

Laura Ciani, Giacomo Martini  
Dipartimento di Chimica e CSGI  
Università di Firenze

Musti J. Swamy, Mingtao Ge, David  
Holowka,  
Jack H. Freed  
Department of Chemistry  
and Chemical Biology  
Cornell University  
Ithaca (USA)

Barbara Baird  
Dipartimento di Chimica, CSGI  
Università di Firenze  
e Department of Chemistry  
and Chemical Biology  
Cornell University  
Ithaca (USA)  
ciani@csgi.unifi.it



# MEMBRANE PLASMATICHE DI CELLULE VIVENTI

## Caratterizzazione chimico-fisica dei loro domini lipidici

Nelle membrane plasmatiche è stata ipotizzata la presenza di almeno due domini lipidici differenti: liquido-ordinato ( $L_o$ ) e liquido-disordinato ( $L_d$ ). In questa comunicazione viene riportata per la prima volta una prova sperimentale diretta, ottenuta tramite ESR di un fosfolipide marcato, di questa ipotesi. Il dominio  $L_o$  e quello  $L_d$  hanno parametri d'ordine e coefficienti di diffusione rotazionale diversi. In questo lavoro sono state analizzate quattro linee cellulari di mammifero che presentano differenze intrinseche, ma i risultati suggeriscono che la coesistenza di domini lipidici differenti sia un fenomeno generale.

**N**ella letteratura chimica e biologica degli ultimi anni sono state accumulate numerose prove in favore di un'eterogeneità di membrana, che dipende dalla composizione lipidica e che gioca un ruolo fondamentale in vari processi cellulari. A seconda del grado di ordine si parla di bistrato fosfolipi-

dico liquido-ordinato ( $L_o$ ) o di liquido-disordinato ( $L_d$ ). Al microdominio che risulta dalla fase di liquido-ordinato è stato dato il nome di *raft* [1]. La Figura 1 rappresenta un modello di *raft* nel quale si assume che questo microdominio di lipidi agisca come una vera e propria piattaforma per l'esplicitarsi di particolari processi biologici [2].

L'importanza funzionale di questa struttura risiede nella sua capacità di segregazione selettiva di proteine. Così, ad esempio, certe chinasi si localizzano preferenzialmente all'interno di queste strutture, men-

All'autrice è stato conferito il premio "Lucio Senatore" da parte della Divisione di Chimica fisica della Società Chimica Italiana.

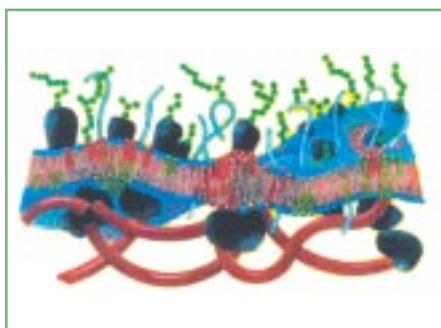


Fig. 1 - Struttura della membrana citoplasmatica secondo il modello di raft: la fase liquido ordinata naviga in un mare di lipidi in fase liquido disordinata

tre alcune fosfatasi, con strutture incompatibili con i *raft*, si segregano al loro esterno; tutto ciò rende possibile l'instaurarsi di interazioni fondamentali per i processi regolativi [3, 4].

Nonostante la grande attenzione loro dedicata, gli aspetti sperimentali necessari per comprendere la formazione di *raft* non sono stati ancora ben definiti, sia per quanto riguarda la loro composizione in lipidi sia in proteine, sia per la loro dinamica generale. Sono stati pubblicati molti studi di fluorescenza per dimostrare la coesistenza dei domini  $L_o$  e  $L_d$ , anche in grandi vescicole monolamellari formate da colesterolo e altri lipidi sintetici di struttura ben definita oppure derivanti da membrane citoplasmatiche [5-8]. L'evidenza sperimentale che vescicole sintetiche aventi una composizione lipidica simile a quella dei *raft* siano largamente insolubili in detergenti [9] suggerisce che i *raft* siano in fase  $L_o$ . La spettroscopia ESR offre l'opportunità di misurare direttamente il comportamento di queste fasi perché presenta una risoluzione temporale più veloce della spettroscopia di fluorescenza. Sono già stati eseguiti studi su membrane resistenti ai detergenti (DRM, detergent resistant membranes; [10]) e su vescicole derivanti da membrane plasmatiche (PMV,

plasma membrane vesicles; [11]) entrambe originate da mastociti (RBL-2H3). Sono stati così ottenuti i valori del parametro d'ordine ( $S_0$ ) e del coefficiente di diffusione rotazionale ( $R_1$ ) di una fosfatidilcolina marcata con l'unità paramagnetica in una determinata posizione della catena alchilica. Dagli spettri ESR di queste sonde inserite nella membrana è stato possibile dedurre che la regione di membrana resistente al detergente presenta le caratteristiche della fase  $L_o$  [10].

In questa comunicazione vengono presentati alcuni concetti fondamentali che sono oggetto di uno vasto studio ESR su cellule viventi delle seguenti quattro linee cellulari: RBL-2H3 (rat basophilic leukemia), COS-7 (african green monkey kidney), NIH-3T3 (swiss mouse hembrio) e CHO-K1 (chinese hamster ovary), cercando di evitare tutte le complicazioni che derivano da distruzione cellulare o da alterazione dell'organizzazione di membrana. Per la prima volta si ha una prova diretta della presenza in membrane citoplasmatiche di cellule viventi di due popolazioni lipidiche distinte che differiscono significativamente sia nell'ordine sia nella dinamica.

### Materiali e metodi

Le fosfatidil-coline marcate nella catena *sn*-2 acilica nelle posizioni 5, 7, 10, 12, 14, e 16 (5-PC, 7-PC, 10-PC, 12-PC 14-PC e

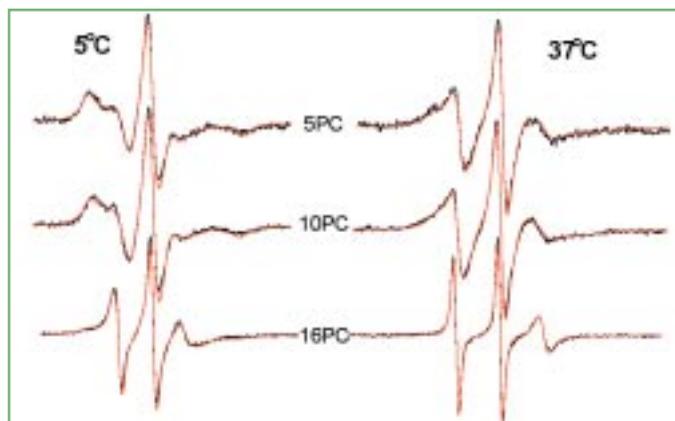
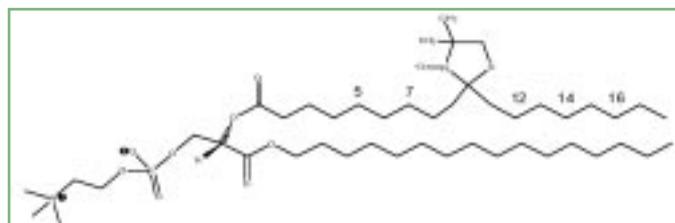


Fig. 2 - Spettri ESR di tre diversi nPC inseriti nella membrana citoplasmatica di mastociti RBL-2H3, registrati a 5 e 37 °C. In nero è riportato lo spettro sperimentale mentre in rosso la sua simulazione ottenuta col programma NLLS



Schema

16-PC, rispettivamente, vedi lo schema molecolare sopra riportato, relativo a 10-PC) sono state acquistate dall'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

### Colture cellulari

Cellule di RBL-2H3 [12] e CHO-K1 [13] vengono fatte crescere come cellule aderenti in beute da 75 e 150 cm<sup>2</sup>, mentre le cellule NIH-3T3 e COS-7 in piastre da 10 cm di diametro nelle condizioni descritte da American Type Culture Center. Tutte le cellule sono state staccate usando EDTA 1,5 mM in 20 mM HEPES con NaCl 135 mM e KCl 5 mM e risospese in BSS (buffer saline solution a pH 7,4), contenente 1 mg/ml di albumina di siero bovino (BSS/BSA). La vitalità delle cellule è stata controllata al termine di ogni esperimento con il saggio del Trypan blu.

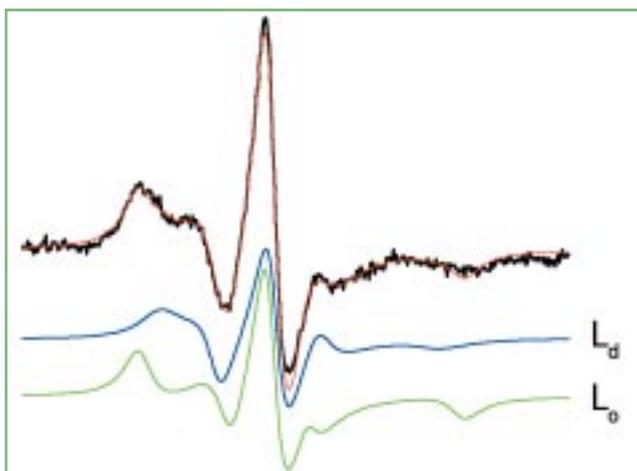


Fig. 3 - In nero è riportato lo spettro della sonda 5-PC in cellule RBL-2H3 registrato a 25 °C. In blu e verde sono riportate le due componenti la cui somma dà origine alla simulazione, riportata in rosso

## Marcatura di cellule vive con lipidi marcati

La metodica di incorporazione dei vari *n*PC marcati nella membrana citoplasmatica delle cellule e la registrazione degli spettri ESR sono descritte in dettaglio nel rif. [14]. In ogni caso il labeling è stato fatto a bassa temperatura (5-10 °C) dove l'endocitosi ed anche il moto di *flip-flop* dello spin label è ridotto drasticamente o addirittura impedito. Durante la raccolta dei dati non è stato osservato nessun fenomeno di internalizzazione, per cui tutto quanto è stato osservato è relativo allo strato esterno della membrana plasmatica.

## Analisi degli spettri ESR

Gli spettri ESR sono stati analizzati con il metodo della minimizzazione dei quadrati, non-linear least square fit (NLLS), basato sull'equazione di Liouville [15, 16], usando l'ultima versione del programma di fitting [17]. Sono stati valutati tre parametri significativi [11]: i) il coefficiente di diffusione rotazionale dell'unità nitrossido intorno all'asse perpendicolare rispetto all'asse principale di simmetria molecolare per la rotazione  $R_{\perp}$  (conside-

rando come direzione preferenziale dell'orientazione la normale al bistrato); ii) il parametro d'ordine  $S_0$ , che è funzione dell'estensione angolare della diffusione rotazionale dell'unità paramagnetica rispetto all'asse principale del sistema (ad esempio la riorientazione principale delle molecole lipidiche in una regione ristretta del bistrato); iii) il para-

metro  $P$  che rappresenta la popolazione relativa di ogni componente nelle simulazioni a due componenti.

## Analisi dei risultati più significativi

La prova diretta dell'esistenza di almeno due domini di moto caratterizzanti la stessa molecola marcata nella membrana citoplasmatica di cellule della stessa linea cellulare (nel caso in esame, RBL-2H3), si può ottenere da un'attenta analisi degli assorbi-

menti ESR di 5-, 10- e 16-PC inseriti in mastociti RBL-2H3 a due diverse temperature (Fig. 2).

Già dalla semplice osservazione della forma della riga ESR si può notare come gli spettri siano costituiti da almeno due assorbimenti da attribuire a radicali che occupano siti a diversa mobilità e ordine. Inoltre le due specie in questione sono in scambio lento fra di loro nella scala dei tempi ESR ( $t_{exc} > 10^{-9}$  s). Esattamente le stesse osservazioni si possono fare sui risultati ottenuti sulle altre linee cellulari e con le altre fosfatidilcoline marcate. La Figura 3 riporta un esempio di simulazione dello spettro di 5-PC in RBL-2H3 a 25 °C, nel quale sono stati sommati, con opportuni coefficienti, i contributi dovuti a due specie radicaliche dotate di caratteristiche di ordine e mobilità diverse. Le due componenti sono indicate in blu e verde e la risultante somma (in rosso) è sovrapposta allo spettro sperimentale. L'accordo, come si vede, è ottimo. Lo stesso accordo si verifica in tutti gli altri sistemi analizzati. Così, ad es., la Figura 4 mostra gli spettri di 7-PC e 12-PC inseriti nelle quattro linee cellulari diverse. Per ciascun spettro sperimentale è

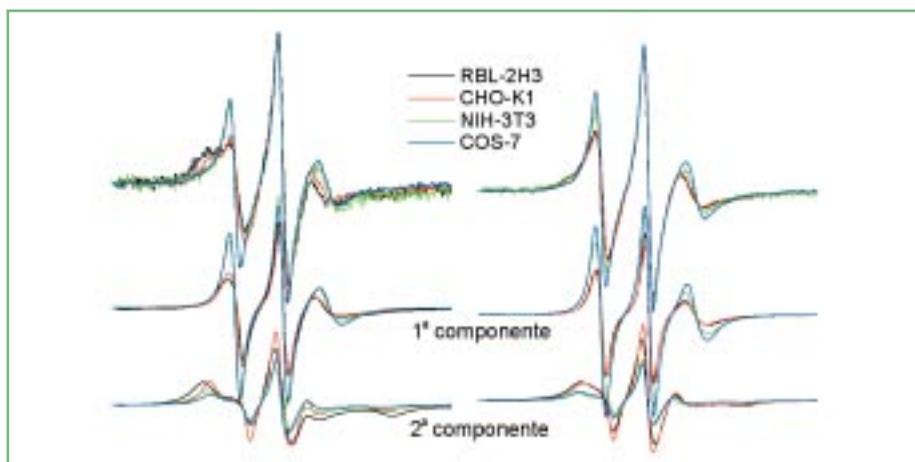


Fig. 4 - Spettri ESR a due componenti: in alto sono riportati gli spettri sperimentali di 7 e 12-PC (rispettivamente a sinistra e destra) nelle quattro linee cellulari analizzate. Sotto sono riportate le due componenti la cui somma dà origine alla simulazione (qui non riportata per maggior chiarezza della figura)

identificata la componente corrispondente alla fase  $L_d$ , o *bulk* di membrana, e la componente dovuta al lipide marcato nella fase  $L_o$ , o *raft* di membrana.

La necessità di usare la composizione di assorbimenti ESR diversi viene a mancare nel caso della sonda 16-PC ad alta temperatura in cellule di RBL-2H3. In questo caso però le condizioni di scambio lento fra i due domini temporali possono non essere soddisfatte e lo spettro risultante deriva dalla mediazione temporale di assorbimenti diversi.

La sonda si trova quindi in due regioni nettamente diverse per quanto riguarda l'arrangiamento e la mobilità molecolare. Queste possono essere identificate con le fasi di liquido-ordinato  $L_o$  e di liquido-disordinato  $L_d$ . La Figura 5 riporta i valori del coefficiente di diffusione  $R_{\perp}$  calcolati dalla forma spettrale delle due componenti  $L_o$  e  $L_d$  in funzione della temperatura per i cinque differenti  $n$ PC inseriti nelle membrane delle quattro linee cellulari. Come previsto, in generale  $R_{\perp}$  aumenta con la temperatura. D'altra parte i valori del parametro d'ordine  $S_o$  (non mostrati) diminuiscono all'aumentare della temperatura, e questo è in perfetto accordo con quanto ci si aspetta da sistemi simili. Questa è un'ulteriore prova diretta che la sonda è localizzata in due regioni distinte differenti per ordine e mobilità e dell'esistenza di due componenti spettrali distinte.

Risultati del tutto confrontabili a questi sono stati ottenuti anche su vescicole derivanti da membrane plasmatiche (PMV, plasma membrane vesicles) ottenute da mastociti RBL-2H3 nelle quali è stata dimostrata la coesistenza delle fasi  $L_o$  e  $L_d$  [11]. Dato che i valori di  $R_{\perp}$  e  $S_o$  sono dello stesso ordine di grandezza e con la stessa tendenza in tutte le linee cellulari qui descritte, si può, con un notevole margine

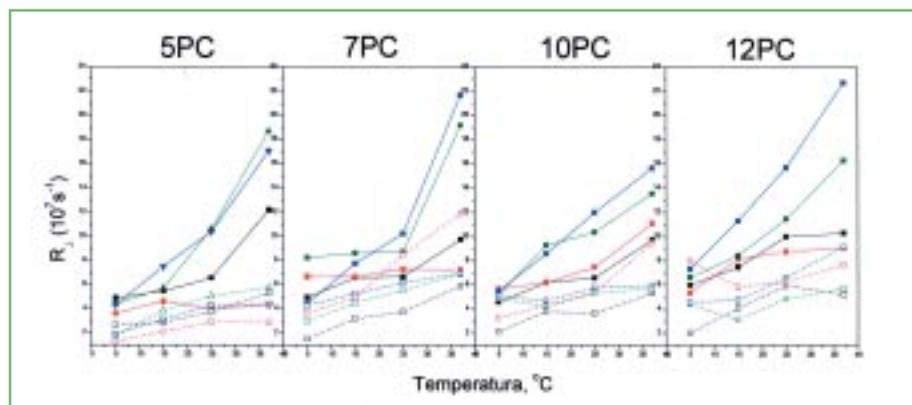


Fig. 5 - Schema dei valori di  $R_{\perp}$  in funzione della temperatura per quattro  $n$ PC. I valori sono stati ottenuti dai parametri di simulazione dei rispettivi spettri EPR tramite il programma NLLS. I colori corrispondono a quelli di Figura 4, la linea piena rappresenta i valori della prima componente, mentre quella tratteggiata a quelli della seconda componente

di sicurezza, affermare che la distribuzione delle eterogeneità di membrana, in almeno due domini differenti per ordine e mobilità, è un fenomeno generalizzato.

Per determinare accuratamente l'estensione delle due regioni nelle cellule viventi è necessario valutare le popolazioni relative dei due domini,  $P_{lo}$  e  $P_{ld}$ : così, ad esempio, si osserva che la componente  $L_d$  è consistentemente più bassa nelle PMV di cellule RBL-2H3 che nelle corrispondenti cellule intere. Questo calcolo, naturalmente, è stato fatto in tutti quei casi nei quali l'accordo fra spettri sperimentali e calcolati ha richiesto l'uso di due componenti. Per una valutazione più quantitativa della ripartizione fra le due fasi, oltre ai valori di  $P$ , sarebbero necessari anche quelli dei coefficienti di ripartizione della sonda nelle due regioni,  $K_p = P_{lo}/P_{ld}$ . Tuttavia questi non sono ottenibili con semplicità nei sistemi sotto studio. Il sistema sfingomielina/DOPC/colesterolo presenta la coesistenza delle fasi  $L_o$  e  $L_d$  [16-18] e fornisce quindi proprio il sistema modello che stiamo cercando. Usando il metodo di Chiang *et al.* [19] sono stati stimati i valori di  $K_p$ ; questi calcoli permettono di stimare nelle cellule

RBL-2H3 valori di  $K_p$  inferiori all'unità per ciascuna fosfatidilcolina marcata  $n$ PC, e crescente con il valore di  $n$  si passa da 0,4 per 5-PC a 0,8 per 12-PC. Per  $K_p > 1$  si ottiene per la sola 16-PC, ma gli spettri di questa, come abbiamo già detto, sono complicati da effetti di scambio.

Quando  $K_p = 1$  si ha una uguale ripartizione della sonda nei domini  $L_o$  e  $L_d$ , quando  $K_p < 1$  significa che la fase  $L_d$  è predominante. Questo significa che tutti gli  $n$ PC utilizzati si ripartiscono nelle due fasi, anche se con una preferenza crescente per la fase  $L_d$  quando l'unità paramagnetica è più vicina alle teste polari del bistrato. In conclusione, utilizzando questi valori come guida per l'interpretazione degli spettri ottenuti dalle cellule di RBL si può affermare che la componente  $L_o$  è predominante. I risultati delle altre linee cellulari analizzate hanno la stessa tendenza, anche se la differenza fra fase liquido-ordinata e liquido-disordinata sembra meno accentuata. In ogni caso la componente  $L_o$  è sempre la maggiore.

Dall'analisi NLLS degli spettri ESR delle varie sonde, introdotte nelle membrane delle quattro linee cellulari, si deducono alcune caratteristiche comuni e altre diffe-

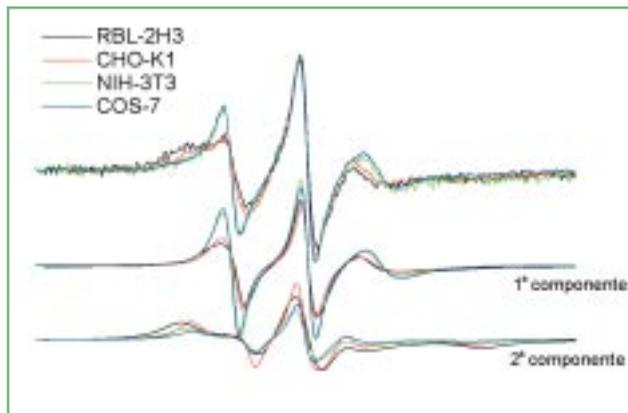


Fig. 6 - Confronto degli spettri della 7-PC inserita nelle membrane delle quattro linee cellulari analizzate: in alto sono riportati gli spettri sperimentali, in basso le due componenti la cui somma dà origine alla simulazione. Si noti come, considerando la prima componente, le linee cellulari si possano dividere in due gruppi: RBL-2H3 e CHO-K1 contro NIH-3T3 e COS-7

renti, che possono essere così riassunte: a) l'ordine molecolare in entrambe le fasi  $L_0$  e  $L_d$  mostra variazioni con la profondità dell'intorno risentito dalla sonda che rientrano nei limiti degli errori di calcolo; b) anche il coefficiente di diffusione  $R_{\perp}$  risulta pressoché costante, almeno fino alla posizione C-10, dopodiché si osserva un aumento significativo del moto; c) la popolazione della fase  $L_d$  cresce con la profondità del bistrato risentita dalla sonda e ciò può essere causato da una più facile ripartizione della sonda nella fase liquido-disordinata oppure un vero e proprio aumento di questa verso la regione centrale del doppio strato.

Un problema che si può presentare a questo momento è relativo alle eventuali somiglianze fra linee cellulari diverse. Anche in questo caso la spettroscopia ESR ha dato risposte significative. Nella Figura 6 sono riportati gli spettri a 25 °C di 7-PC inserita nelle membrane di cellule delle quattro linee cellulari e le loro simulazioni NLLS. Si nota facilmente che ci sono delle differenze significative tra gli spettri ottenuti nelle cellule RBL-2H3 e CHO da una parte e NIH-3T3 e COS7 dall'altra.

possono essere applicati ai risultati ottenuti con la 16-PC in RBL, CHO, NIH e COS7. Come detto in precedenza la situazione con la sonda 16-PC è più complessa. A parte lo spettro registrato a 5 °C, nelle cellule RBL-2H3 è stata registrata apparentemente una sola componente 16-PC (Fig. 7). In realtà questo dato va preso con cautela, fondamentalmente per due motivi. La mobilità della sonda 16-PC in entrambi i domini di moto è sufficientemente elevata da far sì che lo scambio fra i due diversi domini avvenga con tempi confrontabili, se non addirittura più brevi di quanto osservato con le altre sonde. La stabilità di 16-PC in queste cellule (ma anche in quelle COS7 e CHO) è piuttosto bassa e processi di riduzione rapida a idrossilamina fanno decadere rapidamente l'intensità del segnale rendendo lo spettro totale molto rumoroso con un rapporto segnale/rumore molto basso.

L'analisi dello spettro della

Nelle simulazioni riportate la componente spettrale corrispondente alla fase  $L_0$  è sostanzialmente la stessa nei quattro casi, mentre la componente  $L_d$  è più stretta nelle cellule COS7 e NIH-3T3 rispetto a quella nelle cellule RBL-2H3 e CHO. Queste differenze sono presenti anche negli spettri registrati alle altre temperature.

Gli stessi commenti

sonda 16-PC in cellule COS7 e CHO mostra due componenti: una stretta e ben risolta, l'altra molto allargata. Lo spettro della 16-PC in NIH-3T3 è troppo rumoroso per permettere un'analisi affidabile. In ogni caso la seconda componente è una singola riga molto larga, che deriva chiaramente da un'interazione di tipo spin-spin dovuta alla formazione di aggregati della sonda 16PC [20, 21]. Questo tipo di spettro è simile a quello trovato per la stessa sonda inserita in DRM derivate da cellule RBL-2H3 [10].

Tutti gli spettri della sonda 14-PC mostrano un comportamento analogo a quelli di 16-PC. Purtroppo gli spettri di 14-PC nelle linee cellulari non sono troppo riproducibili e quindi la loro analisi è più ridotta.

L'analisi degli spettri ESR delle *n*PC, inserite nella membrana citoplasmatica di cellule vive RBL-2H3, CHO, COS7 e NIH-3T3, è stata possibile solo ammettendo che essi fossero la combinazione di almeno due assorbimenti, corrispondenti a radicali all'interno di domini di moto diversi, che abbiamo identificato come fase liquido-ordinata  $L_0$  (o *raft* di membrana) e fase liquido-disordinata  $L_d$ . Queste due fasi sono del tutto simili a quelle osservate in vescicole di membrana plasmatica (PMV)

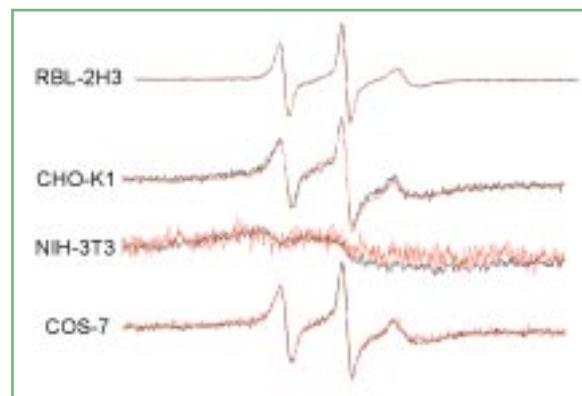


Fig. 7 - Spettri sperimentali della sonda 16-PC inserita nelle linee cellulari analizzate, registrati a 5 °C. In nero ed in rosso sono rappresentati due diversi esperimenti per evidenziare la riproducibilità dei segnali ESR

di cellule RBL [11]. La stretta relazione che lega fra loro le PMV e membrana di cellule vive e la corrispondenza degli spettri ESR permette quindi di affermare la coesistenza delle fasi  $L_o$  e  $L_d$  nel plasmalemma delle cellule.

A questo punto, oltre alla distribuzione dei radicali nelle fasi  $L_o$  e  $L_d$ , si potrebbero avere altre due possibilità relative alla natura delle due componenti spettrali: i) esse potrebbero essere dovute ad una frazione di radicali soggetti a moti di flip-flop oppure a radicali internalizzati nella cellula stessa; ii) potrebbero essere dovute a radicali inseriti in strutture lipidiche di confine o inseriti nel bulk della membrana.

Per quanto riguarda il punto i), se questa fosse la situazione reale una componente potrebbe essere dovuta a sonde localizzate nel foglietto esterno della membrana plasmatica e l'altra a molecole all'interno o nel citoplasma della cellula stessa. Possiamo tuttavia elencare un certo numero di considerazioni che indicano chiaramente la scarsa probabilità di questo evento:

- il moto di flip-flop di una fosfatidilcolina dal foglietto esterno a quello interno della membrana ha effetti trascurabili considerando il tempo necessario per questo tipo di moto anche in termini di tempi necessari a effettuare un esperimento ESR [22, 23];
- lo spettro ESR ottenuto da ripetute scansioni dello stesso campione si mantie-

ne pressoché identico nella forma di riga, indicando che l'ambiente risentito dalla sonda non viene alterato durante la misura; c) sono stati fatti alcuni esperimenti di cinetica di decadimento del segnale ESR a differenti temperature ed è stato visto che la forma di riga non cambia con il tempo, ma la sua intensità decade in 1-3 ore anche a bassa temperatura, dove l'endocitosi è drasticamente ridotta [9] e il flip-flop praticamente assente [22, 23];

d) misure di microscopia a fluorescenza, delle quali non riferiamo in questo testo ma che possono essere trovate in [14], mostra che quando le cellule RBL-2H3 sono marcate con una sonda fluorescente, quale BODIPY-GM1 a temperatura inferiore a 5 °C, questa rimane segregata nella membrana plasmatica per più di un'ora. In esperimenti di doppio labeling tra la sonda fluorescente e 10-PC si osserva l'estinzione (*quenching*) di fluorescenza, che conferma la coesistenza nella stessa regione delle due sonde.

Per quanto riguarda il punto ii) ricordiamo che, da un punto di vista ESR, il concetto di lipide di confine deriva dall'osservazione di assorbimenti in complessi proteina/lipide caratterizzati da tempi di correlazione molto lunghi ( $>10^{-7}$ - $10^{-8}$  s), vicini al limite rigido nella scala dei tempi ESR [24] e che comportano una quasi completa risoluzione delle anisotropie con una separazione

dei picchi più esterni di oltre 60 Gauss. Molecole di lipide marcato con queste caratteristiche sono considerate praticamente immobili. Questo comportamento è stato osservato in molti lipidi in contatto con molecole proteiche [24-30]. In tutte le linee cellulari qui discusse non sono mai stati osservati valori di separazione dei picchi estremi di questo ordine di grandezza e questo ci permette di affermare che le sonde che danno origine alla componente  $L_o$  in tutti gli spettri sperimentali analizzati, non sono localizzati in una zona al confine ma in un reale fase  $L_o$ .

Dobbiamo, inoltre, ricordare il fatto, ampiamente noto [31, 32], che le proteine transmembrana possono alterare il fragile ordine dei lipidi che le circondano, rendendoli più disordinati e mobili. Questa potrebbe essere la causa per cui nella membrana di cellule vive si osserva una fase  $L_d$ . Se si considera il fatto che nelle PMV si ritrovano meno proteine rispetto alla membrana citoplasmatica intatta [33], la maggior estensione della componente  $L_d$  nelle cellule intatte di RBL-2H3 rispetto alle PMV, da queste derivate, concorda con questa tesi ed è un'ulteriore conferma che la componente  $L_o$  non è costituita da lipidi di confine.

Un'ulteriore importante considerazione va fatta a proposito delle popolazioni relative della fase  $L_o$ , almeno per quanto riguarda l'elaborazione degli spettri ESR sperimen-

### **Plasma Membrane. A Physico-Chemical Characterization of its Lipid Domains**

ABSTRACT 

*The importance of membrane-based compartmentalization in eukaryotic cell function has become broadly appreciated, and a number of studies indicate that these eukaryotic cell membranes contain coexisting liquid-ordered ( $L_o$ ) and liquid-disordered ( $L_d$ ) lipid domains. In this study, we provide direct evidence for the presence of two different types of lipid populations in the plasma membranes of live cells from four different cell lines by electron spin resonance. Analysis of the ESR spectra recorded over a range of temperatures, from 5 to 37 °C, shows that the spin-labeled phospholipids incorporated experience two types of environments,  $L_o$ -like and  $L_d$ , with distinct order parameters and rotational diffusion coefficients, but with some differences amongst the four cell lines. These results suggest that coexistence of lipid domains that differ significantly in their dynamic order in the plasma membrane is a general phenomenon.*

tali di 5-, 7-, 10-, e 12-PC, per tutte e quattro le linee cellulari. Questa è praticamente sempre superiore al 50%. Ciò è in disaccordo con la visione classica di piccoli *raft* che navigano in un mare di lipidi disordinati. I nostri risultati possono essere meglio interpretati considerando che l'organizzazione del foglietto esterno della membrana sia una fase pressoché continua di liquido-ordinato  $L_o$  [34]. Non si può, naturalmente, escludere la possibilità che ci siano piccole variazioni dinamiche di alcune molecole nella regione  $L_o$  [32, 35], che vengono mediate nella scala dei tempi ESR. Il nostro modello prevede, quindi, piccole regioni in fase liquido-disordinata  $L_d$  disperse nella fase liquido-ordinata  $L_o$ , ma non

esclude altre possibilità. Per un'analisi più completa di queste dobbiamo considerare anche il fatto che ci possa essere un ripiegamento della catena alchilica nella regione centrale del bistrato, cosicché si possono creare dei difetti. Questo campo di indagine è naturalmente aperto ai più ampi sviluppi.

## Conclusioni

Lo studio ESR qui riportato fornisce una dimostrazione diretta dell'esistenza di almeno due differenti popolazioni lipidiche nel plasmalemma di cellule vive, per quanto riguarda l'ordine e la dinamica molecolare. Questi risultati sono un'importante punto di partenza per l'interpre-

tazione dei processi cellulari che coinvolgono variazioni di fase della membrana citoplasmatica.

La spettroscopia ESR di lipidi sonda, correlata dall'analisi spettrale via NLLS, fornisce un metodo che può essere largamente utilizzato in studi di dinamica di fase nelle membrane cellulari.

**Ringraziamenti:** Laura Ciani e Giacomo Martini ringraziano l'Università di Firenze e il Consorzio Grandi Superfici ed Interfasi; Musti J. Swamy, Mingtao Ge, David Holowka, Jack H. Freed e Barbara Baird ringraziano il National Institute of Health e la W.M. Keck Foundation, per il supporto finanziario che rende possibile il programma di ricerca del quale sono stati qui presentati alcuni significativi risultati.

## Bibliografia

- [1] F. Galbiati *et al.*, *Cell.*, 2001, **106**, 403.
- [2] K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, **59**, 950.
- [3] R.M. Young *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 20746.
- [4] R.M. Young *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 1230.
- [5] R.F. De Almeida *et al.*, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 2406.
- [6] G.W. Feigenson, J.T. Buboltz., *Biophys. J.*, 2001, **80**, 2775.
- [7] C. Dietrich *et al.*, *Biophys. J.*, 2001, **84**, 725.
- [8] S.L. Veatch, S.L. Keller, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 3074.
- [9] R. Schroeder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 12130.
- [10] M. Ge *et al.*, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 925.
- [11] M. Ge *et al.*, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 1278.
- [12] D. Holowka, B. Baird, *Sem. Immunol.*, 2001, **13**, 99.
- [13] K.A. Field *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 17531.
- [14] M.J. Swamy *et al.*, *Biophys. J.*, submitted.
- [15] J.T. Buboltz, W.G. Feigenson, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1417**, 232.
- [16] A.K. Smith *et al.*, *Biophys. J.*, 2003, **84**, 372a.
- [17] N. Kahya *et al.*, *J. Struct. Biol.*, 2004, **147**, 77.
- [18] A. Filippov *et al.*, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 891.
- [19] Y.W. Chiang *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1668**, 99.
- [20] P. Fajer *et al.*, *Biophys. J.*, 1992, **61**, 879.
- [21] K.A. Earle *et al.*, *Biophys. J.*, 1994, **66**, 1213.
- [22] A. Zachowski, *Biochem. J.*, 1993, **294**, 1.
- [23] T.S. Pomorski *et al.*, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2001, **12**, 139.
- [24] D. Marsh, Experimental methods in spin-label spectral analysis, in Biological Magnetic Resonance. Spin Labeling: Theory and Application, L.J. Berliner, J. Reuben (Eds.), Plenum Press, New York., 1989, Vol. 9, 255.
- [25] P.C. Jost *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 480.
- [26] P.F. Knowles *et al.*, *Biochemistry*, 1979, **18**, 4480.
- [27] D. Marsh, A. Watts, Spin labeling and lipid-protein interactions in membranes, in Lipid-Protein Interactions, P.C. Jost, O.H. Griffith (Eds.), Wiley & Sons, New York, 1982, 53.
- [28] O.H. Griffith *et al.*, *Biochemistry*, 1986, **25**, 574.
- [29] P.F. Devaux, M. Seigneuret, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **82**, 63.
- [30] M. Ge, J.H. Freed, *Biophys. J.*, 1999, **76**, 264.
- [31] M. Edidin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct.*, 2003, **32**, 257.
- [32] L.J. Pike, *Biochem. J.*, 2004, **378**, 281.
- [33] D. Holowka, B. Baird, *Biochemistry*, 1983, **22**, 3466.
- [34] S. Munro, *Cell.*, 2003, **115**, 377.
- [35] S. Mayor, M. Rao, *Traffic.*, 2004, **5**, 211.