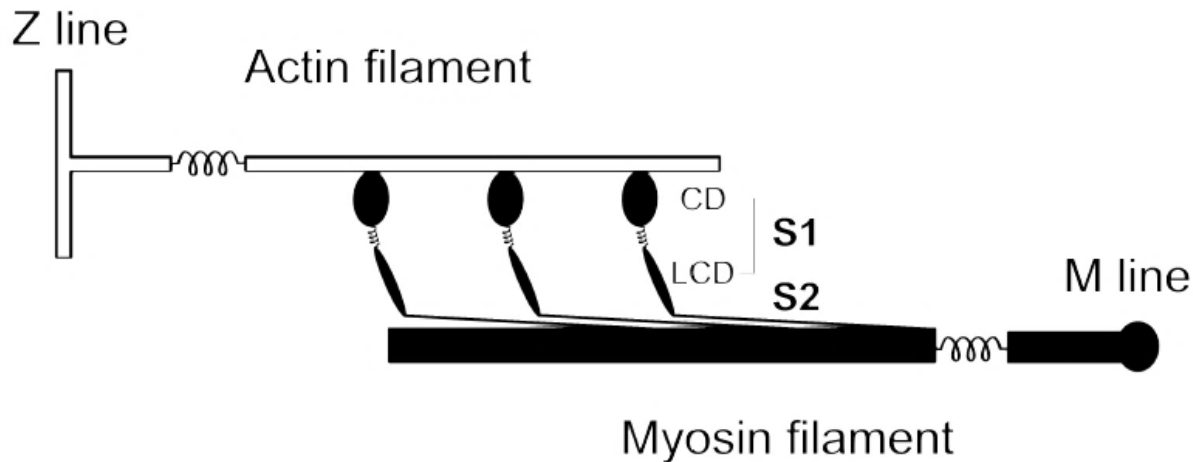


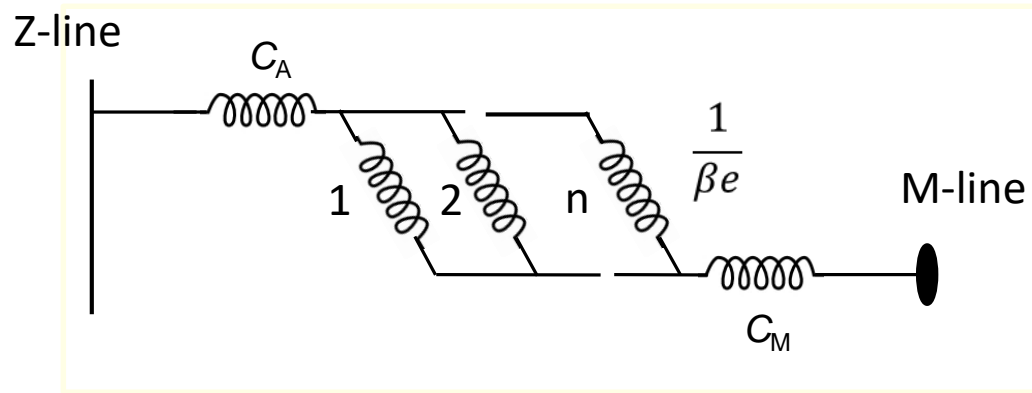
The mechanism of force generation can be verified by determining the elastic properties of the myosin motor in situ with half-sarcomere mechanics in single muscle fibres

*The mechanical model of the half-sarcomere*



In the half-sarcomere the myosin motors are mechanically coupled via their filament attachments and act as a collective motor to generate steady force and shortening.

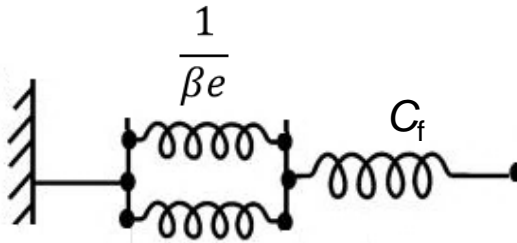
# Mechanical model of the half-sarcomere



$$e = \Delta T / \Delta L$$

$$\beta = n / N$$

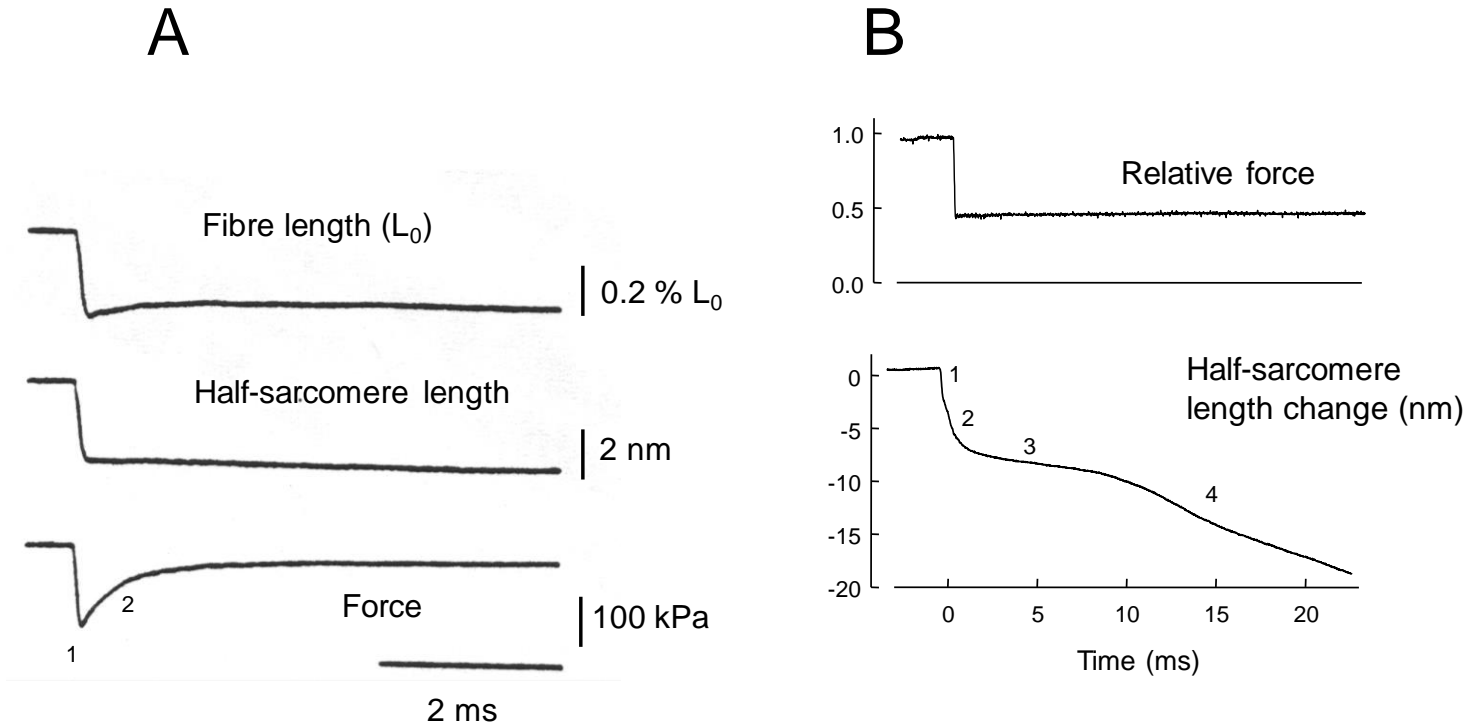
Simplified model



$$C_{hs} = C_A + C_M + \frac{1}{\beta e} = C_f + \frac{1}{\beta e}$$

$C_A$  and  $C_M$ : equivalent actin and myosin compliances;  $1/\beta e$ : compliance of the cross-bridge array;  $\beta$ : fraction of attached heads;  $e$ : stiffness of cross-bridge array when all the heads are attached;  $C_{hs}$ : hs compliance;  $C_f$ : cumulative filament compliance.

## 4. Half-sarcomere mechanics in single intact fibres



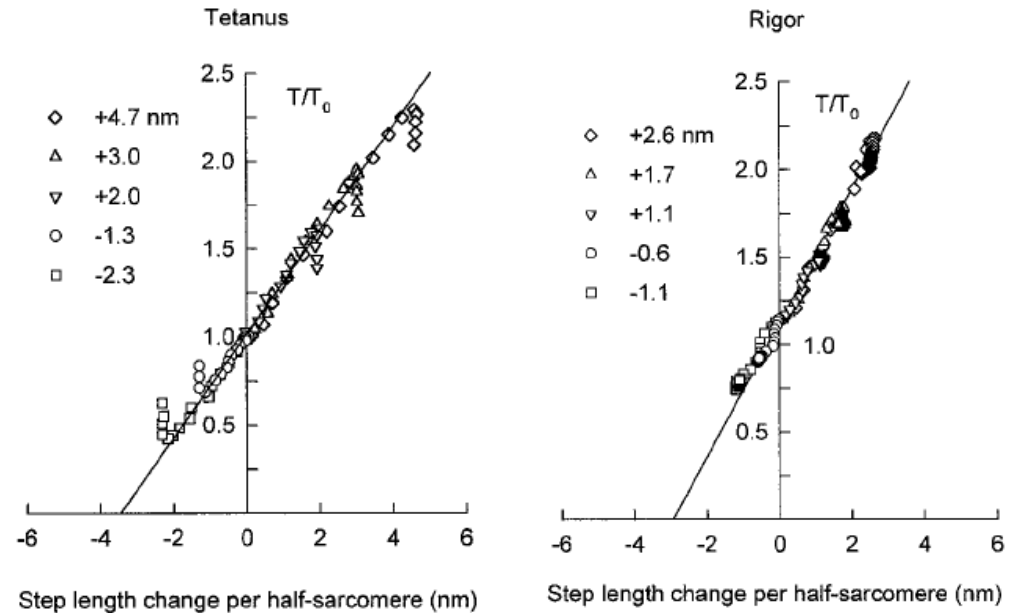
**A. Force transient:** Force response to a step reduction in half-sarcomere length. Phase 1 elastic response is followed by phase 2 quick force recovery, that is the mechanical manifestation of the working stroke in the attached myosin motors.

**B. Velocity transient:** Shortening elicited by a step reduction of force from  $T_0$  to  $0.5 T_0$ . The rapid shortening in phase 2 occurs at constant force and does not imply changes in strain of the elastic elements.

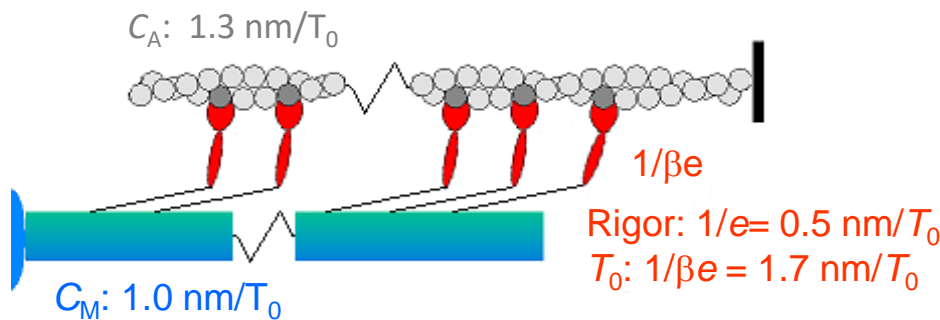
# Force and stiffness in isometric contraction and rigor

Linari et al. (1998) *Biophys J.* **74**, 2459

Rana esculenta, 4 °C  
 Isometric force ( $T_0$ ) = 200 kN/m<sup>2</sup>  
 Filament density  $\sim 0.5 \cdot 10^{15}$  fil/m<sup>2</sup>  
 Force per filament = 400 pN  
 $Y_0 = \{T_0: 4 \text{ nm}; \text{Rigor}: 2.8 \text{ nm}\}$   
 Stiffness ratio ( $T_0/\text{rigor}$ ) = 0.7



## Half-sarcomere compliance analysis



$$C_{hs} = C_A + C_M + 1/\beta e$$

$C_a$  and  $C_m$  from X-ray diffraction measurements  
 H.E. Huxley *et al. Biophys. J.* **67**, 2411, 1994;  
 K. Wakabayashi *et al. Biophys. J.* **67**, 2422, 1994;

$$T_0: 1/\beta e = 4 - (1 + 1.3) = 1.7 \text{ nm}$$

$$\text{Rigor}: 1/e = 2.8 - (1 + 1.3) = 0.5 \text{ nm}$$

- The fraction of motors in an isometric tetanus is  $\beta (= 0.5 \text{ nm} / 1.7 \text{ nm}) = 0.29$
- The number of **motors per filament** is  $(294 \cdot 0.29) = 85$
- The isometric force of a motor  $F_0$  is  $(400 \text{ pN} / 85) = 4.7 \text{ pN}$
- The stiffness of a single myosin motor  $\epsilon$  is  $(4.7 \text{ pN} / 1.7 \text{ nm}) = 2.8 \text{ pN/nm}$

# Incompatibilità energetica del modello thermal ratchet per la generazione di forza

- Ampiezza del working stroke (D): 10 nm (cristallografia, diffrazione a raggi X, transienti meccanici)

- Rigidezza del motore miosinico ( $\epsilon$ ): 3 pN/nm (meccanica dell'emisarcomero)

- $\Delta G_{ATP} = \Delta G_{0,ATP} + RT \cdot \ln([Pi] \cdot [ADP]/[ATP])$ .

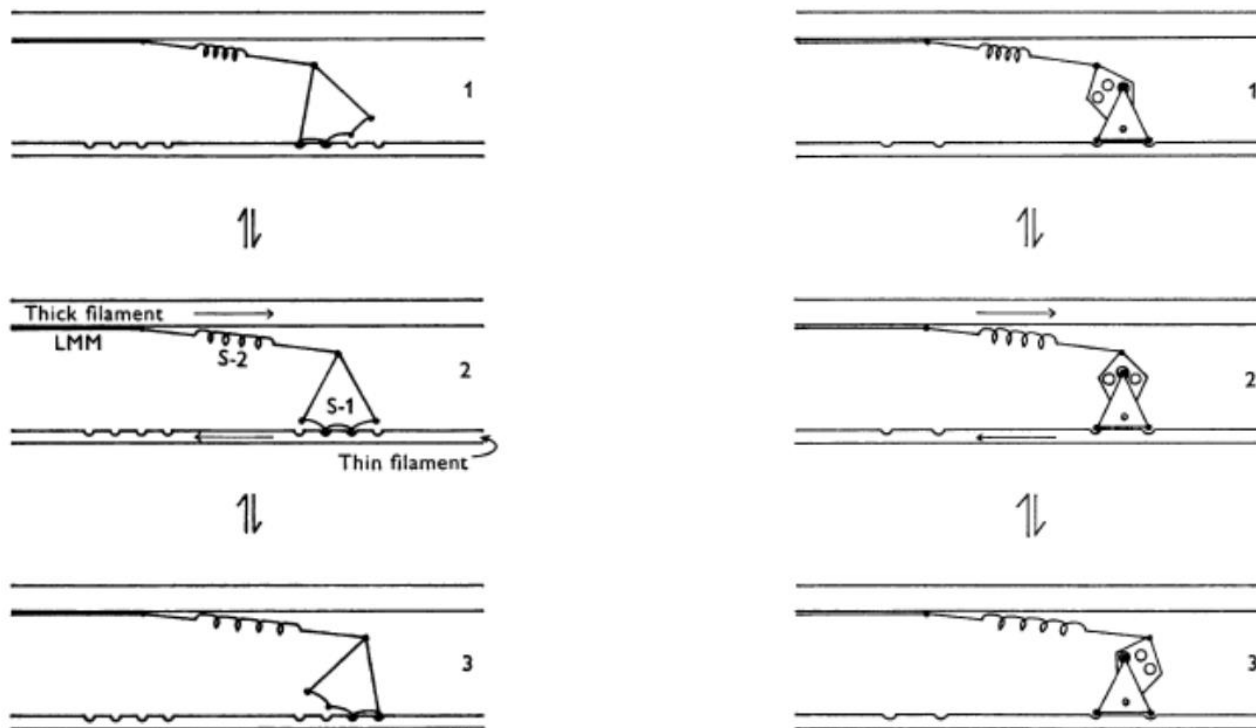
Con  $[Pi] = 10^{-3} M$ ,  $[ADP] = 20 \times 10^{-6} M$  e  $[ATP] = 2 \times 10^{-3} M$  e  $RT (4^\circ C) = 3.8 \times 10^{-21} J$ :  $\Delta G_{ATP} = -85 \times 10^{-21} J$

- Se il working stroke fosse dovuto alla liberazione di energia meccanica catturata tramite l'agitazione termica :

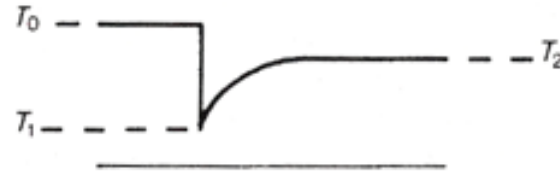
$W = \frac{1}{2} \epsilon D^2 = 150 \text{ zJ } (\sim 2 \times \Delta G_{ATP})$ .

## Modello cinetico della generazione di forza di Huxley e Simmons (1971)

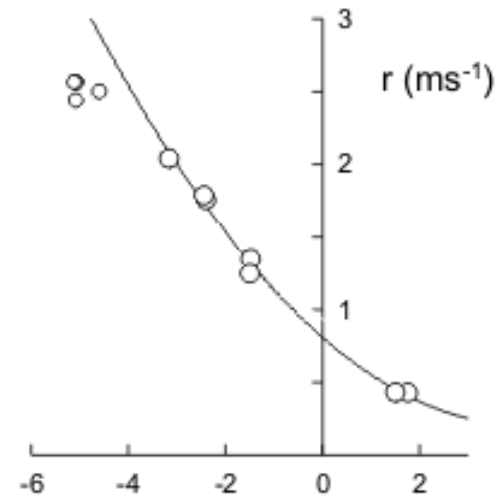
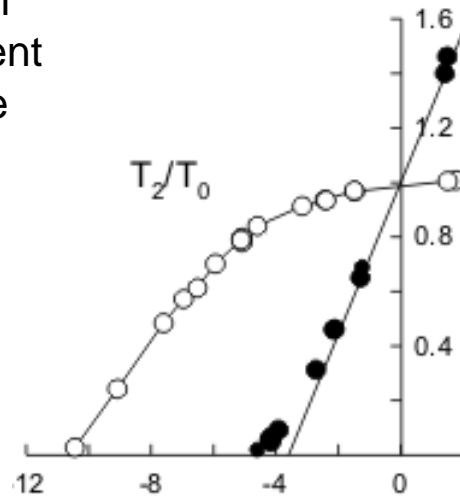
- La capacità di generare forza e movimento sono spiegati dalla transizione tra diversi stati strutturali del motore miosinico attaccato all'actina.



## The force transient provides the mechanical and kinetic constraints for the model of force generation



- The  $T_1$  abscissa intercept,  $\sim 4$  nm per hs, measures the strain in the hs elasticity at  $T_0$ .
- The  $T_2$  abscissa intercept,  $\sim 11$  nm per hs, measures the extent of sliding accounted for by the working stroke.
- The rate of  $T_2$  recovery ( $r$ ) increases with the size of the release.



Step amplitude per half-sarcomere (nm)

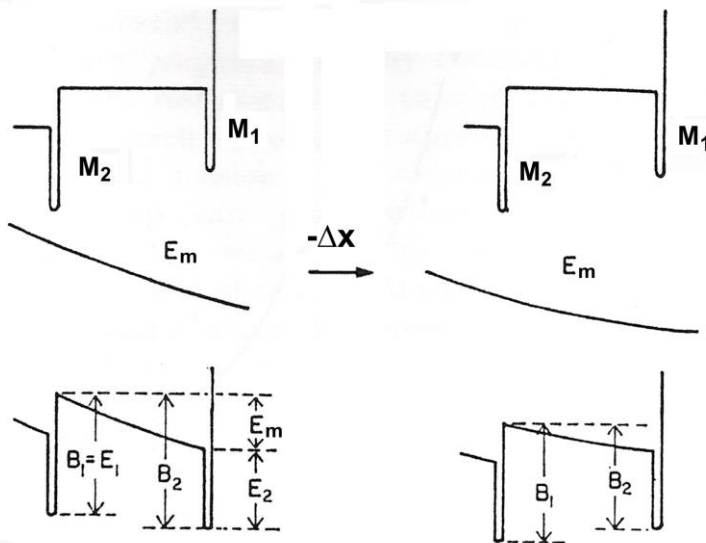
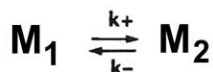
- The non-linearities of phase 2 recovery (amplitude and rate versus step size) provide the kinetic constraints to the working stroke model.
- The energy delivered by the working stroke is much larger than the energy stored in isometric conditions (evidence against the thermal ratchet model of the working stroke).

# Modello cinetico della generazione di forza

I parametri meccanici e cinetici ricavati dall'analisi dei transienti di forza servirono a Huxley e Simmons (1971) per definire un modello del motore molecolare miosinico in cui la capacità di generare forza e movimento sono spiegati dalla transizione tra diversi stati strutturali del motore miosinico attaccato all'actina.

estensione dell'elemento

elastico :  $y = x + z$



**Eq. di Arrhenius per la cinetica di transizione:**

$$k_+ = A_+ \exp(-B_2/k_b T)$$

$$k_- = A_- \exp(-B_1/k_b T)$$

dove:  $B_2 = E_2 + E_m = E_2 + 1/2 \varepsilon y^2$

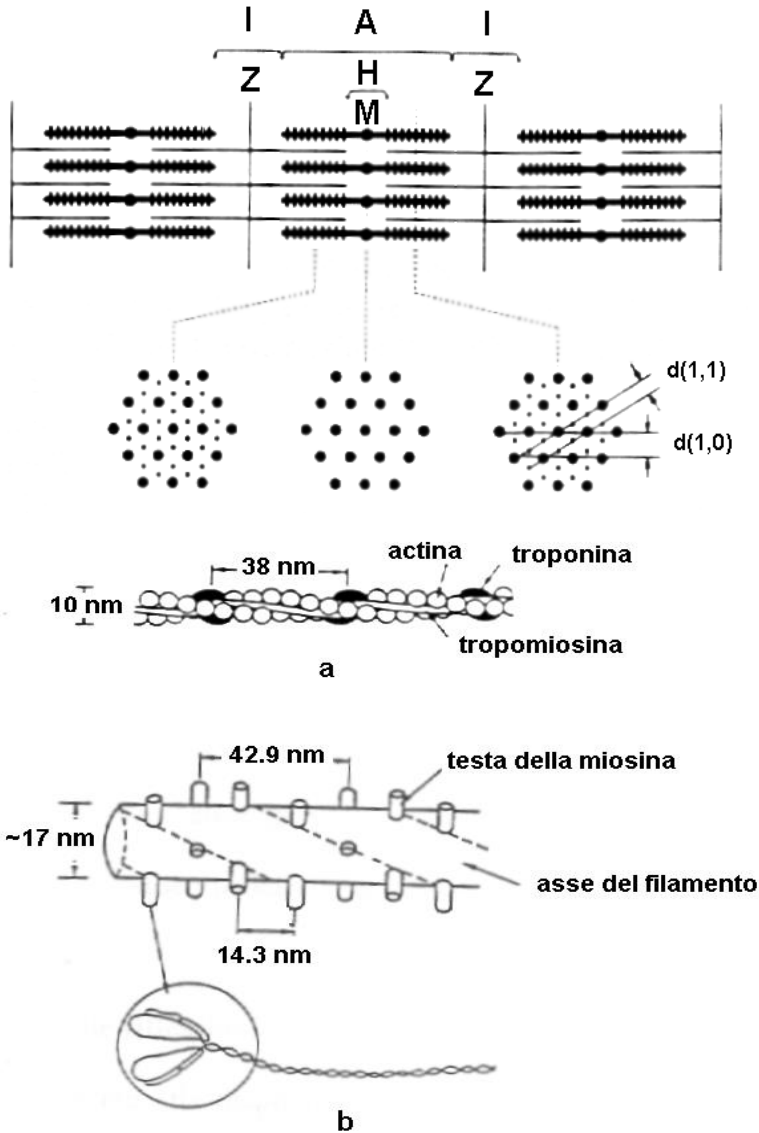
**Eq. di Gibbs per l'equilibrio:**

$$K_{eq} = k_+/k_- = \exp[(B_1 - B_2)/k_b T],$$

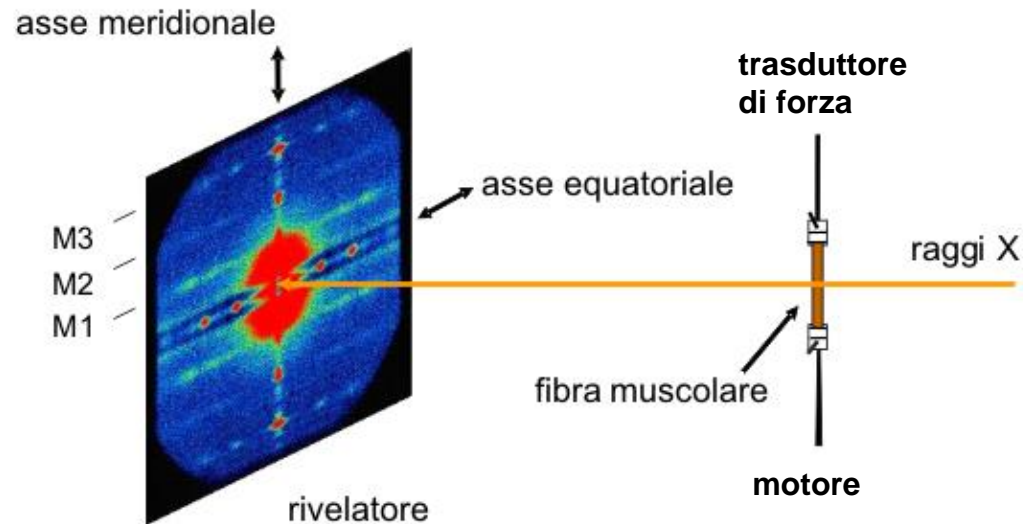
Lo stiramento nell'elemento elastico del cross-bridge ( $y$ , localizzato nella porzione S2 della meromiosina pesante nella versione originale del modello) e quindi la sua forza, sono controllati da due parametri: la posizione reciproca tra i siti di attacco della testa sui filamenti di miosina e di actina,  $x$ , che varia con lo scorrimento dei filamenti, e lo stato strutturale della testa della miosina per cui lo stiramento aumenta di  $z$  progredendo nel working stroke attraverso la transizione dallo stato  $M1$  allo stato  $M2$ . L'equilibrio tra stati è definito dal bilanciamento tra energia libera di base (il livello del fondo della buca di energia) che diminuisce progredendo nel working stroke e energia meccanica nella componente elastica del cross-bridge,  $E_m$ , che cresce con relazione parabolica in funzione dello stiramento ( $E_m = 1/2 \varepsilon y^2$ , dove  $\varepsilon$  è la rigidità dell'elemento elastico). Un accorciamento  $-\Delta x$  riduce la tensione nell'elemento elastico e quindi riduce la barriera di energia meccanica, promuovendo la transizione del motore verso lo stato finale, che si manifesta con il recupero di forza in fase 2, tanto più rapido quanto maggiore è  $\Delta x$  perché con l'aumentare di  $\Delta x$  diminuisce  $B_2$ , l'energia di attivazione della transizione verso  $M2$ , che dipende dalla barriera di energia meccanica  $E_m$ ).

# Metodi strutturali con risoluzione temporale

## La diffrazione a raggi X a piccolo angolo



Quando un fascio di fotoni con lunghezza d'onda di circa 1 Å colpisce una fibra muscolare, la regolare disposizione delle proteine nei filamenti e dei filamenti nel reticolo tridimensionale producono uno scattering della luce che su un rivelatore messo a distanza opportuna ( $L$ ) forma un diagramma di diffrazione a piccolo angolo. L'angolo di diffrazione ( $\theta$ ) dipende dal periodo della sorgente ( $d$ ) secondo la legge:  $\sin \theta = n\lambda/d$ .

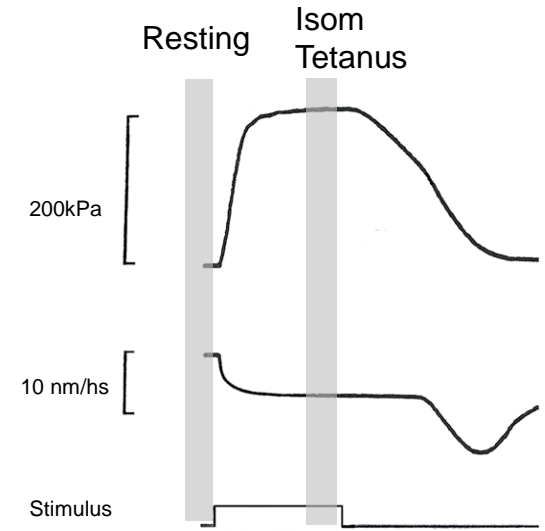
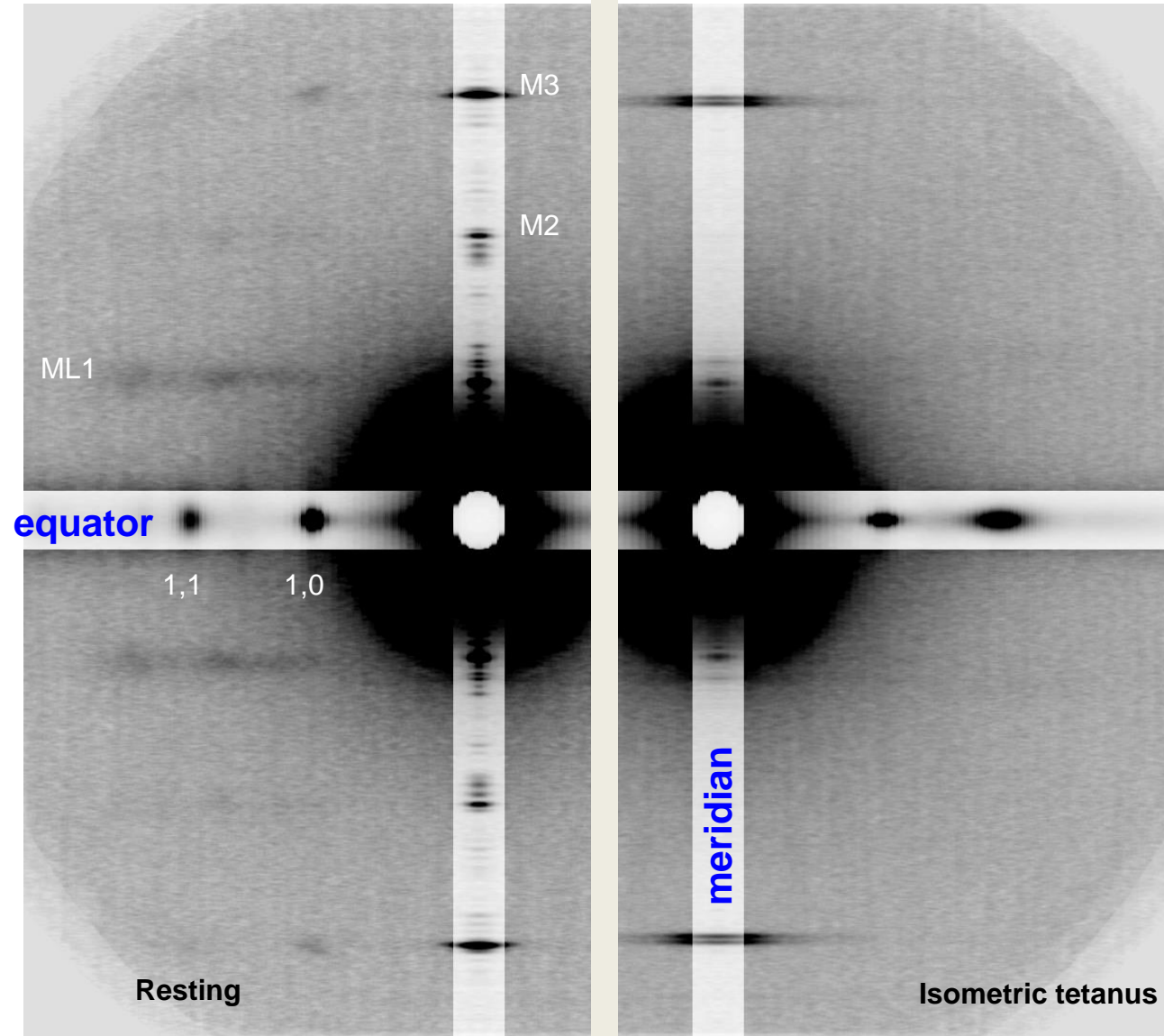


La riflessione  $M3$ , che rimane molto intensa durante la contrazione, è originata dalla periodicità di 14.3 nm con cui si ripetono le teste della miosina lungo l'asse del filamento e la sua intensità è sensibile alle variazioni di forma della testa.



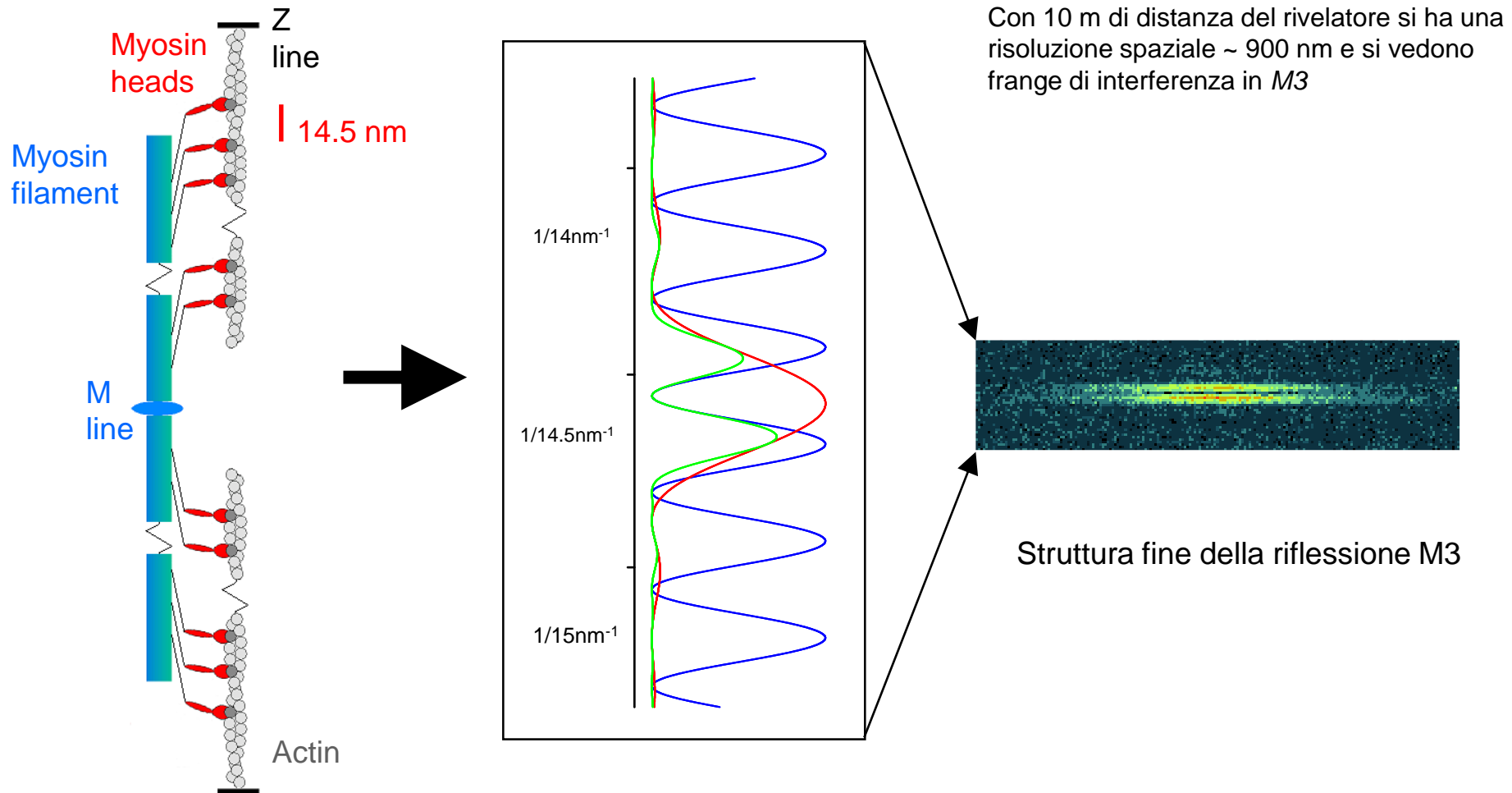
# Diffrazione a raggi X da singola fibra muscolare

Rana temporaria, 4°C; ID02, ESRF (Grenoble);  $t_{exp}=100ms$ ; distanza dal rivelatore = 10m



La riflessione *M3*, dovuta alla ripetizione dei motori lungo l'asse del filamento, rimane intensa durante la contrazione. E' la riflessione di interesse perché è sensibile al numero e alla forma (= proiezione della densità di massa) dei motori, tuttavia manca l'informazione di fase.

# Interferenza a raggi X tra le due schiere di motori in ciascun filamento spesso

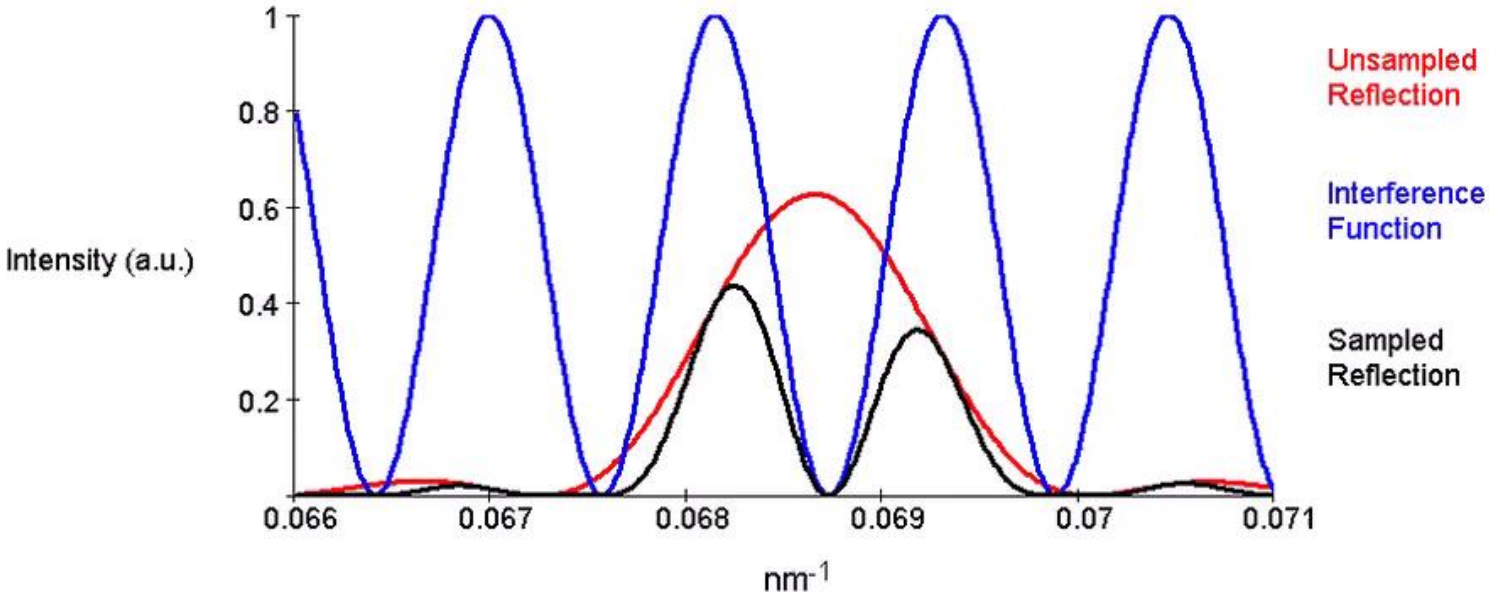


Due schiere di motori in ciascun filamento spesso con distanza centro-centro ~900 nm

Il pattern osservato (verde) è il prodotto di quello generato da una singola schiera di motori (rosso) con la frangia di interferenza generata dalle due schiere (blu)

# X-ray interference between the two arrays of myosin heads allows direct Å scale measurements of axial motion of the motors in situ

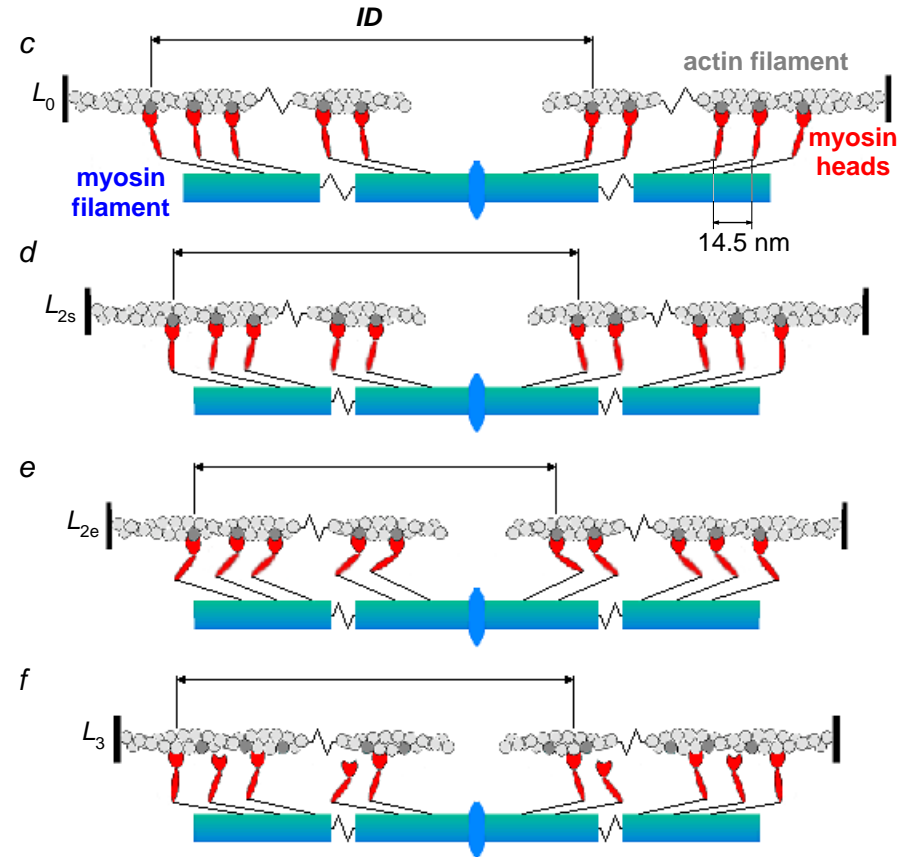
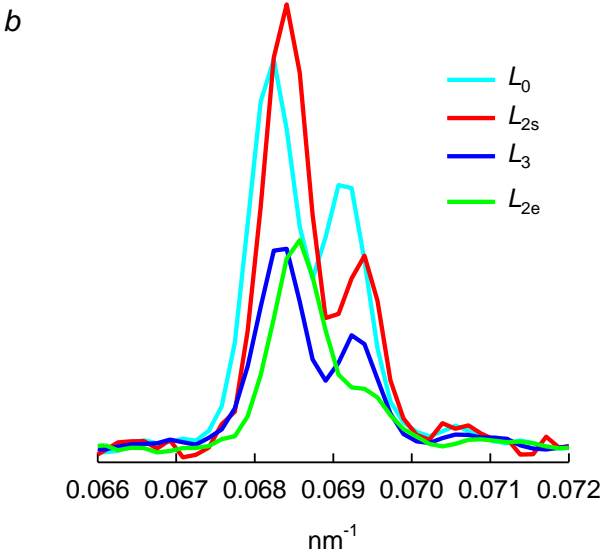
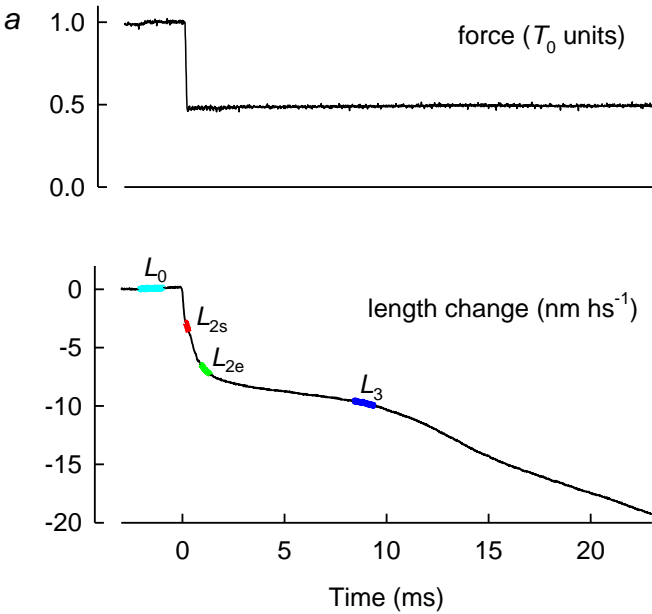
angle = 60 deg



by MassimoReconditi

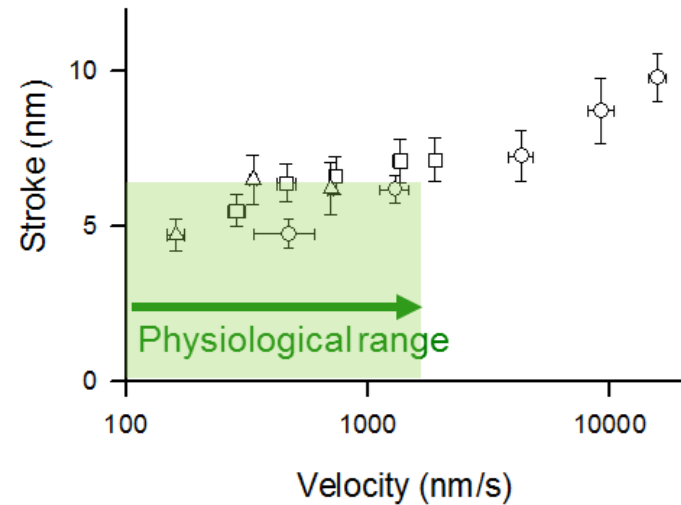
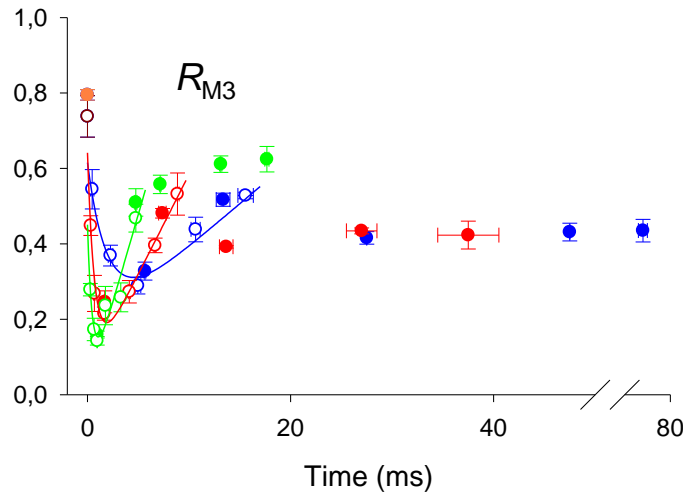
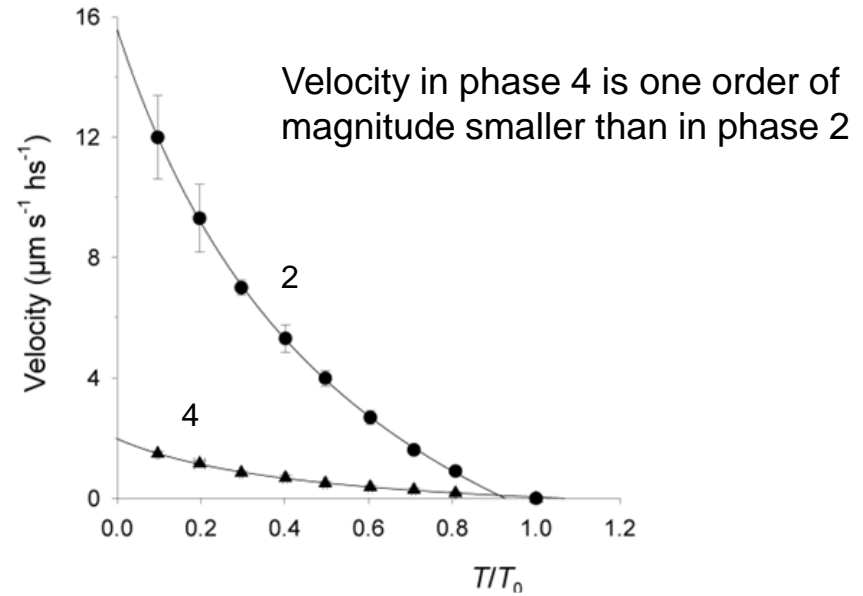
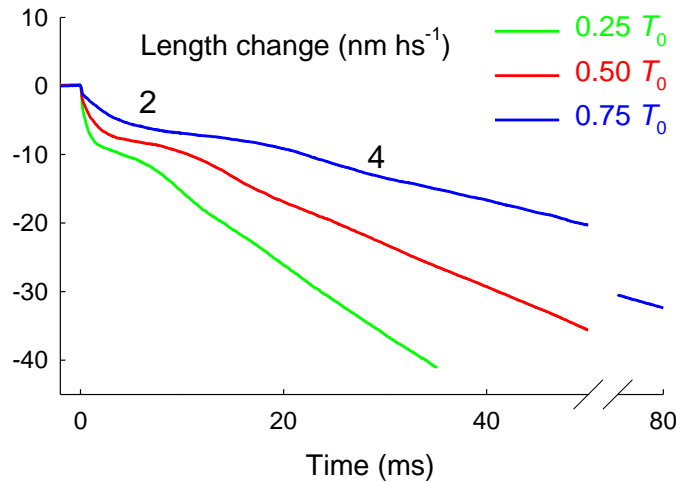
Change in the interference splitting from  $T_0$  to 'rigor' conformation ( $\Delta z = 6$  nm)

# La variazione dell'interferenza a raggi X durante il transiente isotonicico di velocità misura il movimento del motore durante il working stroke



Le teste di miosina si muovono verso il centro del sarcomero in fase 2 e si staccano dall'actina in fase 3

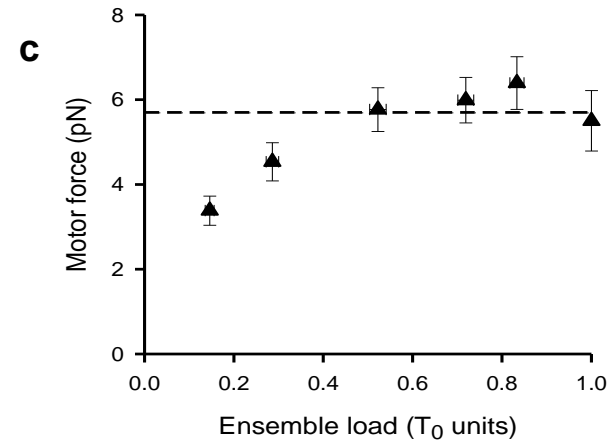
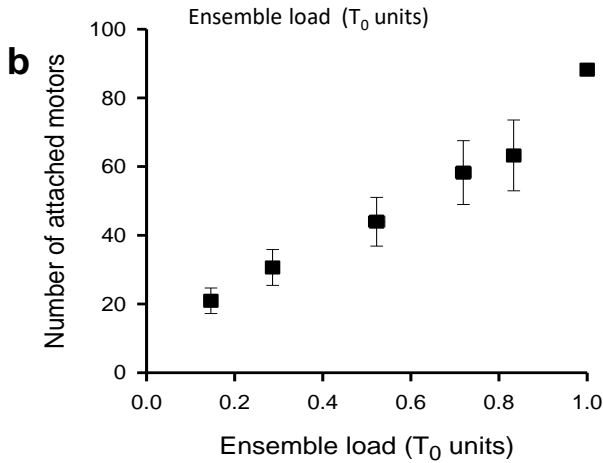
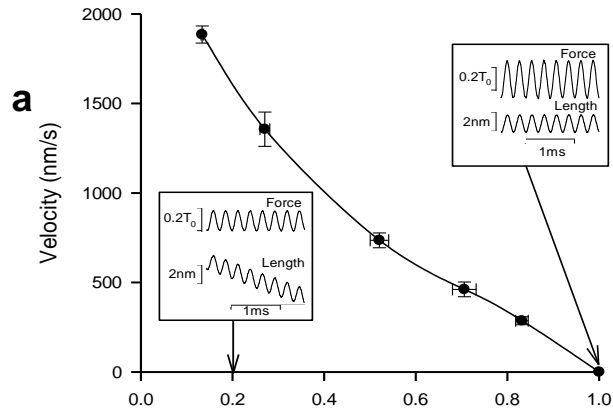
# The working stroke during early and steady shortening



Piazzesi *et al.* (2007) *Cell* **131**, 784-795

Phase 2: the working stroke varies from 6 nm at high load to 11 nm at low load.  
 Phase 4: the working stroke remains almost constant at ~6 nm

# Integrating mechanical and structural parameters of T-V relation



From the relation between stiffness-load (inset in a) we estimate the number of motors (b) and then the force per motor (c)

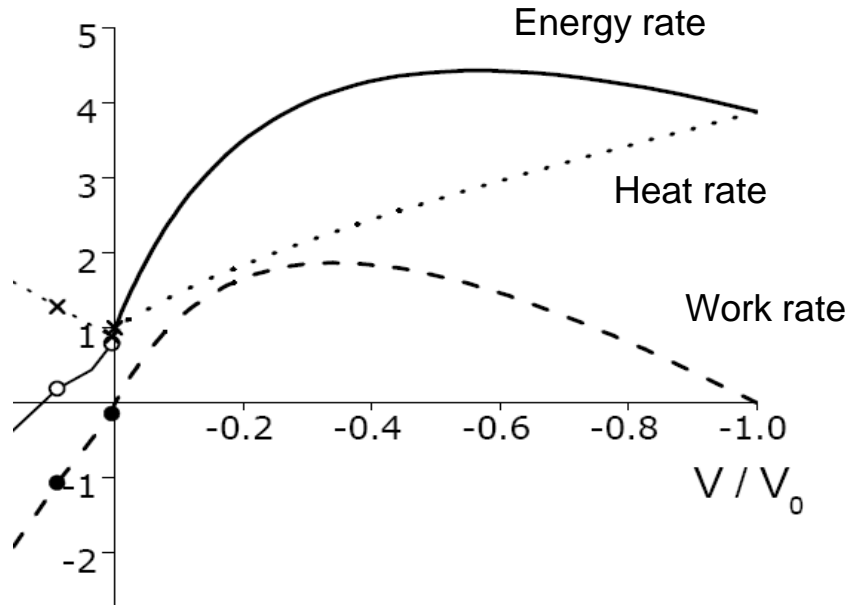
For loads  $\geq 0.5 T_0$  (steady shortening up to 1000 nm s<sup>-1</sup> (load):

1. The number of motors is proportional to the load, the force per motor stays constant ( $\sim 6$  pN);
2. The stroke size ( $L_W$ ) is limited to  $\sim 6$  nm due to a conformation-dependent detachment rate that prevents negative strain
3. The work per motor 36 zJ (against loads for the maximum power,  $\sim 0.5 T_0$ ).

# Integrating mechanical and structural parameters during steady shortening reveals the molecular basis of muscle energetics

## Muscle energetics

Frog, 0 °C	$T_0$	$0.5 T_0$
Heat+work rate	12 mW/g	40 mW/g
Work rate		18 mW/g
efficiency		0.45



Efficiency 0.45 @  $0.5 T_0$

$\Delta G_{ATP} = \Delta G_{0,ATP} + k_b T_K \times \ln \left\{ \frac{[P_i][ADP]}{[ATP]} \right\} \sim 85 \text{ zJ } (21 k_b T_K)$

Assume tight coupling between chemical and mechanical cycle:

Expected work/cycle 38 zJ