3-*por1Δ* [14]. Nevertheless, two hypotheses could explain the lack of complementation of M3-*por1Δpor2Δ* growth phenotype under the restrictive temperature by hVDAC3: (1) thermal instability of the isolated protein, evidenced by a melting temperature of 29 °C [27], which occurs in M3 cells but not in BY4741 cells; and/or (2) the oxidation state of cysteine residues, critical for hVDAC3 gating in reconstitution experiments [31] (Figure 5) or other mechanisms underlying the possibility of complementation of *por1Δ* mutant growth [40] that may differ between M3 and BY4741 cells. In addition, the cysteine residues of hVDAC3 have been identified as essential for the ability of the protein to counteract oxidative stress in human HAP1 cells [38]. It was also shown that hVDAC3ΔCys forms typical VDAC channels without affecting the rate of proper channel insertion, although its interactions with cytosolic proteins are altered [27].

Given that the replacement of hVDAC3 with hVDAC3ΔCys, a variant of hVDAC3 in which all cysteine residues are replaced by alanine, affected the growth of M3-*por1Δpor2Δ* and BY4741-*por1Δpor2Δ* cells differently, it can be concluded that cysteine residues play an important role in the complementation effect of hVDAC3. However, this effect is dependent on intracellular conditions related to the yeast cell genotype. In particular, one of the auxotrophic markers that distinguishes BY4741 from M3 strains is *MET15*, which is absent in BY4741 cells. The absence of *MET15* is known to lead to increased H<sub>2</sub>S production [44,45], which is considered important for mitigating oxidative stress [43,47]. Therefore, the difference in the set of auxotrophic markers may create a different background for hVDAC3 cysteine modification [37] and thus explain the different effects of hVDAC3



cysteine residue depletion in M3-*por1Δpor2Δ* and BY4741-*por1Δpor2Δ* cells. Essentially, if the absence of *MET15* is associated with the complementation effect of hVDAC3 and hVDAC3ΔCys in BY4741-*por1Δpor2Δ* cells, then *MET15* expression should influence the ability of the proteins to affect growth phenotype of BY4741-*por1Δpor2Δ* cells. Indeed, *MET15* expression decreased the ability of hVDAC3 to reverse growth phenotype but increased the ability in the case of hVDAC3ΔCys expression that makes BY4741-*por1Δpor2Δ* mutant similar to M3-*por1Δpor2Δ* mutant although the relevant changes in the growth of BY4741-*por1Δpor2Δ* cells are statistically significant only at restrictive temperature and more pronounced in the presence of glucose. The reason could be temperature-related increase in ROS level [e.g., 36], mutual interactions between ROS level and glycolysis rate [e.g., 52] and effectiveness of hVDAC3 in counteracting the increase in ROS, depending on the presence of cysteines and *MET15* [4,38]. Thus, H<sub>2</sub>S is emerging as a molecule important for modulation of hVDAC3 involvement in cellular response to oxidative stress that is based on the protein cysteine residues but contributing mechanism(s) requires further studies. Our hypothesis addressing the mechanism is shown in Figure 5.



**Figure 5. Influence of yeast genetic background on *MET15* and VDAC3 gating.** In yeast strains with the recessive *met15* mutation, hydrogen sulfide is produced, which activates VDAC3 gating (VDAC3 normal gating). This gating is triggered by the suppression of disulfide-bond formation between the N-terminal region and the pore. Conversely, in strains with a functional *MET15* gene, hVDAC3 channels are likely stabilized in an open state under oxidizing conditions (hVDAC3 fixed). This hypothesis suggests that the genetic background of yeast strains, particularly regarding the *MET15* gene, can significantly influence the phenotypic outcomes related to hVDAC3 expression. Different genetic backgrounds may therefore result in distinct phenotypes due to varying mechanisms of VDAC3 gating activation and stabilization.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plasmids

The pML104-POR1 plasmid, which was used for CRISPR/Cas9 genome editing, was derived from the pML104 plasmid, which was kindly provided by John Wyrick. This plasmid is cataloged with Addgene under the identifier #676380 [49].

For the generation of pML104-POR1, a specific guide RNA sequence (5'-GTT-GTTCAATGTAGCGCCCA-3') was integrated into the pML104 plasmid using the Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit from New England Biolabs following the protocol outlined by Hu et al. (2018) [50]. Genes encoding hVDAC 1, 2, and 3 and a cysteine-depleted variant



of hVDAC3 (hVDAC3 $\Delta$ Cys) optimized for yeast codon usage were synthesized along with sequences flanking the *POR1* gene both upstream and downstream and cloned into pBSK(+) Simple-Amp or pBluescript II SK(+) plasmids from Biomatik (Ontario, Canada). The pUM plasmid was a gift from Markus Ralser. This plasmid has been registered with Addgene under the identifier #64176 [51]. This plasmid was designed to restore prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking the *URA3* and *MET15* genes. The list of plasmids used in this research is shown in Table 1.

**Table 1.** List of plasmids used in this study.

Plasmid	Size (bp)	Description
pML104- <i>POR1</i>	11 258	CRISPR/Cas9 vector designed for targeting the <i>POR1</i>
pBSK(+) Simple-Amp- <i>hVDAC1</i>	4 383	Contains the repair DNA sequence for human <i>VDAC1</i> , used in CRISPR/Cas9-mediated gene editing
pBSK(+) Simple-Amp- <i>hVDAC2</i>	4 416	Contains the repair DNA sequence for human <i>VDAC2</i> , used in CRISPR/Cas9-mediated gene editing
pBluescript II SK(+)- <i>hVDAC3</i>	4 437	Contains the repair DNA sequence for human <i>VDAC3</i> , used in CRISPR/Cas9-mediated gene editing
pBluescript II SK(+)- <i>hVDAC3</i> $\Delta$ Cys	4 437	Contains the repair DNA sequence for cysteine-depleted variant of human <i>VDAC3</i> , used in CRISPR/Cas9-mediated gene editing
pUM	6 448	Contains <i>URA3</i> and <i>MET17</i> auxotrophy selection markers

#### 4.2. Strains and culture media

The NEB® 5-alpha competent *E. coli* bacterial strain, purchased from New England Biolabs (Catalog # C2987H), was used for plasmid amplification. The bacterial culture was performed in liquid LB medium composed of 1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 1% sodium chloride, with ampicillin added to a final concentration of 100  $\mu$ g/ml. The culture was maintained in the dark at 37 °C.

The yeast strains used in this study are listed in Table 2. Several media were used to grow the yeast cells to meet the specific experimental requirements. YPD (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% D-glucose) and YPG (1% yeast extract, 2% peptone, and 3% glycerol, pH adjusted to 5.5) media were used for the viability assay. In addition, SD-Ura (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, yeast synthetic nutrient supplement without uracil, and 2% D-glucose) and SG-Ura (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, yeast synthetic nutrient supplement without uracil, and 3% glycerol, pH adjusted to 5.5) media were also used for viability assay, specifically for cells harboring the pUM plasmid. SD-Ura medium served a dual purpose. In addition to viability assay, it was also used for the selection of cells containing the pUM and pML104-*POR1* plasmids. SDC+5-FOA (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, complete yeast synthetic drop-out medium

supplemented with 2% D-glucose, and 0.1% 5-fluoroorotic acid) medium supplemented with 5-fluoroorotic acid (5-FOA) was used to selectively remove plasmids from yeast cells. Agar at a concentration of 2% was added to the solid media.

**Table 2.** List of yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Feature	Source
<b>M3</b>	<i>MATa lys2; his4; trp1; ade2;</i> <i>leu2; ura3</i>	WT	[17]
<b>M3-<i>por1</i>Δ</b>	<i>MATa lys2; his4; trp1; ade2;</i> <i>leu2; ura3; por1Δ::LEU2</i>	Lacking the <i>POR1</i> gene ( <i>por1</i> Δ)	Blachly-Dyson et al., 1997 (M22-2)
<b>M3-<i>por2</i>Δ</b>	<i>MATa lys2; his4; trp1; ade2;</i> <i>leu2; ura3; por2Δ::TRP1</i>	Lacking the <i>POR2</i> gene ( <i>por2</i> Δ)	Blachly-Dyson et al., 1997(M3-2)
<b>M3-<i>por1</i>Δ<i>por2</i>Δ</b>	<i>MATa lys2; his4; trp1; ade2;</i> <i>leu2; ura3; por1Δ::LEU2;</i> <i>por2Δ::TRP1</i>	Double mutant lacking <i>POR1</i> and <i>POR2</i> genes ( <i>por1</i> Δ <i>por2</i> Δ)	Blachly-Dyson et al., 1997 (M22-2-1)
<b>M3-<i>por1</i>Δ<i>por2</i>Δ-<i>hVDAC1</i></b>	<i>MATa lys2; his4; trp1; ade2;</i> <i>leu2; ura3;</i> <i>por1Δ::HVDAC1;</i> <i>por2Δ::TRP1</i>	Expresses human <i>VDAC1</i> under the control of the <i>POR1</i> promoter ( <i>hVDAC1</i> )	This work
<b>M3-<i>por1</i>Δ<i>por2</i>Δ-<i>hVDAC2</i></b>	<i>MATa lys2; his4; trp1; ade2;</i> <i>leu2; ura3;</i> <i>por1Δ::HVDAC2;</i> <i>por2Δ::TRP1</i>	Expresses human <i>VDAC2</i> under the control of the <i>POR1</i> promoter ( <i>hVDAC2</i> )	This work
<b>M3-<i>por1</i>Δ<i>por2</i>Δ-<i>hVDAC3</i></b>	<i>MATa lys2; his4; trp1; ade2;</i> <i>leu2; ura3;</i> <i>por1Δ::HVDAC3;</i> <i>por2Δ::TRP1</i>	Expresses human <i>VDAC3</i> under the control of the <i>POR1</i> promoter ( <i>hVDAC3</i> )	This work
<b>M3-<i>por1</i>Δ<i>por2</i>Δ-<i>hVDAC3</i>-Δ<i>Cys</i></b>	<i>MATa lys2; his4; trp1; ade2;</i> <i>leu2; ura3;</i>	Expresses human <i>VDAC3</i> under the control of the <i>POR1</i> promoter. <i>HVDAC3</i> mutations:	This work

345  
346  
347

348

	<i>por1Δ::HVDAC3ΔCys</i> ; <i>por2Δ::TRP1</i>	C2A, C8A, C36A, C65A, C122A, C229A (hVDAC3ΔCys)	
<b>BY4741</b>	<i>MATa his3Δ1; leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0; ura3Δ0</i>	WT	Euroscarf
<b>BY4741-<i>por1Δ</i></b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0; ura3Δ0</i> ; <i>por1Δ0</i>	Lacking the <i>POR1</i> gene ( <i>por1Δ</i> )	This work
<b>BY4741-<i>por2Δ</i></b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0; ura3Δ0</i> ; <i>por2Δ::kanMX4</i>	Lacking the <i>POR2</i> gene ( <i>por2Δ</i> )	Euroscarf (Y02273)
<b>BY4741-<i>por1Δ por2Δ</i></b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0; ura3Δ0</i> ; <i>por1Δ0; por2Δ::kanMX4</i>	Double mutant lacking <i>POR1</i> and <i>POR2</i> genes ( <i>por1Δ por2Δ</i> )	This work
<b>BY4741-<i>por1Δpor2Δ</i>- hVDAC1</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0; ura3Δ0</i> <i>por1Δ::HVDAC1</i> ; <i>por2Δ::kanMX4</i>	Expresses human VDAC1 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC1)	This work
<b>BY4741-<i>por1Δpor2Δ</i>- hVDAC2</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0; ura3Δ0</i> ; <i>por1Δ::HVDAC2</i> ; <i>por2Δ::kanMX4</i>	Expresses human VDAC2 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC2)	This work
<b>BY4741-<i>por1Δpor2Δ</i>- hVDAC3</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0; ura3Δ0</i> ; <i>por1Δ::HVDAC3</i> ; <i>por2Δ::kanMX4</i>	Expresses human VDAC3 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC3)	This work
<b>BY4741-<i>por1Δpor2Δ</i>- hVDAC3-ΔCys</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0; ura3Δ0</i> ;	Expresses human VDAC3 under the control of the <i>POR1</i> promoter. HVDAC3 mutations:	This work

	<i>por1Δ::HVDAC3ΔCys;</i>	C2A, C8A, C36A, C65A, C122A,	
	<i>por2Δ::kanMX4</i>	C229A (hVDAC3ΔCys)	

#### 4.3. Yeast genetic modification

BY4741-*por1Δ* and BY4741-*por1Δpor2Δ* strains were generated using the CRISPR/Cas9 method previously described [49] with the pML104-POR1 vector together with repair DNA synthesized by annealing two complementary oligonucleotides, POR1\_KO\_1 and POR1\_KO\_2. These oligonucleotides were specifically designed to contain sequences flanking the *POR1* open reading frame by 55 nucleotides. Similarly, all strains expressing human VDACs were generated using CRISPR/Cas9 and homology-directed repair, with the pML104-POR1 vector and repair DNA produced by PCR amplification from plasmid templates (Figure 1). The sequences of all the repair DNA used are available in the Supplementary File S1.

Yeast cells were transformed with 250 ng of pML104-POR1 vector and 400 ng of repair DNA using the Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Takara). After transformation, the cells were plated on SD-Ura solid medium and incubated in the dark at 28 °C for 3-5 days. The genetic modification of each strain was confirmed with PCR genotyping using targeted primers [52] followed by analysis of the PCR products using Sanger sequencing. Once the desired genome editing was confirmed, the pML104-POR1 plasmid was removed by culturing the cells on SDC medium supplemented with 5-FOA. All oligonucleotides are listed in Table 3.

**Table 3.** List of oligonucleotides used in this study.

Oligonucleotides	Sequence (5' -> 3')	Description
pML104_por1_F	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC	insertion of guide sgRNA sequence into pML104 vector
pML104_por1_R	GCAGTGAAAGATAAAATGATCGATCATTTATCTTTCCTGC	
POR1A	TTCCAACAAGTTTAATGGTCAGAAT	amplification of repair DNA, sequencing, diagnostic
POR1B	CTCTAATTTGGTTTGAAGTTGTTT	diagnostic
POR1C	AACTGCAAACCTACCTAACTCCAATG	diagnostic
POR1D	AATGTTCGAAACCAATCTGAAAATA	amplification of repair DNA, sequencing, diagnostic
hVDAC1/2opt_B	CCGAATTCAGTACCGTCGTT	diagnostic
hVDAC3opt_B	GCCGGTGTAGGAACAAAA	diagnostic
POR1_KO_1	CCAACACGAAACAGCCAAGCGTACCCAAAGCAAAAATCAAA CCAACCTCTCAACAACGTATATATCTAATATATATATGTTC ACTATATACCATATATGTGCTCGTTCCT	oligonucleotides for hybridization, DNA repair for gene deletion
POR1_KO_2	AAGAACGAGCACATATATGGTATATAGTGAACATATATATA TTAGATATATACGTTGTTGAGAGGTTGGTTTGATTTTGGCT TTGGGTACGCTTGGCTGTTTCGTGTTGG	

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

#### 4.4. Analysis of cell growth

Yeast growth was analyzed using a yeast viability assay. Yeast cells were grown in liquid YPD medium until they reached an optical density (OD) of 0.5. Serial dilutions of  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  were then prepared. Then, 10  $\mu$ l from each dilution was added to plates containing one of the following solid media: YPD, YPG, SD-Ura, or SG-Ura. The plates were incubated in the dark at 28 °C and 37 °C for 3 days. After incubation, the plates were scanned to obtain high-resolution images of the colonies. The images were then analyzed using ImageJ software to quantify colony growth by converting the images to grayscale and then analyzing the pixel intensity values. To evaluate yeast growth, three independent experiments were performed.

#### 4.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 10.2.1, and 2-way ANOVA was used to evaluate the data. Statistical significance is indicated by the following symbols: \*\*\*\* for  $p < 0.0001$ , \*\*\* for  $p < 0.001$ , \*\* for  $p < 0.01$ , \* for  $p < 0.05$ , and 'ns' for not significant.

## 5. Conclusions

In this study, we showed for the first time that heterologous expression of human VDAC paralogs in *S. cerevisiae por1 $\Delta$ por2 $\Delta$*  double mutants, derived from two different strains, differentially affected cell growth, highlighting the influence of the yeast genotype on the effect of heterologous expression of these proteins. Specifically, in BY4741-*por1 $\Delta$ por2 $\Delta$*  cells, hVDAC3 fully compensates for the lack of native yVDAC proteins, demonstrating its functionality, in contrast to M3-*por1 $\Delta$ por2 $\Delta$*  cells, for which this complementation is not observed. An analogous difference is also evident for the hVDAC3 cysteine-depleted variant, further highlighting the unique interplay between the intracellular conditions of the yeast strain and hVDAC3 complementation ability. Accordingly, the complementation effect of hVDAC3, which lacks all cysteine residues in *S. cerevisiae* double *por1 $\Delta$ por2 $\Delta$*  mutants, has not been previously investigated. Moreover, the use of CRISPR/Cas9 technology allowed the expression of genes encoding hVDAC proteins in BY4741-*por1 $\Delta$ por2 $\Delta$*  cells under the control of the native yeast *POR1* promoter, providing a novel approach to study these proteins in a closely mimicked natural environment. The distinct phenotypes displayed by BY4741-*por1 $\Delta$ por2 $\Delta$*  and M3-*por1 $\Delta$ por2 $\Delta$*  cells, particularly with respect to the role and efficiency of hVDAC3 and its cysteine-depleted variant, make them valuable models for the study of human VDACs, particularly hVDAC3. The diverse responses of these cells offer intriguing perspectives on the functional complexity of hVDAC3 in the yeast cellular environment, including the role of H<sub>2</sub>S and providing important tools for more comprehensive studies of the functional diversity of human VDACs.

**Supplementary Materials:** File S1: Sequences of repair DNA used in the CRISPR/Cas9 + homology-directed repair (HDR) method.

**Author Contributions:** conceptualization, A.K.; methodology, M.B-G.; validation, H.K., formal analysis, A.K.; investigation, M.B-G., W.G., D.M. and A.K.; writing—original draft preparation, H.K.; writing—review and editing, A.K. and H.K.; visualization, A.K.; supervision, H.K.; funding acquisition, A.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the research grant of National Science Centre, Poland, Grant Number 2017/26/D/NZ1/00075.

<b>Institutional Review Board Statement:</b> Not applicable.	417
<b>Informed Consent Statement:</b> Not applicable.	418
	419
<b>Data Availability Statement:</b> All data are contained within the article and Supplementary Material.	420
<b>Acknowledgments:</b> Special thanks to Dr. Savani Anbalagan (Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland) for valuable discussions on the effect of hydrogen sulfide on human VDAC3 protein.	421
	422
<b>Conflicts of Interest:</b> The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.	423
	424
	425

## References 426

1. Benz, R. Historical Perspective of Pore-Forming Activity Studies of Voltage-Dependent Anion Channel (Eukaryotic or Mitochondrial Porin) Since Its Discovery in the 70th of the Last Century. *Front Physiol* **2021**, *12*, 734226, doi:10.3389/fphys.2021.734226. 427
2. Benz, R. Permeation of Hydrophilic Solutes through Mitochondrial Outer Membranes: Review on Mitochondrial Porins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1994**, *1197*, 167–196, doi:10.1016/0304-4157(94)90004-3. 428
3. Colombini, M. VDAC Structure, Selectivity, and Dynamics. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1818*, 1457–1465, doi:10.1016/j.bbamem.2011.12.026. 429
4. De Pinto, V. Renaissance of VDAC: New Insights on a Protein Family at the Interface between Mitochondria and Cytosol. *Biomolecules* **2021**, *11*, 107, doi:10.3390/biom11010107. 430
5. Mannella, C.A. VDAC-A Primal Perspective. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1685, doi:10.3390/ijms22041685. 431
6. 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*, 99–120, doi:10.1007/BF01869662. 432
7. 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*, 227–285, doi:10.1016/j.mam.2010.03.002. 433
8. Heslop, K.A.; Milesi, V.; Maldonado, E.N. VDAC Modulation of Cancer Metabolism: Advances and Therapeutic Challenges. *Front Physiol* **2021**, *12*, 742839, doi:10.3389/fphys.2021.742839. 434
9. Homblé, F.; Krammer, E.-M.; Prévost, M. Plant VDAC: Facts and Speculations. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1818*, 1486–1501, doi:10.1016/j.bbamem.2011.11.028. 435
10. Bay, D.C.; Hafez, M.; Young, M.J.; Court, D.A. Phylogenetic and Coevolutionary Analysis of the  $\beta$ -Barrel Protein Family Comprised of Mitochondrial Porin (VDAC) and Tom40. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1818*, 1502–1519, doi:10.1016/j.bbamem.2011.11.027. 436
11. Young, M.J.; Bay, D.C.; Hausner, G.; Court, D.A. The Evolutionary History of Mitochondrial Porins. *BMC Evolutionary Biology* **2007**, *7*, 31, doi:10.1186/1471-2148-7-31. 437
12. Ravi, B.; Kanwar, P.; Sanyal, S.K.; Bheri, M.; Pandey, G.K. VDACs: An Outlook on Biochemical Regulation and Function in Animal and Plant Systems. *Front Physiol* **2021**, *12*, 683920, doi:10.3389/fphys.2021.683920. 438
13. De Pinto, V.; Guarino, F.; Guarnera, A.; Messina, A.; Reina, S.; Tomasello, F.M.; Palermo, V.; Mazzoni, C. Characterization of Human VDAC Isoforms: A Peculiar Function for VDAC3? *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1797*, 1268–1275, doi:10.1016/j.bbabbio.2010.01.031. 439
14. Karachitos, A.; Grobys, D.; Antoniewicz, M.; Jedut, S.; Jordan, J.; Kmita, H. Human VDAC Isoforms Differ in Their Capability to Interact with Minocycline and to Contribute to Its Cytoprotective Activity. *Mitochondrion* **2016**, *28*, 38–48, doi:10.1016/j.mito.2016.03.004. 440

15. Komarov, A.G.; Graham, B.H.; Craigen, W.J.; Colombini, M. The Physiological Properties of a Novel Family of VDAC-like Proteins from *Drosophila Melanogaster*. *Biophys J* **2004**, *86*, 152–162, doi:10.1016/S0006-3495(04)74093-X.
16. Xu, X.; Decker, W.; Sampson, M.J.; Craigen, W.J.; Colombini, M. Mouse VDAC Isoforms Expressed in Yeast: Channel Properties and Their Roles in Mitochondrial Outer Membrane Permeability. *J Membr Biol* **1999**, *170*, 89–102, doi:10.1007/s002329900540.
17. 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. *Molecular and Cellular Biology* **1997**, *17*, 5727–5738, doi:10.1128/MCB.17.10.5727.
18. 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*, 173–181, doi:10.1007/s002329900324.
19. Morgenstern, M.; Stiller, S.B.; Lübbert, P.; Peikert, C.D.; Dannenmaier, S.; Drepper, F.; Weill, U.; Höß, P.; Feuerstein, R.; Gebert, M.; et al. Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Rep* **2017**, *19*, 2836–2852, doi:10.1016/j.celrep.2017.06.014.
20. Magrì, A.; Di Rosa, M.C.; Orlandi, I.; Guarino, F.; Reina, S.; Guarnaccia, M.; Morello, G.; Spampinato, A.; Cavallaro, S.; Messina, A.; et al. Deletion of Voltage-Dependent Anion Channel 1 Knocks Mitochondria down Triggering Metabolic Rewiring in Yeast. *Cell Mol Life Sci* **2020**, *77*, 3195–3213, doi:10.1007/s00018-019-03342-8.
21. Ellenrieder, L.; Dieterle, M.P.; Doan, K.N.; Mårtensson, C.U.; Floerchinger, A.; Campo, M.L.; Pfanner, N.; Becker, T. Dual Role of Mitochondrial Porin in Metabolite Transport across the Outer Membrane and Protein Transfer to the Inner Membrane. *Mol Cell* **2019**, *73*, 1056–1065.e7, doi:10.1016/j.molcel.2018.12.014.
22. Guardiani, C.; Magrì, A.; Karachitos, A.; Di Rosa, M.C.; Reina, S.; Bodrenko, I.; Messina, A.; Kmita, H.; Ceccarelli, M.; De Pinto, V.  $\gamma$ VDAC2, the Second Mitochondrial Porin Isoform of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **2018**, *1859*, 270–279, doi:10.1016/j.bbabi.2018.01.008.
23. Leggio, L.; Guarino, F.; Magrì, A.; Accardi-Gheit, R.; Reina, S.; Specchia, V.; Damiano, F.; Tomasello, M.F.; Tommasino, M.; Messina, A. Mechanism of Translation Control of the Alternative *Drosophila Melanogaster* Voltage Dependent Anion-Selective Channel 1 mRNAs. *Sci Rep* **2018**, *8*, 5347, doi:10.1038/s41598-018-23730-7.
24. Lohret, T.A.; Kinnally, K.W. Multiple Conductance Channel Activity of Wild-Type and Voltage-Dependent Anion-Selective Channel (VDAC)-Less Yeast Mitochondria. *Biophys J* **1995**, *68*, 2299–2309.
25. Schulte, U.; den Brave, F.; Haupt, A.; Gupta, A.; Song, J.; Müller, C.S.; Engelke, J.; Mishra, S.; Mårtensson, C.; Ellenrieder, L.; et al. Mitochondrial Complexome Reveals Quality-Control Pathways of Protein Import. *Nature* **2023**, *614*, 153–159, doi:10.1038/s41586-022-05641-w.
26. Sousa, A.D.; Costa, A.L.; Costa, V.; Pereira, C. Prediction and Biological Analysis of Yeast VDAC1 Phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* **2024**, *753*, 109914, doi:10.1016/j.abb.2024.109914.
27. Queralt-Martín, M.; Bergdoll, L.; Tejjido, O.; Munshi, N.; Jacobs, D.; Kuszak, A.J.; Protchenko, O.; Reina, S.; Magrì, A.; De Pinto, V.; et al. A Lower Affinity to Cytosolic Proteins Reveals VDAC3 Isoform-Specific Role in Mitochondrial Biology. *Journal of General Physiology* **2020**, *152*, e201912501, doi:10.1085/jgp.201912501.
28. Trindade, D.; Pereira, C.; Chaves, S.R.; Manon, S.; Côrte-Real, M.; Sousa, M.J. VDAC Regulates AAC-Mediated Apoptosis and Cytochrome c Release in Yeast. *Microb Cell* **2016**, *3*, 500–510, doi:10.15698/mic2016.10.533.
29. Messina, A.; Reina, S.; Guarino, F.; De Pinto, V. VDAC Isoforms in Mammals. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1818*, 1466–1476, doi:10.1016/j.bbamem.2011.10.005.
30. 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*, 39206–39212, doi:10.1074/jbc.M104724200.

31. 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848*, 3188–3196, doi:10.1016/j.bbamem.2015.09.017.
32. De Pinto, V.; Reina, S.; Gupta, A.; Messina, A.; Mahalakshmi, R. Role of Cysteines in Mammalian VDAC Isoforms' Function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2016**, *1857*, 1219–1227, doi:10.1016/j.bbabbio.2016.02.020.
33. Karachitos, A.; Grabiński, W.; Baranek, M.; Kmita, H. Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis. *Front Physiol* **2021**, *12*, 750627, doi:10.3389/fphys.2021.750627.
34. 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*, 2837–2844, doi:10.1016/j.febslet.2010.04.066.
35. Costa, V.; Moradas-Ferreira, P. Oxidative Stress and Signal Transduction in *Saccharomyces Cerevisiae*: Insights into Ageing, Apoptosis and Diseases. *Mol Aspects Med* **2001**, *22*, 217–246, doi:10.1016/s0098-2997(01)00012-7.
36. Zhang, M.; Shi, J.; Jiang, L. Modulation of Mitochondrial Membrane Integrity and ROS Formation by High Temperature in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology* **2015**, *18*, 202–209, doi:10.1016/j.ejbt.2015.03.008.
37. Reina, S.; Pittalà, M.G.G.; Guarino, F.; Messina, A.; De Pinto, V.; Foti, S.; Saletti, R. Cysteine Oxidations in Mitochondrial Membrane Proteins: The Case of VDAC Isoforms in Mammals. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 397, doi:10.3389/fcell.2020.00397.
38. Reina, S.; Nibali, S.C.; Tomasello, M.F.; Magrì, A.; Messina, A.; De Pinto, V. Voltage Dependent Anion Channel 3 (VDAC3) Protects Mitochondria from Oxidative Stress. *Redox Biol* **2022**, *51*, 102264, doi:10.1016/j.redox.2022.102264.
39. Pittalà, M.G.G.; Saletti, R.; Reina, S.; Cunsolo, V.; De Pinto, V.; Foti, S. A High Resolution Mass Spectrometry Study Reveals the Potential of Disulfide Formation in Human Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Selective Channel Isoforms (hVDACs). *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 1468, doi:10.3390/ijms21041468.
40. Reina, S.; Checchetto, V.; Saletti, R.; Gupta, A.; Chaturvedi, D.; Guardiani, C.; Guarino, F.; Scorciapino, M.A.; Magrì, A.; Foti, S.; et al. VDAC3 as a Sensor of Oxidative State of the Intermembrane Space of Mitochondria: The Putative Role of Cysteine Residue Modifications. *Oncotarget* **2016**, *7*, 2249–2268, doi:10.18632/oncotarget.6850.
41. Gałgańska, H.; Antoniewicz, M.; Budzińska, M.; Gałgański, L.; Kmita, H. VDAC Contributes to mRNA Levels in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells by the Intracellular Reduction/Oxidation State Dependent and Independent Mechanisms. *J Bioenerg Biomembr* **2010**, *42*, 483–489, doi:10.1007/s10863-010-9315-6.
42. Xu, S.; Shieh, M.; Paul, B.D.; Xian, M. Hydrogen Sulfide: Recent Development of Its Dual Donors and Hybrid Drugs. *Br J Pharmacol* **2023**, doi:10.1111/bph.16211.
43. Kabil, O.; Motl, N.; Banerjee, R. H<sub>2</sub>S and Its Role in Redox Signaling. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1844*, 1355–1366, doi:10.1016/j.bbapap.2014.01.002.
44. Linderholm, A.L.; Findleton, C.L.; Kumar, G.; Hong, Y.; Bisson, L.F. Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **2008**, *74*, 1418–1427, doi:10.1128/AEM.01758-07.
45. Van Oss, S.B.; Parikh, S.B.; Castilho Coelho, N.; Wacholder, A.; Belashov, I.; Zdanczewicz, S.; Michaca, M.; Xu, J.; Kang, Y.P.; Ward, N.P.; et al. On the Illusion of Auxotrophy: met15Δ Yeast Cells Can Grow on Inorganic Sulfur, Thanks to the Previously Uncharacterized Homocysteine Synthase Yll058w. *J Biol Chem* **2022**, *298*, 102697, doi:10.1016/j.jbc.2022.102697.



46. Gu, Z.; Sun, Y.; Wu, F.; Wu, X. Mechanism of Growth Regulation of Yeast Involving Hydrogen Sulfide From S-Propargyl-Cysteine Catalyzed by Cystathionine- $\gamma$ -Lyase. *Front Microbiol* **2021**, *12*, 679563, doi:10.3389/fmicb.2021.679563. 541-543
47. Correia-Melo, C.; Kamrad, S.; Tengölics, R.; Messner, C.B.; Trebulle, P.; Townsend, S.; Jayasree Varma, S.; Freiwald, A.; Heineike, B.M.; Campbell, K.; et al. Cell-Cell Metabolite Exchange Creates a pro-Survival Metabolic Environment That Extends Lifespan. *Cell* **2023**, *186*, 63-79.e21, doi:10.1016/j.cell.2022.12.007. 544-546
48. Liemburg-Apers, D.C.; Willems, P.H.G.M.; Koopman, W.J.H.; Grefte, S. Interactions between Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cellular Glucose Metabolism. *Arch Toxicol* **2015**, *89*, 1209–1226, doi:10.1007/s00204-015-1520-y. 547-549
49. Laughery, M.F.; Wyrick, J.J. Simple CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Curr Protoc Mol Biol* **2019**, *129*, e110, doi:10.1002/cpmb.110. 550-551
50. Hu, G.; Luo, S.; Rao, H.; Cheng, H.; Gan, X. A Simple PCR-Based Strategy for the Introduction of Point Mutations in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* via CRISPR/Cas9. *Biochem Mol Biol J* **2018**, *4*, 9, doi:10.21767/2471-8084.100058. 552-553
51. Müllleder, M.; Campbell, K.; Matsarskaia, O.; Eckerstorfer, F.; Ralser, M. *Saccharomyces Cerevisiae* Single-Copy Plasmids for Auxotrophy Compensation, Multiple Marker Selection, and for Designing Metabolically Cooperating Communities. *F1000Res* **2016**, *5*, 2351, doi:10.12688/f1000research.9606.1. 554-556
52. Giaever, G.; Nislow, C. The Yeast Deletion Collection: A Decade of Functional Genomics. *Genetics* **2014**, *197*, 451–465, doi:10.1534/genetics.114.161620. 557-558

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content. 559-563

Martyna Baranek-Grabińska

Poznań, 28.10.2024

Zakład Bioenergetyki  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Biologii UAM  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w manuskrypcie pt. „Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research” autorstwa: **Baranek-Grabińska M.**, Grabiński W., Musso D., Karachitos A., Kmita H. (2024), który stanowi część mojej rozprawy doktorskiej, polegał na opracowaniu i optymalizacji metod badawczych, otrzymaniu szczepów modelu drożdżowego użytych w badaniach oraz określeniu przeżywalności komórek z wykorzystaniem testów płytkowych i udziale w dyskusji wyników.



Martyna Baranek-Grabińska



Promotor: prof. dr hab. Hanna Kmita



Promotor pomocniczy: dr hab. Andonis Karachitos

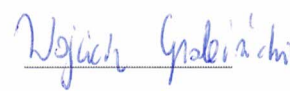
Wojciech Grabiński

Poznań, 28.10.2024

Zakład Bioenergetyki  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Biologii UAM  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w manuskrypcie pt. „Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research” autorstwa: **Baranek-Grabińska M.**, Grabiński W., Musso D., Karachitos A., Kmita H. (2024), który stanowi część rozprawy doktorskiej Martyny Baranek – Grabińskiej, polegał na udziale w konstrukcji szczepów oraz w przeprowadzeniu płytkowych testów przeżywalności komórek.



Podpis

Deborah Musso  
Department of Molecular Medicine  
University of Pavia  
Via Ferrata 9 - 27100 Pavia  
deborah.musso01@universitadipavia.it

Pavia, 24/10/2024

### STATEMENT

I declare that my participation in manuscript of article "Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research" by **Baranek-Grabińska M.**, Grabiński W., Musso D., Karachlitos A., Kmita H. (2024), which is a part of Martyna Baranek - Grabińska's doctoral dissertation, consisted of performing laboratory work during construction and preparation of yeast strains used in experiments.

(Signature)

A handwritten signature in black ink that reads "Deborah Musso". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

(Deborah Musso)



**dr hab. Andonis Karachitos**

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Zakład Bioenergetyki  
Wydział Biologii UAM  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

Poznań, 28. 10. 2024 r.

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji:

Baranek-Grabińska M., Grabiński W., Musso D., Karachitos A., Kmita H., Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research, wysłanej na zaproszenie do zeszytu tematycznego „Stress Response Research: Yeast as Models: 2nd Edition” przygotowywanego w ramach International Journal of Molecular Sciences, mój udział polegał na tworzeniu koncepcji i założeń badań, organizacji badań, mentoringu i prowadzenia zespołu badawczego, tworzeniu elementów wizualnych do publikacji wyników, współtworzeniu pierwszej wersji manuskryptu i dopracowaniu wersji końcowej manuskryptu.

Z poważaniem,

Andonis Karachitos



Poznań, 15.10.2024

Prof. dr hab. Hanna Kmita  
kmita@amu.edu.pl

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji:

Baranek-Grabińska M., Grabiński W., Musso D., Karachitos A., Kmita H., Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research, wysłanej na zaproszenie do zeszytu tematycznego „Stress Response Research: Yeast as Models: 2nd Edition” przygotowywanego w ramach International Journal of Molecular Sciences, mój udział polegał na uczestniczeniu w dyskusji dotyczącej planowanych badań i otrzymanych wyników oraz w przygotowaniu maszynopisu publikacji.

Hanna Kmita

# **Human VDAC3 as a sensor of intracellular redox state: contribution to cytoprotection mechanisms in oxidative stress**

Martyna Baranek-Grabińska<sup>1</sup>, Tomasz Skrzypczak<sup>2</sup>, Hanna Kmita<sup>1\*</sup>, Andonis Karachitos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioenergetics, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland.

<sup>2</sup>Center for Advanced Technology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland.

\*Correspondence: Hanna Kmita, [kmita@amu.edu.pl](mailto:kmita@amu.edu.pl); Andonis Karachitos, [andonis@amu.edu.pl](mailto:andonis@amu.edu.pl)

## **Keywords:**

Human VDAC3; Human VDAC2; Human VDAC1; Oxidative stress; Mitochondrial function; Cysteine residues; *Saccharomyces cerevisiae*; Reactive oxygen species; ATP synthesis; Proton leak

## **Founding:**

The work was supported by the following funding: the ID-UB minigrant for doctoral students (017/02/SNP/0008) awarded to Martyna Baranek-Grabińska; the research grant of National Science Centre (2017/26/D/NZ1/00075) awarded to Andonis Karachitos.

## Abstract

Voltage-dependent anion channels (VDACs) are essential for mitochondrial function, facilitating the exchange of metabolites between the cytosol and mitochondria. This study investigates the role of human VDAC paralogs - hVDAC1, hVDAC2 and hVDAC3 - in maintaining mitochondrial function under oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking endogenous VDACs (encoded by *POR1* and *POR2*) and antioxidant enzymes; i.e., superoxide dismutases (encoded by *SOD1* and *SOD2*). Yeast cells expressing hVDAC3 showed stable growth under oxidative stress, maintained mitochondrial membrane potential and morphology, exhibited reduced superoxide anion levels, and achieved efficient ATP synthesis with minimal proton leak. In contrast, cells expressing hVDAC1 or hVDAC2 showed impaired mitochondrial function. The cysteine residues in hVDAC3 were essential for its protective role, as the cysteine-depleted variant (hVDAC3 $\Delta$ Cys) showed impaired growth under stress conditions. Although hVDAC2 exhibited higher spare respiratory capacity, it had increased proton leak and reduced ATP synthesis-linked respiration, likely due to limited metabolite exchange leading to proton gradient accumulation and subsequent proton leak. These findings highlight the unique protective function of hVDAC3 under oxidative stress, attributed to efficient metabolite transport and regulation via cysteine oxidation.



## 1. Introduction

Mitochondria are essential organelles responsible for energy transfer, calcium homeostasis, and regulation of regulated death pathways in eukaryotic cells. The outer mitochondrial membrane (OMM) contains several proteins that facilitate the exchange of metabolites and ions between the mitochondria and the cytosol [1]. Among these proteins, voltage-dependent anion channels (VDACs) play a crucial role in controlling mitochondrial function and cellular metabolism [2].

In mammals, the VDAC family consists of three paralogs: VDAC1, VDAC2, and VDAC3 [3]. While VDAC1 and VDAC2 have been extensively studied and well characterized, VDAC3 remains the least understood member of this family [4]. Despite the significant amino acid sequence similarity between VDAC3 and the other paralogs, the channel function of VDAC3 was the subject of much controversy. Early studies suggested that VDAC3 may not form functional anion channels in OMM, in contrast to the well characterized VDAC1 and VDAC2 [5,6]. Some researchers suggested that VDAC3 has mainly regulatory or structural rather than channel functions [7,8]. They pointed to low activity *in vitro*, suggesting that VDAC3 may be channel inactive or that its activity is regulated by specific cellular conditions that have not been reproduced in laboratory experiments. However, other studies have demonstrated that VDAC3 is capable of forming functional channels similar to VDAC1 [9–12], indicating its potential ability to act as a pore forming protein under certain conditions.

This controversy may be due to differences in study methodology, such as protein expression systems, experimental conditions, or the presence of posttranslational modifications affecting VDAC3 function. In addition, oxidation of specific cysteine residues in VDAC3 has been proposed as a mechanism regulating its channel activity [11].

Despite the progress in VDAC3 research, its actual role as a channel in OMM remains incompletely understood. However, there is increasing evidence that VDAC3 may act as a redox state sensor, responding to changes in the oxidation-reduction status of the cell [13]. Oxidation of specific cysteine residues in the structure of VDAC3 indicates that the protein is sensitive to oxidative stress, which may affect its conformation and channel activity. Thus, VDAC3 may play an important role in protecting the cell from ROS-induced damage, contributing to the maintenance of mitochondrial integrity and cellular homeostasis [14]. Studies have shown that alterations in VDAC3 expression or function can lead to impaired ATP synthesis, mitochondrial dysfunction and increased susceptibility to oxidative stress [14]. In addition, the redox sensor function of VDAC3 may be crucial in modulating signaling processes, which influence a cells decision to survive or die in response to environmental stress [2,15].

In this study, we aimed to investigate the role of human VDAC paralogs - hVDAC1, hVDAC2, and hVDAC3 - in mitochondrial function under oxidative stress conditions by expressing these paralogs in

the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lacking the endogenous *POR1* and *POR2* genes, encoding for yVDAC1 and yVDAC2, respectively. The yVDAC1 paralog is well-known for its role in forming permeable channels for ions and metabolites while yVDAC2 was initially considered inactive or non-functional until recent studies that confirmed its ability to form canonical channels [16]. Interestingly, yVDAC2 expression can be induced under specific conditions, such as when certain human proteins are introduced, suggesting its potential compensatory role in the absence of yVDAC1 [17]. Thus, in yeast models based on heterologous expression of human VDAC, elimination of both yVDAC1 and yVDAC2 should be considered to allow clearer observation of the human protein's function and to prevent potential compensatory effects of the yeast VDAC paralogs. Additionally, to induce oxidative stress and assess the ability of each VDAC paralog to support mitochondrial function, we generated yeast strains with deletions of *SOD1* and *SOD2*, encoding for CuZnSOD and MnSOD, respectively, being crucial for converting superoxide radicals into hydrogen peroxide, thus mitigating oxidative damage [18,19]. The human VDAC paralogs were analyzed for their impact on cell growth, the mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\psi$ ), superoxide anion levels, and respiratory parameters to better understand their functional differences.

The data showed that hVDAC3 provided superior protection against oxidative stress by reducing superoxide anion levels, and supporting efficient ATP synthesis, even under stress conditions. The protection was not provided by hVDAC1 and hVDAC2 although heterologous expression of hVDAC2 enabled a greater spare respiratory capacity but with a significant cost to mitochondrial efficiency, reflected in increased proton leak and decreased ATP synthesis. These findings highlight distinct functional roles for each human VDAC paralog in maintaining mitochondrial homeostasis and support protective role of hVDAC3 under oxidative stress.

## 2. Results

### 2.1. The cell growth of the *sod1Δsod2Δ* mutant requires the presence of VDAC

The construction of yeast strains expressing human VDAC paralogs was aimed to investigate their impact on mitochondrial function and cellular viability under oxidative stress. Using the *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 *por2Δ* model, we employed the CRISPR/Cas9 genome editing system to delete the *yVDAC1*. This deletion allowed for the integration of genes encoding for human hVDAC1, hVDAC2, or hVDAC3 into the yeast genome and effectively replacing the native *yVDAC1* channels by their human variants (Fig. 1). This approach enabled us to assess the functional roles of single human VDACS within an eukaryotic organism in the absence of *yVDAC2*, which function is still unknown [16]. To enhance oxidative stress within the cells, we also deleted the *SOD1* and *SOD2* genes. Their absence led to an accumulation of superoxide anion, significantly increasing the oxidative burden inside the cells.

Interestingly, attempts to construct a yeast strain lacking *POR1*, *POR2*, *SOD1* and *SOD2* were unsuccessful, suggesting synthetic lethality resulting from the combination of these deletions. The simultaneous absence of VDAC channels and key antioxidant enzymes (i.e., CuZnSOD and MnSOD) likely created conditions incompatible with cell survival due to impaired metabolite transport across OMM and heightened oxidative stress.

In contrast, cells expressing any variant of VDAC, whether the native or a human analog, exhibited normal viability on YPD medium at 28°C (Fig. 2A). This finding underscores the essential role of functional VDAC channels in maintaining cellular homeostasis, even under increased oxidative stress. It also confirms that human VDAC paralogs can functionally complement their yeast counterparts, ensuring proper mitochondrial function.

### 2.2. Under oxidative stress cell growth based on mitochondria functionality occurs only in the presence of hVDAC3

A major focus of this study was to compare the effects of each human VDAC paralog on yeast growth under both normal and oxidative stress conditions. Growth assays were performed on media containing either a fermentable carbon source (glucose, YPD) or a non-fermentable carbon source (glycerol, YPG) to assess mitochondrial functionality, which is crucial when cells rely on oxidative phosphorylation for energy transformation.

Temperature has a significant effect on *S. cerevisiae* cellular processes and viability. While the yeast typically grows well at moderate temperatures (around 28°C), exposure to higher temperatures, such as

37°C, can induce stress responses. At 37°C, yeast cells can experience impaired protein folding, increased membrane fluidity, and oxidative stress, which can disrupt mitochondrial function and metabolism [20–22]. Some mutant strains, particularly those lacking specific mitochondrial proteins such as VDAC, exhibit temperature sensitivity and are unable to survive at 37°C [23]. These strains may show reduced cell growth rates or fail to grow at all, highlighting the essential role of proteins involved in stress adaptation and mitochondrial integrity under thermal stress.

On solid YPD, all yeast strains, regardless of the expressed VDAC or the presence of *sod1Δsod2Δ* deletions, demonstrated efficient cell growth (Fig. 2A). This observation indicates that under fermentative conditions, where glycolysis suffices for ATP generation, neither the type of VDAC expressed nor the oxidative stress status significantly impacts cell viability.

However, significant differences emerged when the yeast strains were grown on YPG at elevated temperature. Growth on glycerol necessitates functional mitochondria because cells must perform oxidative phosphorylation to generate ATP from non-fermentable carbon sources. At 28°C and 37°C, only the cells expressing hVDAC3 in the *sod1Δsod2Δ* background were able to grow efficiently on YPG. In contrast, cells expressing hVDAC1 or hVDAC2 in the same background showed significantly impaired growth under these conditions (Fig. 2A). This finding highlights the unique ability of hVDAC3 to support mitochondrial function under oxidative stress.

To further quantify mitochondrial functionality, we monitored the growth of yeast strains in liquid YPG at 28°C (Fig. 2B). The cells expressing hVDAC3 in a *sod1Δsod2Δ* background displayed the highest optical density ( $OD_{600} = 0.3281 \pm 0.013$ ), indicating superior growth in the presence of non-fermentable carbon source when compared to cells expressing hVDAC1 ( $OD_{600} = 0.1575 \pm 0.002$ ) or hVDAC2 ( $OD_{600} = 0.1707 \pm 0.008$ ). This growth advantage suggests that hVDAC3 maintains more efficient mitochondrial energy transformation in oxidative stress environment.

### **2.3. Under oxidative stress the level of mitochondrial ROS does not increase only in the presence of hVDAC3**

Mitochondrial ROS levels were measured using the MitoSOX Red probe, a fluorogenic dye that selectively detects superoxide anions within live cells. This probe is specifically targeted to mitochondria, allowing for the assessment of oxidative stress directly at the site of ROS production [24]. The yeast cells expressing hVDAC1 or hVDAC2 in the *sod1Δsod2Δ* background exhibited a significant accumulation of superoxide anion (Fig. 3) under oxidative stress conditions imposed by the elimination of *SOD1* and *SOD2*. The recorded mean fluorescence values increased from  $63525 \pm 16092$  to  $118915 \pm 22497$  for cells expressing hVDAC1 and from  $71635 \pm 12395$  to  $134000 \pm 15451$  for cells

expressing hVDAC2. In contrast, the cells expressing hVDAC3 showed a markedly lower accumulation of superoxide anion, with a mean fluorescence value of  $49974 \pm 9674$  in the presence of *SOD1* and *SOD2*, and of  $56538 \pm 2509$  in the *sod1Δsod2Δ* background. This significant difference suggests that hVDAC3 has a protective effect against superoxide anion accumulation, even in the absence of the superoxide dismutases. The lower ROS levels in hVDAC3-expressing cells correlated with these cells superior growth performance under oxidative stress conditions, as previously observed in our growth assays on YPG (Fig. 2).

The elevated levels of superoxide anion in yeast mitochondria expressing hVDAC1 or hVDAC2 indicate that these VDAC paralogs are less effective in mitigating oxidative stress when the primary antioxidant enzymes CuZnSOD and MnSOD are absent. The high ROS levels could impair mitochondrial function, leading to reduced cellular viability under stress conditions.

#### **2.4. Under oxidative stress hVDAC3 supports mitochondrial morphology and the mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\psi$ )**

To further investigate how the human VDAC paralogs influence mitochondrial morphology and the mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\psi$ ) under oxidative stress, we utilized the MitoLoc dual fluorescent reporter system [25]. This system employs two fluorescent markers: preSu9-GFP and preCox4-mCherry. The preSu9-GFP is targeted to mitochondria in  $\Delta\psi$ -independent manner, serving as a consistent indicator of mitochondrial presence and morphology. In contrast, preCox4-mCherry import into mitochondria is dependent on  $\Delta\psi$ , allowing to assess the functional state of the mitochondrial membrane (Fig. 4A).

In *por1Δpor2Δ* cells depleted of both endogenous VDAC genes, the GFP signal was strong and relatively well distributed, whereas the mCherry signal showed a more dispersed and fragmented pattern (Fig. 4B). The overlay showed partial co-localization (yellow regions), but it was significantly reduced, suggesting a decreased  $\Delta\psi$  due to the absence of VDAC.

Under control conditions without oxidative stress, yeast cells expressing yVDAC1 (Fig. 4B) or any of the three human VDAC paralogs - hVDAC1, hVDAC2, or hVDAC3 (Fig. 4C) - displayed tubular mitochondrial networks with substantial overlap between the GFP and mCherry signals. This overlap indicates that cells of the all strains maintained a stable  $\Delta\psi$  and intact mitochondrial morphology when antioxidant defenses were sufficient.

However, under oxidative stress induced by the deletion of *SOD1* and *SOD2*, distinct differences emerged among the strain cells (Fig. B and Fig 4D). In *yVDAC1sod1Δsod2Δ* cells, mitochondrial

morphology appeared more fragmented when compared to the yVDAC1 strain under normal conditions. Both preSu9-GFP and preCox4-mCherry signals were present, but mitochondria showed increased aggregation and fragmentation (as seen in the overlay panel), with lower levels of co-localization of GFP and mCherry signals. This suggests that under oxidative stress, yVDAC1 can partially maintain  $\Delta\psi$  but the stress conditions result in increased mitochondrial fragmentation, which affects the overall stability of the mitochondrial network. Similarly, cells expressing hVDAC1 or hVDAC2 exhibited fragmented mitochondria, characterized by disrupted tubular structures and the formation of mitochondrial fragments. Additionally, these strains showed diffused mCherry fluorescence, suggesting a significant reduction in  $\Delta\psi$ . The loss of  $\Delta\psi$  likely impaired the import of preCox4-mCherry into mitochondria, resulting in its diffused cytosolic distribution and indicating mitochondrial dysfunction.

In contrast, cells expressing hVDAC3 retained a significant amount of mCherry signal, indicating that  $\Delta\psi$  was better maintained, even though there was a slight reduction. Moreover, the morphology of mitochondria expressing hVDAC3 remained intact, highlighting the ability of this paralog to support mitochondrial stability without fragmentation, unlike hVDAC1 and hVDAC2.

## **2.5. Quantitative analysis of $\Delta\psi$ under oxidative stress suggests the similarity between cells expressing hVDAC2 and hVDAC3**

To further investigate the impact of human VDAC paralogs on mitochondrial function under oxidative stress, we measured  $\Delta\psi$  using tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) fluorescence (Fig. 5). Under control conditions, the yeast cells expressing hVDAC1, hVDAC2 or hVDAC3 exhibited distinct levels of  $\Delta\psi$  as determined by TMRM fluorescence intensity. Cells expressing hVDAC1 displayed the highest TMRM fluorescence intensity ( $138579.97 \pm 7879.02$ ), indicating a robust  $\Delta\psi$ . The hVDAC3-expressing cells showed an intermediate  $\Delta\psi$  ( $91979.61 \pm 10686.19$ ), while the hVDAC2-expressing cells had the lowest  $\Delta\psi$  among the cells expressing these paralogs ( $78427.43 \pm 9533.31$ ).

Upon inducing oxidative stress through the deletion of *SOD1* and *SOD2* (*sod1 $\Delta$ sod2 $\Delta$*  background), the disparities between the hVDAC2- and hVDAC3-expressing cells became less pronounced. These types of cells exhibited similar mean  $\Delta\psi$  values of  $67254.35 \pm 3520.71$  for cells expressing hVDAC2 and of  $58494.24 \pm 1182.25$  for cells expressing hVDAC3. This suggests that under oxidative stress, hVDAC2 and hVDAC3 have a comparable ability to sustain  $\Delta\psi$ . Interestingly, cells expressing hVDAC1 showed a smaller reduction in membrane potential compared to the other paralogs, retaining its highest value of  $91915.24 \pm 12913.71$  under stress conditions.

The similarity in  $\Delta\psi$  under oxidative stress between cells expressing hVDAC2 and hVDAC3 was unexpected, given that hVDAC3 was previously demonstrated to enable superior mitochondrial protection and growth under stress conditions (Fig. 2A, Fig. 2B and Fig. 3). This observation indicates that  $\Delta\psi$  measurements alone may not fully capture the functional differences between cells expressing these paralogs in terms of mitochondrial efficiency and bioenergetic performance.

To delve deeper into these findings, we planned additional bioenergetic analyses to assess parameters such as ATP synthesis rate, proton leak level, uncoupling capacity and spare respiratory capacity to estimate whether underlying metabolic differences exist between cells expressing hVDAC2 and hVDAC3.

## **2.6. Under oxidative stress cells expressing hVDAC2 and hVDAC3 differ in values of basic mitochondrial respiratory parameters**

The measurements of oxygen uptake rate revealed no significant differences in basal respiration between cells expressing hVDAC2 and hVDAC3, indicating that both paralogs support similar baseline oxygen uptake in *sod1Δsod2Δ* background (Fig. 6A). However, differences became apparent upon assessing maximal respiration using FCCP, an uncoupling agent that collapses the proton gradient across the mitochondrial inner membrane, thereby stimulates the electron transport rate within the respiratory chain (Fig. 6B). The hVDAC2-expressing cells exhibited a significantly greater FCCP uncoupling capacity ( $1.39 \pm 0.043$ ) compared to cells expressing hVDAC3, that indicated a higher potential to increase respiratory rate when the electron transport chain is fully activated. Additionally, hVDAC2-expressing cells demonstrated a much higher spare respiratory capacity ( $6.76 \pm 0.85$  nmol O<sub>2</sub>/ mL / min) than cells expressing hVDAC3 ( $0.46 \pm 0.45$  nmol O<sub>2</sub>/ mL / min) (Fig. 6C). Spare respiratory capacity reflects the ability of cells to respond to increased energy demands or stress by enhancing mitochondrial respiration beyond basal levels. The distinctly higher value of the parameter determined for cells expressing hVDAC2 suggests that they can upregulate their respiratory activity more effectively under maximal stimulation.

Despite these observations, when focusing on ATP synthesis-linked respiration, i.e., the portion of the oxygen uptake rate within basal respiration eliminated in the presence of an inhibitor of mitochondrial ATP synthase (Fig. 6D), hVDAC3-expressing cells showed a significantly higher contribution of the respiration to basal respiration ( $59.99 \pm 10.48\%$ ) when compared to cells expressing hVDAC2 ( $19.83 \pm 14.74\%$ ). This indicates that hVDAC3 enables more efficient utilization of mitochondrial respiration for ATP synthesis under oxidative stress conditions. A higher ATP synthesis-linked

respiration implies a better coupling efficiency between the electron transport chain and ATP synthase activity, resulting in more effective energy transformation for cellular processes.

Furthermore, cells expressing hVDAC2 exhibited a substantially higher proton leak contribution to basal respiration ( $80.16 \pm 14.74\%$ ) compared to cells expressing hVDAC3 ( $40.01 \pm 10.48\%$ ) (Fig. 6E). Proton leak represents the proportion of oxygen uptake rate that does not contribute to ATP synthesis but instead results in the energy dissipation of the proton gradient. A higher proton leak in cells expressing hVDAC2 suggests increased permeability of the mitochondrial inner membrane to protons, leading to energy dissipation and reduced efficiency of oxidative phosphorylation.

## **2.7. The protective capability of hVDAC3 under oxidative stress requires the presence of cysteine residues**

To investigate the functional significance of cysteine residues in hVDAC3, we constructed a cysteine-depleted variant, hVDAC3 $\Delta$ Cys, by substituting all cysteine residues with alanine residues. This variant was expressed in yeast cells both in the presence and absence of CuZnSOD and MnSOD to assess its ability to support cellular viability and mitochondrial function under normal and oxidative stress conditions. Growth assays were conducted on both YPD and YPG at 28°C and 37°C to evaluate the impact of cysteine depletion on yeast viability and mitochondrial respiration.

As shown in Figure 7, cells expressing hVDAC3 exhibited efficient growth on YPD at both 28°C and 37°C, indicating efficient fermentation-based energy transformation. Additionally, these cells grew well on YPG at both temperatures, reflecting functional mitochondrial respiration supported by hVDAC3. The hVDAC3 *sod1* $\Delta$ *sod2* $\Delta$  cells, lacking CuZnSOD and MnSOD, also showed good growth on YPD at both temperatures, suggesting that hVDAC3 can maintain cellular viability even under increased oxidative stress during fermentative conditions at 37°C. On YPG medium, these cells displayed reduced but noticeable growth 37°C, indicating that while oxidative stress impacted mitochondrial function, hVDAC3 remained sufficiently functional to support respiration-dependent growth.

In contrast, cells expressing hVDAC3 $\Delta$ Cys demonstrated significantly impaired growth under all tested conditions. On YPD medium at 28°C, their growth was notably reduced compared to cells expressing hVDAC3, and it struggled to grow at 37°C, highlighting that cysteine residues are essential for optimal hVDAC3 function, particularly under heat stress. This defect was exacerbated in the *sod1**sod2* $\Delta$  background, where oxidative stress levels were further elevated, leading to complete growth inhibition on both YPD and YPG. This outcome indicates that the lack of cysteine residues in hVDAC3 greatly impairs its ability to function under oxidative stress conditions, leading to loss of cellular viability.



### 3. Discussion

Our findings indicate that hVDAC3 uniquely supports mitochondrial function under oxidative stress, as evidenced by efficient growth on YPG even at elevated temperature, maintenance of  $\Delta\psi$  and mitochondria morphology, reduced superoxide anion accumulation, and efficient ATP synthesis with low proton leak. In contrast, cells expressing hVDAC1 or hVDAC2 exhibited impaired mitochondrial function under the conditions.

Our previous studies highlighted the critical role of CuZnSOD in maintaining yVDAC1 functionality in yeast cells. The absence of CuZnSOD disrupts the normal conductance and voltage dependence of reconstituted yVDAC1, increasing its propensity to adopt lower conductance states that impair metabolite exchange between the mitochondria and the cytoplasm [26]. Accordingly, oxidative stress resulting from CuZnSOD and MnSOD elimination may lead to oxidative modifications of VDAC proteins, particularly affecting their conductance states. Limited substrate supply to mitochondria, due to impaired VDAC function, can lead to electron accumulation within the mitochondrial respiratory chain. This electron backlog increases the possibility of one-electron reductions of molecular oxygen, leading to enhanced superoxide anion production [27,28]. The higher superoxide anion levels observed in cells expressing hVDAC1 and hVDAC2 support this mechanism, as their impaired substrate transport amplifies ROS generation.

The role of cysteine residues in VDAC function is emerging as a critical factor in this context. hVDAC1 contains two cysteine residues occupying diametrically opposite positions in the barrel structure that makes it similar to yVDAC1. Available data indicates that mutation of these cysteine residues to alanine residues (C127A/C232A) does not significantly affect the conductance or voltage dependence of the channel, suggesting that cysteine oxidation does not alter the transport properties of hVDAC1 [29]. In contrast, hVDAC2 contains nine cysteine residues, including Cys8 and Cys13 in the N-terminal tail and others in the barrel loops, in positions similar to the cysteine residues of hVDAC3. While the electrophysiological effects of cysteine residues oxidation in hVDAC2 is not fully understood, studies suggest that these residues are involved in anchoring the barrel to the lipid environment [30,31]. Therefore, oxidative modifications of cysteine residues in hVDAC2 may disrupt its structural integrity and impair its ability to facilitate efficient metabolite exchange, leading to increased ROS production and mitochondrial dysfunction.

Cysteine residues in hVDAC3 have been proposed to be critical for its function under oxidative stress. Okazaki et al. (2015) demonstrated that oxidation of cysteines Cys2, Cys8, and Cys122 in hVDAC3 stabilizes the channel in an open state [11]. This oxidation-induced stabilization may enhance metabolite exchange and support efficient mitochondrial respiration under stress conditions. However, Queralt-Martín et al. (2020) provided evidence that isolated cysteine-depleted hVDAC3 variant does not differ

from native hVDAC3 in electrophysiological parameters such as conductance and gating, indicating that cysteine residues are not essential for the basic channel function *in vitro* [12].

Our results align these findings by suggesting that while cysteine residues may not impact the intrinsic electrophysiological properties of hVDAC3 in isolated systems, they play a crucial regulatory role *in vivo* under oxidative stress conditions. Heterologous expression of the cysteine-depleted hVDAC3 $\Delta$ Cys variant significantly impaired growth and mitochondrial function of yeast cells, especially under stress conditions. This impairment implies that the absence of cysteine residues prevents the oxidation-mediated regulation of hVDAC3, rendering it less capable of maintaining mitochondrial efficiency during oxidative stress. Therefore, although cysteine residues are not necessary for the fundamental channel activity, they are vital for the redox-dependent modulation of hVDAC3 function within the cellular environment.

The differential bioenergetic profiles of cells expressing hVDAC2 or hVDAC3 further elucidate distinct roles of the paralogs. Although cells expressing hVDAC2 exhibited higher maximal respiration and spare respiratory capacity, they also showed a higher proton leak and lower ATP-linked respiration compared to cells with expression of hVDAC3. This paradox suggests that hVDAC2 supports increased respiration at the cost of efficiency, with more energy dissipated as proton leak rather than being utilized for ATP synthesis. One hypothesis to explain this phenomenon is the limited exchange of metabolites, such as ATP and ADP, across the mitochondrial membranes in hVDAC2-expressing cells.

If the transport of ADP into the mitochondria and ATP out of the mitochondria is restricted due to impaired VDAC function, the activity of ATP synthase could be constrained by the availability of its substrates. This limitation would lead to a slower utilization of the proton gradient generated by the respiratory chain. As a result, the excess proton motive force might be dissipated through proton leak to prevent overcharging of  $\Delta\psi$ . This increased proton leak in hVDAC2-expressing cells could be a compensatory mechanism to maintain mitochondrial homeostasis in the face of restricted metabolite exchange. Consequently, despite the higher maximal respiration and spare respiratory capacity, the efficiency of oxidative phosphorylation is reduced, leading to decreased ATP production and increased energy dissipation.

This hypothesis is supported by available data indicating that VDAC is crucial for ATP/ADP exchange across OMM [32,33]. Impaired VDAC function can hinder this exchange, leading to a buildup of the proton gradient and increased proton leak to dissipate the excess potential energy [34]. Brand and Nicholls (2011) noted that when ATP synthesis is limited by ADP availability, the proton motive force increases, enhancing proton leak as a protective mechanism against excessive membrane potential [35]. This scenario results in higher oxygen consumption without a corresponding increase in ATP production, reflecting higher spare respiratory capacity but reduced coupling efficiency.

In contrast, hVDAC3 appears to facilitate more efficient metabolite transport (Fig. 8), allowing for effective utilization of the proton gradient for ATP synthesis and minimizing proton leak. This efficient coupling of respiration to ATP synthesis in hVDAC3-expressing cells underscores their superior bioenergetic performance under oxidative stress conditions. Using near-haploid human HAP1 cells with CRISPR/Cas9-mediated deletions of hVDAC3 and employing techniques such as high-resolution respirometry, flow cytometry, and transfection of cysteine-depleted mutants, Reina et al. (2022) demonstrated that deletion of hVDAC3 results in increased cellular vulnerability to oxidative stress, increased ROS accumulation, and downregulated mitochondrial biogenesis [14]. They emphasize that hVDAC3 plays an important role in buffering mitochondrial ROS levels and regulating redox states, that makes the paralog essential for ROS homeostasis. Furthermore, their results showed that cysteine residues in hVDAC3 are critical for its protective function, as cysteine-null mutant failed to compensate for ROS-induced damage. The improved survival and preserved oxygen consumption in cells expressing hVDAC3 are consistent with our data indicating an enhanced ATP synthesis and reduced proton leak in hVDAC3-expressing yeast cells under oxidative stress.

Taken together, these studies underscore the role of hVDAC3 in mitochondrial defense against oxidative stress, with cysteine residues acting as key modulators of this protective response. The cumulative evidence advances our understanding of VDAC paralog-specific functions and highlights the distinct bioenergetic profile of hVDAC3-expressing yeast cells and efficient coupling of ATP synthesis to mitochondrial respiration in these cells. Targeting the regulatory properties of hVDAC3, particularly its redox regulation mediated by cysteine residues, may offer novel therapeutic approaches for diseases characterized by impaired mitochondrial function and increased ROS production.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plasmids

MitoLOC was a gift from Markus Ralser (Addgene plasmid # 58980) [25]. CRISPR/Cas9 plasmids targeting the *SOD1* and *SOD2* genes were constructed using the pML104 vector (a gift from John Wyrick; Addgene plasmid #67638) [36]. Guide RNA sequences specific to each gene were introduced into the pML104 vector via site-directed mutagenesis using the Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs), following the manufacturer's protocol and as described by Hu et al. (2018) [37]. For *SOD1*, the guide RNA sequence 5'-GTCAGACATGTCGGTGACAT-3' (PAM sequence GGG) was used. Site-directed mutagenesis was performed with the following primers: forward primer: 5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC-3', reverse primer: 5'-ATGTCACCGACATGTCTGACGATCATTTATCTTTCACTGC-3'. For *SOD2*, the guide RNA sequence 5'-CAAACATCAAGTTCCATGG-3' (PAM sequence CGG) was utilized. The primers used for mutagenesis were: forward primer: 5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC-3', reverse primer: 5'-CCATGGAAGTTGATGTTTTGGATCATTTATCTTTCACTGC-3'. The mutagenesis reactions were set up according to the kit instructions, and the thermocycling conditions were optimized for the primer sets. The resulting plasmids, pML104-SOD1\_gRNA and pML104-SOD2\_gRNA, were transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competent cells. Plasmid DNA was isolated and verified by Sanger sequencing to confirm the correct insertion of the guide sequences.

### 4.2. Strains

All yeast strains used in the study are described in Table 1. The *por1* $\Delta$ *por2* $\Delta$  strain and the strains expressing human VDACs were previously constructed in our laboratory [38]. Based on the yVDAC1 strain (genetic background BY4741 *por2* $\Delta$ ) and the strains expressing various human VDAC paralogs, new strains lacking CuZnSOD (SOD1) and MnSOD (SOD2) were generated. Specifically, the *sod1* $\Delta$ *sod2* $\Delta$  strain was created using the CRISPR/Cas9 genome editing system with the pML104 plasmid as indicated in the part 4.1. Homology-directed repair was facilitated by hybridizing two complementary oligonucleotides:

*SOD1*\_repair\_oligo\_fwd:(5'GGAAAAACAGGCAAGAAAGCAATCGCGCAAACAAATAAAACA  
TAATTAATTTATATGTTAATGATAATATACTTGAATAAAAACCGTATGTAAGTAAGTAGT  
AAGCGCAT3')

and

*SOD1\_repair\_oligo\_rev*:(5'ATGCGCTTACTACTTACTTACATACGGTTTTTTATTCAAGTATATTATCATTAACATATAAAATTAATTATGTTTTATTTGTTTGCGCGATTGCTTCTTGCCTGTTTTTCC3').

*SOD2\_repair\_oligo\_fwd*:(5'CTGCTACAGGAACGAAACCCCAATTGATAACTATACCTCCTAAAAACGTACCAGGAGAAAGAAAGAAAATACCTTTTTTTTTTCCACTGTGTCGTTTTTATTCTAAC3')

and

*SOD2\_repair\_oligo\_rev*:(5'GTTAGAATAAAAACGACACAGTGGAAAAAAAAAAGGTATTTTCTTTCTTTCTTCTCCTGGTACGTTTTTAGGAGGTATAGTTATCAATTGGGGTTTCGTTCCCTGTAGCAG3').

Deletion of *SOD1* was confirmed by diagnostic PCR using primers *SOD1\_A* (5'GACGTAAGTATCTCTGAAGTGCAGC-3') and *SOD1\_D* (5'GGAAGCTTTATGGTGAAGTTAATGA-3'). Successful deletion of *SOD2* was confirmed by diagnostic PCR using primers *SOD2\_A* (5'-CTAATTGCTATTATCATTGTTGGCG-3') and *SOD2\_D* (5'-ATTATCGGTTGGAACAATAACAAGA-3').

After transformation and selection, the pML104 plasmid was cured from the yeast strains by counter-selection on media containing 5-fluoroorotic acid (5-FOA), which eliminates cells retaining the *URA3* marker present on the plasmid.

#### 4.3. Media and cell culture

Bacterial cultures were maintained in LB liquid medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride), supplemented with 100 µg/ml ampicillin. Yeast cells were cultivated in YPD (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% D-glucose) or YPG (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol, adjusted to pH 5.5) media. When using the MitoLOC plasmid, media were supplemented with 100 µg/ml nourseothricin (ClonNAT). Additional yeast media included: SD-ura, (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, yeast synthetic drop-out medium supplement lacking uracil, and 2% D-glucose) and SDC supplemented with 1 mg/ml 5-fluoroorotic acid (5-FOA) (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, yeast complete synthetic drop-out medium supplement, and 2% D-glucose). All solid media were prepared by adding 2% agar to the respective formulations.

#### **4.4. Yeast transformation**

Yeast cells were transformed using a modified lithium acetate method. To prepare competent cells, cultures were grown to mid-log phase ( $OD_{600} = 0,5$ ) on YPD medium, harvested by centrifugation at  $3,000\times g$  for 5 minutes at room temperature, and washed once with sterile water. The cell pellets were resuspended in 700  $\mu\text{L}$  of TE/LiAc buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc), transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes, and centrifuged at maximum speed for 15 seconds. Supernatants were discarded, and the cells were resuspended in 300  $\mu\text{L}$  of TE/LiAc buffer. For each transformation, 2  $\mu\text{L}$  of plasmid DNA (200 ng), 5  $\mu\text{L}$  of heat-denatured salmon sperm ssDNA (incubated at  $95^\circ\text{C}$  for 5 minutes and immediately chilled on ice), 50  $\mu\text{L}$  of competent yeast cells, and 500  $\mu\text{L}$  of PEG/LiAc solution (40% PEG 3350, 100 mM LiAc in TE buffer) were gently mixed. The mixture was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 30 minutes with gentle mixing every 10 minutes. Then, 20  $\mu\text{L}$  DMSO was added and mixed thoroughly. Heat shock was performed by incubating the tubes at  $42^\circ\text{C}$  for 15 minutes, with brief vortexing (1–2 seconds) every 5 minutes. Cells were centrifuged at maximum speed for 15 seconds, the supernatant was removed, and the pellets were resuspended in 1 mL of YPD medium. The suspension was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 60 minutes with gentle shaking to allow for recovery. Cells were then centrifuged again, resuspended in 1 mL of 0.9% NaCl solution, and 200  $\mu\text{L}$  aliquots were spread onto selective medium. Plates were incubated at  $28^\circ\text{C}$  in the dark for 3–5 days to allow colony formation.

#### **4.5. Yeast growth assay**

Yeast growth was evaluated using both solid and liquid media under various conditions. For solid media assay, yeast cells were either spread across agar plates or spotted as a serial dilutions onto media containing fermentable (YPD) or non-fermentable (YPG) carbon source. The plates were then incubated at  $28^\circ\text{C}$  or  $37^\circ\text{C}$  to assess growth phenotypes. In liquid culture, yeast strains were inoculated into YPG medium at an initial optical density ( $OD_{600}$ ) of 0.05 and incubated at  $28^\circ\text{C}$  for 24 hours. After incubation, cultures were subjected to a 10-fold dilution, and  $OD_{600}$  measurements were taken to quantify growth performance.

#### **4.6. Confocal microscopy**

Confocal microscope Leica Stellaris 8 with white laser and HyD S detectors was used to obtain GFP and mCherry fluorescence images in yeast cells. Leica PL APO 63x/1.20 W CORR CS2 objective was used. Imaging settings were applied that allowed to visualize GFP and mCherry. Images were done in 512x512 resolution as z-stacks, then converted to Maximum Projection images.

#### **4.7. Cell staining with fluorescence probes**

To stain cells with tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM; ThermoFisher Scientific, #T668), the published staining protocol was modified [39] by omitting 5% glucose from the buffer. Cell cultures were centrifuged (3,000×g for 5 minutes) and the pellets were washed with a buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.0). After removing the supernatant, the pellets were resuspended in the same buffer supplemented with 50 nM TMRM. Cells were stained in the dark for 15 minutes. Then, the cells were washed twice (3,000×g for 5 minutes) with the same buffer and resuspended in 1 mL of the buffer. To stain cells with MitoSOX Red (ThermoFisher Scientific, #M36008), yeast cultures were centrifuged at 3000×g for 5 minutes at room temperature and washed twice (3000×g for 5 minutes) with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The cell pellets were resuspended in PBS to an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 1. An equal volume of the MitoSOX Red working solution was added to the cell suspension, resulting in a final dye concentration of 2.5  $\mu$ M. Cells were incubated in the dark at 28°C for 45 minutes with gentle agitation. Following incubation, cells were washed twice with PBS to remove excess dye and resuspended in PBS for analysis.

#### **4.8. Fluorescence analysis**

Fluorescence measurements were performed using a Tecan Spark multimode microplate reader. Yeast cell suspensions (100  $\mu$ L) with an  $OD_{600}$  of 10 were placed into flat-bottom black 96-well fluorescence microplate. For TMRM-stained samples, fluorescence was measured with an excitation wavelength of 535 nm and an emission wavelength of 590 nm. For MitoSOX Red-stained samples, measurements were taken with an excitation wavelength of 510 nm and an emission wavelength of 580 nm. Data acquisition and analysis were conducted using the Tecan Spark Control software.

#### 4.9. Cellular respiration measurements

Cellular respiration was assessed in intact cells to calculate values of basic mitochondrial respiratory parameters [35,40]. Cells were washed three times with YPG medium (3,000×g for 5 minutes). After washing, cells were resuspended in YPG medium to OD value at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 4. The oxygen uptake rate measurements were performed at 28 °C using a computer-controlled Clark-type oxygen electrode (Oxygraph, Hansatech, UK) in a water-thermostated incubation chamber containing 1 mL of YPG medium. To determine mitochondrial respiratory parameters the rates of the following respiratory states were estimated: basal respiration, state 4 respiration (corresponding to proton leak), state 3 respiration (corresponding to ATP synthesis) and maximal respiration. Basal respiration was recorded for cells added to the incubation chamber at the beginning of each trace. To obtain the rate of proton leak, 16  $\mu$ M tributyltin (TBT), an inhibitor of mitochondrial ATP synthase, was added to the chamber. The rate of ATP synthesis was calculated by subtracting the proton leak rate from the basal respiration rate. Maximal respiration was achieved by the addition of 2  $\mu$ M carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), a mitochondrial uncoupler. Then the following mitochondrial respiratory parameters were calculated: (a) FCCP uncoupling capacity corresponding to the ratio of maximal respiration to basal respiration; (b) spare respiratory capacity corresponding to the difference between maximal respiration and basal respiration; (c) ATP synthesis contribution to basal respiration and (d) proton leak contribution to basal respiration, the last two assessed as a percentage of basal respiration.

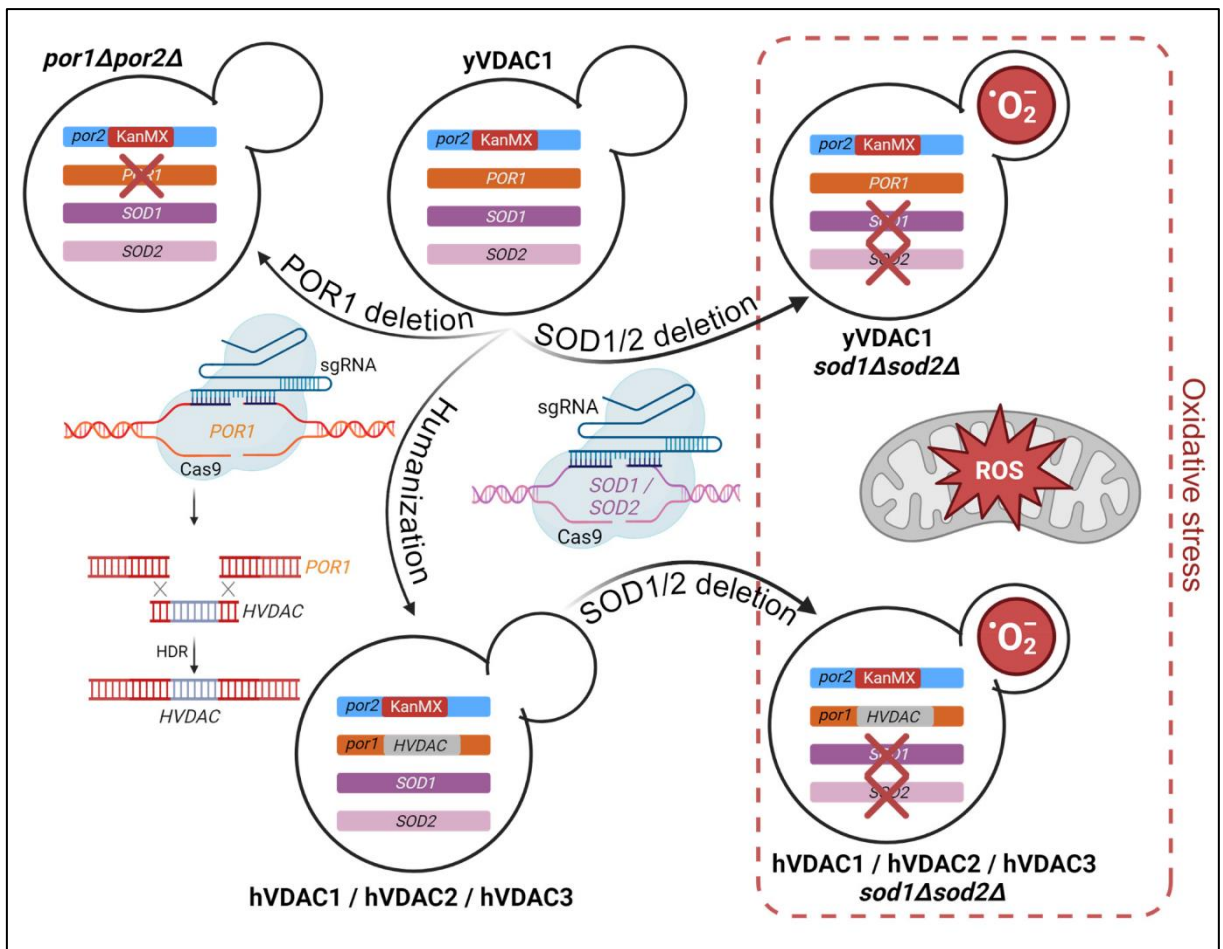


Table 1. List of yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Feature	Source
<b>yVDAC1</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por2Δ::kanMX4</i>	Lacking the <i>POR2</i> gene ( <i>por2Δ</i> ). Expresses only one yeast VDAC1	Euroscarf (Y02273)
<b>por1Δ por2Δ</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ0; por2Δ::kanMX4</i>	Double mutant lacking <i>POR1</i> and <i>POR2</i> genes	[38]
<b>hVDAC1</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ::HVDAC1; por2Δ::kanMX4</i>	Expresses human VDAC1 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC1)	[38]
<b>hVDAC2</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ::HVDAC2; por2Δ::kanMX4</i>	Expresses human VDAC2 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC2)	[38]
<b>hVDAC3</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ::HVDAC3; por2Δ::kanMX4</i>	Expresses human VDAC3 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC3)	[38]
<b>hVDAC3-ΔCys</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ::HVDAC3ΔCys; por2Δ::kanMX4</i>	Expresses human VDAC3 under the control of the <i>POR1</i> promoter. HVDAC3 mutations: C2A, C8A, C36A, C65A, C122A, C229A (hVDAC3ΔCys)	[38]
<b>yVDAC1 sod1Δ sod2Δ</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por2Δ::kanMX4; sod1Δ0; sod2Δ0</i>	Lacking the <i>POR2</i> gene ( <i>por2Δ</i> ), <i>SOD1</i> and <i>SOD2</i> genes ( <i>sod1Δ sod2Δ</i> ). Expresses only one yeast VDAC1.	This work
<b>hVDAC1 sod1Δ sod2Δ</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ::HVDAC1;</i>	Lacking the <i>POR2</i> gene ( <i>por2Δ</i> ), <i>SOD1</i> and <i>SOD2</i> genes ( <i>sod1Δ sod2Δ</i> ).	This work

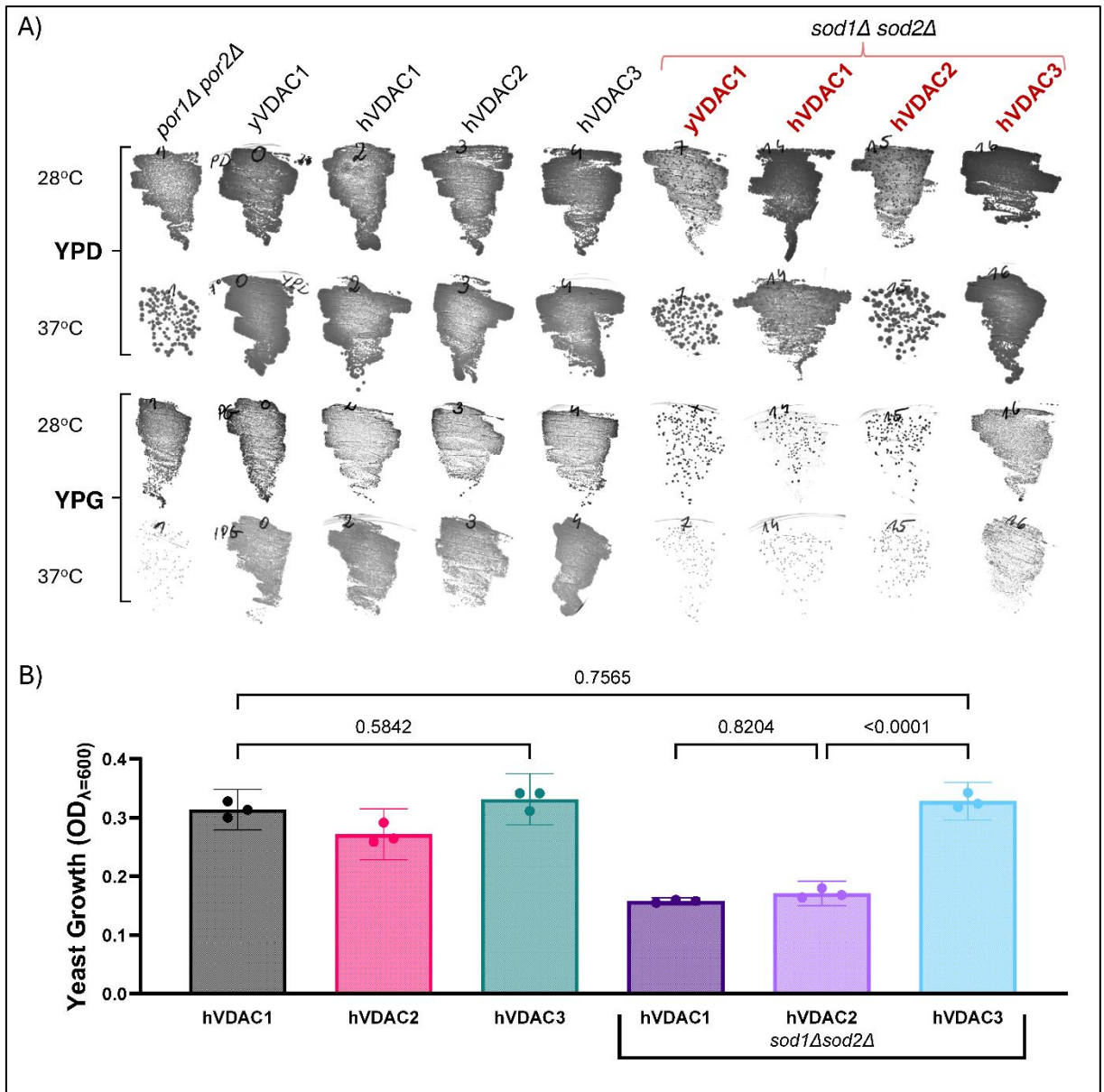
	<i>por2Δ::kanMX4; sod1Δ0; sod2Δ0</i>	Expresses human VDAC1 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC1)	
<b>hVDAC2 <i>sod1Δ sod2Δ</i></b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ::HVDAC2; por2Δ::kanMX4; sod1Δ0; sod2Δ0</i>	Lacking the <i>POR2</i> ( <i>por2Δ</i> ), <i>SOD1</i> and <i>SOD2</i> genes ( <i>sod1Δ sod2Δ</i> ). Expresses human VDAC1 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC2)	This work
<b>hVDAC3 <i>sod1Δ sod2Δ</i></b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ::HVDAC3; por2Δ::kanMX4; sod1Δ0; sod2Δ0</i>	Lacking the <i>POR2</i> ( <i>por2Δ</i> ), <i>SOD1</i> and <i>SOD2</i> genes ( <i>sod1Δ sod2Δ</i> ). Expresses human VDAC1 under the control of the <i>POR1</i> promoter (hVDAC3)	This work
<b>hVDAC3-ΔCys <i>sod1Δ sod2Δ</i></b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; por1Δ::HVDAC3ΔCys; por2Δ::kanMX4 sod1Δ0; sod2Δ0</i>	Lacking the <i>POR2</i> ( <i>por2Δ</i> ), <i>SOD1</i> and <i>SOD2</i> genes ( <i>sod1Δ sod2Δ</i> ). Expresses human VDAC3 under the control of the <i>POR1</i> promoter. HVDAC3 mutations: C2A, C8A, C36A, C65A, C122A, C229A (hVDAC3ΔCys)	This work

## Figures



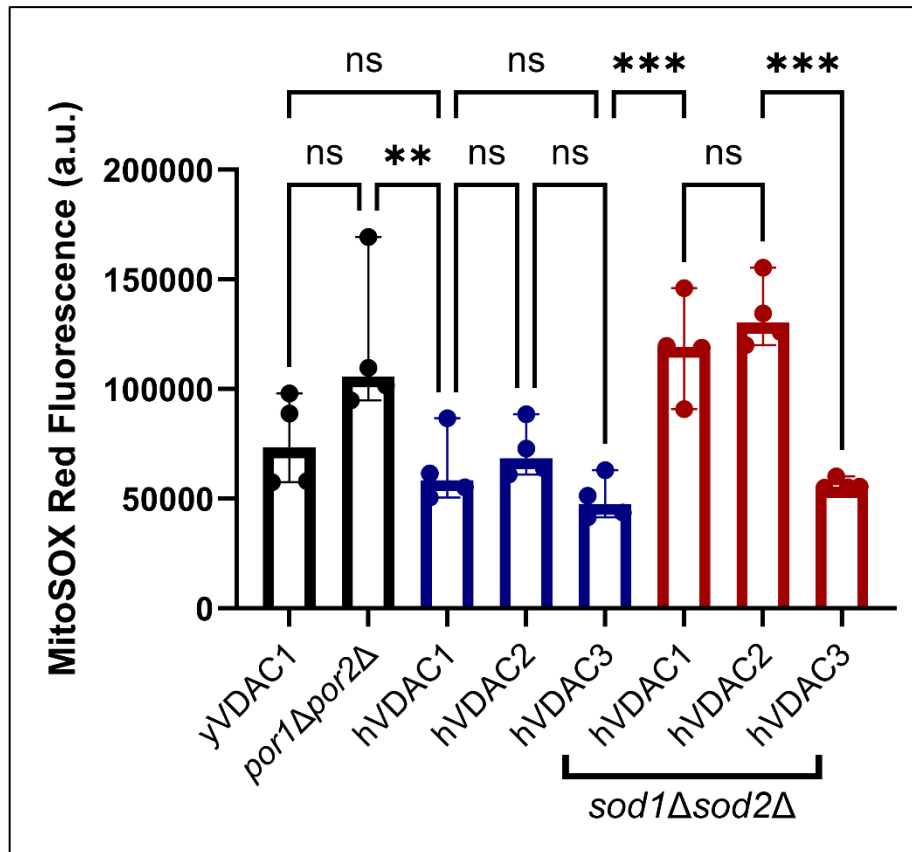
**Figure 1. Generation of yeast strains for studying contribution of human VDAC paralogs to mitochondrial function under oxidative stress conditions.**

Yeast cells with deletion of *POR2* and *POR1* genes (*por1Δpor2Δ* Strain) were obtained using CRISPR/Cas9 technology. sgRNA targets *POR1*, leading to its deletion. ***yVDAC1* Strain** - yeast cells with *POR2* gene deletion and intact *POR1* along with *SOD1* and *SOD2* genes. This strain serves as a control, having endogenous yeast *VDAC1* (*yVDAC1*) expressed without additional oxidative stress. ***yVDAC1 sod1Δsod2Δ* Strain** – yeast cells with deleted *SOD1* and *SOD2* genes, resulting in the accumulation of superoxide anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) used to introduce a given human VDAC paralog encoding gene (*hVDAC*) in place of *POR1*. Humanization and *SOD1/2* deletion: The CRISPR/Cas9 system and HDR (Homology-Directed Repair) were used to humanize yeast by replacing *POR1* with one of the *hVDAC* genes (***hVDAC1*, *hVDAC2*, *hVDAC3***). Additionally, *SOD1* and *SOD2* genes were deleted in these strains to generate ***hVDAC1/hVDAC2/hVDAC3 sod1Δsod2Δ*** strains (see also Table 1).



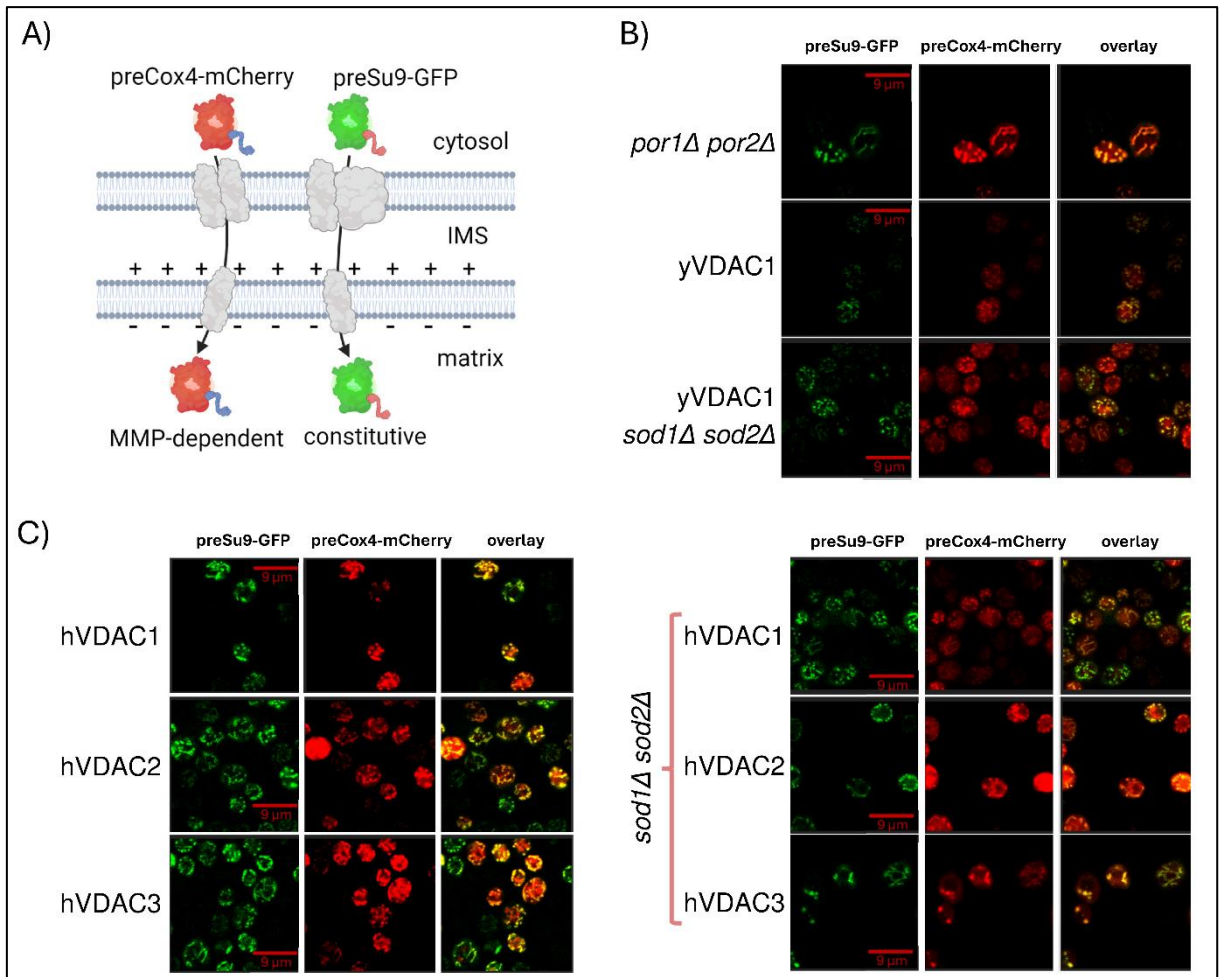
**Figure 2. Growth analysis of yeast cells expressing human VDAC paralogs under different conditions.**

(A) Cell growth analysis of various yeast strains on solid media containing fermentable (YPD) and non-fermentable (YPG) carbon source at 28°C and 37°C. (B) Quantification of yeast cell growth in liquid YPG at 28°C. Optical density ( $OD_{600}$ ) was measured to assess the growth performance. Cells of each strain were inoculated with a starting OD of 0.05, and growth was measured after 24 hours of incubation. The measurement was taken from a 10-fold diluted culture. Comparisons between cells expressing human VDAC paralogs were performed using one-way ANOVA, with error bars representing the 95% confidence interval ( $n = 3$ ). Significance of differences between strains is indicated with p-values for each comparison. Strain abbreviations as explained in caption of Figure 1.



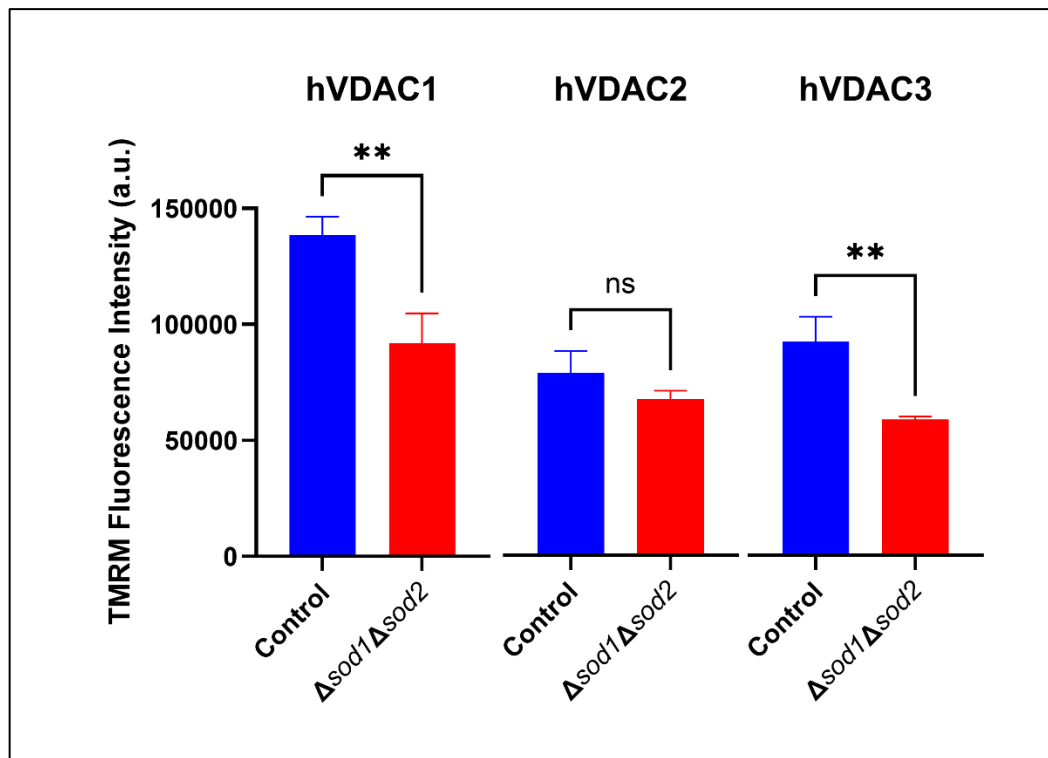
**Figure 3. Superoxide anion levels in yeast cells expressing human VDAC paralogs.**

Superoxide anion levels were measured using MitoSOX Red fluorescence and are presented in arbitrary units (a.u.). Measurements were performed using a Spark Multimode Microplate Reader. One-way ANOVA was performed to assess statistical differences, and significance is indicated as follows: ns = not significant, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Error bars represent standard deviation (SD) based on 4 biological replicates. Strain abbreviations as explained in caption of Figure 1.



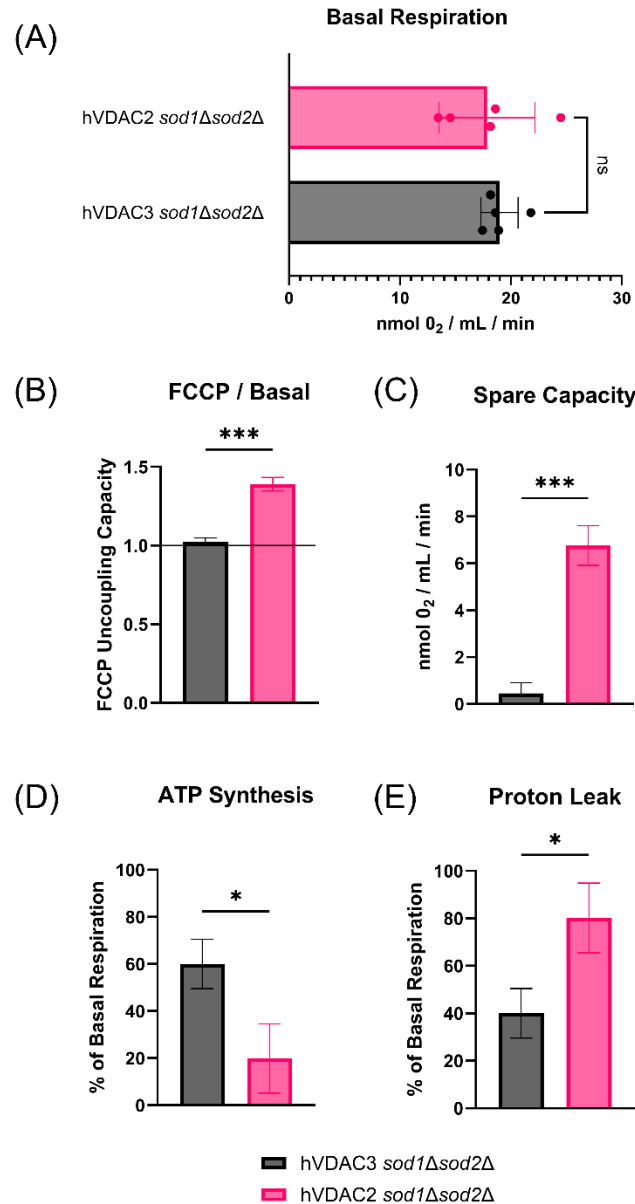
**Figure 4. Visualization of mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\psi$ ) and network morphology in yeast cells expressing human VDAC paralogs.**

(A) Schematic presentation of MitoLoc dual-reporter system for mitochondrial morphology and  $\Delta\psi$  estimation. The preSu9-GFP (green marker) is imported into mitochondria independently of  $\Delta\psi$  and serves as a constitutive mitochondrial marker. The preCox4-mCherry (red marker) is imported in  $\Delta\psi$ -dependent manner, with localization indicating  $\Delta\psi$  status. (B -D) Typical confocal microscopy images of expression of MitoLoc reporters by yeast cells with different genetic backgrounds. Strain abbreviations as explained in caption of Figure 1.



**Figure 5. Quantification of the mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\psi$ ) in yeast cells expressing different human VDAC paralogs.**

The mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\psi$ ) in yeast cells expressing one of human VDAC paralogs; i.e., hVDAC1, hVDAC2, or hVDAC3 as measured by determination of TMRM fluorescence. Control, strains with expression of CuZnSOD and MnSOD; *sod1* $\Delta$ *sod2* $\Delta$ , strains with deletion of CuZnSOD and MnSOD encoding genes, leading to oxidative stress. The significance of differences between the control and *sod1* $\Delta$ *sod2* $\Delta$  is indicated as follows:  $p < 0.01$  for significant differences, and ns for non-significant differences. Error bars represent the standard deviation ( $n = 3$ ). Strain abbreviations as explained in caption of Figure 1.

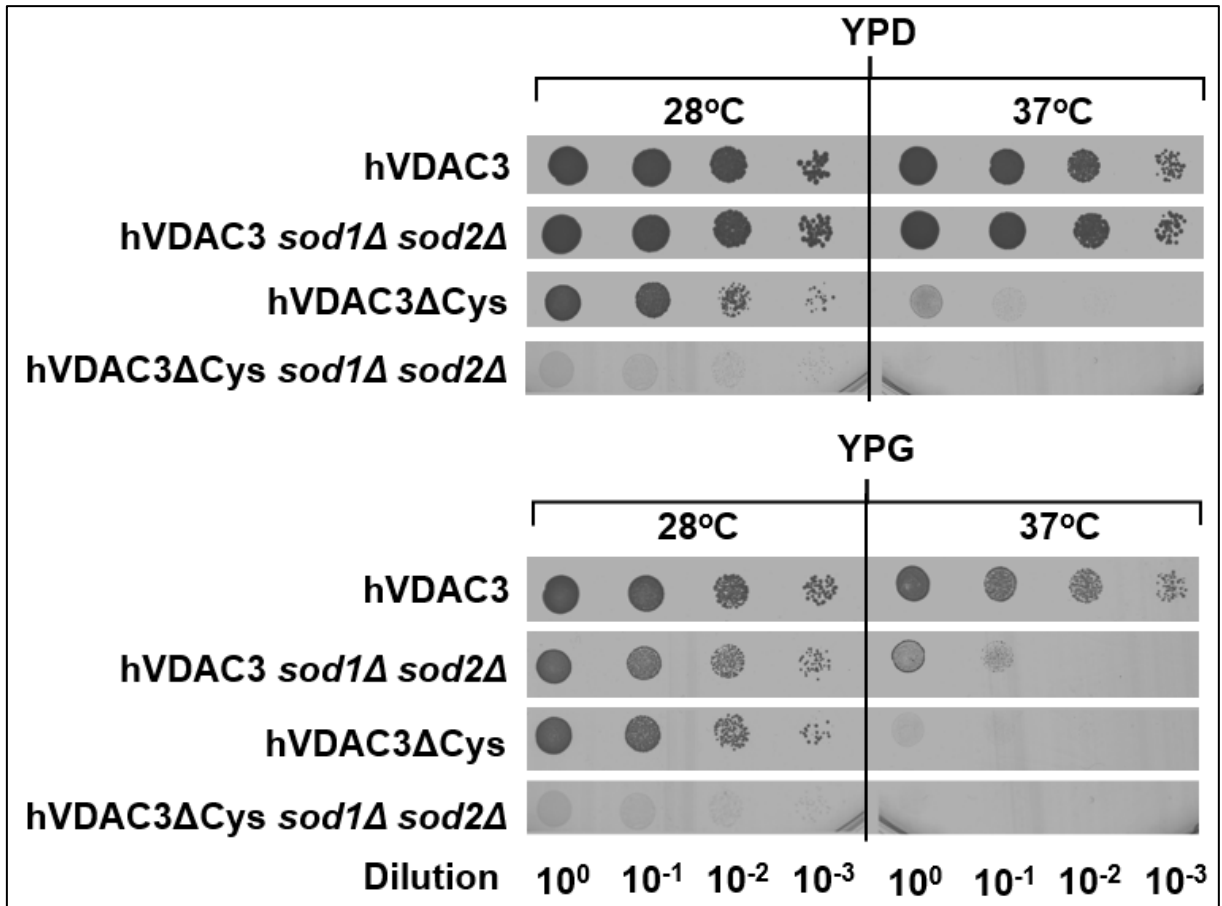


**Figure 6. Mitochondrial respiratory parameters for yeast cells expressing hVDAC2 and hVDAC3 under oxidative stress conditions.**

Determination of values of basic mitochondrial respiratory parameters. (A) Basal respiration rate measured for yeast cells expressing hVDAC2 (pink) and hVDAC3 (gray) in *sod1Δsod2Δ* background to assess mitochondrial respiratory activity. (B) FCCP uncoupling capacity, which reflects the ratio of maximal respiration (the oxygen uptake rate after FCCP treatment) to basal respiration. (C) Spare respiratory capacity, determined as the difference between maximal respiration and basal respiration, which represents the potential reserve of mitochondria to meet additional energy requirements. (D) ATP synthesis and (E) proton leak determined as contribution of the relevant oxygen uptake rate to basal respiration, assessed as a percentage of basal respiration. Tributyltin (TBT) in a final concentration of

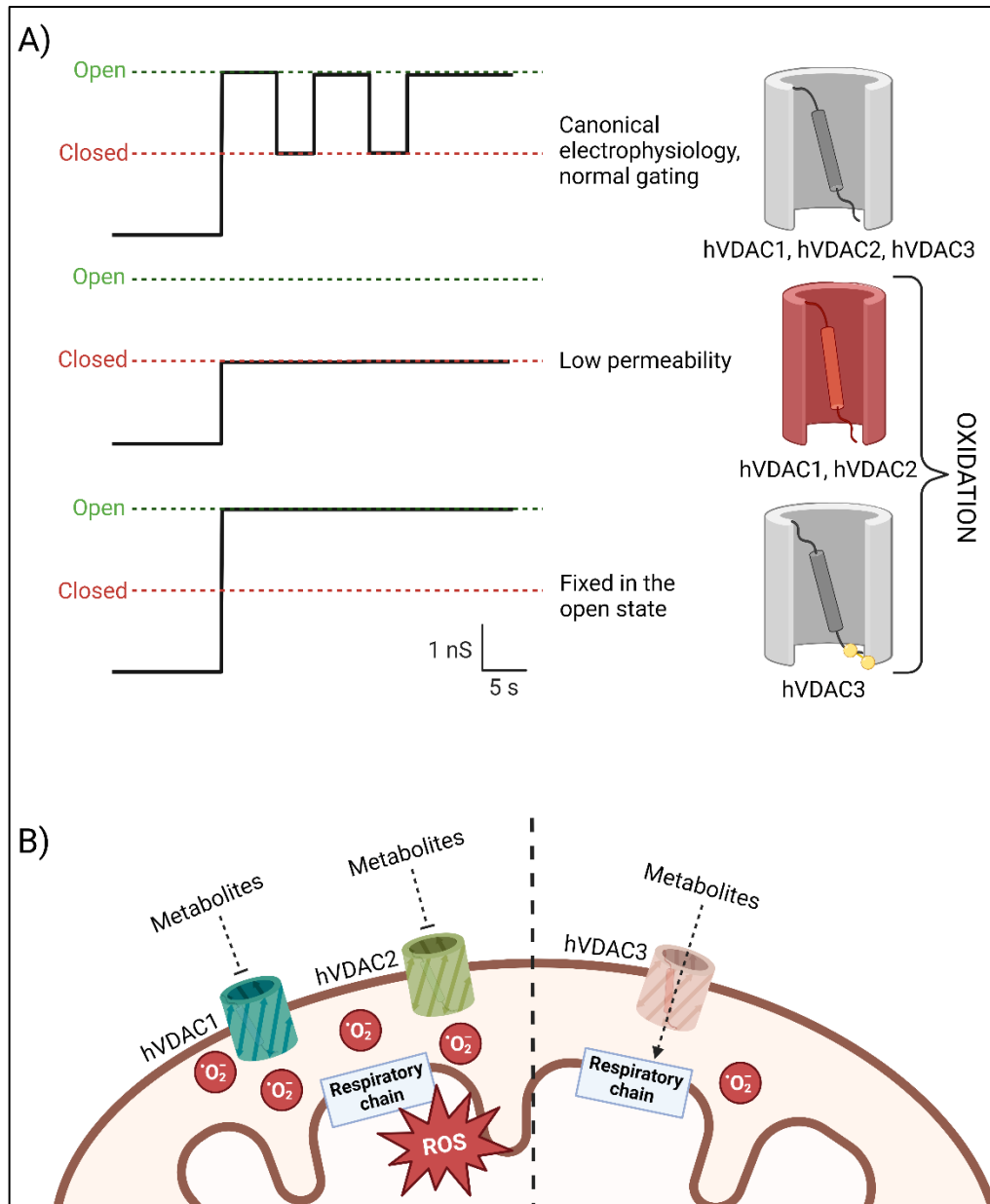


16  $\mu$ M was added to eliminate ATP synthesis. Cellular respiration was measured in YPG at 28°C. The statistical differences were assessed using a one-way t-test. (A) data are based on n = 5, while (B) - (E), data are based on n = 3. Error bars represent the standard deviation (SD) of biological replicates. Statistical significance was determined as follows: p < 0.05 indicates a significant difference, p < 0.001, and ns indicates no significant difference between the strains. Strain abbreviations as explained in caption of Figure 1



**Figure 7. Growth analysis of yeast cells expressing hVDAC3 and hVDAC3ΔCys.**

The spot assay growth analysis of yeast cells expressing hVDAC3 and its cysteine-depleted variant hVDAC3ΔCys on YPD and YPG at 28°C and 37°C. The cells expressed hVDAC3 and hVDAC3ΔCys in the presence of CuZnSOD and MnSOD or in the absence of the enzyme encoding genes; i.e., in the presence of *sod1Δsod2Δ* background. A dilution series (10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>) was performed. The figure represents three biological replicates.



**Figure 8. Hypothetical model explaining how hVDAC3 functions as a redox sensor to protect against mitochondrial dysfunction under oxidative stress.**

(A) Three different electrophysiological gating patterns of human VDAC paralogs. All three VDAC paralogs (hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3), show normal gating behavior with transitions between open and closed states. Under oxidative stress, hVDAC1 and hVDAC2 demonstrate reduced gating, leading to a low permeability state. This conformation restricts metabolite passage through the channel. hVDAC3, when oxidized, remains fixed in the open state, allowing continuous passage of metabolites.

(B) The impact of different VDAC paralogs on mitochondrial function and ROS levels. hVDAC1 and hVDAC2 are associated with increased production of superoxide anion and higher ROS accumulation, particularly under oxidative stress. The restricted permeability of hVDAC1 and hVDAC2 under oxidation limits the access of metabolites, which in turn leads to increased production of superoxide anion and enhanced oxidative stress. Unlike hVDAC1 and hVDAC2, hVDAC3 in the oxidized state remains open, which allows efficient passage of metabolites through the mitochondrial membrane. This helps reduce ROS accumulation and supports mitochondrial function by mitigating oxidative stress.

## 5. Literature

- [1] M. Colombini, VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol, *Mol Cell Biochem*, 256–257 (2004) 107–115.
- [2] V. Shoshan-Barmatz, D. Ben-Hail, VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target, *Mitochondrion*, 12 (2012) 24–34.
- [3] A. Messina, S. Reina, F. Guarino, V. De Pinto, VDAC isoforms in mammals, *Biochim Biophys Acta*, 1818 (2012) 1466–1476.
- [4] V. De Pinto, S. Reina, A. Gupta, A. Messina, R. Mahalakshmi, Role of cysteines in mammalian VDAC isoforms' function, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857 (2016) 1219–1227.
- [5] V. Checchetto, S. Reina, A. Magrì, I. Szabo, V. De Pinto, Recombinant human voltage dependent anion selective channel isoform 3 (hVDAC3) forms pores with a very small conductance, *Cell Physiol Biochem*, 34 (2014) 842–853.
- [6] S. Reina, V. Checchetto, R. Saletti, A. Gupta, D. Chaturvedi, C. Guardiani, F. Guarino, M.A. Scorciapino, A. Magrì, S. Foti, M. Ceccarelli, A.A. Messina, R. Mahalakshmi, I. Szabo, V. De Pinto, VDAC3 as a sensor of oxidative state of the intermembrane space of mitochondria: the putative role of cysteine residue modifications, *Oncotarget*, 7 (2016) 2249–2268.
- [7] D. Ponnalagu, H. Singh, Anion Channels of Mitochondria, *Handb Exp Pharmacol*, 240 (2017) 71–101.
- [8] J.-H. Han, J. Park, S.-H. Myung, S.H. Lee, H.-Y. Kim, K.S. Kim, Y.-W. Seo, T.-H. Kim, Noxa mitochondrial targeting domain induces necrosis via VDAC2 and mitochondrial catastrophe, *Cell Death Dis*, 10 (2019) 519.
- [9] A. Karachitos, D. Grobys, M. Antoniewicz, S. Jedut, J. Jordan, H. Kmita, Human VDAC isoforms differ in their capability to interact with minocycline and to contribute to its cytoprotective activity, *Mitochondrion*, 28 (2016) 38–48.
- [10] X. Xu, W. Decker, M.J. Sampson, W.J. Craigen, M. Colombini, Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability, *J Membr Biol*, 170 (1999) 89–102.
- [11] M. Okazaki, K. Kurabayashi, M. Asanuma, Y. Saito, K. Dodo, M. Sodeoka, VDAC3 gating is activated by suppression of disulfide-bond formation between the N-terminal region and the bottom of the pore, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848 (2015) 3188–3196.
- [12] M. Queralt-Martín, L. Bergdoll, O. Tejjido, N. Munshi, D. Jacobs, A.J. Kuszak, O. Protchenko, S. Reina, A. Magrì, V. De Pinto, S.M. Bezrukov, J. Abramson, T.K. Rostovtseva, A lower affinity to cytosolic proteins reveals VDAC3 isoform-specific role in mitochondrial biology, *Journal of General Physiology*, 152 (2020) e201912501.
- [13] S. Reina, M.G.G. Pittalà, F. Guarino, A. Messina, V. De Pinto, S. Foti, R. Saletti, Cysteine Oxidations in Mitochondrial Membrane Proteins: The Case of VDAC Isoforms in Mammals, *Front Cell Dev Biol*, 8 (2020) 397.
- [14] S. Reina, S.C. Nibali, M.F. Tomasello, A. Magrì, A. Messina, V. De Pinto, Voltage Dependent Anion Channel 3 (VDAC3) protects mitochondria from oxidative stress, *Redox Biol*, 51 (2022) 102264.
- [15] A. Karachitos, W. Grabiński, M. Baranek, H. Kmita, Redox-Sensitive VDAC: A Possible Function as an Environmental Stress Sensor Revealed by Bioinformatic Analysis, *Front Physiol*, 12 (2021) 750627.
- [16] C. Guardiani, A. Magrì, A. Karachitos, M.C. Di Rosa, S. Reina, I. Bodrenko, A. Messina, H. Kmita, M. Ceccarelli, V. De Pinto, yVDAC2, the second mitochondrial porin isoform of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859 (2018) 270–279.
- [17] A. Magrì, M.C. Di Rosa, M.F. Tomasello, F. Guarino, S. Reina, A. Messina, V. De Pinto, Overexpression of human SOD1 in VDAC1-less yeast restores mitochondrial functionality modulating beta-barrel outer membrane protein genes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857 (2016) 789–798.

- [18] X.F. Liu, I. Elashvili, E.B. Gralla, J.S. Valentine, P. Lapinskas, V.C. Culotta, Yeast lacking superoxide dismutase Isolation of genetic suppressors, *Journal of Biological Chemistry*, 267 (1992) 18298–18302.
- [19] R. Maslanka, R. Zadrąg-Tecza, M. Kwolek-Mirek, Linkage between Carbon Metabolism, Redox Status and Cellular Physiology in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Devoid of SOD1 or SOD2 Gene, *Genes (Basel)*, 11 (2020) 780.
- [20] J.F. Davidson, B. Whyte, P.H. Bissinger, R.H. Schiestl, Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1996) 5116.
- [21] P.W. Piper, The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap, *FEMS Microbiol Lett*, 134 (1995) 121–127.
- [22] J. Verghese, J. Abrams, Y. Wang, K.A. Morano, Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System, *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 76 (2012) 115.
- [23] E. Blachly-Dyson, J. Song, W.J. Wolfgang, M. Colombini, M. Forte, Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein, *Molecular and Cellular Biology*, 17 (1997) 5727–5738.
- [24] P. Mukhopadhyay, M. Rajesh, K. Yoshihiro, G. Haskó, P. Pacher, Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358 (2007) 203.
- [25] J. Vowinckel, J. Hartl, R. Butler, M. Ralser, MitoLoc: A method for the simultaneous quantification of mitochondrial network morphology and membrane potential in single cells, *Mitochondrion*, 24 (2015) 77–86.
- [26] A. Karachitos, H. Galganska, M. Wojtkowska, M. Budzinska, O. Stobienia, G. Bartosz, H. Kmita, Cu,Zn-superoxide dismutase is necessary for proper function of VDAC in *Saccharomyces cerevisiae* cells, *FEBS Lett*, 583 (2009) 449–455.
- [27] M.D. Brand, The sites and topology of mitochondrial superoxide production, *Exp Gerontol*, 45 (2010) 466–472.
- [28] M.P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J*, 417 (2009) 1–13.
- [29] L. Aram, S. Geula, N. Arbel, V. Shoshan-Barmatz, VDAC1 cysteine residues: topology and function in channel activity and apoptosis, *Biochem J*, 427 (2010) 445–454.
- [30] S.R. Maurya, R. Mahalakshmi, Modulation of Human Mitochondrial Voltage-dependent Anion Channel 2 (hVDAC-2) Structural Stability by Cysteine-assisted Barrel-lipid Interactions, *The Journal of Biological Chemistry*, 288 (2013) 25584.
- [31] S.R. Maurya, R. Mahalakshmi, N-helix and Cysteines Inter-regulate Human Mitochondrial VDAC-2 Function and Biochemistry, *J Biol Chem*, 290 (2015) 30240–30252.
- [32] V. Shoshan-Barmatz, V. De Pinto, M. Zweckstetter, Z. Raviv, N. Keinan, N. Arbel, VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death, *Mol Aspects Med*, 31 (2010) 227–285.
- [33] J.J. Lemasters, E. Holmuhamedov, Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box, *Biochim Biophys Acta*, 1762 (2006) 181–190.
- [34] D.G. Nicholls, S.J. Ferguson, eds., Front-matter, in: *Bioenergetics (Fourth Edition)*, Academic Press, Boston, 2013: pp. i–iii.
- [35] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochem J*, 435 (2011) 297–312.
- [36] M.F. Laughery, J.J. Wyrick, Simple CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr Protoc Mol Biol*, 129 (2019) e110.
- [37] G. Hu, S. Luo, H. Rao, H. Cheng, X. Gan, A Simple PCR-based Strategy for the Introduction of Point Mutations in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR/Cas9, *Biochem Mol Biol J*, 4 (2018) 9.
- [38] M. Baranek-Grabińska, W. Grabiński, D. Musso, A. Karachitos, H. Kmita, Developing a novel and optimized yeast model for human VDAC research, *International Journal of Molecular Sciences*, (2024) (under review).
- [39] A.L. Hughes, C.E. Hughes, K.A. Henderson, N. Yazvenko, D.E. Gottschling, Selective sorting and destruction of mitochondrial membrane proteins in aged yeast, *eLife*, 5 (2016) e13943.

- [40] A. Karachitos, J. Jordan, H. Kmita, Cytoprotective activity of minocycline includes improvement of mitochondrial coupling: the importance of minocycline concentration and the presence of VDAC, *J Bioenerg Biomembr*, 44 (2012) 297–307.

Martyna Baranek-Grabińska


Poznań, 29.10.2024

Zakład Bioenergetyki  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Biologii UAM  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w manuskrypcie pt. „Human VDAC3 as a sensor of intracellular redox state: contribution to cytoprotection mechanisms in oxidative stress” autorstwa: **Baranek-Grabińska M.**, Skrzypczak T., Kmita H., Karachitos, A., który stanowi część mojej rozprawy doktorskiej, polegał na opracowaniu i optymalizacji metod badawczych, otrzymaniu szczepów drożdży użytych w badaniach, określeniu przeżywalności komórek za pomocą testów płytkowych, udziale w określeniu stanu funkcjonalnego mitochondriów i poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach oraz udziale w dyskusji wyników.

  
Martyna Baranek-Grabińska

  
Promotor: prof. dr hab. Hanna Kmita



Promotor pomocniczy: dr hab. Andonis Karachitos

dr Tomasz Skrzypczak

Poznań, 29.10.2024

Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10  
61-614 Poznań

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w manuskrypcie pt. „Human VDAC3 as a sensor of intracellular redox state: contribution to cytoprotection mechanisms in oxidative stress” autorstwa **Baranek-Grabińska M.**, Skrzypczak T., Kmita H., Karachitos A., który stanowi część rozprawy doktorskiej Martyny Baranek-Grabińskiej, polegał na opracowaniu metody i wykonaniu analizy zmian w morfologii i sprzężenia energetycznego mitochondriów. Analiza została wykonana przy pomocy obrazowania z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego



Tomasz Skrzypczak





Poznań, 15.10.2024

Prof. dr hab. Hanna Kmita  
kmita@amu.edu.pl

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji:

Baranek-Grabińska M., Skrzypczak T., Kmita H., Karachitos A., Human VDAC3 as a sensor of intracellular redox state: contribution to cytoprotection mechanisms in oxidative stress, przygotowanego do wysłania do *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, mój udział polegał na uczestniczeniu w dyskusji dotyczącej planowanych badań i otrzymanych wyników oraz w przygotowaniu maszynopisu publikacji.

Hanna Kmita



**dr hab. Andonis Karachitos**

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Zakład Bioenergetyki  
Wydział Biologii UAM  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

Poznań, 28.10.2024 r.

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji:

Baranek-Grabińska M., Skrzypczak T., Kmita H., Karachitos A., Human VDAC3 as a sensor of intracellular redox state: contribution to cytoprotection mechanisms in oxidative stress, przygotowanego do wysłania do Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji i założeń badań, pozyskaniu funduszy na realizację badań, tworzeniu wykresów i schematów, pisaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz zarysowaniu głównych punktów pracy.

Z poważaniem,

Andonis Karachitos