

Załącznik nr 3

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Lucyna Mrówczyńska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

1991 - magister biologii, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Kierownik pracy: prof. dr hab. Józef Bielawski

1999 - doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, stopień uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na podstawie rozprawy doktorskiej: „Wpływ soli kwasów żółciowych na błony erytrocytów”. Promotor: prof. dr hab. Józef Bielawski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1991-1999 – asystent, Zakład Cytologii i Histologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

1999 - do chwili obecnej – adiunkt, Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Charakterystyka mikrodomen błonowych zawierających gangliozydy GM1

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe składa się z cyklu 6 prac, których **sumaryczny IF** (wg roku opublikowania) jest równy **12,131**, a liczba **punktów MNiSW** wynosi **115**.

1. **Mrówczyńska, L.**, Hägerstrand, H. 2008. Patching of ganglioside_{M1} in human erythrocytes - distribution of CD47 and CD59 in patched and curved membrane. *Molecular Membrane Biology* 25(3): 258-265 [IF = 3,596; pkt. MNiSW = 25; cytowania = 9]
2. **Mrówczyńska, L.**, Salzer, U., Perutková, Š., Iglič, A., Hägerstrand, H. 2010. Echinophilic proteins stomatin, sorcin, synexin locate outside ganglioside_{M1} (GM1) patches in the erythrocyte membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401(3): 396-400 [IF = 2,595; pkt. MNiSW = 25; cytowania = 6]
3. **Mrówczyńska L.**, Bobrowska-Hägerstrand, M., Hägerstrand, H., Lindqvist, C. 2011. Increased sensitivity of cholera toxin treated K562 cells to natural killer cells. *Cellular Immunology* 269(1): 1-4 [IF = 1,974; pkt. MNiSW = 20; cytowania = 2]
4. **Mrówczyńska L.**, Salzer, U., Iglič, A., Hägerstrand, H. 2011. Curvature factor and membrane solubilization, with particular reference to membrane rafts. *Cell Biology International* 35(10): 991-995 [IF = 1,482; pkt. MNiSW = 15; cytowania = 6]
5. **Mrówczyńska, L.**, Lindqvist, C., Iglič, A., Hägerstrand, H. 2012. Spontaneous curvature of ganglioside GM1 - effect of cross-linking. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 422(4): 776-779 [IF = 2,484; pkt. MNiSW = 25; cytowania = 3]
6. **Mrówczyńska L.** 2012. Lipid Microdomains - Structure, Function, and Controversies. In: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Vol. XVI, Chapter 6, p. 165-197. Elsevier Inc. Aleš Iglič, Editor, Burlington: Academic Press. ISBN: 978-0-12-396534-9 [IF = 0; pkt. MNiSW = 5; cytowania = 0]

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W roku 2012 minęło 40 lat od zaproponowania modelu płynnej mozaiki dla struktury błony komórkowej przez Singera i Nicolsona [1972]. W modelu tym, dwuwarstwa lipidowa jest przedstawiona jako „homogeny ocean lipidów”, pełniący funkcje podporowe dla białek błonowych. Model błony komórkowej wielokrotnie modyfikowano, w szczególności zaś ewoluowało znaczenie strukturalno-funkcjonalne dwuwarstwy lipidowej. Różnorodność struktury lipidów tworzących dwuwarstwę (obecnie szacowana na ok. tysięcy rodzajów w

blonie *Eukariota* [Sud i wsp. 2007]) sugerowała, że nie może ona odgrywać jedynie roli podporowej. Wykazano ponadto, że struktura dwuwarstwy jest stabilizowana słabymi wiązaniami Van der Waalsa oraz oddziaływaniami elektrostatycznymi, co umożliwia lipidom segregację w bocznej płaszczyźnie błony [Thomson i Tillack 1985]. Dowiedziono także, że lipidy, a w szczególności cholesterol i sfingolipidy w stopniu zależnym od ich struktury chemicznej i teoretycznego kształtu molekularnego oraz warunków środowiska, formują w dwuwarstwie różnego rodzaju kompleksy i domeny [Israelachvili i wsp. 1980]. Simons i Fuller [1985] wykazali istotne różnice w domenowej strukturze powierzchni apikalnej i bazolateralnej plazmolemy komórek spolaryzowanych. Dowiedziono ponadto, że kompleksy glikosfingolipidów i białek zakotwiczonych w dwuwarstwie przez kotwicę glikozylofosfatydyloinozytolową (GPI) występujące wyłącznie w egzoplazmatycznej warstwie powierzchni apikalnej błony, są formowane w aparacie Golgiego i z transportem pęcherzykowym trafiają do błony komórkowej [Simons i van Meer 1988]. Odkrycia te były podstawą do wysunięcia hipotezy [Simons i Ikonen 1997] o występowaniu w dwuwarstwie lipidowej błony komórkowej - obok obszarów bogatych w stochastycznie rozmieszczone glicerofosfolipidy - rejonów obfitujących w sfingolipidy, fosfolipidy nasycone i cholesterol, nazwanych tratwami lipidowymi (*lipid rafts*).

Istotnym komponentem tratw lipidowych są gangliozydy [Harder i wsp. 1998]. Wiązania wodorowe między cząsteczkami gangliozydów, między gangliozydami i cholesterolem oraz oddziaływania elektrostatyczne między elementami łańcucha oligosacharydowego gangliozydów, stabilizują strukturę tratw. Właściwości gangliozydów, w tym ich zdolność do tworzenia homo- i/lub heterokompleksów są intensywnie badane [Sonino i Prinetti 2010, Cantu i wsp. 2011]. Spośród wyróżnionych ok. 200 rodzajów cząsteczek gangliozydów [Yu i wsp. 2011] monosialogangliozyd_{GM1} (GM1) uznano za jeden z markerów tratw lipidowych [Janes i wsp. 1999, Harder i wsp. 1998].

Tratwy lipidowe (określane spolszczonym terminem angielskim - rafty) to kompleksy lipidowo-białkowe odgrywające ważną rolę w funkcjonowaniu komórki i sygnalizacji międzykomórkowej [Simons i Sampaio 2011]. Białka występujące na terenie raftów nazwano raftofilnymi, natomiast te spoza obszarów tratw, określono mianem raftofobowych [Kusumi i Suzuki 2005]. Do białek raftofilnych zaliczono m.in. (a) białka zakotwiczone w egzoplazmatycznej warstwie błony komórkowej przez kotwicę GPI (np. białko CD59), (b) białka podwójnie acylowane związane z endoplazmatyczną warstwą błony plazmatycznej (np. stomatyna/białko 7.2b) oraz (c) białka wykazujące powinowactwo do fosfolipidów błonowych w obecności jonów Ca^{2+} (np. syneksyna i sorcyna). Białka wielokrotnie mirystylowane i/lub palmitylowane zaliczono do białek raftofobowych.

Dane dotyczące występowania białek w mikrodomen błonowych uzyskano głównie z analiz DRMs (*detergent resistant membranes*), czyli fragmentów błony opornych na solubilizację niejonowym detergentem Tritonem X-100 (TX-100) w niskiej temperaturze (+4°C) [Brown i Rose 1992]. DRMs bogate w sfingomielinę i glikosfingolipidy otrzymano po raz pierwszy z cieni erytrocytarnych, na długo przed sformułowaniem hipotezy tratw lipidowych [Fairbanks i wsp. 1971]. W literaturze terminy „DRMs” i „tratwy lipidowe” są często stosowane zamiennie, jednak wielu Autorów dowodzi, że kompozycja izolowanych DRMs nie odpowiada rzeczywistej strukturze tratw lipidowych w błonie komórkowej [Munro 2003, Schuck i wsp. 2003, Lichtenberg i wsp. 2005]. Liczne wyniki badań ukazują istotną zależność między kompozycją DRMs i warunkami solubilizacji błony. Do głównych czynników modyfikujących skład DRMs zaliczono (1) rodzaj detergentu (np. TX-100, Lubrol WX, Brij 96) [Delaunay i wsp. 2008, Heffer-Lauc i wsp. 2007, Lichtenberg i wsp. 2005], (2) temperaturę [Domingues i wsp. 2010] i (3) skład roztworu inkubacyjnego [Ciana i wsp. 2005] oraz (4) zanieczyszczenie preparatu błonami wewnątrzkomórkowymi (głównie mitochondrialnymi) [Foster i wsp. 2003], a w przypadku erytrocytów zanieczyszczenie granulocytami (głównie neutrofilami), uwalniającymi proteazy [Ciana i wsp. 2011]. Uważa się, że analiza DRMs stanowiących swoisty „koktajl” różnych fragmentów błon, nie odzwierciedla rzeczywistej struktury mikrodomeny błonowej, lecz stanowi wypadkową wielu [Magee i Parmryd 2003]. Metody mechanicznej izolacji tratw lipidowych z błony komórkowej bez udziału detergentu nie są z kolei powszechnie akceptowane [Ciana i wsp. 2005].

Poznanie struktury i topografii błony komórkowej jest jednym z najważniejszych wyzwania współczesnej biologii komórki. Stale podejmowane są wysiłki kierowane na opracowanie metod umożliwiających bezpośrednią obserwację mikrodomen w plazmolemie, ponieważ badania raftów *in situ* za pomocą technik mikroskopowych uważane są za bardziej wiarygodne, gdyż ograniczają powstanie artefaktów indukowanych detergentami [Hancock 2006]. Jednak rozmiar tratw lipidowych (od 20 do 30 molekuł lipidów kotwiczących kilka białek, do domen o średnicy 200 nm) i czas ich trwania (od kilku milisekund do minut) sprawia, że mikrodomeny nie są łatwym obiektem badań eksperymentalnych. Obecnie przyjmuje się, że w błonach plazmatycznych współwystępuje wiele rodzajów dynamicznych, heterogennych w strukturze i funkcji mikrodomen błonowych [Simons i Sampaio 2011, Sonnino i Prinetti 2013].

Celem moich badań była charakterystyka jednego z rodzajów mikrodomen obecnych w błonie komórkowej, za pomocą technik mikroskopii fluorescencyjnej, a mianowicie mikrodomen zawierających GM1. Głównym materiałem do badań były erytrocyty ludzkie izolowane z pełnej krwi żyłnej. Erytrocyt jest komórką modelową w badaniach struktury i funkcji błony plazmatycznej ze względu na brak innych błon oraz względnie stały skład

jakościowo-ilościowy plazmolemy. Ponadto, erytrocyty nie mają zdolności do endocytozy kompleksów GM1 i związanych z nimi przeciwciał stosowanych do ich wizualizacji, co jest obserwowane w komórkach jądrzastych [Chinnapen i wsp. 2007]. Celem weryfikacji postawionych hipotez w badaniach wykorzystano także komórki jądrzaste: erytroleukemiczne K562 i limfoidalne REH. Moje badania prowadziłam we współpracy z dr Henrym Hägerstrandem i dr Christerem Lindqvistem z Åbo Akademi University w Turku w Finlandii, Prof. Alešem Igličem z University of Ljubljana ze Slovenii oraz dr Ulrichem Salzerem z Medical University of Viena z Austrii, w ramach dwóch projektów badawczych [zał. 5, pkt. II (I) poz. 2 i 3].

W pierwszym etapie badań opracowałam metodę utrwalania erytrocytów umożliwiającą ich dogodnie obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym [Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1], przy minimalnej autofluorescencji hemoglobiny i utrwalacza oraz jednoczesnym zachowaniu parametrów morfologicznych tych komórek. Wyniki te uzupełniły doniesienia literaturowe na temat efektów działania utrwalaczy i ich mieszanin na właściwości komponentów błony komórkowej [Kusumi i Suzuki 2005].

Nasze wcześniejsze próby wizualizacji mikrodomen GM1 w błonie erytrocytów wyłącznie za pomocą sprzężonej z fluorochromem podjednostki beta toksyny cholery (CTB), selektywnie wiążącej się z pięcioma GM1, nie pozwoliły na optymalną detekcję tych mikrodomen w mikroskopie fluorescencyjnym [zał. 5, pkt. II (A), poz. 7]. Zaproponowana przez mnie rozbudowa protokołu doświadczalnego o etap z użyciem przeciwciała anti-CTB (grupującego GM1 związane z CTB), umożliwiła skuteczną wizualizację mikrodomen GM1 w błonie erytrocytów [Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1]. Zgodnie z definicją tratw lipidowych (Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function 2006), grupowanie mikrodomen błonowych w większe platformy jest procesem naturalnie zachodzącym w błonie komórkowej *in vivo* [Pike 2006], zatem indukowane doświadczalnie skupianie mikrodomen GM1 przez CTB i anti-CTB, odpowiada zjawiskom obserwowanym w warunkach fizjologicznych. Szczegółowa analiza mikroskopowa wykazała obecność od 40 do 60 skupisk mikrodomen GM1, równomiernie rozmieszczonych w błonie erytrocytarnej. Nasze badania nie potwierdziły doniesień opisujących agregację grupowanych mikrodomen błonowych w jedną platformę obserwowaną w błonie komórek jądrzastych [Harder i wsp. 1998, Janes i wsp. 1999]. Uzyskane różnice dowodzą komórkowo-specyficznych interakcji między komponentami mikrodomen GM1 i elementami cytoszkieletu.

W badania na erytrocytach dużej grupy dawców wykazaliśmy, że zastosowanie metyl- β -cyklodekstryny (MBCD), czynnika wywołującego sekwestrację cholesterolu z dwuwarstwy lipidowej [Samuel i wsp. 2001], znacząco utrudnia wizualizację mikrodomen GM1 [Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1]. Z kolei działanie MBCD po uprzednim

grupowaniu mikrodomen GM1 przez CTB i anti-CTB, jedynie w nieznacznym stopniu ograniczyło ich detekcję. Osiągnięciem tego etapu badań było wykazanie istotnej roli cholesterolu w utrzymaniu struktury mikrodomen GM1.

Sprzeczne dane literaturowe na temat składu białkowego DRMs były inspiracją do podjęcia badań występowania tych białek w mikrodomenach GM1 [Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1]. Wyszliśmy z założenia, że białka DRMs obecne w mikrodomenach GM1 będą również akumulować się w domenach GM1 indukowanych przez CTB plus anti-CTB. Selekcję białek do badań oparto na podobnym do GM1 sposobie znakowania przeciwciałami od strony egzoplazmatycznej błony oraz na różnicach w zakotwiczeniu tych białek w dwuwarstwie lipidowej. Wyniki badań nie potwierdziły obecności klasycznego białka DRMs, białka CD59 zakotwiczonego przez GPI [Murphy i wsp. 2004] w erytrocytarnych mikrodomenach GM1. Transbłonowe białka CD47 (*integrin associated protein, IAP*) i CD95 (Fas/APO-1), raftofilne w komórkach jądrazstych [Manna i wsp. 2005, Söderström i wsp. 2005], również nie występowały mikrodomenach GM1. Szczegółowa analiza mikroskopowa wykazała ponadto brak jakiegokolwiek wpływu grupowania mikrodomen GM1 przez CTB i anti-CTB na rozmieszczenie badanych białek w bocznej płaszczyźnie błony. Występowanie białek DRMs poza mikrodomenami GM1 w błonie dyskocytów, czyli ich właściwości raftofobowe, dowodzą strukturalnej różnorodności oraz komórkowej specyficzności mikrodomen GM1 [Lingwood i Simons 2010].

W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że mobilne komponenty błony przemieszczają się do miejsc energetycznie korzystnych, tj. krzywizn dodatnich lub ujemnych, w stopniu zależnym m.in. od ich molekularnego kształtu teoretycznego [zał. 5, pkt. II (A), poz. 7]. Erytrocyty podczas ok. 120 dni w układzie krążenia, pokonują ok. 200 km (ok. $1,7 \times 10^5$ cykli) i tracą 20% swojej powierzchni w efekcie uwalniania mikropęcherzyków [Bosman i wsp. 2005]. W mikropęcherzykach uwalnianych z uwypukleń błony erytrocytarnej, które są tożsame z dodatnimi krzywiznami błony, potwierdzono obecność niektórych białek DRMs [Salzer i wsp. 2002]. Powyższy fakt był punktem wyjścia do badań segregacji i preferencji mikrodomen GM1 do indukowanej dodatniej krzywizny błony [Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1]. Krzywizny dodatnie uzyskano eksponując erytrocyty na działanie jonoforu A23187 dla jonów Ca^{2+} , wywołującego echinocytarną transformację dyskocytów [Kamp i wsp. 2001], efektem której jest powstanie komórek sferycznych z równomiernie rozmieszczonymi 30-50-cioma kolcami. Kolce echinocytów reprezentują w naszych badaniach dodatnie krzywizny błony. Wykazałam, że mikrodomeny GM1 preferencyjnie akumulują się w kolcach echinocytów, czyli są strukturami echinofilnymi. Podobny typ segregacji (echinofilność) odnotowałam dla mobilnego białka CD59, natomiast białka CD47 i CD95 nie akumulowały się w krzywiznach dodatnich błony, czyli

charakteryzowały je właściwości echinofobowe. Echinofilność białka CD59 nie była warunkowana wcześniejszym grupowaniem mikrodomen GM1 przez CTB i anti-CTB, co więcej, dość często obserwowano brak współwystępowania mikrodomen GM1 i białka CD59 w danej krzywiźnie. Zaproponowana przez nas metoda umożliwiła dogodną ocenę mobilności, segregacji oraz współwystępowania komponentów błony w erytrocytach, zarówno dyskocytach i echinocytach.

Tratwy lipidowe obejmują obie warstwy błony komórkowej [Janes i wsp. 1999], a ich dwuwarstwowość stabilizowana jest m.in. interakcjami między długimi łańcuchami acylowymi sfingolipidów warstwy egzoplazmatycznej i fosfatydyloseryną oraz fosfatydyloetanolaminą warstwy endoplazmatycznej. Dlatego w kolejnych badaniach [**Mrówczyńska i wsp. 2010, poz. 2**] analizowano występowanie białek DRMs związanych z warstwą endoplazmatyczną, a mianowicie białko integralne stomatynę oraz białka wiążące się z dwuwarstwą lipidową w sposób zależny od jonów wapnia, syneksynę i sorcynę [Salzer i wsp. 2002], w mikrodomenach GM1. Podobnie jak w przypadku białek CD59, CD47 i CD95 [**Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1**], kolejne badane białka DRMs charakteryzowały właściwości raftofobowe w błonie dyskocytów. Wykazano także echinofilność tych białek, które podobnie jak CD59, bardzo często akumulowały się z mikrodomenami GM1 w tej samej dodatniej krzywiźnie błony. Przeprowadzona przez nas analiza teoretyczna wykazała, że stożkowy teoretyczny kształt molekularny cząsteczek GM1 [Cantu i wsp. 2009], predysponuje mikrodomeny GM1 do roli centrum nukleacyjnego dla kolców echinocytów, w których akumulują się mobilne białka o właściwościach echinofilnych [**Mrówczyńska i wsp. 2010, poz. 2**]. Obserwowany niekiedy brak współwystępowania mikrodomen GM1 i echinofilnych białek DRMs w kolcach echinocytów, jest prawdopodobnie efektem dynamicznego tworzenia w błonie innych, konkurencyjnych echinofilnych mikrodomen.

Analizując fakt, że echinofobowe białko CD47, które nie jest białkiem mobilnym w bocznej płaszczyźnie błony i nie jest rejestrowane w erytrocytranych DRMs [Murphy i wsp. 2004], dostrześliśmy istotny związek między echinofilnością mobilnych komponentów błony i ich obecnością w DRMs. Bazując na danych literaturowych oraz wynikach własnych [**Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1; Mrówczyńska i wsp. 2010, poz. 2**], zaproponowaliśmy wyjaśnienie mechanizmu specyficznego sortowania echinofilnych mikrodomen GM1 i białek w czasie solubilizacji błony przez TX-100 [**Mrówczyńska i wsp. 2011, poz. 3**]. Zgodnie z hipotezą sprzężonych monowarstw [Sheetz i Singer 1974], molekuly detergentu wbudowując się w dwuwarstwą lipidową dyskocytów, stymulują transformację echino- lub stomatocytarną, czyli indukują w błonie krzywizny dodatnie lub ujemne. Stomatocytogenny TX-100 po wbudowaniu się do egzoplazmatycznej warstwy błony, akumuluje się stopniowo w jej warstwie endoplazmatycznej, indukując powstanie

zarówno krzywizn dodatnich, jak i ujemnych. Proces ten wywołuje przemieszczanie się mobilnych komponentów błony do odpowiednich dla nich miejsc energetycznie korzystnych. W oparciu o wyniki badań eksperymentalnych [Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1; Mrówczyńska i wsp. 2010, poz. 2] twierdzimy, że echinofiline mikrodomeny GM1 i echinofilne białka DRMs, akumulując się w dodatnich krzywiznach błony pozostają poza zasięgiem działania TX-100 i dlatego są rejestrowane w DRMs. Fakt, że echinofobowe białko CD47 [Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1], które jest związane z membranoszkieletem [Dahl i wsp. 2004] i nie jest obecne w erytrocytarnych DRMs [Murphy i wsp. 2004], potwierdza słuszność naszego założenia. Uważamy, że echinofilny charakter komponentów błony jest ważnym kryterium ich obecności w erytrocytarnych DRMs. Zaproponowany przez nas model segregacji echinofilnych mikrodomen GM1 i białek błonowych wpisuje się w dyskusję na temat zależności między warunkami solubilizacji błony i kompozycją izolowanych z niej DRMs.

Kolejnym zadaniem badawczym była weryfikacja metody wizualizacji mikrodomen GM1 w innych typach komórek. Do badań wybrano erytroleukemiczne komórki K562 oraz limfoidalne komórki REH, a uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność opracowanej metody w obu typach komórek [Mrówczyńska i wsp. 2011, poz. 4]. Zaobserwowaliśmy ponadto obecność dodatkowego, większego skupienia mikrodomen GM1 w błonie komórek K562, które nie występowało w błonie erytrocytów [Mrówczyńska i Hägerstrand 2008, poz. 1; Mrówczyńska i wsp. 2010, poz. 2]. Szczegółowa analiza komórek K562 w mikroskopie konfokalnym wykazała, że skupienie to tworzą endocytowane kompleksy mikrodomen GM1-CTB i GM1-CTB-antyCTB [Mrówczyńska i wsp. 2012, poz. 5].

Komórki K562 są modelowymi komórkami w badaniach cytotoxyczności limfocytów NK-92, natomiast komórki REH nie są rozpoznawane i niszczone przez te limfocyty. Gangliozydy GM1 są istotnym elementem synapsy immunologicznej (*NK cell immunological synapse, NKIS*) tworzonej między komórkami nowotworowymi i limfocytami NK [Thomas i wsp. 2004]. Postawiliśmy sobie zatem pytanie, czy rozmieszczenie mikrodomen GM1 w błonie komórek nowotworowych odgrywa rolę w rozpoznaniu tych komórek przez limfocyty cytotoxyczne. Nasze badania wykazały, że grupowanie mikrodomen GM1 przez CTB oraz CTB i anty-CTB, odpowiednio zwiększa efektywność niszczenia komórek K562 przez limfocyty NK-92, lecz nie komórek REH, naturalnie niewrażliwych na NK [Mrówczyńska i wsp. 2011, poz. 4]. Uzyskany wynik sugerował jednoznacznie akumulację pewnych białek NIKS w zgrupowaniach mikrodomen GM1, ułatwiającą rozpoznanie komórek nowotworowych. W celu identyfikacji tych białek, określiliśmy gęstość występowania wybranych białek NIKS w cytometrze przepływowym i do badań cytotoxyczności wybraliśmy białka CD59, MICA/B i ULBP-2. Blokując wybrane białka w błonie komórek K562

przeciwciałami monoklonalnymi, zarówno pojedynczo jak i grupowo, nie odnotowaliśmy jednak żadnej zmiany efektywności niszczenia tych komórek przez limfocyty NK-92. Wynik ten potwierdził złożoność procesu rozpoznania komórek nowotworowych przez limfocyty NK, w który zaangażowane są liczne receptory i ligandy [Moretta i wsp. 2000]. Ważnym osiągnięciem tych badań było wykazanie zależności między sposobem rozmieszczenia mikrodomen GM1 w bocznej płaszczyźnie błony i efektywnością rozpoznania i niszczenia komórek nowotworowych przez komórki NK. Skupianie mikrodomen przez CTB plus anti-CTB sprzyja akumulacji niezidentyfikowanych przez nas białek NIKS i ułatwia rozpoznanie komórek nowotworowych przez komórki cytotoksyczne.

W kolejnym zadaniu badawczym szczegółowo analizowaliśmy echinofilne właściwości GM1 i mikrodomen GM1 oraz mobilność molekuł GM1 i mikrodomen GM1 w bocznej płaszczyźnie błony erytrocytów oraz komórek K562 [Mrówczyńska i wsp. 2012, poz. 5]. Wykazaliśmy, że echinofilność charakteryzuje mikrodomeny GM1 i jest proporcjonalna do ich rozmiaru, nie jest zaś cechą cząsteczek gangliozydów GM1. Prawdopodobną przyczyną tego zróżnicowania są różnice w teoretycznym kształcie molekularnym cząsteczek GM1 i mikrodomen GM1 [Israelachvili 1997]. Wykazaliśmy ponadto, że mobilność molekuł GM1 i mikrodomen GM1 w błonie komórkowej obu typów komórek nie jest hamowana działaniem utrwalaczy stosowanych standardowo w mikroskopii fluorescencyjnej. Dowiedliśmy, że całkowite zahamowanie mobilności GM1 i mikrodomen GM1 w bocznej płaszczyźnie błony wymaga dodatkowego dotrwalenia czterotlenkiem osmu (OsO_4). Wynik ten uzupełnia dane literaturowe o efektach działania utrwalaczy na właściwości mikrodomen i komponentów i błonowych [Kusumi i Suzuki 2005].

Współczesny punkt widzenia na mikrodomeny zawierające GM1 przedstawiłam w rozdziale opublikowanym w serii *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Wydawnictwa Elsevier [Mrówczyńska 2012, poz. 6]. Publikacja ta, podsumowująca moje własne badania na tle osiągnięć innych badaczy, szczegółowo charakteryzuje mikrodomeny błonowe pod względem strukturalnym i funkcjonalnym oraz ukazuje przyczyny rozbieżności wyników w zależności od zastosowanej metody badawczej. W pracy tej przedstawiłam także znaczenie mikrodomen błonowych w funkcjonowaniu komórki i organizmu oraz ich udział w patogenezie niektórych chorób.

Podsumowując, wyniki prezentowane jako osiągnięcie habilitacyjne, w znaczący sposób poszerzyły wiedzę na temat właściwości mikrodomen zawierających GM1 oraz ich roli w strukturze i funkcji błony komórkowej. W badaniach wykazałam, że wizualizacja mikrodomen GM1 za pomocą technik mikroskopii fluorescencyjnej jest możliwa i pozwala na szczegółową analizę ich właściwości w błonie komórkowej *in situ*. Udowodniłam, że struktura mikrodomen GM1 jest stabilizowana cholesterolem. Dowiodłam, że mikrodomeny GM1 są

strukturami dynamicznymi, które łatwo grupują się w bocznej płaszczyźnie błony oraz preferencyjne akumulują w dodatnich krzywiznach błony, w stopniu zależnym od ich rozmiaru. Bardzo istotnym rezultatem badań było wykazanie, że echinofilne właściwości mikrodomen GM1 oraz mobilnych białek błonowych, mogą warunkować ich obecność w izolowanych z błony DRMs.

Wyniki porównawczych badań mikrodomen GM1 erytrocytarnych i komórek jądrzastych dowodzą, że są one strukturami heterogennymi i zależnymi od typu komórki. Erytrocytarne mikrodomeny GM1 są ubogie w białka błonowe, natomiast mikrodomeny komórek K562 kotwiczą niezidentyfikowane przez nas białka. Skupiskowe rozmieszczenie mikrodomen GM1 w błonie komórek K562 zwiększa efektywność niszczenia tych komórek przez limfocyty cytotoksyczne.

Wyniki badań rzucają nowe światło na zjawiska zachodzące w mikrodomenach lipidowych, zarówno erytrocytów, jak i komórek jądrzastych. Część uzyskanych rezultatów nad mechanizmem działania komórek cytotoksycznych, stwarza możliwości ich wykorzystania w terapiach chorób nowotworowych.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Na mój dorobek naukowy, poza **6 pracami** zaprezentowanymi jako osiągnięcie naukowe wykazane w punkcie **4b i c Autoreferatu**, składa się **13 prac**, w tym **11** opublikowanych w czasopismach znajdujących się w **bazie Journal Citation Reports (10 oryginalnych publikacji i 1 publikacja przeglądowa)**, **1** oryginalna publikacja anglojęzyczna w recenzowanym czasopiśmie spoza w/w bazy i **1** rozdział w monografii w języku polskim.

Po uzyskaniu stopnia doktora moje badania koncentrowały się głównie na zjawiskach zachodzących w błonie erytrocytarnej pod wpływem działania związków naturalnie występujących w organizmie ludzkim lub stosowanych w medycynie i farmacji. Erytrocyty stanowią 99% elementów morfotycznych krwi i są komórkami najbardziej narażonymi na działanie substancji docierających do organizmu drogą oddechową i pokarmową lub w wyniku iniekcji. Co więcej, od lat stanowią dogodny model w badaniach właściwości błony komórkowej, a ocena zmian zachodzących w strukturze i funkcji błony erytrocytarnej *in vitro* dostarcza informacji o możliwych efektach wywieranych przez związki aktywne biologicznie na błony innych typów komórek.

Bezpośrednio po doktoracie kontynuowałam badania hemolitycznej aktywności soli kwasów żółciowych, naturalnych detergentów anionowych. Pomimo udokumentowanej hemolitycznej aktywności cholanów [Coleman i wsp. 1976] nie był znany szczegółowy

mechanizm indukowanej nimi hemolizy. Moje badania wykazały, że w pH fizjologicznym cholany wywołują hemolizę koloidowo-osmotyczną (typ przepuszczalności), niezależnie od wartości ich indeksu hydrofobowości [zał. 5, pkt. II (A) poz. 1]. Najważniejszym osiągnięciem tych badań było stwierdzenie hemolitycznej aktywności cholanów już w ich stężeniach monomerycznych (poniżej krytycznego stężenia micelizacji, CMC). Ponadto, interesującym wynikiem było wykazanie znaczącego wzrostu cytotoksyczności cholanów w kwaśnym środowisku ($\text{pH} \leq 6$), a w przypadku dezoksycholany odnotowanie zmiany mechanizmu hemolizy z typu przepuszczalności na bardziej destrukcyjny typ niszczenia. Uzyskane wyniki mają wymiar praktyczny ponieważ wskazują, że efektem długotrwałego działania monomerów niekoniugowanych cholanów na komórki nabłonka śluzówki jelita grubego może być ich niszczenie prowadzące do nowotworzenia. W roku 2013, powróciłam do zagadnień związanych z cytotoksycznością cholanów. W literaturze opisano modulujące działanie alkaloidów na cytotoksyczne właściwości cholanów [Leverrier i wsp. 2013], natomiast nie opisano wpływu alkaloidów na aktywność permeabilizacyjną tych detergentów. We współpracy z Prof. dr hab. Beatą Jasiewicz i koleżankami z Pracowni Chemii Związków Heterocyklicznych, Wydziału Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, przeprowadzono syntezę nowych połączeń kwasów żółciowych i alkaloidów (m.in. gaminy i nikotyny) oraz zbadano ich aktywność hemolityczną wobec erytrocytów ludzkich [zał. 5, pkt. II (D) poz. 2 i pkt. II (A) poz. 11]. Badania wykazały, że w połączeniach z alkaloidami maleje permeabilizacyjna aktywność cholanów. Za prawdopodobną przyczynę spadku cytotoksycznej aktywności kwasów cholowych w połączeniach z nikotyną, uważamy utrudnione wbudowanie się tych rozbudowanych molekuł w strukturę dwuwarstwy lipidowej błony [pkt. II (A) poz. 11]. Nie można wykluczyć tworzenia podobnych kompleksów cholanów z nikotyną *in vivo* i w efekcie obniżenia cytotoksyczności tych detergentów. Nasze wyniki prezentowane na ubiegłorocznej konferencji [zał. 5, pkt. III (B) poz. 16] zostały wyróżnione II nagrodą w konkursie na najciekawszą prezentację posterową. Badania cytotoksycznych właściwości cholanów w połączeniach z alkaloidami są obecnie kontynuowane. W roku ubiegłym (2013) wraz z Prof. dr hab. Beatą Jasiewicz podjęliśmy starania o pozyskanie funduszy na badania antyoksydacyjnych właściwości związków obecnych w ziarnach kawy różniących się miejscem pochodzenia oraz sposobem produkcji, nawiązując współpracę z INSTITUT INTERNATIONAL DE CAFEOLOGIE w Vence we Francji [zał. 5, pkt. II (I) poz. 4].

Detergenty w stężeniach sublitycznych indukują zmiany w kształcie erytrocytów oraz powstawanie endo- lub egzopęcherzyków w błonie erytrocytarnej [Hägerstrand i Isomaa 1989]. Specyficzny typ endopęcherzyków tubularnych, nazwanych torocytarnymi, odnotowano w efekcie działania stomatocytogenego detergentu C_{12}E_8 [Bobrowska-

Hägerstrand i wsp. 1999]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że detergenty z serii *CmEn* indukowały powstanie pęcherzyków torocytarnych w błonie erytrocytarnej w sposób ściśle zależny od ilości podstawników *m* oraz *n* [zał. 5, pkt. II (A) poz. 4].

W kolejnych badaniach analizowano cytotoksyczne właściwości czynnika aktywującego płytki krwi (*platelet-activating factor, PAF*). W warunkach fizjologicznych PAF aktywuje trombocyty do tworzenia czopu płytkowego, natomiast znaczący wzrost jego stężenia we krwi obwodowej i płynach ustrojowych rejestrowany jest w stanach alergicznych [Vadas et al. 2008]. Wykazaliśmy, że PAF w stężeniach subfitycznych szybko akumuluje się w egzoplazmatycznej warstwie błony erytrocytarnej i wywołuje stabilny efekt echinocytogeny [zał. 5, II (A) poz. 8]. Nie odnotowaliśmy jednak akumulacji molekuł PAF w endoplazmatycznej warstwie błony, ani nie potwierdziliśmy indukowanej nim eryptozy, opisananej przez Lang i wsp. [2005]. Wykazaliśmy natomiast, że PAF w wysokich stężeniach działa silnie hemolitycznie. Wynik ten pozwala sądzić, że w przebiegu miejscowego wzrostu stężenia (m.in. w stanach alergicznych) PAF może wbudowywać się do błon innych typów komórek krwi i modyfikować ich funkcje, co dodatkowo pogorszy stan chorego.

Badając właściwości mikrodomen bogatych w GM1, interesowały mnie także funkcje receptorowe GM1. W doniesieniach literaturowych wskazano na możliwy udział GM1 w niespecyficznym wiązaniu inwazyjnej cyklazy adenylowej (CyA) produkowanej przez *Bordetella pertussis* [Vojtova-Vodolanova et al. 2009], specyficznie wiążącej się z receptorem integrynowym CD11b/CD18 w błonie leukocytów. W naszych badaniach wykazaliśmy, że GM1 może pełnić funkcje receptorowe dla CyA w błonie erytrocytów i komórek K562, pozbawionych naturalnych receptorów dla tych toksyn [zał. 5, pkt. II (D) poz. 1]. Szczegółowa porównawcza analiza struktury łańcucha oligosacharydowego GM1 i receptora integrynowego, wykazała istotne podobieństwo, dlatego uważamy że CyA wiąże się z terminalną galaktozą i kwasem sialowym GM1 erytrocytów na zasadzie podobieństwa ich konfiguracji w receptorze integrynowym.

Szerokie spojrzenie na znaczenie gangliozydów w strukturze i funkcji błony komórkowej oraz ich udział w patogenezie niektórych chorób, przedstawiłam w pracy przeglądowej poświęconej tym niezwykle interesującym glikosfingolipidom kwaśnym [zał. 5, pkt. II (A) poz. 10].

Uczestniczyłam również w badaniach na temat segregacji komponentów błony do indukowanych w niej mikrozakrzywień dodatnich oraz ujemnych w efekcie działania na komórkę związkami echino- i stomatocytogennymi. Wyniki badań eksperymentalnych i analizy teoretycznej, potwierdziły przemieszczanie się mobilnych komponentów błony do miejsc energetycznie korzystnych (mikrozakrzywień) zależne od ich teoretycznego kształtu molekularnego [zał. 5, pkt. II (A) poz. 7].

Szczególnie interesującymi badaniami w których uczestniczyłam, był międzynarodowy projekt poświęcony blokowaniu mechanizmu oporności wielolekowej (*multidrug resistance, MDR*) [zał. 5, pkt. II (I) poz. 1]. Jednym z białek zaangażowanych w powstanie MDR jest białko MRP1 (*multidrug resistance-associate protein 1, ABCC1*), którego obecność potwierdzono w błonie erytrocytów ludzkich [Pulaski wsp. 1996]. MRP1 jest członkiem nadrodziny białek ABC i transportuje poza komórkę m.in. aniony organiczne (ksenobiotyki) i endogenne substancje toksyczne. W efekcie chemio- lub antybiotykoterapii dochodzi do zwielokrotnienia kopii białka MRP1 w błonie komórek nowotworowych, co uniemożliwia uzyskanie stężenia terapeutycznego cytostatyków wewnątrz tych komórek. Poszukiwanie skutecznego inhibitora funkcji transportowych MRP1 w komórkach nowotworowych jest jednym z najważniejszych wyzwań medycyny. W naszych badaniach wykazaliśmy istotne zahamowanie funkcji transportowych białka MRP1 w efekcie wbudowania się w strukturę błony komórkowej detergentów anionowych, zarówno syntetycznych [zał. 5, pkt. II (A) poz. 3], jak i naturalnych (cholanów) [zał. 5, pkt. II (A) poz. 5]. Zastosowane w badaniach detergenty nie są substratami dla białka MRP1, zatem zaobserwowany efekt inhibicyjny jest prawdopodobnie rezultatem bezpośredniego oddziaływania molekuł detergentów z hydrofobowym regionem białka MRP1. Niespecyficzne modyfikacje struktury dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej, m.in. sekwestracja cholesterolu, nie hamowały funkcji transportowych białka MRP1.

Bardzo interesującą i ważną grupą związków w badaniach odwrócenia zjawiska lekooporności są flawonoidy. Badania zależności między strukturą chemiczną flawonoidów (flawanonów, flawonów i izoflawonów) wykazały wysoką skuteczność niektórych flawanonów w zahamowaniu funkcji transportowych MRP1 [zał. 5, pkt. II (A) poz. 2]. Efektywność inhibicyjna flawanonów zależała od obecności grupy prenylowej w pozycji 8 na pierścieniu A. Wykazaliśmy także, że polifenole z grupy stilbenów, o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych, hamują funkcje transportowe białka MRP1 w erytrocytach oraz pęcherzykach odwróconych (*inside-out vesicles*) uzyskanych z cieni erytrocytarnych [zał. 5, pkt. II (A) poz. 6]. Właściwości inhibicyjne stilbenów wzrastały proporcjonalnie do stopnia ich oligomeryzacji i najsilniejszym inhibitorem MRP1 był trimer resweratrolu, obecnego m.in. w czerwonym winie oraz owocach czarnej porzeczki. W ostatnim czasie prowadziliśmy badania wpływu różnych polifenoli na właściwości cytotoksyczne limfocytów NK-92 względem komórek K562. Spośród zastosowanych flawonoidów, flawonol mirycetyna istotnie zwiększała cytotoksyczną aktywność tych limfocytów wobec komórek nowotworowych [zał. 5, pkt. II (A) poz. 12].

Poza projektami związanymi z problematyką zjawisk zachodzących w błonie komórkowej, zaangażowałam się w badania właściwości cytotoksycznych hormonów

owadziach. Wykorzystując moje wieloletnie doświadczenie w pracy z komórkami krwi, opracowałam technikę izolacji hemocytów z hemolimfy *Tenebrio molitor* oraz procedurę ich utrwalania do mikroskopii świetlnej i elektronowej we współpracy z pracownikami Zakładu Biologii i Rozwoju Zwierząt Wydziału Biologii UAM. Opracowanie powyższej techniki umożliwiło dogodne prowadzenie obserwacji mikroskopowych hemocytów eksponowanych na działanie różnych czynników. W badaniach wykazaliśmy hemocytotoksyczne działanie peptydowego hormonu gonadotropowego, *neb*-kolostatyny, zarówno w testach *in vivo* oraz *in vitro* [zał. 5, pkt. II (A) poz. 9]. Istotnym osiągnięciem tych badań było wykazanie po raz pierwszy proapoptotycznych właściwości hormonu gonadotropowego względem komórek hemolimfy. Zważywszy, że *T. molitor* jest szkodnikiem produktów zbożowych, ograniczenie liczebności jego populacji w efekcie indukowanego zaburzenia funkcji hemocytów, miałyby wymierne efekty praktyczne. Procedura syntezy *neb*-kolostatyny, hormonu o silnych właściwościach hemocytotoksycznych, została opatentowana [zał. 5, pkt. II (B)].

Powszechne wykorzystanie nanomateriałów w wielu dziedzinach życia oraz potwierdzone właściwości cytotoksyczne niektórych ich rodzajów [Šimundić i wsp. 2013] sprawiło, że włączyłam się w nurt badań nad właściwościami cytotoksycznymi nanocząstek we współpracy z pracownikami z Zakładu Ziemi Rzadkich Wydziału Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza. Prowadzone obecnie badania potwierdzają przyłączanie się nanomateriałów do błon erytrocytów, indukowanie zmian ich kształtu i zaburzenie sedymentacji. Ponadto, niektóre z nanomateriałów charakteryzuje wysoka aktywność hemolityczna. Wyniki badań zaprezentowano w 2013 r. w trakcie międzynarodowego sympozjum [zał. 5, pkt. III (B), poz. 9], a manuskrypt pierwszej publikacji jest obecnie finalizowany [zał. 5, pkt. I (A) poz. 13].

Za osiągnięcia naukowe zostałam trzykrotnie wyróżniona nagrodą Rektora UAM [zał. 5, pkt. II (J)].

Literatura:

- Bobrowska-Hägerstrand M., Kralj-Iglič V., Iglič A. et al. Toroidal membrane endovesicles induced by polyethyleneglycol dodecylether in human erythrocytes. *Biophys. J.*, 1999; 77: 3356-336
- Bosman G..J., Willekens F.L., Were J.M. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell. Physiol. Biochem.*, 2005; 16: 1-8
- Brown D.A., Rose J.K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 1992; 68: 533-544
- Cantu L., Corti M., Brocca P. et al. Structural aspects of ganglioside containing membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1788: 202–208
- Cantu L., Del Favero E., Sonnino S. et al. Gangliosides and the multiscale modulation of membrane structure. *Chem. Phys. Lipids*, 2011; 164: 796-810
- Chinnapen D.J., Chinnapen H., Saslowsky D. et al. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007; 266: 129-137
- Ciana A., Balduini C., Minetti G. Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton. *J. Biosci.*, 2005; 30: 317-328
- Ciana A., Achilli C., Balduini C. et al. On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1808: 183-190

- Coleman R., Holdsworth G. The release of membrane components prior to haemolysis during extraction of intact erythrocytes with bile salts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 426: 776-780
- Dahl K.N., Parthasarathy R., Westhoff C.M. et al. Protein 4.2 is critical to CD47-membrane skeleton attachment in human red cells. *Blood*; 2004, 103: 1131-1136
- Delaunay J.L., Breton M., Trugnan G. et al. Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1778: 105-112
- Domingues C.C., Ciana A., Buttafava A. et al. Effect of cholesterol depletion and temperature on the isolation of detergent-resistant membranes from human erythrocytes. *J. Membr. Biol.*, 2010; 234: 195-205
- Dykstra M., Cherukuri A., Sohn H.W. et al. Location is everything: lipid rafts and immune cell signalling. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003; 21: 457-481
- Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 1971; 10: 2606-2617
- Foster L.J., de Hoog C.L., Mann M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *PNAS*, 2003; 100: 5813-5818
- Hancock J.F. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2006; 7: 456-462
- Harder T., Scheiffele P., Verkade P. et al. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.*, 1998; 141: 929-942
- Hägerstrand H., Isomaa B. Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989; 982: 179-186
- Heffer-Lauc M., Viljetić B., Vajn K. et al. Effects of detergents on the redistribution of gangliosides and GPI-anchored proteins in brain tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 2007; 55: 805-812
- Israelachvili J.N., Marcelja S., Horn R.G. Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.*, 1980; 13: 121-200
- Israelachvili J.N. *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London, 1997
- Janes P.W., Ley S.C., Magee A.L. Aggregation of lipid rafts accompanies signalling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.*, 1999; 147: 447-461
- Kamp D., Sieberg T., Haest C.W. Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes. *Biochemistry*, 2001; 40: 9438-9446
- Kusumi A., Suzuki K. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1746: 234-251
- Lang P.A., Kempe D.S., Tanneur V. et al. Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 1233-1243
- Leverrier A., Bero J., Frédéric M. et al. Antiparasitic hybrids of Cinchona alkaloids and bile acids. *Eur. J. Med. Chem.*, 2013; 66: 355-363
- Lichtenberg D, Goñi F.M., Heerklotz H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.*, 2005; 30: 430-436
- Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane organizing principle. *Science*, 2010; 327: 46-50
- Magee A.I., Parmryd I. Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biol.*, 2003; 4: a234
- Manna P.P., Dimitry J., Oldenborg P.A. et al. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 29637-29644
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. et al. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-mediated cytotoxicity, *Immunol. Today*, 2000; 21: 228-234
- Munro S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 2003; 115: 377-388
- Murphy S.C., Samuel B.U., Harrison T. et al. Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood*, 2004; 103: 1920-1928
- Pike L.J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.*, 2006; 47: 1597-1598
- Pulaski L., Jedlitschky G., Leier I. et al. Identification of the multidrug-resistance protein (MRP) as the glutathione-S-conjugate export pump of erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 1996; 241: 644-648
- Samuel B.U., Mohandas N., Harrison T. et al. The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 29319-29329
- Salzer U., Hinterdorfer P., Hunger U. et al. Ca⁺⁺-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood*, 2002, 99: 2569-2577

- Schuck S., Honsho M., Ekroos K. et al. Resistance of cell membranes to different detergents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003; 100: 5795-5800
- Sheetz M.P., Singer S.J. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974; 71: 4457-4461
- Simons K., Fuller S.D. Cell surface polarity in epithelia. Annu. Rev. Cell Biol. 1985; 1: 243-288
- Simons K., van Meer G. Lipid sorting in the epithelial cells. Biochemistry, 1988; 27: 6197-6202
- Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature, 1997; 387: 569-572
- Simons K., Sampaio J.L. Membrane organization and lipid rafts. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2011; 03 (10) a004697
- Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 1972; 175: 720-731
- Sonnino S., Prinetti A. Gangliosides as regulators of cell membrane organization and functions. Adv. Exp. Med. Biol., 2010; 688:165-184
- Sonnino S, Prinetti A. Membrane domains and the "lipid raft" concept. Curr. Med. Chem., 2013; 20: 4-21
- Söderström T.S., Nyberg S.D., Eriksson J.E. CD95 capping is ROCK-dependent and dispensable for apoptosis. J. Cell Sci., 2005; 118: 2211-2223
- Sud M., Fahy E., Cotter D., Brown A. et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. Nucleic Acids Res., 2007; 35: D527-D532
- Šimundić M., Drašler B., Šuštar V. et al. Effect of engineered TiO₂ and ZnO nanoparticles on erythrocytes, platelet-rich plasma and giant unilamellar phospholipid vesicles. BMC Vet. Res., 2013; 9: 7 doi: 10.1186/1746-6148-9-7.
- Thomas S., Preda-Pais A., Casares S., Brumeanu T.D. Analysis of lipid rafts in T Cells. Mol. Immunol., 2004; 41: 399-409
- Thompson T.E., Tillack T.W. Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1985; 14: 361-386
- Vadas P., Gold M., Perelman B., Liss G.M., Lack G., Blyth T., Simons F.E., Simons K.J., Cass D., Yeung J. Plateletactivating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. N. Engl. J. Med., 2008; 358: 28-35
- Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka R. et al. Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin. FASEB J., 2009; 23: 2831- 2843
- Yu R.K., Tsai Y.T., Ariga T. et al. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides-an overview. J. Oleo Sci., 2011; 60: 537-544

Lucyna Miodarczyńska

Poznań, 26.01.2014r.