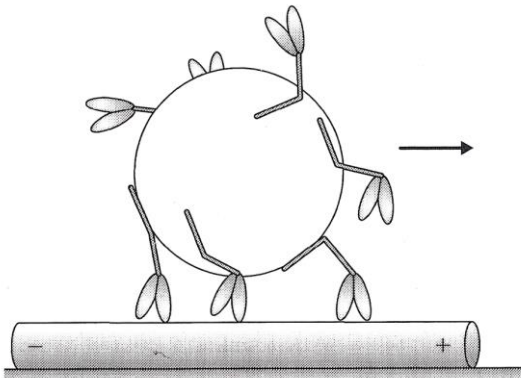


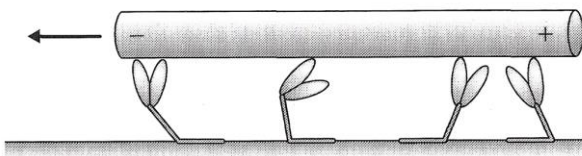
Misure di meccanica di singola molecola

1. Saggi di motilità in vitro (IVMA)

Bead assay. Registrazione del movimento di una microsfera di latex fluorescente rivestita di molecole di miosina sui cavi di actina che uniscono le file di cloroplasti nell'alga *Nitella*

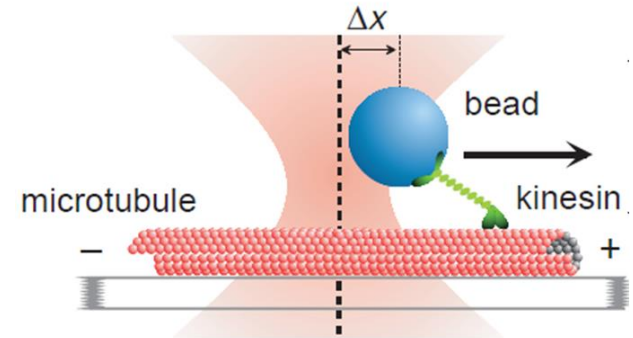


Gliding assay. Registrazione dello scorrimento di filamenti di actina, resi visibili con falloidina marcata con rodamina, sulla superficie di un vetrino ricoperta da molecole di miosina

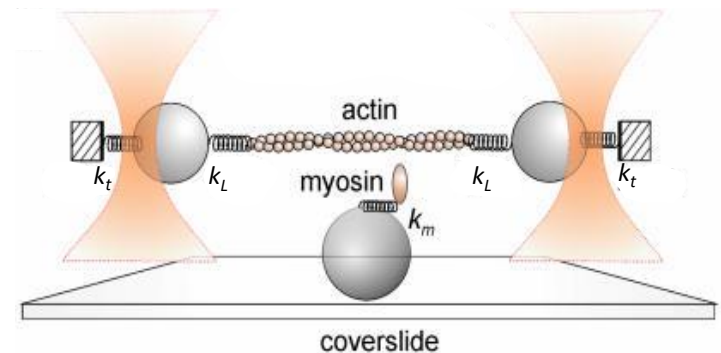


2. Meccanica con trappola ottica

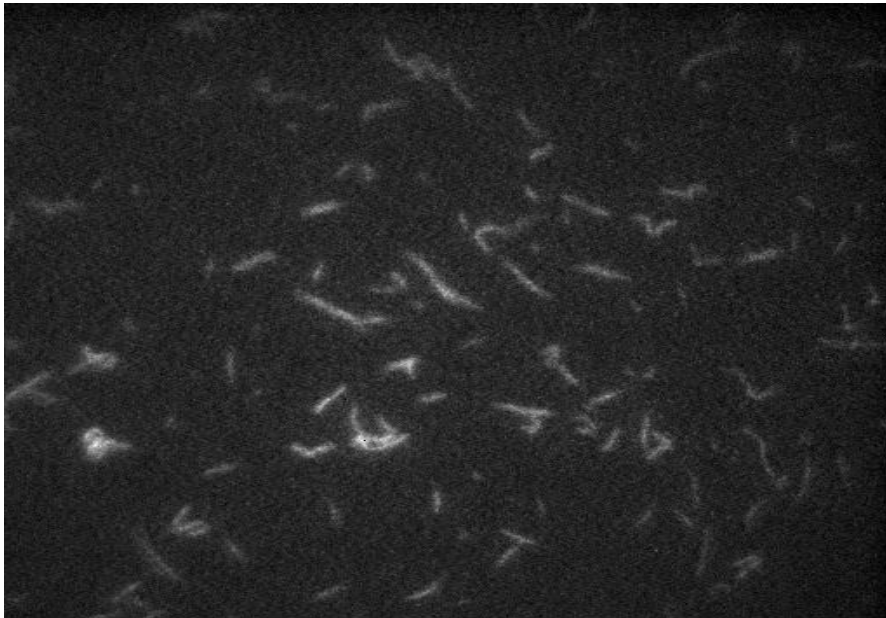
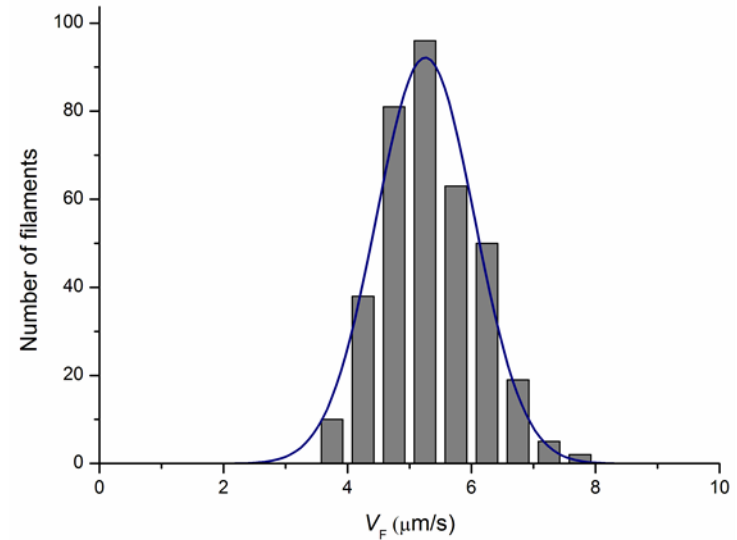
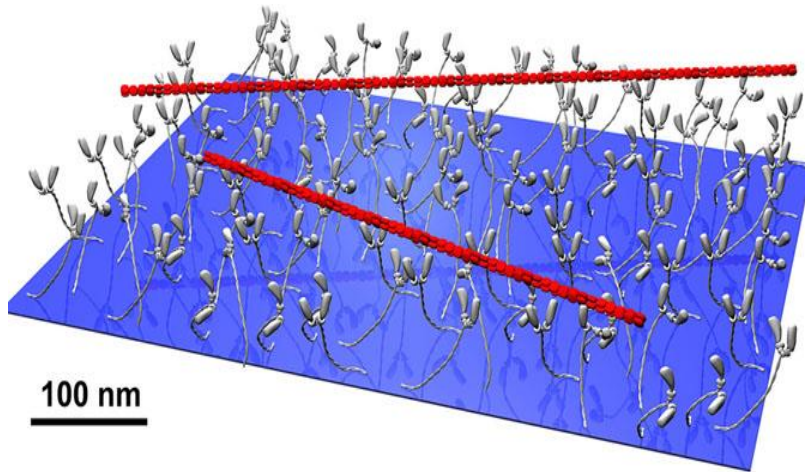
Il sistema sfrutta la forza di intrappolamento che si genera quando su una microbiglia di polistirene (con indice di rifrazione maggiore del mezzo circostante) viene focalizzato un raggio laser. La forza è proporzionale alla distanza dal fuoco del laser (Δx)



Con la doppia trappola ottica il filamento di actina con gli estremi attaccati a due microbiglie è portato e tenuto in prossimità di una molecola di miosina fissata su una terza biglia muovendo i raggi laser con deflettori acustooptici (saggio con tre biglie, Three Bead Assay).



In Vitro Motility Assay



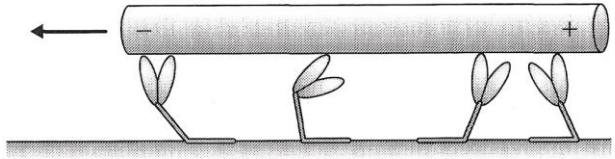
Frog myosin
(22 °C, pH 7.5,
[Mg²⁺] 1mM, [MgATP] > 2mM)

La velocità di scorrimento nell'IVMA ($V_f = 5 \mu\text{m/s}$) dovrebbe corrispondere alla velocità di accorciamento con carico zero *in situ* (in effetti risulta circa il 30% minore (spiegato da miosine danneggiate o legami aspecifici del filamento con substrato))

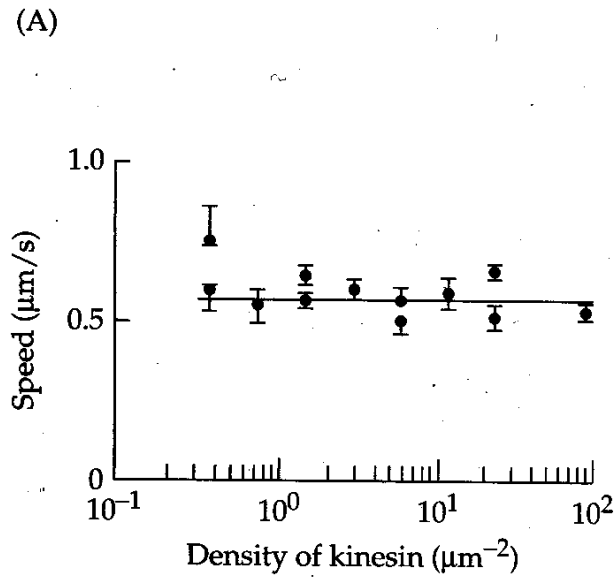
Motori processivi e non processivi

La **processività** è la proprietà di uno stesso motore di muoversi in modo continuo lungo lo stesso supporto, fino a percorrere distanze dell'ordine del μm ed è legata all'organizzazione e funzione dei motori. Per un motore non processivo come la miosina muscolare, le interazioni del motore con il filamento di actina sono così brevi che in misure in vitro su singola molecola non sono rilevabili se non riducendo ATP e quindi aumentando τ_{on} .

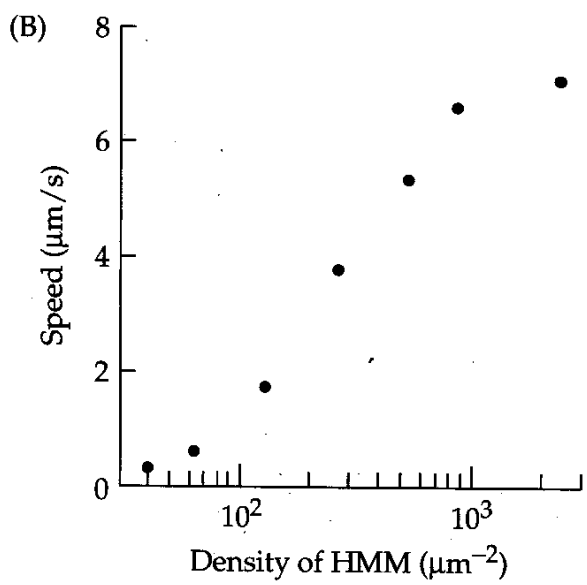
- Chinesine, dineine citoplasmatiche e miosine non sarcomeriche sono motori processivi e operano da sole o in piccoli numeri.
- La miosina muscolare e la dineina assonemica non sono processivi e operano in schiere estremamente numerose



Per la **chinesina**, la velocità del movimento del microtubulo non dipende dal numero di motori che partecipano (il carico è $<0.2 \text{ pN}$ data l'assenza di attrito lungo l'asse del filamento)



Per la **miosina II**, con l'aggiunta di metilcellulosa alla soluzione si previene la diffusione dei filamenti di actina in direzione perpendicolare alla superficie del vetrino e si può vedere che, al di sotto della soglia, la velocità del movimento dipende dalla



densità della miosina. Ciò è dovuto al basso valore del **duty ratio** (il rapporto tra il tempo di interazione e il tempo totale dell'idrolisi dell'ATP), per cui è necessario un numero minimo di miosine per assicurare che almeno una sia attaccata all'actina e compia il working stroke ad ogni tempo.

Motori processivi e non processivi

duty ratio (r) è la frazione di tempo del ciclo ATPasico che il motore spende attaccato al supporto

$$r = \tau_{\text{on}} / (\tau_{\text{on}} + \tau_{\text{off}})$$

dove: $(\tau_{\text{on}} + \tau_{\text{off}})$ è il tempo totale del ciclo ATPasico ($\tau_0 = 1/k_{\text{cat}}$ ricavabile dalla velocità di idrolisi dell'ATP da parte dello stesso motore in soluzione)

τ_{on} è il tempo in cui il motore sta attaccato al filamento ed esegue il *working stroke*,

τ_{off} è il tempo in cui il motore è staccato e recupera la conformazione iniziale.

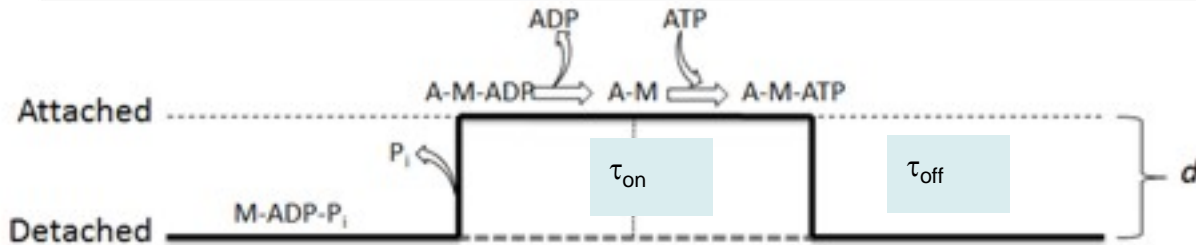
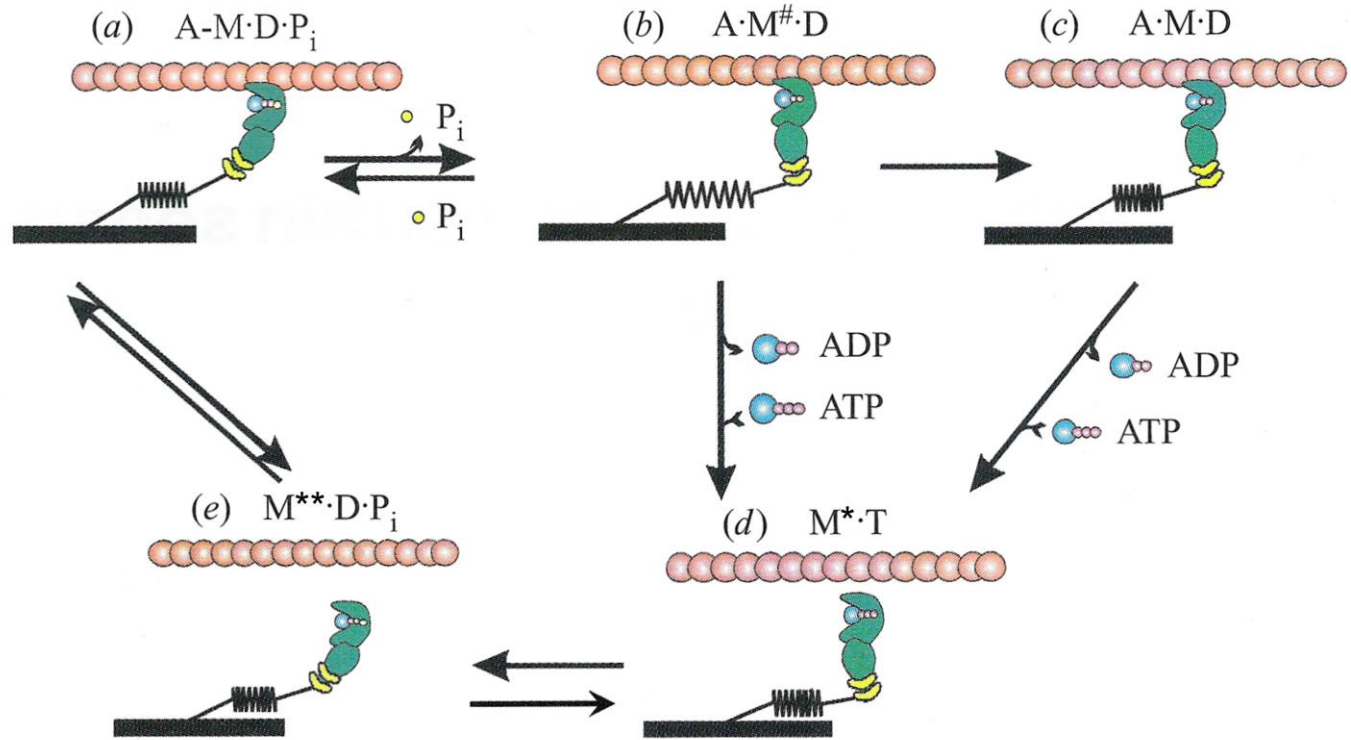
Per avere un movimento continuo del filamento (**processività**) bisogna che ad ogni tempo almeno un motore sia attaccato. Se i motori lavorano in modo coordinato (come le due porzioni motrici del dimero della chinesina) il numero minimo di motori che ci vuole per avere processività (n_{min}) varia con r secondo la relazione: **$n_{\text{min}} = 1/r$ ($n_{\text{min}} r = 1$)**. Un dimero è processivo se $r \geq 0.5$.

Chinesina, miosina V e dineina citoplasmatica (dimeri capaci di movimento continuo): $r = 0.5$
Dineina assonemica e miosina II muscolare (lavorano in schiere): $r \ll 0.5$

- Se la miosina sarcomerica lavorasse in modo cooperativo e $r = 0.05 \rightarrow n_{\text{min}} = 1/r = 20$
- Quando i motori sono indipendenti (come nei saggi in vitro) la relazione tra r e n_{min} è: **$r \cdot n_{\text{min}} \sim 3$** . Più precisamente la velocità di scorrimento è massima quando almeno un motore è attaccato ad ogni tempo: **$V = V_0 [1 - (1 - r)^n]$** ; **$V > 0.95 V_0$** quando **$r \cdot n = 3$** (significa che ci devono essere almeno 3 motori attaccati in media perché almeno uno sia attaccato ad ogni momento).

- Nel saggio *in vitro* con motori miosina II sono necessarie almeno 60 teste di miosina perché ci sia movimento continuo di un filamento di actina di $2 \mu\text{m}$, $r = 3/60 = 0.05$.
- Con metilcellulosa si mantengono i filamenti di actina a contatto con il letto di miosine e la perdita di processività si misura dalla caduta di V .

Chemo-mechanical cycle of muscle myosin (non processive motor)



$$\tau_0 (= \tau_{on} + \tau_{off}) \sim 100 \text{ ms}$$

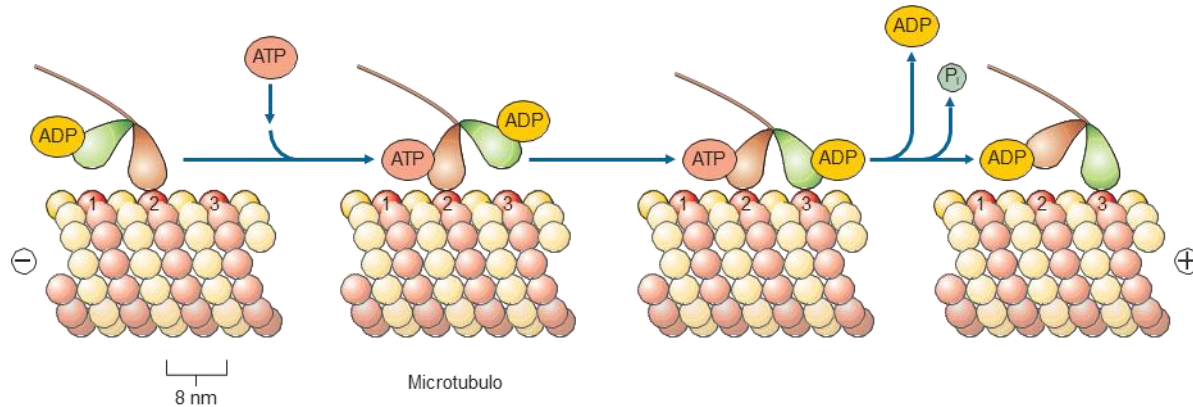
$$r (\text{duty ratio}) = \tau_{on} / \tau_0 = 0.02-0.05$$

$$\tau_{on} (= 1/k_{off}) = \tau_{-ADP} + \tau_{+ATP} = 1/k_{-ADP} + 1/([ATP] \cdot k_{+ATP})$$

with [ATP] 2 mM (physiological concentration) $\Rightarrow \tau_{on} = 1/k_{-ADP}$ (~2 ms)

in single molecule experiments the [ATP] is reduced to increase τ_{on} and reveal the interaction

Chemomechanical cycle of kinesin (a processive motor)



Aspects similar to myosin ATPase:

The ATP-ase rate is slow in absence of microtubules

Microtubules stimulate ATPase rate 5000-fold, by accelerating ADP release

Differences:

(1) phase shift in chemomechanical coupling and (2) head-head coordination

Chemomechanical coupling:

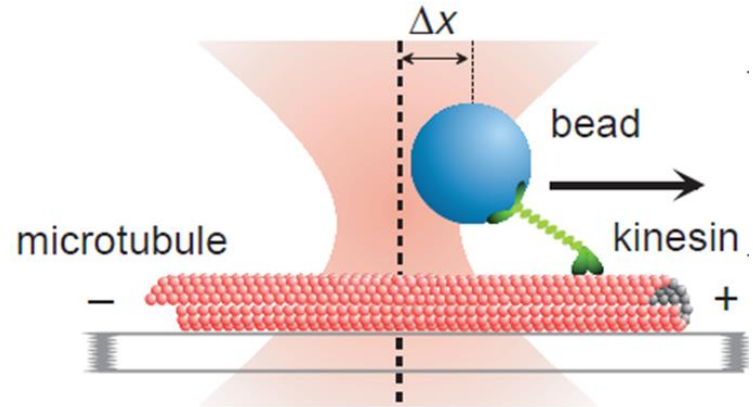
- Hydrolysis promotes unbinding of the trailing head from microtubule
- ATP binding promotes the working stroke in the leading head
- Microtubule binding of the trailing head to the next heterodimer is promoted by the working stroke of the leading head
- Microtubule binding of the green (now leading) head promotes ADP and Pi release and then ATP binding

Head coordination: Hand-over-hand mechanism, the trailing head detaches following hydrolysis when the leading head is bound and undergoes the stroke (**a single head kinesin detaches very slowly at any ATP concentration**).

Misure di meccanica di singola molecola tramite trappola ottica

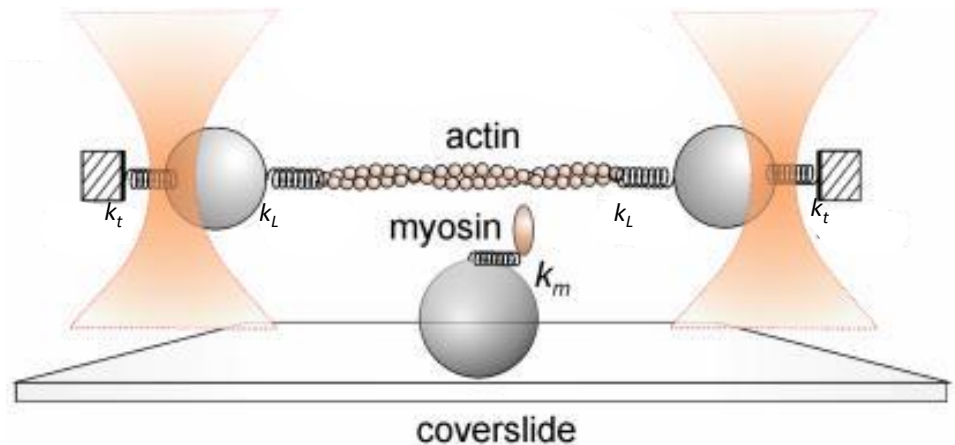
Motori processivi

Il sistema sfrutta la forza di intrappolamento che si genera quando su una microbiglia di polistirene (con indice di rifrazione maggiore del mezzo circostante) viene focalizzato un raggio laser. La forza è proporzionale alla distanza dal fuoco del laser (Δx)



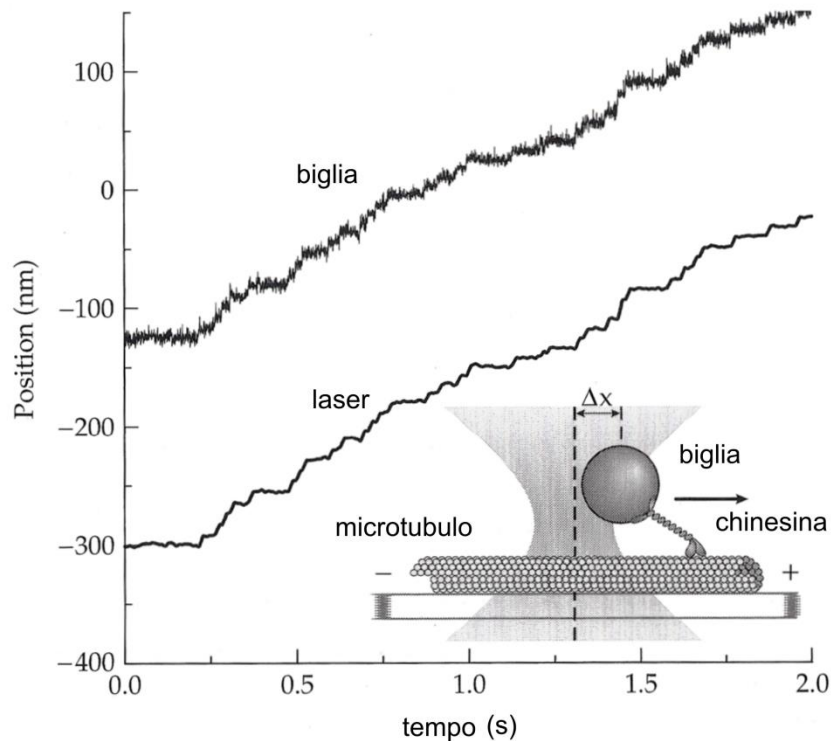
Motori non processivi

Con la doppia trappola ottica il filamento di actina con gli estremi attaccati a due microbiglie intrappolate è portato e tenuto in prossimità di una molecola di miosina fissata su una terza biglia muovendo i raggi laser con deflettori acustoottici (saggio con tre biglie, Three Bead Assay).

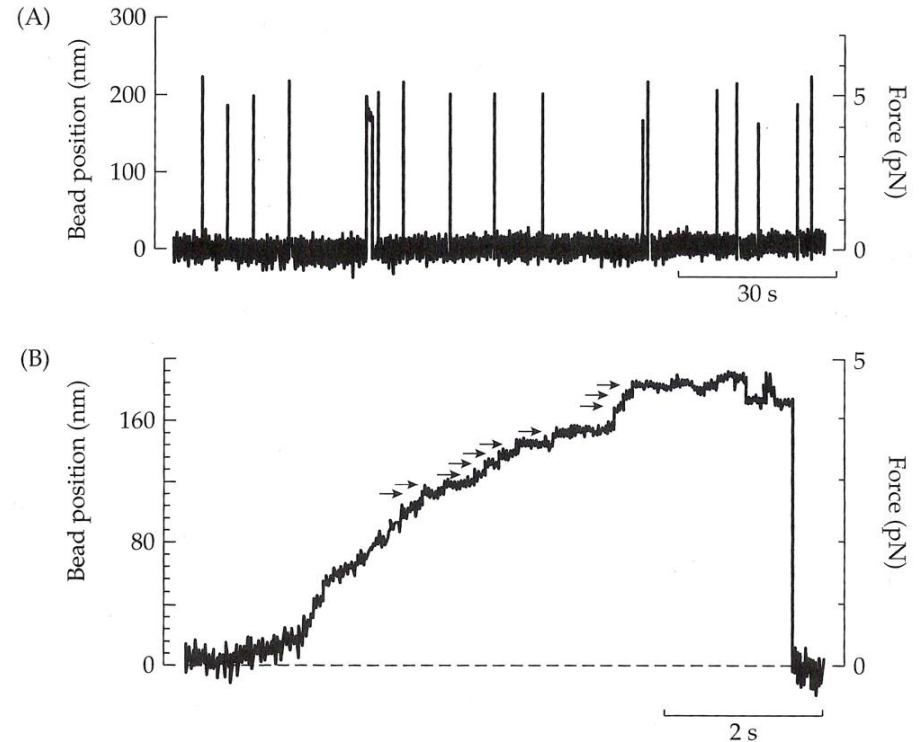


Misura con la trappola ottica dell'ampiezza dello step di lunghezza e di forza nella chinesina del trasporto assonico

Registrazione in clamp di forza



Registrazione in clamp di posizione

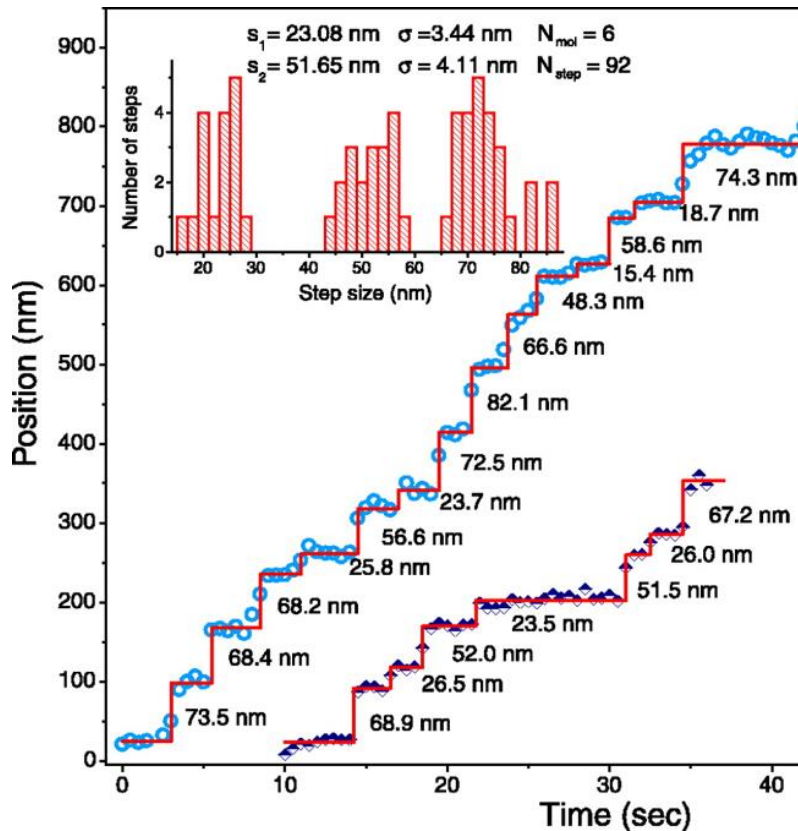
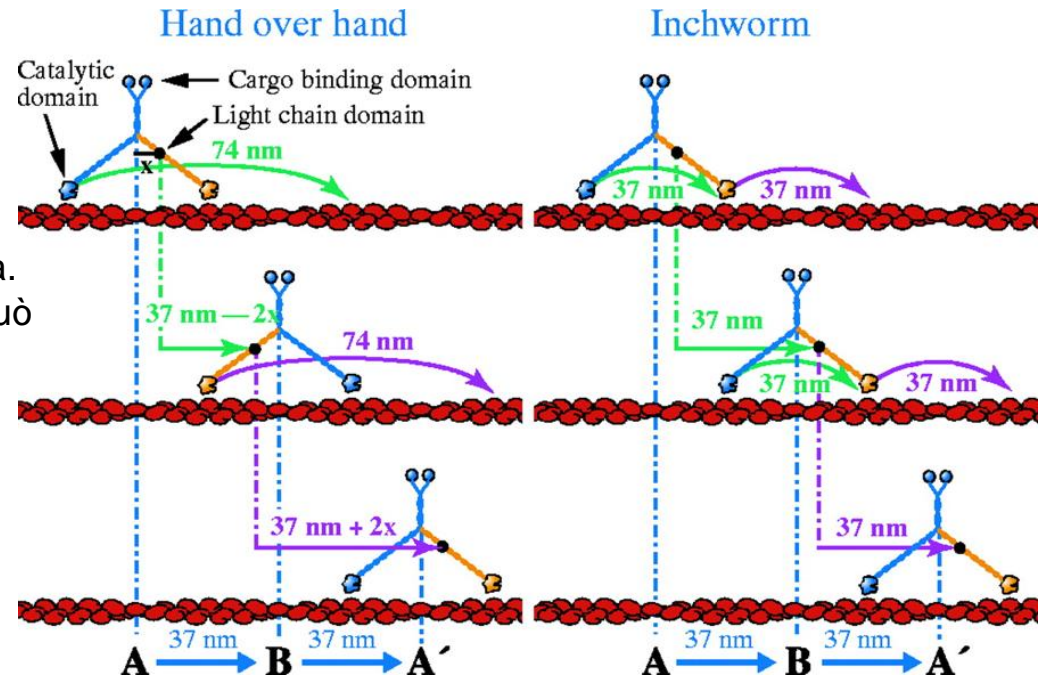


Clamp di forza: La chinesina dimerica si muove procedendo in maniera rettilinea lungo lo stesso protofilamento in step di **8 nm** (corrispondenti alla distanza tra dimeri successivi), con le due teste che si alternano alla guida coprendo ognuna una distanza di 16 nm, in modo simile all'avanzamento alternato di un piede dopo l'altro nell'atto di camminare.

Clamp di posizione: Con l'aumento del carico sulla chinesina, la frequenza dei passi si riduce, finché ad un carico massimo il motore va in stallo. La forza di stallo, circa **6 pN**, è la massima forza che la chinesina può sviluppare. Dall'ampiezza dello step e dalla forza di stallo si può calcolare il lavoro massimo per step che è $(8 \text{ nm} \cdot 6 \text{ pN}) = 48 \text{ pN nm}$ o 48 zJ ($\sim \frac{1}{2} \Delta G_{\text{ATP}}$, simile alla miosina muscolare).

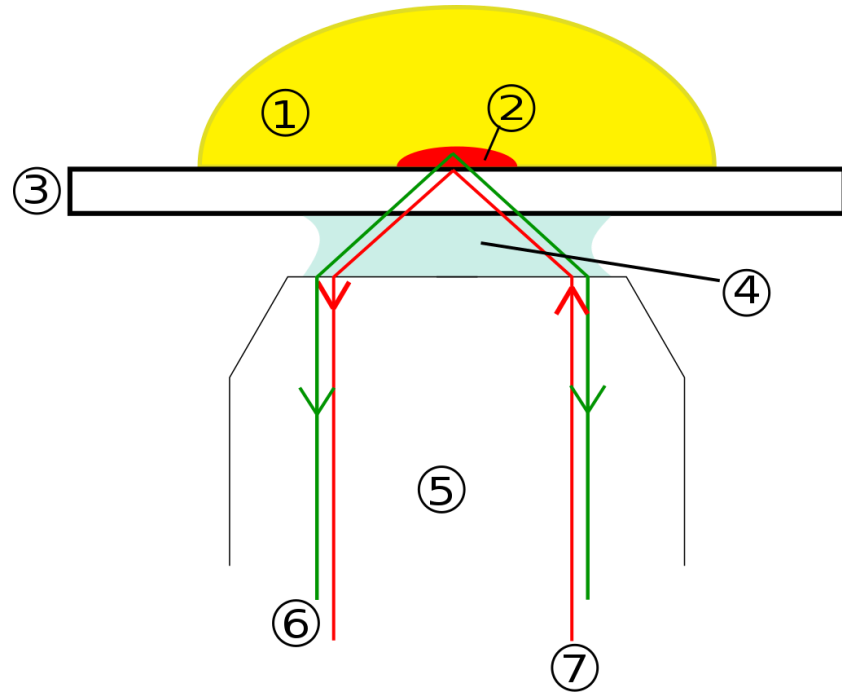
Determinazione del meccanismo del passo della miosina V tramite trappola ottica e microscopia TIRF

La miosina V è un motore processivo che ha un dominio delle catene leggere (il braccio di leva) costituito da 6 motivi IQ (~30 nm) e muove il carico lungo il filamento di actina in step di 37 nm (simili al semiperiodo della doppia elica). Il motore procede in modo rettilineo lungo il filamento di actina. Con sonde spettroscopiche e microscopia TIRF si può discriminare tra i due possibili meccanismi:



Nel meccanismo “un passo dopo l’altro” ogni motore si muove di una distanza doppia (74 nm) del carico. Un fluoroforo posto ad una distanza intermedia nel dominio delle catene leggere mostra l’alternarsi di step di $(37 + 2x) \text{ nm}$ e step di $(37 - 2x) \text{ nm}$, dove x è la distanza del fluoroforo dallo stelo. Nell’esperimento $x = 7 \text{ nm}$. I passi di 74 nm sono dovuti alla mancata di risoluzione di due passi successivi.

Total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM)

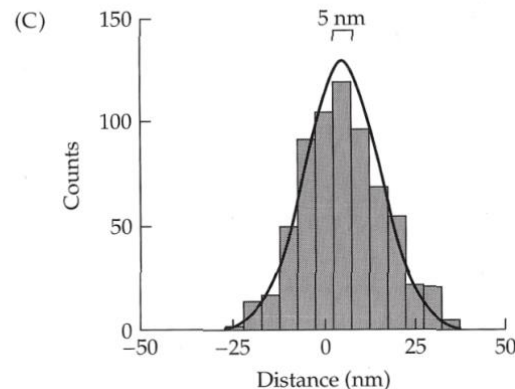
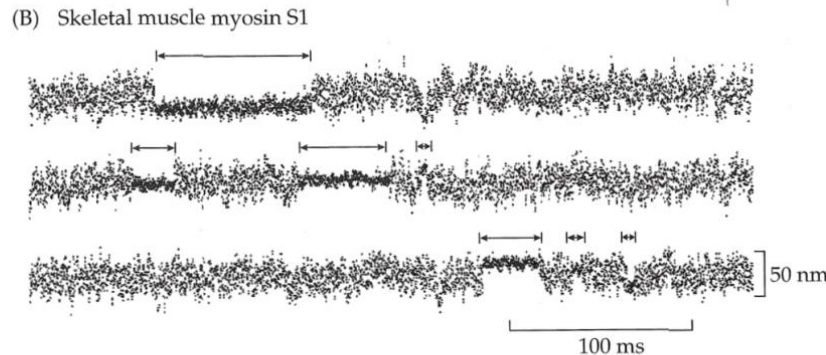
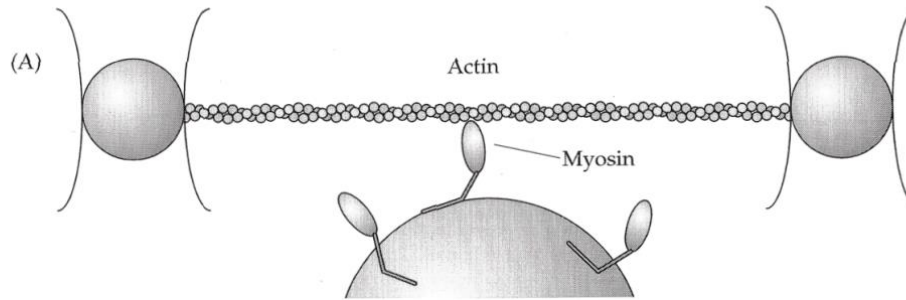


1. Specimen
2. Evanescent wave range
3. Cover slip
4. Immersion oil
5. Objective
6. Emission beam (signal)
7. Excitation beam

Only motors within the evanescent field (those interacting with the track) are excited and emit the fluorescent signal

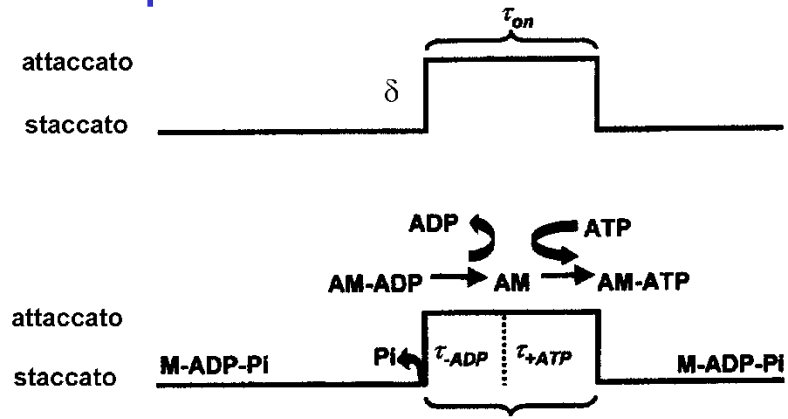
Misure di singola molecola sulla miosina muscolare

Saggio con tre biglie (Three Bead Assay)



- Le interazioni actina-miosina sono rivelate dalla riduzione del moto browniano del complesso actina-biglia (dovuto all'aumento della rigidità del sistema in seguito all'attacco della miosina all'actina). La distribuzione della posizione media durante l'attacco è gaussiana, con un centro spostato dal centro della gaussiana durante il distacco di una distanza (δ) di 5 nm. δ rappresenta la distanza di scorrimento indotto dall'azione del motore. (**step di lunghezza**)
- Con [ATP] fisiologico (≥ 2 mM) e nelle condizioni di alta cedevolezza (basso carico) del saggio le interazioni della miosina II sono troppo rapide per la risoluzione temporale del sistema. Per rilevarle:
 1. la **durata delle interazioni** è aumentata riducendo la concentrazione dell'ATP (< 0.1 mM).
 2. La cedevolezza della trappola è ridotta usando come segnale a feedback la posizione della biglia

TBA: Analisi dell'ampiezza e della durata dello step di lunghezza



La **durata dello step** (τ_{on}) è il risultato della somma di due processi, la liberazione dell'ADP (con una costante di tempo τ_{ADP}) e la formazione del legame con l'ATP (con una costante di tempo τ_{+ATP}):

$\tau_{on} (=1/k_{off}) = \tau_{ADP} + \tau_{+ATP} = 1/k_{ADP} + 1/([ATP] \cdot k_{+ATP})$,

per [ATP] fisiologico (saturante): $k_{off} = k_{ADP}$; infatti in vivo in condizioni fisiologiche $V_0 \propto k_{ADP} (=g_2)$ che è la **costante di velocità per il distacco**

τ_{on} si può aumentare riducendo [ATP]

$\tau_0 (=1/k_{cat})$ è il tempo impiegato da una molecola di miosina per idrolizzare una molecola di ATP (si ricava dalla cinetica in soluzione).

$r (= \tau_{on}/\tau_0)$ esprime la frazione di tempo in cui la miosina è attaccata all'actina rispetto al tempo impiegato per l'idrolisi dell'ATP (**duty ratio**); nella miosina muscolare è estremamente basso (0.05), specie ai bassi carichi di queste misure, comparabili, in situ, con unloaded shortening.

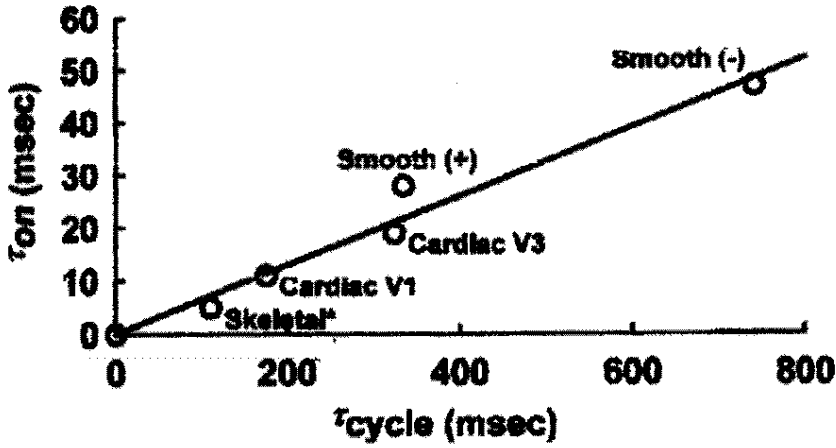
Correlazione tra meccanica e chimica, Barany (1967):

$V_0 \propto k_{cat}$ per tutte le miosine muscolari

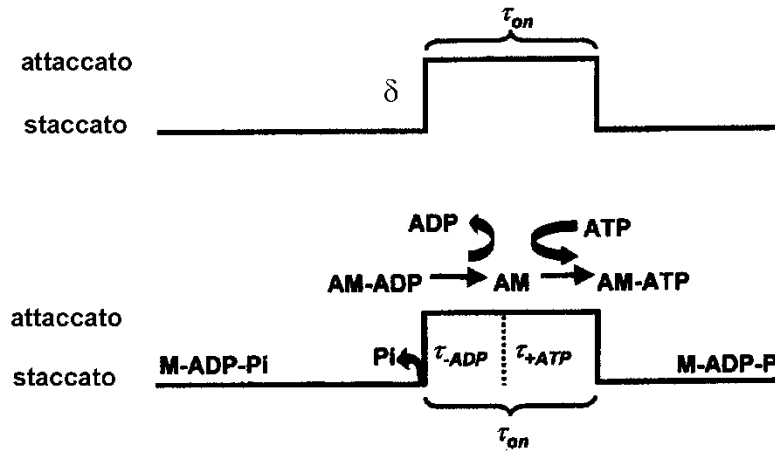
Si può spiegare con il fatto che in una gamma di τ_0 che varia di dieci volte il rapporto τ_{on}/τ_0 , il duty ratio, rimane costante (~0.05)

Infatti $V_0 \propto k_{off}$ e $\tau_{on}/\tau_0 = k_{cat}/k_{off} = 0.05$, per cui

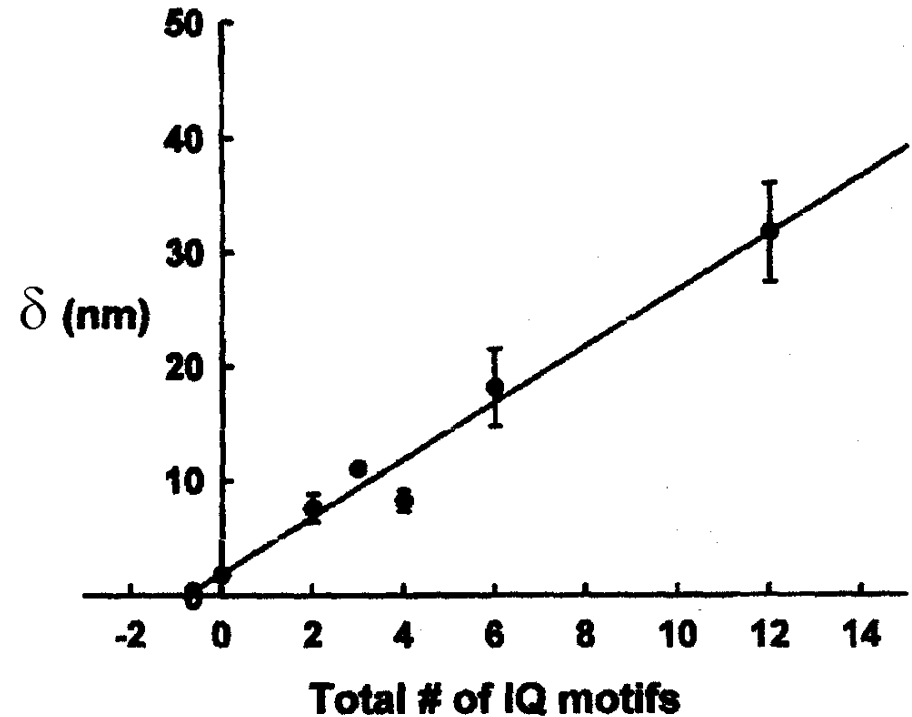
$k_{cat} = 0.05k_{off}$ e $V_0 \propto k_{cat}$



TBA: Analisi dell'ampiezza e della durata dello step di lunghezza

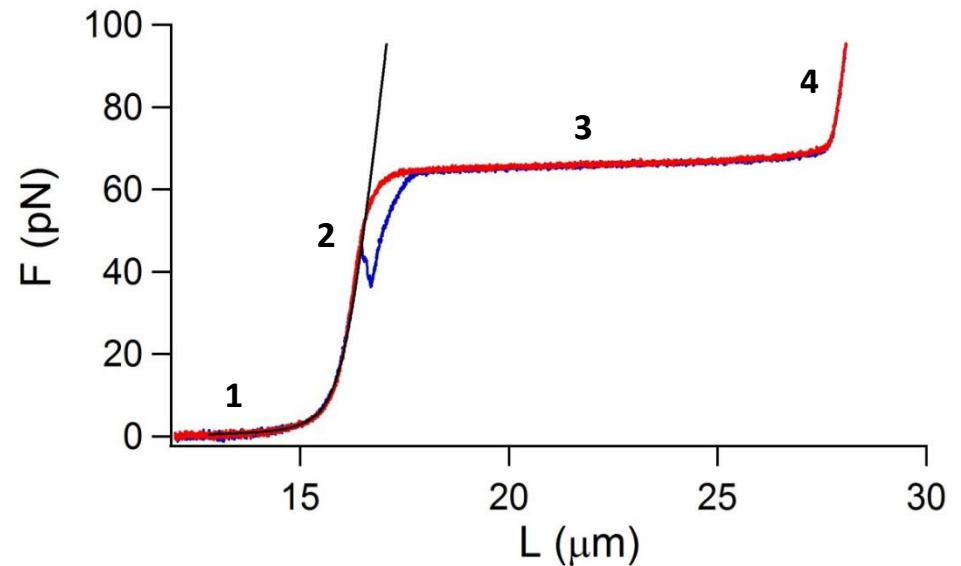
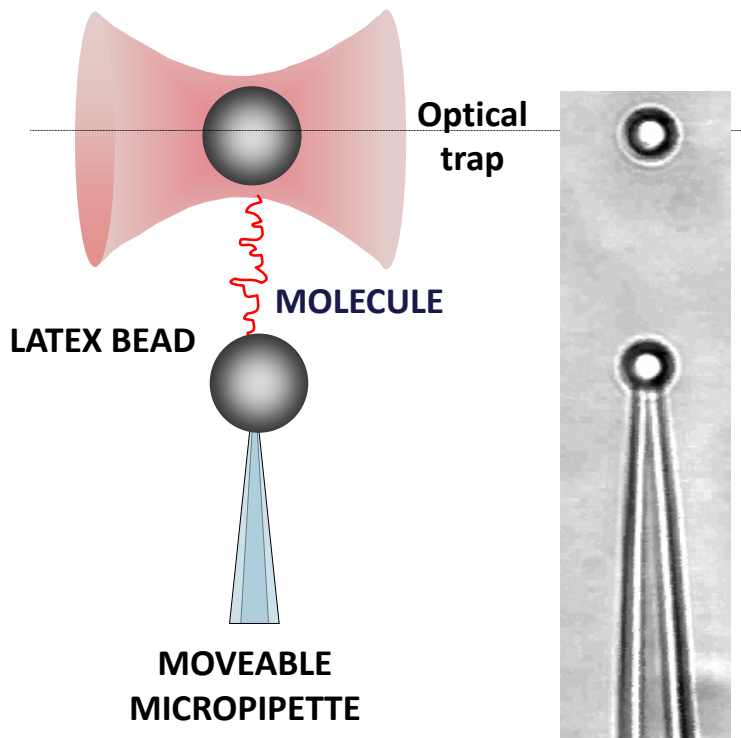


Modificando con la manipolazione genetica il numero di sequenze che iniziano per IQ, si trova una relazione lineare tra **l'ampiezza dello step (δ)** e la lunghezza della leva. Ciò prova che il working stroke è basato sulla rotazione della regione delle catene leggere che funziona da leva.

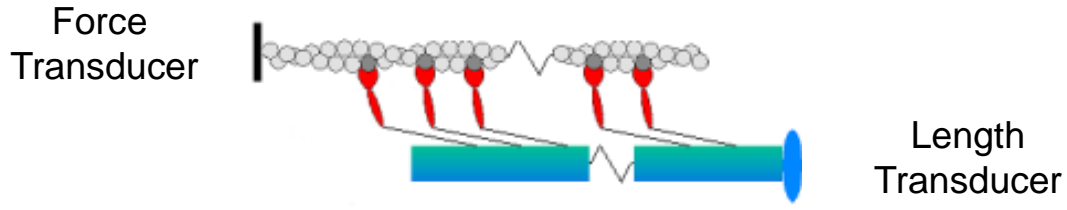


Misure di meccanica in una macchina di sintesi basata sulla miosina muscolare con la trappola ottica a doppio laser

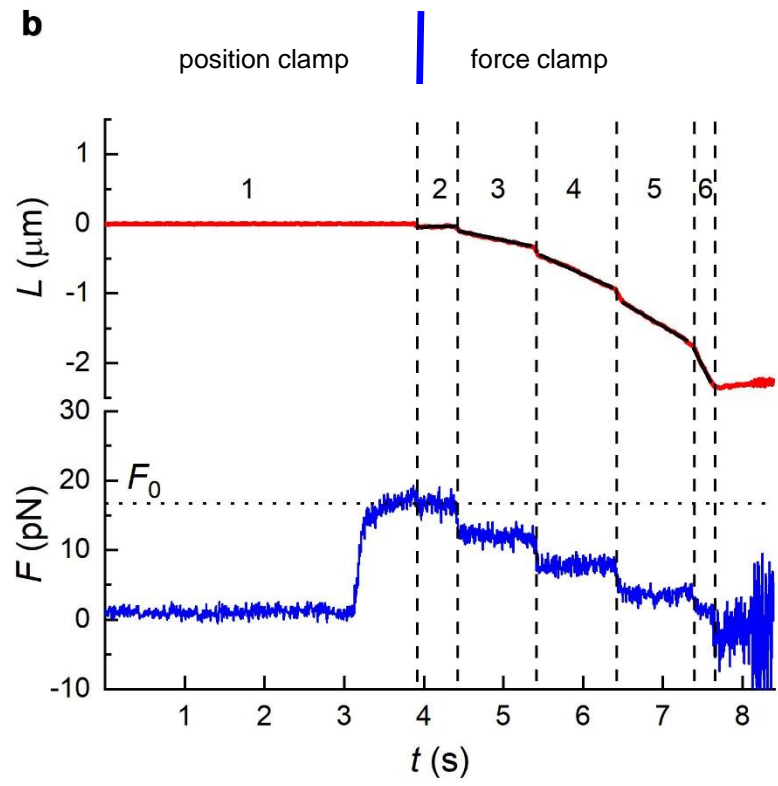
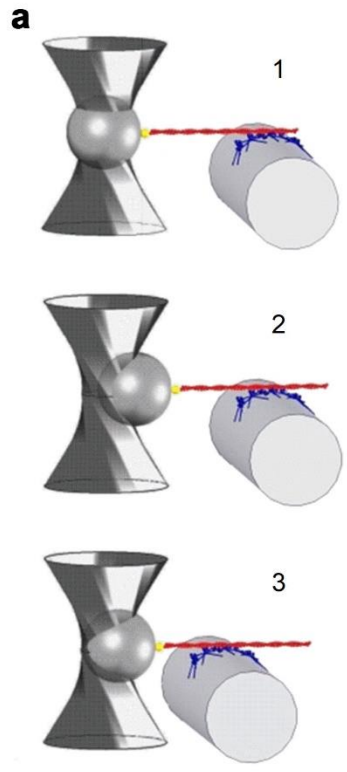
La trappola ottica a doppio laser espande l'ambito dinamico della forza di dieci volte e permette di registrare la dinamica strutturale della transizione di superallungamento del DNA (che avviene a circa 70 pN) o la forza di un motore collettivo basato sulla miosina muscolare



A myosin-based machine able to recover the half-sarcomere processivity



Half-sarcomere mechanics in a single muscle cell



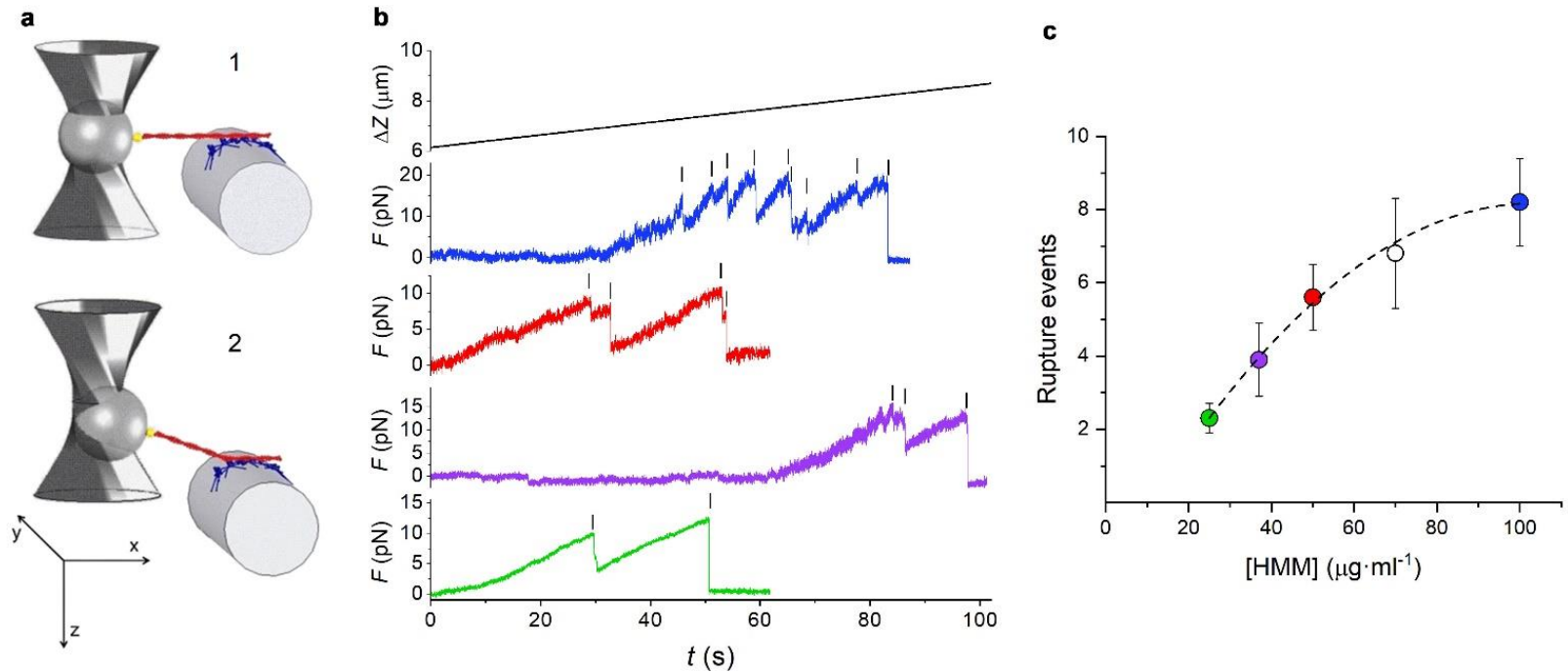
Synthetic one-dimensional machine: an array of myosin motors deposited on a nanostructured surface carried by a three-ways nanopositioner is brought to interact with the actin filament attached with the correct polarity to the trapped bead via gelsolin.

Perfusion solution with with 2 mM ATP:

In **position clamp**, force develops up to a steady maximum value (F_0), as in an **isometric contraction**.

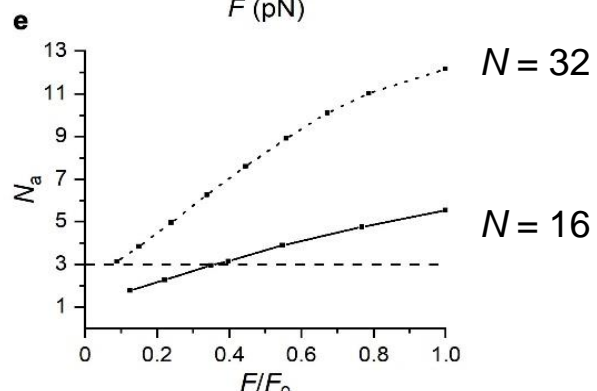
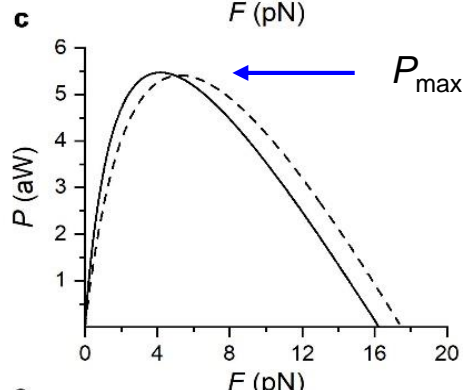
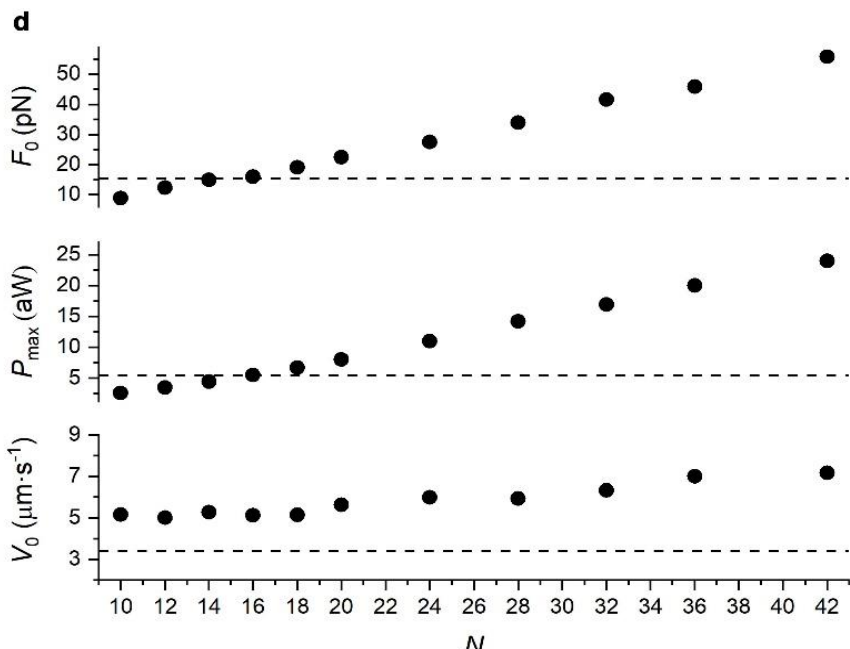
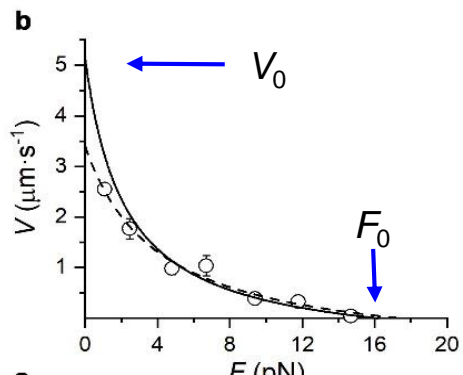
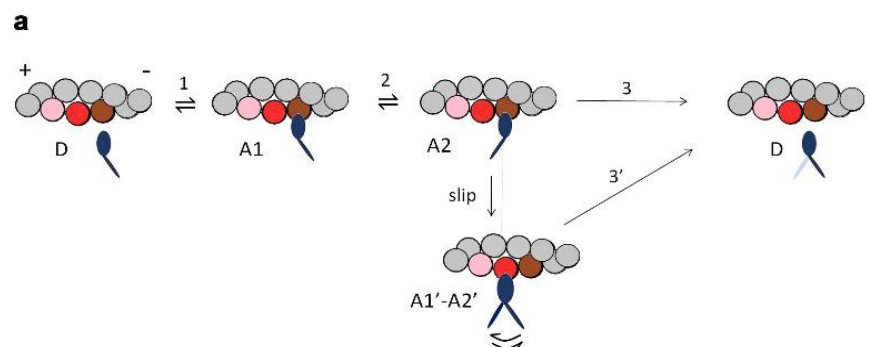
In **force clamp**: steady shortening at velocity dependent on the load (**isotonic contraction**)

Number of available motors estimated from rupture events in rigor



After the actin-myosin bond formation in ATP-free solution, motor support moved away in direction orthogonal to the actin myosin interface to avoid reattachment. Rupture of a bond (=detachment of a HMM dimer) indicated by the abrupt force drop. Number of ruptures increases with [HMM] to a maximum of 8. Thus, assuming that in physiological conditions each motor of a dimer acts independently, the support has 16 motors available for actin interaction.

The experimental F - V and P - F relations and their model simulation

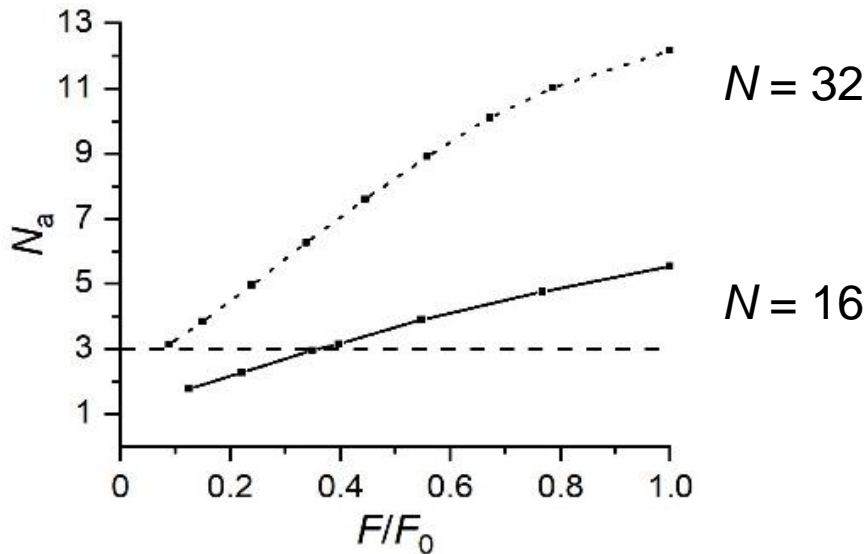
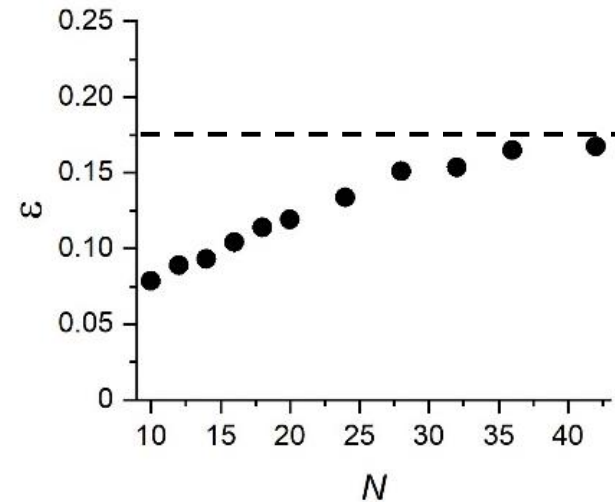


Model predictions

- Two of the three parameters featuring the machine performance (F_0 and P_{max}) are fitted by the model setting the number of available motors (N) to 16.
- With $N = 16$, due to the reduction of duty ratio with V , the number of attached motors (N_a) drops below 3 during shortening against a load of $0.4 F_0$

Model predictions

Considering that the random orientation of the motors reduces the force capability to 0.5 that of the correctly oriented motors, the expected efficiency ε is one half of that of fast mammalian muscle, that is $0.36/2 = 0.18$. The machine with $N=16$ does not get the required efficiency.



The machine with $N = 16$ misses the condition for processivity at $F < 0.4 F_0$. For the machine to get full half-sarcomere efficiency at any load, the number of available motors must be ≥ 32 .

Motori processivi e non processivi

Meccanica ed energetica

La **distanza di scorrimento** del filamento durante un ciclo completo, è :

$$\Delta = V \cdot \tau_0 = V / k_{\text{cat}} .$$

La **distanza dovuta al *working stroke*** è:

$$\delta = V \cdot \tau_{\text{on}} .$$

dato che $\tau_0 = \tau_{\text{on}} / r$ ne deriva: $\Delta = V \cdot \tau_{\text{on}} / r = \delta / r$

→ Δ aumenta riducendo r

Miosina muscolare: $\delta = 10 \text{ nm}$ e $r = 0.05 \rightarrow \Delta = 200 \text{ nm}$.

Chinesina: $\delta = 8 \text{ nm}$ e $r = 0.5 \rightarrow \Delta = 16 \text{ nm}$

$V = \Delta \cdot k_{\text{cat}}$ → aumenta con l'aumento di Δ (riduzione di r) e/o con l'aumento di k_{cat}

Comparative kinetics of molecular motors

Motor	Function	V_F (nm/s)	ATPase <i>in vitro</i> (s ⁻¹)	Δ (V/kcat) (nm)	τ_{on} (ms)	r ($\tau_{on}k_{cat}$)	δ (= $\Delta \cdot r$) (nm)	δ_{oss} (nm)
Miosin								
Miosin I	Ameboid motility, hair cell adaptation	200	6	33				
Miosin II	Fast skeletal muscle	6000	25	240	1	0.025	6	5-10
Miosin II	Smooth muscle	250	1.2	210	25	0.03		
Miosin V	Vescicle transport	350	5	70	100	0.5	35	35
Dynein								
Axonemal	Movement of cilia and sperm	-4500	10	450		0.02	8	
Cytoplasmic	Retrograde axonal transport	-1250	2	625				
Kinesin								
Conventional	Anterograde axonal transport	840	44	19	10	0.44	8.3	8
Nkin	Secretory vescicle transport	1800	78	23				
BimC	Mitotic spindle	60	2	30				

Nei **motori non processivi**, come la miosina muscolare, velocità di scorrimento elevate possono essere raggiunte con bassi valori della velocità di idrolisi dell'ATP grazie al basso valore del *duty ratio*.

Nei **motori processivi** costituiti da dimeri, il *duty ratio* è 0.5 e una velocità di trasporto alta è ottenuta aumentando la velocità di idrolisi dell'ATP (chinesina) o l'ampiezza del passo (miosina V)

Testi consigliati:

J. Howard: Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton.
Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA (2001).

D'Angelo – Peres: Fisiologia: Molecole, cellule e sistemi.
Edi-ermes Milano (2006).

Lecture suggerite:

Pertici et al.: A myosin II nanomachine mimicking the striated muscle.
Nature Communication **9**:3532 (2018).