

Prof. dr hab. Eliza Wyszko

Poznań, 11.03.2024

Pracownia Analiz Struktur Subkomórkowych

Ocena osiągnięcia dorobku naukowego, dydaktycznego oraz organizacyjnego dr Andonisa Karachitosa
w związku z postępowaniem w sprawie o nadanie stopnia naukowego
doktora habilitowanego

Tytuł osiągnięcia naukowego

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

Aktywność naukowa Habilitanta

Dr Andonis Karachitos jest absolwentem Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, gdzie w 2008 r ukończył studia magisterskie na Wydziale Biologii; specjalność: biologia molekularna.

W 2013 r obronił prace doktorską pt „Mechanizm działania minocykliny w komórkach drożdży *Sacharomyces cerevisiae*. Efekt cytoprotekcyjny.”, którego promotorem była prof. dr hab. Hanna Kmita.

Kandydat uzyskał tytuł doktora nauk biologicznych, specjalność: biologia molekularna.

Od 2013 r jest adiunktem na stanowisku badawczo-dydaktycznym w Zakładzie Bioenergetyki UAM prowadzonym przez prof. dr hab. Hannę Kmitę.

Osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne i popularyzujące naukę

Działalność dydaktyczna dr Karachitosa jest bardzo szeroka. Od 2009 roku prowadzi zajęcia na Wydziale Psychologii oraz Biologii UAM, obejmujące kursy eksperymentalne związane z inżynierią białek, enzymologią, biochemią i biotechnologią. Jest koordynatorem przedmiotu "Wykorzystanie organizmów modyfikowanych genetycznie w procesach produkcyjnych" dla studentów kierunku Biotechnologia oraz prowadzi zajęcia laboratoryjne z hodowli organizmów modelowych wykorzystywanych w biotechnologii. Podczas pracy akademickiej był promotorem 14 prac licencjackich i 3 prac magisterskich, a także pełnił funkcję promotora pomocniczego w pracy doktorskiej Darii Grobys w 2018 roku. Był także recenzentem kilku prac licencjackich, magisterskich i pracy doktorskiej z Wolnego Uniwersytetu Brukselskiego w 2017 roku. Ponadto przetłumaczył kilka rozdziałów w podręcznikach z biochemii i podstaw biologii komórki.

Dr Karachitos pełnił funkcję opiekuna I roku Biotechnologii na Wydziale Biologii UAM.

W 2017 r został członkiem komitetu organizacyjnego konferencji naukowej „6th Mitochondrion”, a od 2020 jest członkiem Zespołu Oceniającego na Wydziale Biologii UAM.

Ponadto dr Karachitos prowadził pokazy laboratoryjne pt. „Kolorowa kuchnia biochemiczna dla biologów” na Poznańskim Festiwalu Nauki i Sztuki, przygotował i poprowadził warsztaty pt. „Z wizytą u śluzowca” w ramach IV Edycji Dni Akademickich dla uczniów klas patronackich Wydziału Biologii UAM.

Ponadto, poprowadził warsztaty pt. „Niesporczaki - wodne cwaniaki” w ramach Nocy Naukowców. W 2021 roku wygłosił wykład pt. „Mikrobohaterowie w akcji, czyli jak drożdże pomagają nam w badaniach naukowych” w czasie Dni Kandydata UAM.

Dr Karachitos jest laureatem szeregu nagród i wyróżnień

Wyróżnienia i nagrody dr Karachitosa obejmują: stypendium w ramach projektu wsparcia stypendialnego dla doktorantów na kierunkach strategicznych z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski. Habilitant uzyskał grant na uczestnictwo w 16 Europejskiej Konferencji Bioenergetycznej w Warszawie oraz w 10th Young Scientist Forum w Göteborgu. Otrzymał także stypendium Fundacji Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, wyróżnienie Dziekana Wydziału Biologii za osiągnięcia naukowe w czasie studiów doktoranckich, stypendium Miasta Poznania dla młodych badaczy oraz nagrody za plakat prezentowany podczas konferencji naukowo-dydaktycznej Wydziału Biologii UAM i nagrodę zespołową III stopnia Rektora UAM za osiągnięcia w pracy naukowej.

Habilitant ukończył również kursy i szkolenia, takie jak "Programowanie w języku Python" oraz zaawansowane szkolenie z spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS). Uzyskał także certyfikat tutora I stopnia po ukończeniu Szkoły Tutorów Akademickich.

W 2023 r dr Karachitos wystąpił z wnioskiem o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Przygotowana dokumentacja zawierała autoreferat w języku polskim, kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, oświadczenia o udziale własnym w powstaniu tych publikacji oraz wykaz innych osiągnięć naukowych, dydaktycznych i organizacyjnych.

Ocena ogólnego dorobku naukowego Kandydata

Dorobek publikacyjny Habilitanta oceniam pozytywnie. Składa się na niego 22 publikacje naukowe, z których 6 zostało przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne. Wskaźniki naukometryczne prac dr. Karachitosa są dobre - publikacje były cytowane 439 razy, a indeks H wynosi 12. Najwyżej cytowane publikacje zostały uwzględnione w składzie osiągnięcia Habilitanta.

Ocena osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę habilitacji

Przedłożona do oceny rozprawa habilitacyjna stanowi cykl 6-ciu powiązanych tematycznie publikacji które ukazały się w latach 2016-2021 w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

W autoreferacie Kandydat szczegółowo omówił tematykę tych prac, podkreślając jego istotny udział w badaniach i nowatorskich osiągnięciach. W każdej z omawianych publikacji Habilitant miał wiodący udział, uczestniczył w tworzeniu koncepcji pracy, zbieraniu danych oraz przygotowaniu manuskryptów. We wszystkich prezentowanych pracach kandydat zajmuje pierwszą pozycję, a w dwóch z nich dzieli ją z innymi autorami. Wskaźnik ich oddziaływania mieści się w granicach (IF 2,3 - 4,7).

Celem prowadzonych przez habilitanta badań było poznanie funkcji wybranych paralogów białek VDAC, szczególnie VDAC3 u człowieka i VDAC2 u drożdży *S. cerevisiae*. We wszystkich publikacjach stanowiących zbiór prac składających się na pracę habilitacyjną dr Karachitos jest pierwszym autorem.

Prace badawcze były prowadzone wieloetapowo, od poznania mechanizmu działania kanałów w komórkach drożdży, przeprowadzenie nadprodukcji białek VDAC, po pomiar ich aktywności kanałowej w błonach lipidowych. Duży nacisk położono na wykazanie, że białka te pełnią funkcje kanałowe.

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

Publikacja nr 1 umożliwiła wykazanie, że ludzki VDAC 3 tworzy funkcjonalny kanał i jest kluczowy dla cytoprotekcyjnych właściwości w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego przez H_2O_2 . Te wyniki pozwalają zrozumieć różnice we właściwościach VDAC3 i pozostałych paralogów.

Autorzy pokazali możliwe wykorzystanie leków działających na VDAC jako leków cytoprotekcyjnych i że to właśnie VDAC3, a nie inne paralogi VDAC, jest kluczowy dla cytoprotekcyjnych właściwości minocykliny w sytuacjach stresu oksydacyjnego. Odkrycie to zostało uznane przez innych badaczy i potwierdzone. Pokazano, że VDAC 3 może tworzyć kanały transportujące jony nieorganiczne i różne metabolity porównywalnie do VDAC1.

Publikacja nr 2 jest międzynarodową pracą przeglądową opisującą zaangażowanie kanałów VDAC w chorobach sercowo-naczyniowych i naczyń mózgowych.

Autorzy podkreślają, że dysfunkcja mitochondriów wywołana zmianami aktywności VDAC może przyczynić się do śmierci komórek i rozwoju chorób naczyń mózgowych oraz układu krążenia. Wykorzystanie aktywności VDAC i jego izoform, jako kanałów może stanowić skuteczną interwencję terapeutyczną. Identyfikacja związków małocząsteczkowych potencjalnie oddziałujących z VDAC, może chronić mitochondria przed ich dysfunkcją komórki w konsekwencji śmiercią komórek

Publikacja nr 3 powstała również w wyniku współpracy międzynarodowej Zespołu kierowanego przez prof. Kmitę i dwóch zespołów z Włoch. Autorzy analizowali strukturę i funkcję VDAC2 w drożdżach *S. cerevisiae*. Dzięki symulacji dynamiki molekularnej oraz pomiarów elektrofizjologicznych zbudowano modele białek drożdżowych VDAC1 i VDAC2 i przeprowadzono analizę cech kanału i ścieżek transportu K^+ i Cl^- . Autorzy wykazali, że drożdżowy VDAC2 ma zdolność do tworzenia kanału. Jego przewodnictwo, zależność od napięcia i selektywność jonowa były podobne do wartości otrzymywanych dla drożdżowego VDAC1 i białek VDAC innych organizmów.

Publikacja nr 4 to również praca przeglądowa, w której autorzy skupili się na roli ludzkiego paralogu VDAC3 w motoryce i morfologii plemników ludzkich. Celem tych badań było sprawdzenie możliwości wykorzystania VDAC3 jako potencjalnego celu dla męskich środków antykoncepcyjnych. W pracy podkreślono, że VDAC3 odgrywa kluczową rolę w regulacji transportu ATP i homeostazy Ca^{2+} , co jest istotne dla ruchliwości plemników. Zidentyfikowano także mutacje w genie kodującym VDAC3 u pacjentów z niską ruchliwością plemników, co sugeruje, że mogą one wpływać na strukturę i funkcję kanału VDAC3.

W pracy tej zwrócono także uwagę na to, że nieprawidłowe funkcjonowanie VDAC3 może prowadzić do niepłodności. VDAC3 jest również związany z procesami takimi jak reakcja akrosomalna, która jest kluczowa dla funkcji plemników.

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

Publikacja nr 5 dotyczyła porównania elektrofizjologicznych cech VDAC2 uzyskiwanego przy zastosowaniu różnych metod. Porównano VDAC2 oczyszczony po nadekspresji w komórkach bakterii (VDAC2 rekombinowany) i VDAC2 otrzymany metodą opisaną w pracy C3 (VDAC2 natywny), co pozwoliło na głębsze zrozumienie mechanizmów regulujących jego aktywność. Analiza wykazała, że rekombinowany VDAC2, podobnie jak jego natywna forma, może tworzyć kanały zależne od napięcia, a jego średnie przewodnictwo może być podobne do tego wykazywanego przez natywną formę. Niestety rekombinowany VDAC2 charakteryzował się mniejszą wrażliwością na zmiany napięcia w porównaniu z jego natywnym odpowiednikiem. Wymagał ponadto zastosowania wyższych napięć, aby możliwe było zamknięcie kanału. Zauważono również różnice w selektywności względem jonów między natywną a rekombinowaną formą.

Publikacja nr 6 zakładała, że stres oksydacyjny, wynikający z braku równowagi między produkcją RFT a zdolnościami antyoksydacyjnymi komórek, może wpływać na funkcje kanału VDAC w mitochondriach. Autorzy skupili się na analizie sekwencji aminokwasowych VDAC w różnych organizmach, aby zidentyfikować potencjalne miejsca, w których reszty cysteiny mogą ulegać utlenieniu, co z kolei mogłoby wpływać na właściwości kanału. Zauważono, że w organizmach, które mają tylko jeden gen kodujący VDAC często brakuje tzw. "wrażliwego na redoks" VDAC, reprezentowanego przez ludzki VDAC3. Kanał VDAC wrażliwy na redoks jest specyficznym typem kanału, który posiada zdolność do modyfikacji swojej struktury i funkcji w odpowiedzi na zmiany w stanie redoks

komórki. Kluczową cechą tego kanału jest obecność reszt cysteiny, które mogą ulegać utlenieniu lub redukcji. Tworzone przez te reszty cysteiny wiązania dwusiarczkowe są kluczowe dla właściwości kanału, takich jak przewodnictwo i selektywność dla jonów. Tymczasem w organizmach z wieloma paralogami VDAC, takich jak *Drosophila melanogaster* czy ludzkie, istnieją paralogi VDAC, które są wrażliwe na redoks, a ich geny ulegają ekspresji w specyficznych tkankach. Ludzki VDAC1 jest wszechobecny w ludzkich tkankach i charakteryzuje się najwyższym poziomem ekspresji. W przeciwieństwie do VDAC1, VDAC3 ulega ekspresji na szczególnie wysokim poziomie w jądrach, a jego nokaut w modelu mysim prowadzi do niepłodności samców, co podkreśla jego znaczenie w biologii rozrodu.

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

Informacja o istotnej aktywności naukowej realizowanej w więcej niż w jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Staże naukowe:

W 2012 roku dr Karachitos odbył staż naukowo-badawczy w Laboratorium Neurofarmakologii na Uniwersytecie Medycznym Kastylia-La w Albacete w Hiszpanii, pod kierunkiem prof. Joaquina Jordana, gdzie prowadził badania nad wpływem różnych leków na mitochondria. Jego badania skupiały się głównie na analizie trzech substancji: minocykliny, Mdivi-1 oraz metadonu. W 2014 roku odbył kolejny staż naukowo-badawczy w Zakładzie Struktury i Funkcji Błón Biologicznych na Wydziale Biologii Strukturalnej i Bioinformatyki, Wolnego Uniwersytetu Brukselskiego w Belgii.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych, których wyniki umieszczone są w pracach naukowych

Dr Karachitos uczestniczył aktywnie w badaniach nad zjawiskiem anhydrobiozy u niesporczaków. Anhydrobioza to rodzaj przejściowej hibernacji, która pozwala organizmom przetrwać w bardzo niekorzystnych warunkach wynikających z niedoboru wody. Zjawisko to jest obserwowane u niesporczaków, które zaliczane są do bezkręgowców. Zaangażowanie dr Karachitosa w te badania wynikało z jego zainteresowania mechanizmami funkcjonowania mitochondriów w warunkach stresowych, co znalazło odzwierciedlenie w artykułach należących do monotematycznego cyklu publikacji.

Proces anhydrobiozy składa się z kilku etapów w wyniku czego organizm traci ok. 70% swojej objętości w wyniku utraty wody. Organizm przyjmuje wtedy kształt przypominający baryłkę lub beczkę, co jest wynikiem kurczenia się wzdłuż osi ciała, wciągnięcia głowy i cofnięcia się nóg oraz reorganizacji narządów wewnętrznych i komórek.

Niezwykle interesujące jest to, że proces ten jest odwracalny a w sprzyjających warunkach dochodzi do rehydratacji i przywrócenia do pierwotnej formy.

Wspólną cechą w analizie mechanizmów komórkowych związanych z anhydrobiozą jest najprawdopodobniej funkcjonowanie mitochondriów ze względu na to, że proces ten jest zasilany energią.

Badania dr Karachitosa dostarczyły ważnych informacji dotyczących roli alternatywnej oksydazy (AOX) u niesporczaków. Enzym ten znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dr Karachitos wykazał funkcjonowanie AOX u niesporczaków, które polega na umożliwieniu bezpośredniego transferu elektronów z kompleksu I i/lub II przez koenzym Q do tlenu, omijając szlak cytochromowy, który składa się z kompleksu III i IV. Pozwala to na zrozumienie funkcjonowania mitochondriów niesporczaków, ich potencjału do przetrwania w ekstremalnych warunkach, dzięki anhydrobiozie.

W analizie mechanizmów komórkowych związanych z anhydrobiozą, wspólną cechą jest prawdopodobnie funkcjonowanie mitochondriów, ponieważ proces ten wymaga energii. Badania dr Karachitosa dostarczyły istotnych informacji dotyczących roli alternatywnej oksydazy (AOX) u niesporczaków. Enzym ten znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dr Karachitos wykazał funkcjonowanie AOX u niesporczaków, co polega na umożliwieniu bezpośredniego transferu elektronów z kompleksu I i/lub II do koenzymu Q, omijając szlak cytochromowy złożony z kompleksów III i IV. To z kolei pozwoliło na zrozumienie funkcjonowania mitochondriów u niesporczaków i ich zdolności do przetrwania w ekstremalnych warunkach dzięki anhydrobiozie.

Podsumowanie

Stwierdzam, że przedstawiony cykl sześciu publikacji wnosi poważny wkład do badań podstawowych rozwijając wiedzę na temat działania i funkcji paralogów VDAC: człowieka i drożdży.

Treść merytoryczna pokazuje dojrzałość i samodzielność naukową Autora. Jego aktywność około naukowa jest również godna podziwu. Dlatego z przekonaniem rekomenduję nadanie Panu dr Andonisowi Karachitasowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych.

