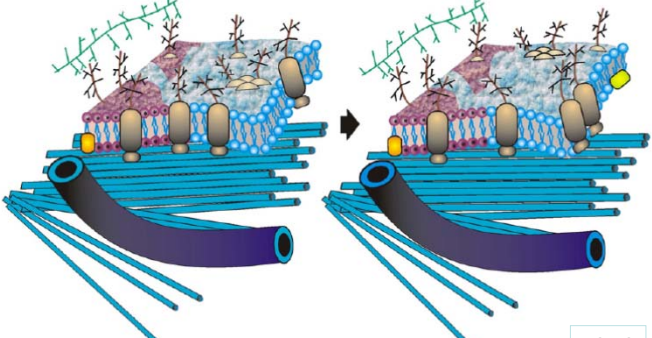


Garth Nicolson &
Jonathan Singer

1972

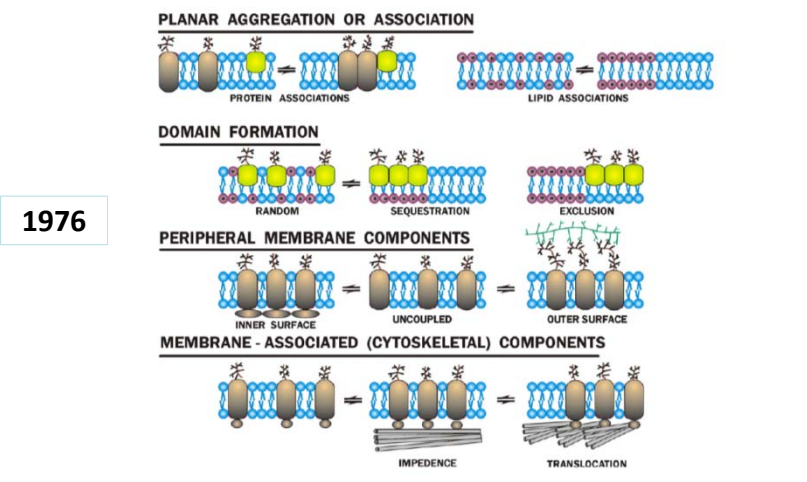


1976

Evoluzione del modello del mosaico fluido

Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jun;1838(6):1451-66.

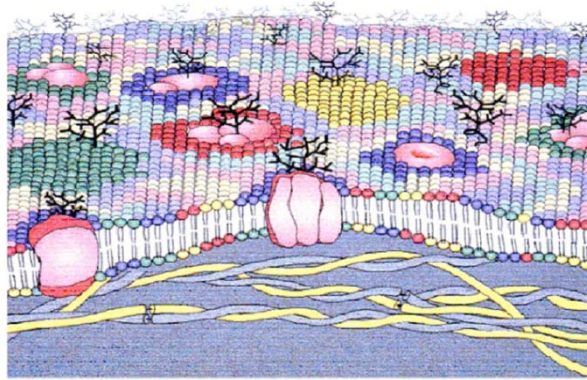
Alcuni dei **meccanismi di restrizione della mobilità** che potrebbero influenzare la **velocità di diffusione laterale** e la **mobilità** delle glicoproteine e dei fosfolipidi nella membrane



Da: Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jun;1838(6):1451-66.

Evoluzione del modello del mosaico

Modello di Escribá *et al.*



✚ **Lipidi differenti**, indicate con colori differenti, formano **domini specializzati** attorno a **proteine integrali di membrana e a glicoproteine**.

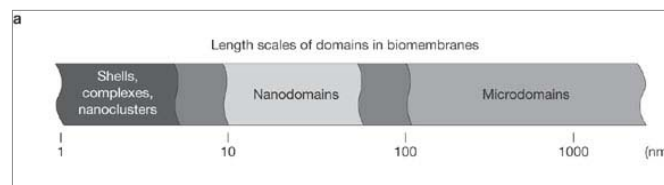
✚ I lipidi sono distribuiti in modo asimmetrico attraverso la membrana.

Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1451-66.

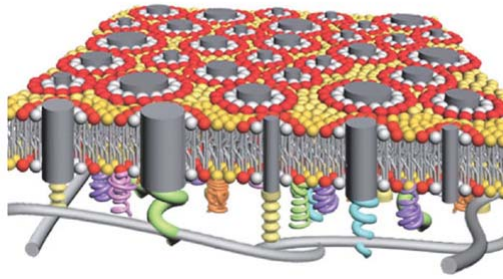
NATURE CELL BIOLOGY VOLUME 9 | NUMBER 1 | JANUARY 2007

Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics

Ken Jacobson, Ole G. Mouritsen and Richard G. W. Anderson



Scala di lunghezza dei domini nelle biomembrane. I gusci («shells»), complessi e nanoclusters hanno diametro da 1-10 nm mentre i nanodomini come le caveolae possono raggiungere 100 nm.



Bianco: lipidi del primo strato circostante.
Rosso: lipidi del 2° strato.
Giallo: altri lipidi.

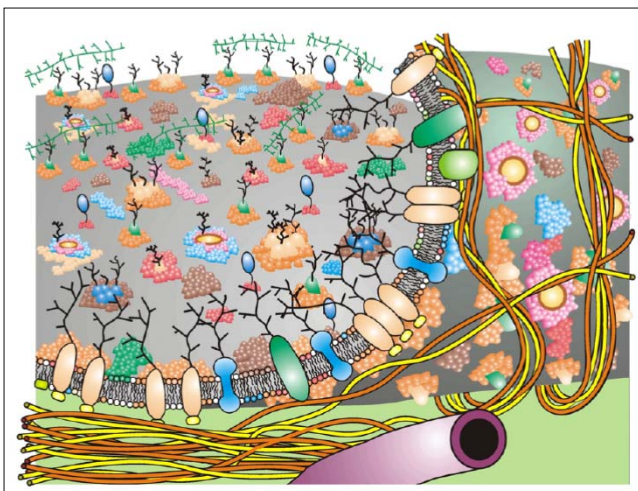
Le proteine che legano lipidi e quelle adattatrici che collegano le proteine transmembrana agli elementi del citoscheletro prossimali alla membrana sono illustrate come strutture colorate in modo diverso sotto il piano della membrana. [Gli ectodomini delle proteine di membrana sono stati omessi per facilità].

Rappresentazione schematica delle biomembrane come materiali composti di lipidi e proteine. Le stime della **concentrazione** laterale di **proteine** sono di circa

$30,000/\mu\text{m}^2$ [calcoli su rodopsina nel segmento esterno dei bastoncelli e proteine transmembrana della membrana di "baby hamster kidney" (BHK)]. Si è assunto che i lipidi occupassero un'area superficiale di $\sim 0.68 \text{ nm}^2$ (diametro $\sim 0.93 \text{ nm}$) e un' α -elica $\sim 1 \text{ nm}^2$ (diametro $\sim 1.1 \text{ nm}$). E' illustrata una sezione di $30 \times 30 \text{ nm}^2$ di membrana con 32 lipidi da una parte, 35 proteine transmembrana ad α -elica di 15 "single-span", 12 "tetraspan" e 8 "heptaspan", rispettivamente. Prendendo in considerazione l'area esclusa delle proteine, il **rapporto numerico lipide: proteina è ~ 50** . Per ogni elica monopasso con un diametro di $\sim 1.1 \text{ nm}$, ci sono circa 7 lipidi nel primo strato limitante; per una proteina "tetraspan" con un diametro of $\sim 2.4 \text{ nm}$, ci sono circa 11 lipidi nel primo strato circostante; per una proteina "heptaspan" (come la rodopsina) con un diametro di $\sim 3.2 \text{ nm}$, ci saranno circa 14 lipidi nel primo strato circostante.

Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RG. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. Nat Cell Biol. 2007 Jan;9(1):7-14.

Evoluzione del modello del mosaico fluido 2014



Prof. Garth
Nicolson

Da: Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. Biochim Biophys Acta. 2014 Jun;1838(6):1451-66.

Il modello del mosaico fluido aggiornato – 1

[didascalia figura di Nicolson, 2014]


- ✚ Tiene in considerazione la **struttura dei domini di membrane**, le **strutture citoscheletriche** e quelle **extracellulari** associate alla membrana.
- ✚ Le differenti proteine integrali, lipidi e oligosaccaridi sono rappresentate da colori diversi.
- ✚ Nelle zone in cui la membrana è stata rimossa per mettere in evidenza la superficie della **membrana interna** si può notare una sorta di **steccato** (“corral”) fatto dal **citoscheletro** che **restringe la diffusione laterale di alcune ma non di tutte le glicoproteine transmembrane**.



Il modello del mosaico fluido aggiornato – 2


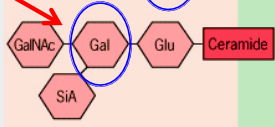
[didascalia figura di Nicolson, 2014]

- ✚ Sono rappresentati meccanismi che restringono la diffusione laterale:
 - ✚ **domini lipidici**
 - ✚ **complessi** tra **glicoproteine integrali di membrana** (osservati nella sezione trasversale della membrana)
 - ✚ **associazioni polisaccaridi-glicoproteine** (nell'estremo sinistra in alto)
 - ✚ **collegamento** diretto o indiretto **dei domini del foglietto interno della membrana ad elementi del citoscheletro** (in basso a sinistra).

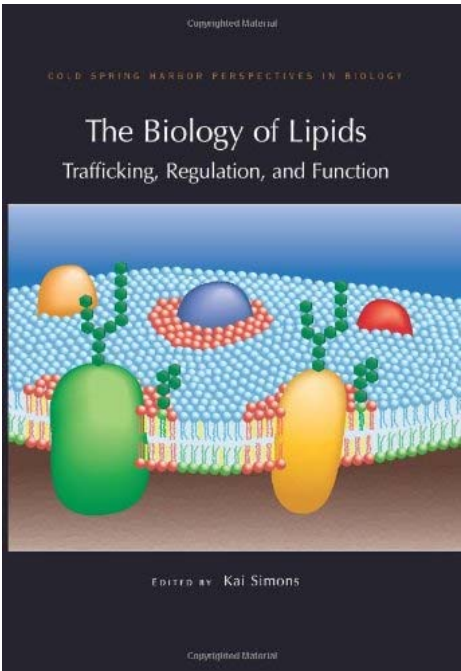


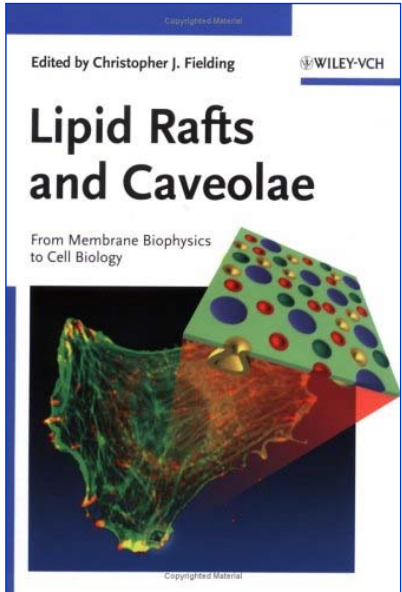
Struttura degli Sfingolipidi

Galattosio: zucchero al quale nella maggior parte dei casi si lega il dominio V3 di virus e dei precursori delle placche amiloide e della proteina prionica

Sfingosina	$\text{HO}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_3}{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$
Ceramide	$\text{HO}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}}{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ $\text{O}=\text{C}-\text{R}$
Sfingomielina	$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}^-}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}}{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ $\text{O}=\text{C}-\text{R}$
Un cerebroside	
Un ganglioside (G _{M2})	

(b)





LIPID RAFTS - 1

- ✚ **IMPORTANTE:** La struttura della membrana plasmatica ha un' **organizzazione** e **specializzazione** molto superiori a quelle suggerite dal modello del mosaico fluido semplice.
- ✚ Ad esempio, la membrana contiene **regioni** ("patches") **specializzate** in cui sono **concentrate funzioni speciali**.
- ✚ Il concetto dei "rafts lipidici" che contengono elevate concentrazioni di colesterolo, glicolipidi e certi complessi proteici è stato ora ben supportato da prove sperimentali.
- ✚ I componenti dei "lipid rafts" permettono lo **svolgimento efficace di funzioni specializzate** quali **endocitosi, segnalamento**, o formazione di **macchine complesse multiproteiche** che svolgono, in membrane cellulari diverse, funzioni importanti quali la sintesi di ATP, trasporto di elettroni e riconoscimento di segnali extracellulari che permettono il trasporto attraverso la membrana.

<http://classes.kumc.edu/som/cellbiology/organelles/pm/tut5.html>

LIPID RAFTS - 2

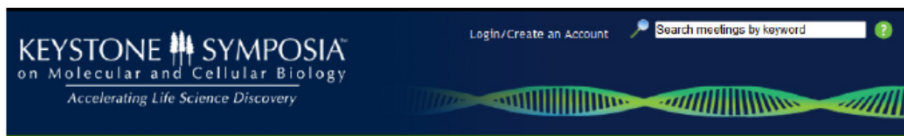
- ✚ Le **proteine si aggregano nei "rafts lipidici"** per ragioni diverse, quali l'affinità per alcuni lipidi della membrana (ad es. glicolipidi) che si concentrano in quelle zone oppure per il fatto che possiedono un segmento peptidico transmembrana che se "sente confortabile" nel doppio strato più spesso caratteristico dei "rafts".
- ✚ Una volta che una proteina si sistema in un "raft" per il quale ha affinità, altre proteine per le quali ha affinità si legheranno nello stesso posto.

<http://classes.kumc.edu/som/cellbiology/organelles/pm/tut5.html>

Definizione di «rafts» lipidici

2006 Keystone Symposium on «Lipid Rafts and Cell Function»

- ✚ Piccoli domini eterogenei (10-200 nm), altamente dinamici, e arricchiti in **steroli** e **glicosfingolipidi** che compartimentalizzano diversi processi cellulari.
- ✚ I rafts piccoli possono talvolta venire stabilizzati per formare **piattaforme**, mediante interazioni proteina-proteina.



Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle

Daniel Lingwood and Kai Simons*

Cell membranes display a tremendous complexity of lipids and proteins designed to perform the functions cells require. To coordinate these functions, the membrane is able to laterally segregate its constituents. This capability is based on dynamic liquid-liquid immiscibility and underlies the raft concept of membrane subcompartmentalization. Lipid rafts are fluctuating nanoscale assemblies of sphingolipid, cholesterol, and proteins that can be stabilized to coalesce, forming platforms that function in membrane signaling and trafficking. Here we review the evidence for how this principle combines the potential for sphingolipid-cholesterol self-assembly with protein specificity to selectively focus membrane bioactivity.

1 JANUARY 2010 VOL 327 SCIENCE

Rafts lipidici - a

- ✚ Questi **microdomini specializzati** della membrana plasmatica **compartimentalizzano** diversi processi cellulari servendo da **centri organizzativi per l'assemblaggio di molecole di segnalamento**.
- ✚ Influenzano la **fluidità della membrana**, il **traffico di proteine** di membrana e **regolano i processi di neurotrasmissione** e in particolare il **traffico dei recettori**.

http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_raft

Rafts lipidici - b

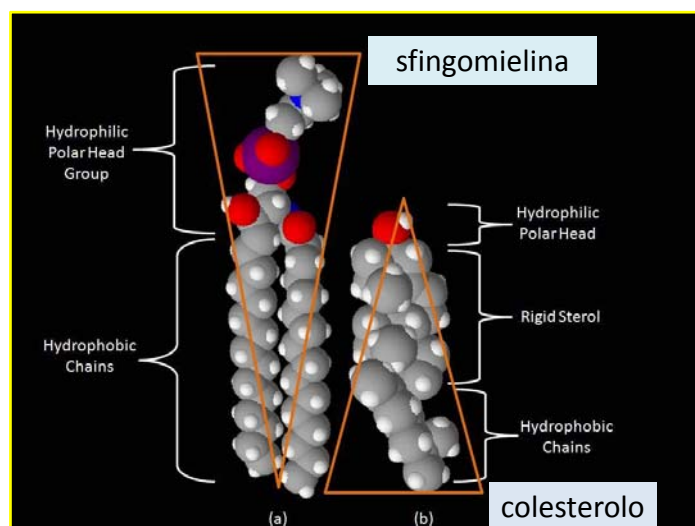
- ✚ Sono più **ordinati** ed più **strettamente impacchettati** rispetto al doppio strato circostante ma **galleggiano** liberamente nel doppio strato lipidico.
- ✚ Anche se sono più frequenti nella membrana plasmatica, sono stati evidenziati anche nell'apparato di Golgi e nei lisosomi.

http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_raft

Proprietà dei rafts lipidici - 1

- ✚ Rispetto alle zone circostante più fluide, i rafts contengono circa **3-5 volte più colesterolo**.
- ✚ Anche la **sfingomielin**a ha una concentrazione di circa **50% superiore**.
- ✚ Il **colesterolo interagisce preferenzialmente, ma non esclusivamente, con gli sfingolipidi** a causa della sua struttura e della saturazione delle catene idrocarburiche.
- ✚ Anche se non tutti i fosfolipidi nei rafts sono totalmente **saturo**, **le catene idrofobiche dei lipidi contenuti nei rafts sono più sature e strettamente impacchettate che nel bilayer circostante**.

http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_raft

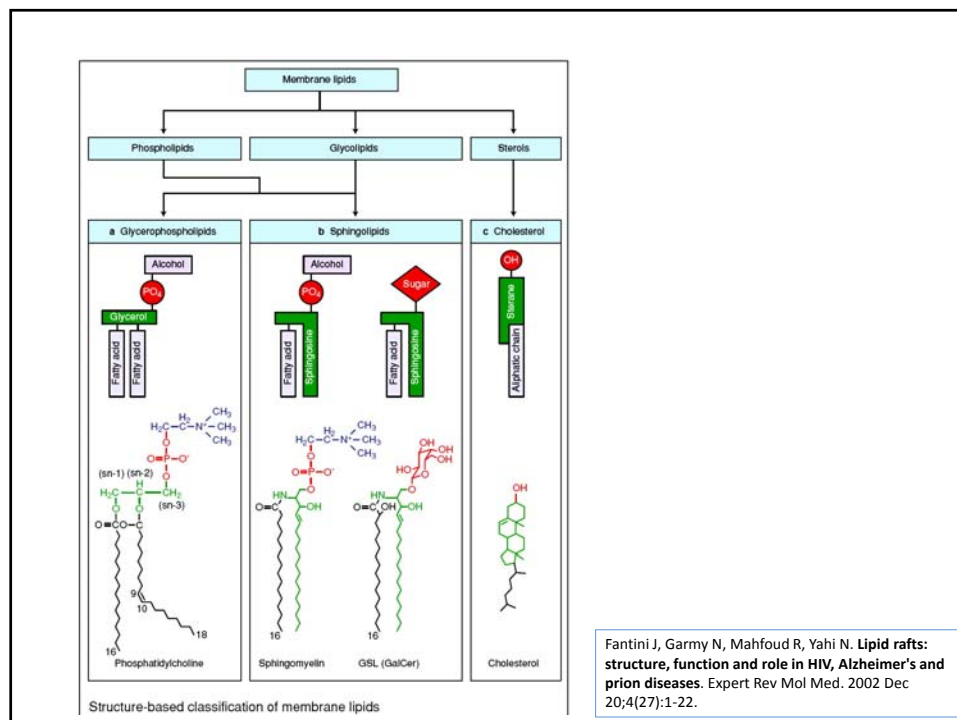


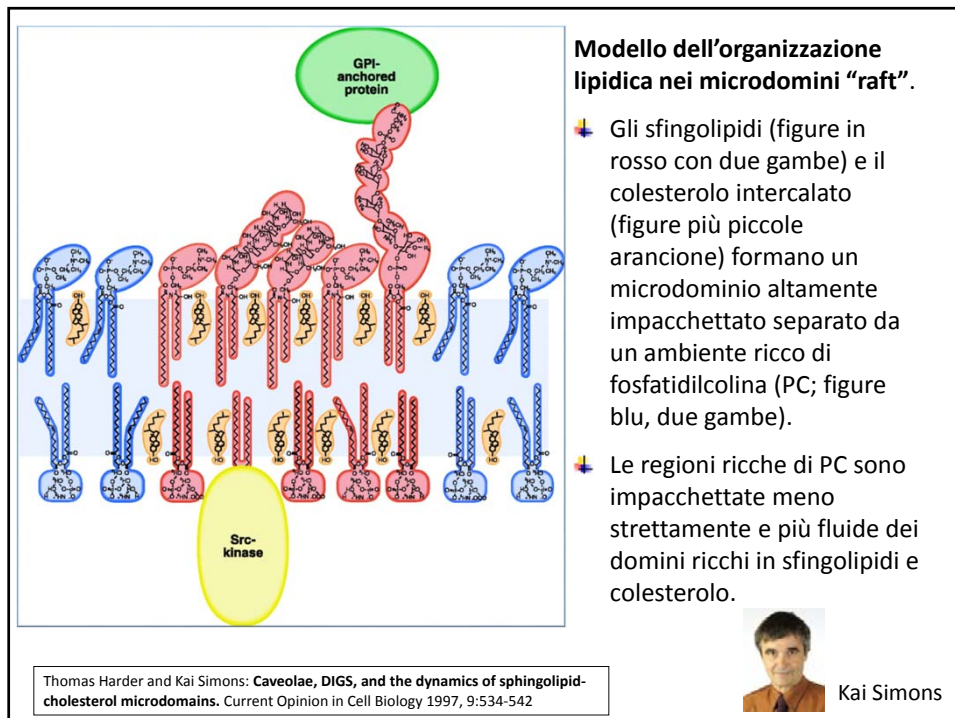
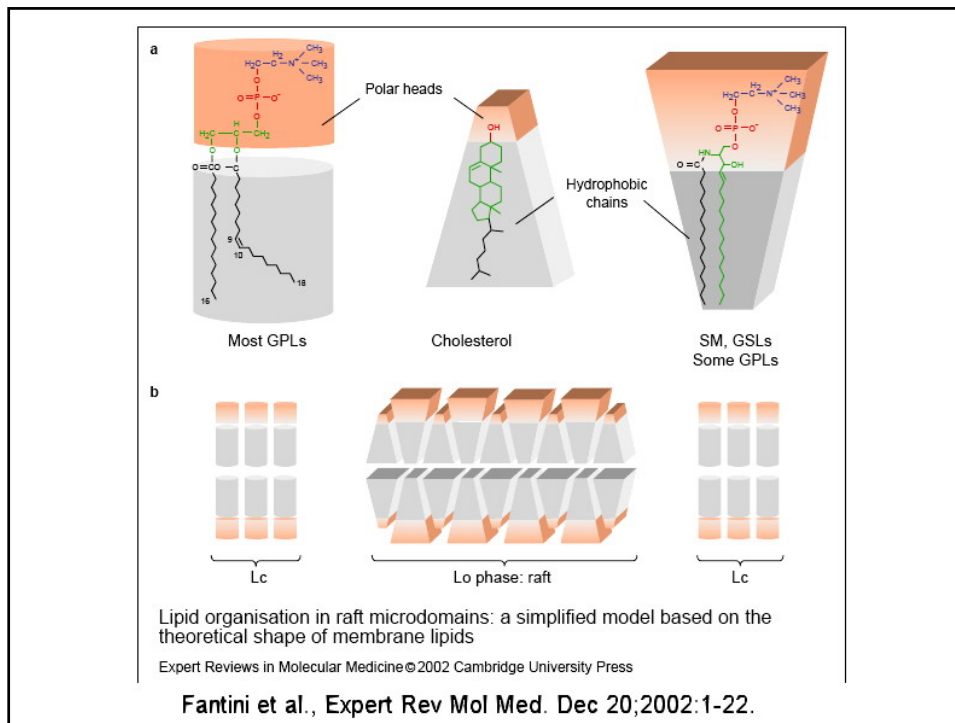
"Space-Filling Model Sphingomyelin and Cholesterol" by Wlstutts - http://en.wikipedia.org/wiki/File:Space-Filling_Model_Sphingomyelin_and_Cholesterol.jpg. Licensed under Public Domain via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Space-Filling_Model_Sphingomyelin_and_Cholesterol.jpg#/media/File:Space-Filling_Model_Sphingomyelin_and_Cholesterol.jpg

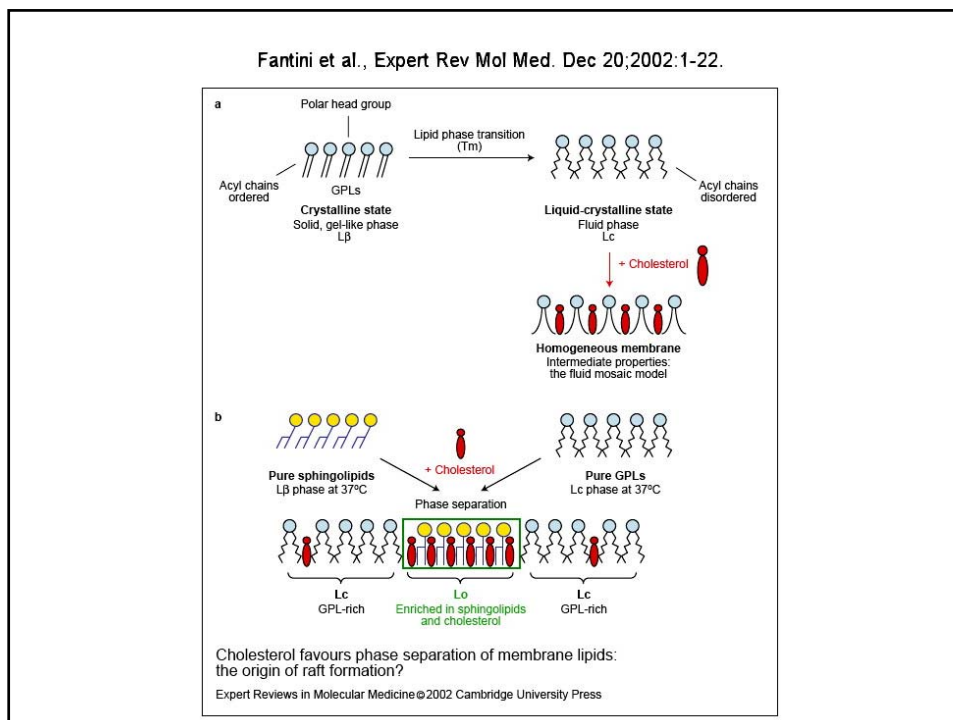
Proprietà dei rafts lipidici - 2

- Il colesterolo funge come una sorta di «colla» dinamica che trattiene i componenti dei rafts.
- A causa della rigidità del gruppo sterico, il colesterolo si partiziona preferenzialmente nei rafts dove le catene aciliche dei lipidi tendono ad essere più rigide e quindi in uno stato meno fluido.

http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_raft







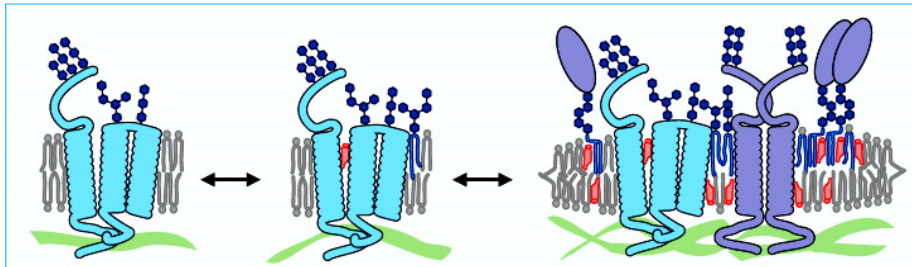
Biochemistry 2010, 49, 6305–6316

Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts[†]

Ilya Levental, Michal Grzybek, and Kai Simons*

ABSTRACT: Increasing evidence suggests that biological membranes can be laterally subdivided into domains enriched in specific lipid and protein components and that these domains may be involved in the regulation of a number of vital cellular processes. An example is membrane rafts, which are lipid-mediated domains dependent on preferential association between sterols and sphingolipids and inclusive of a specific subset of membrane proteins. While the lipid and protein composition of rafts has been extensively characterized, the structural details determining protein partitioning to these domains remain unresolved. Here, we review evidence suggesting that post-translation modification by saturated lipids recruits both peripheral and transmembrane proteins to rafts, while short, unsaturated, and/or branched hydrocarbon chains prevent raft association. The most widely studied group of raft-associated proteins are glycosphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-AP), and we review a variety of evidence supporting raft-association of these saturated lipid-anchored extracellular peripheral proteins. For transmembrane and intracellular peripheral proteins, S-acylation with saturated fatty acids mediates raft partitioning, and the dynamic nature of this modification presents an exciting possibility of enzymatically regulated raft association. The other common lipid modifications, that is, prenylation and myristoylation, are discussed in light of their likely role in targeting proteins to nonraft membrane regions. Finally, although the association between raft affinity and lipid modification is well-characterized, we discuss several open questions regarding regulation and remodeling of these post-translational modifications as well as their role in transbilayer coupling of membrane domains.

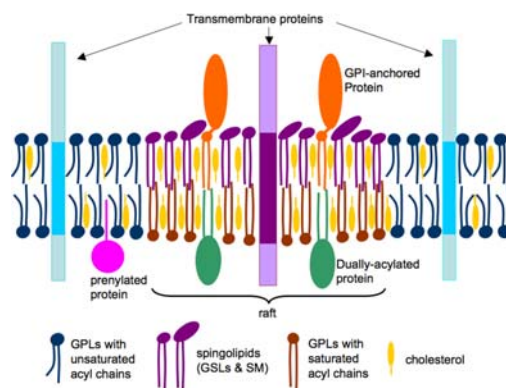
Lubrificazione da parte dei lipidi di una proteina transmembrana appartenente ad un raft



- Le proteine di membrana si legano e/o si concentrano in alcune regioni lipidiche mediante specifiche interazioni fisico-chimiche. Tali lipidi possono essi stessi esibire un potenziale di assemblaggio sfingolipide/colesterolo.
- In questo schema una proteina transmembrana di un raft (azzurro) interagisce specificamente con uno sterolo e con un glicosfingolipide (GSL), un'interazione che lubrifica la sua inclusione nel raft e l'assemblaggio di una membrana di tipo raft funzionante dovuta alla coalescenza delle due regioni.

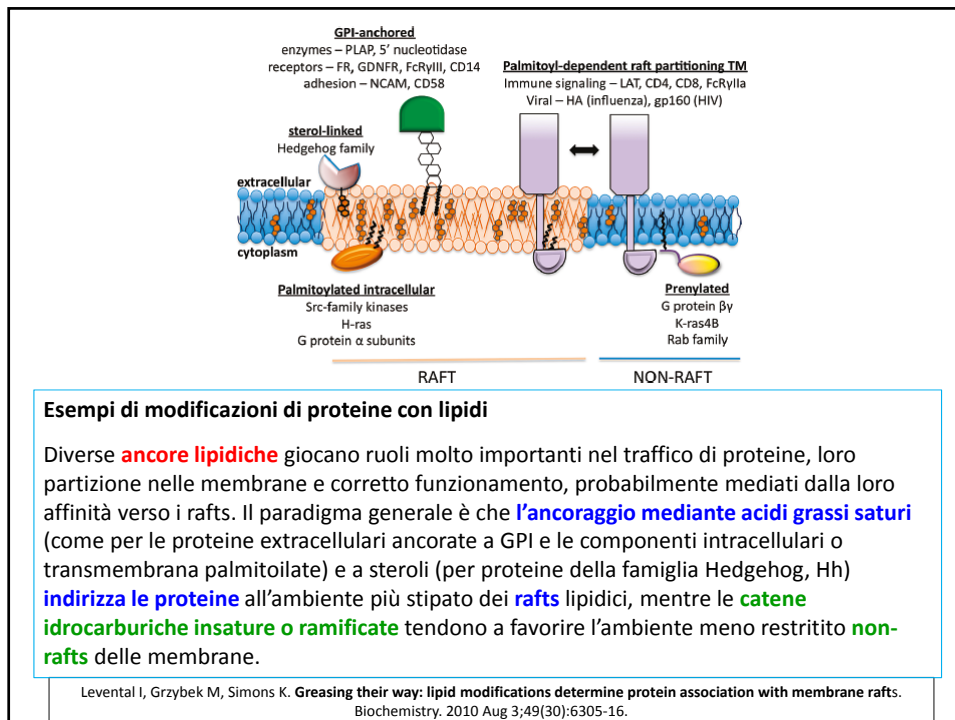
Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science 2010 Jan 1;327(5961):46-50.

Modello semplificato dei rafts lipidici nelle membrane



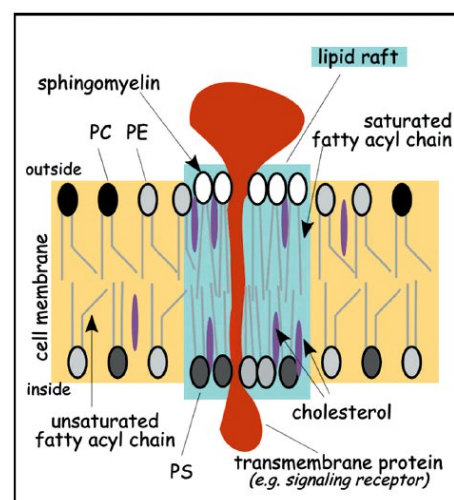
Waheed AA, Freed EO. The Role of Lipids in Retrovirus Replication. Viruses. 2010 May 1;2(5):1146-1180.

I **fosfolipidi** (blu e marrone) e il **colesterolo** (giallo) sono distribuiti **in entrambi i foglietti**, mentre gli **sfingolipidi** (viola) sono **concentrati nel foglietto esterno del doppio strato**. Le **catene aciliche dei lipidi dei rafts sono di solito lunghe e insature** (viola e marrone), mentre **quelle dei domini non-rafts sono più corte e contengono catene aciliche mono- o poliinsature** (blu). I domini di **rafts** contengono grandi concentrazioni di **proteine con code lipidiche doppiamente acilate** (verde) o **legate ad ancore di GPI** (marrone) mentre **le proteine transmembrana** (blu) o **con code preniliche** (verde) di solito non sono associate ai rafts.



Foglietti delle membrane nei rafts lipidici

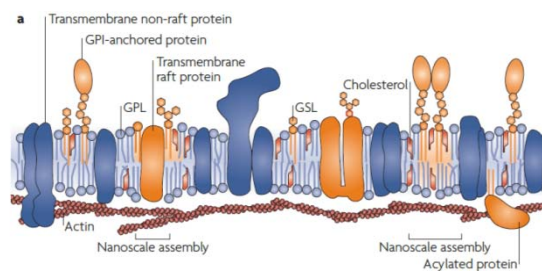
- La maggior parte delle molecole lipidiche in un monostrato sono in grado di muoversi indipendentemente da quelle dell'altro monostrato.
- Tuttavia, **nei "rafts" lipidici, le lunghe catene idrocarburiche degli sfingolipidi di un monostrato interagiscono con quelle dell'altro monostrato.**
- Perciò, **i due monostrati di un "raft" lipidico interagiscono mediante le loro code lipidiche.**



Karikó K, Weissman D, Welsh FA. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling—a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Nov;24(11):1288-304.

Eterogeneità nelle membrane cellulare basate sui rafts - 1

- ✚ **a** | Gli assemblamenti a scala nanometrica di steroli (es. Colesterolo), sfingolipidi (es. sfingomieline, glicosfingolipidi (GSLs)) e proteine della membrana plasmatica hanno composizione variabile.
- ✚ Viene postulato che proteine ancorate a GPI, proteine transmembrana dei rafts e proteine citosoliche **acilate** (con coda di acido grasso **saturo**) siano costituenti di questi assemblamenti che possono essere modulati da filamenti di actina.
- ✚ Non si sa molto sullo stato in scala nanometrica degli assemblamenti nei foglietti citosolici della membrane.

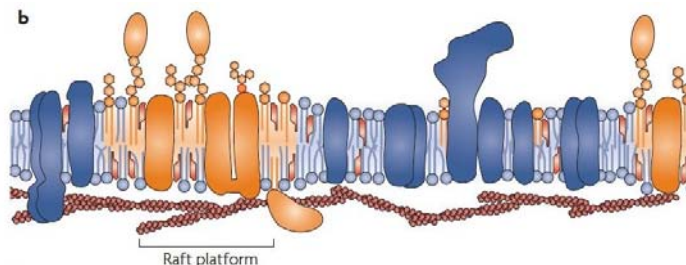


Simons K, Gerl MJ. **Revitalizing membrane rafts: new tools and insights.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Oct;11(10):688-99.

Eterogeneità nelle membrane cellular basate sui rafts - 2

b | In risposta a segnali esterni o all'inizio di eventi di traffico di membrana (intracellulari) si formano piattaforme di tipo rafts a partire da assemblamenti fluttuanti, mediante interazioni lipidi-lipidi, lipidi-proteine, e oligomerizzazione di proteine.

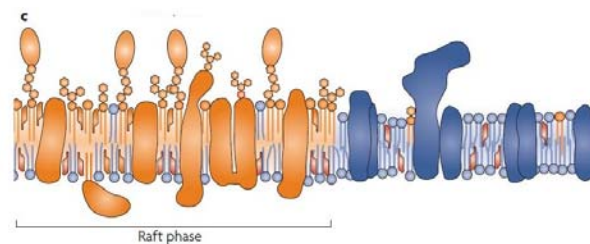
Queste piattaforme sono importanti per i processi di segnalamento a livello della membrana e per il traffico di membrana.



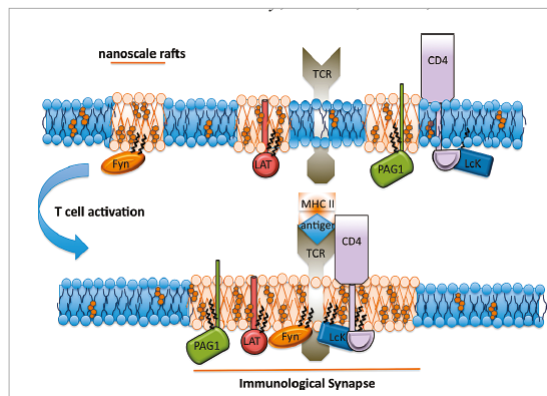
Simons K, Gerl MJ. **Revitalizing membrane rafts: new tools and insights.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Oct;11(10):688-99.

Eterogeneità nelle membrane cellulari basate sui rafts - 3

- ✚ c | In una situazione di equilibrio si possono indurre fasi tipo rafts delle dimensioni di micron.
- ✚ Questo stato può essere osservato in sistemi modello quali le vescicole unilamellari giganti (“giant unilamellar vesicles”, GUVs) e anche in vescicole giganti della membrana plasmatica (“giant plasma membrane vesicles”, GMPVs) o sfere di membrane plasmatica rilasciate dalla cellula [Vd. ectosomi].



Simons K, Gerl MJ. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Oct;11(10):688-99.



Verrà approfondito nel Seminario «Rafts e attivazione di linfociti e di mast cells»

Si presume che le **modificazioni con lipidi delle proteine** giochino un ruolo importante per la loro **associazione con la immunosinapsi (IS)**. Le cellule T quiescenti contengono rafts piccoli e dinamici, ciascuno con un numero limitato di molecole associate, che si aggregano **dopo attivazione** per formare un dominio raft funzionale: la **sinapsi immunologica**. Molte delle proteine che formano la IS sono modificate da lipidi e tali modificazioni sono cruciali per la loro partizione nella IS.

Levental I, Grzybek M, Simons K. Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. Biochemistry. 2010 Aug 3;49(30):6305-16.

Proprietà dei rafts lipidici

- ✚ Il rafts lipidici sono **resistenti a detergenti non-ionici** quali il Triton X-100 o Brij-98 a basse temperature (circa 4°C).
- ✚ Quando un tale detergente viene aggiunto alle cellule, la membrana più fluida si scioglierà mentre i rafts possono rimanere intatti e possono essere estratti.
- ✚ A causa della loro composizione e resistenza ai detergenti, i rafts sono anche chiamati «**detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes**» (GEMs) o DIGs o «**Detergent resistant membranes**» (DRMs).
- ✚ Tuttavia questa metodologia è stata messa recentemente in dubbio in quanto provoca artefatti.

http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_raft

Box 4 | Common tools to disrupt rafts

Cholesterol sequestration

- Antibiotics:
Filipin | Nystatin | Amphotericin
- Pore-forming agents:
Saponin | Digitonin | Streptolysin O

Cholesterol depletion

- Methyl- β -cyclodextrin

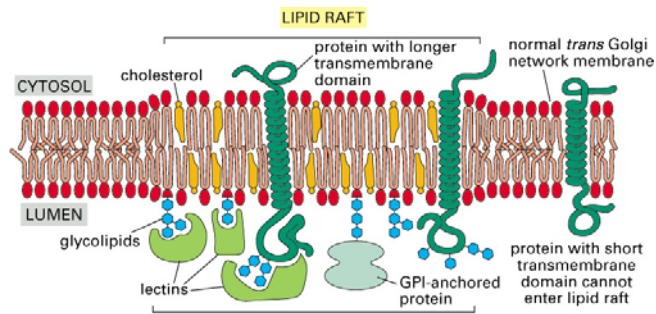
Inhibition of cholesterol biosynthesis

- Lovastatin

Perturbation of raft stability

- Exogenous cholesterol
- Exogenous gangliosides
- Exogenous polyunsaturated fatty acids

Simons K, Toomre D. **Lipid rafts and signal transduction**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000 Oct;1(1):31-9. Review. Erratum in: Nat Rev Mol Cell Biol 2001 Mar;2(3):216.



Modello di formazione di rafts lipidici nella rete trans del Golgi. Si pensa che gli glicosfingolipidi e il colesterolo formino "rafts" nel "bilayer lipidico". Proteine di membrana con segmenti trans-membrana sufficientemente lunghi si distribuiscono preferenzialmente nei "rafts" lipidici e quindi vengono smistate in vescicole di trasporto. Questi "rafts" vengono in seguito inglobati in vescicole di trasporto che li trasportano al **dominio apicale della membrana plasmatica**. Proteine che legano i carboidrati (lectine) nel lume della rete trans- del Golgi possono aiutare a stabilizzare i "rafts", come illustrato.

<http://www.mpipks-dresden.mpg.de/~manoj/res.html>

Una cellula polarizzata

