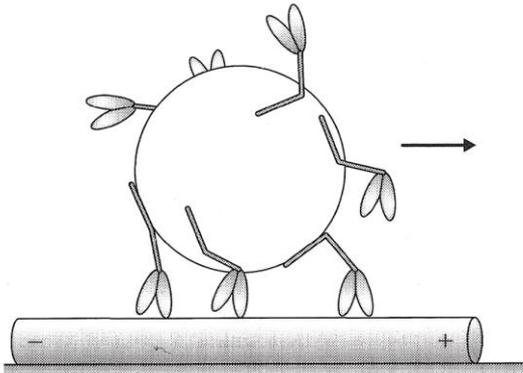


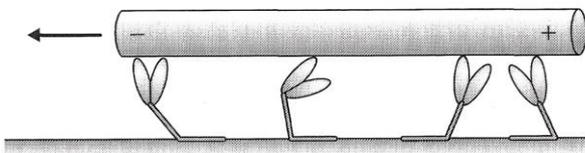
# Misure di meccanica di singola molecola

## 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*

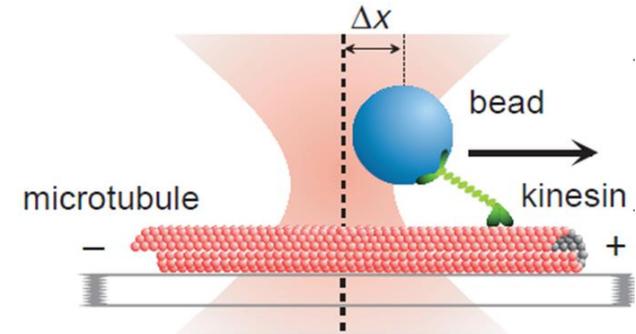


**Gliding assay.** Registrazione dello scorrimento di filamenti di actina, resi visibili con falloidina marcata con rodamina, sulla superficie di un vetrino ricoperta da molecole di miosina

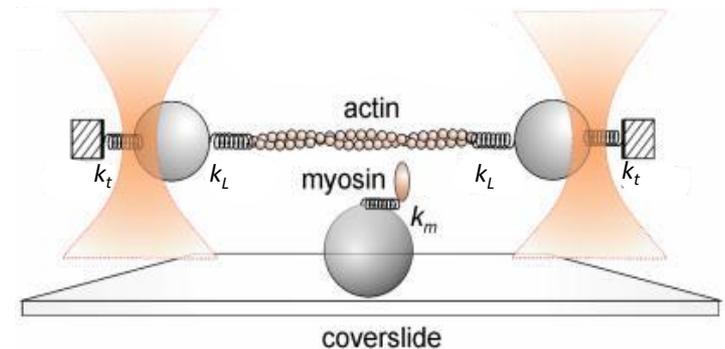


## 2. Meccanica con trappola ottica

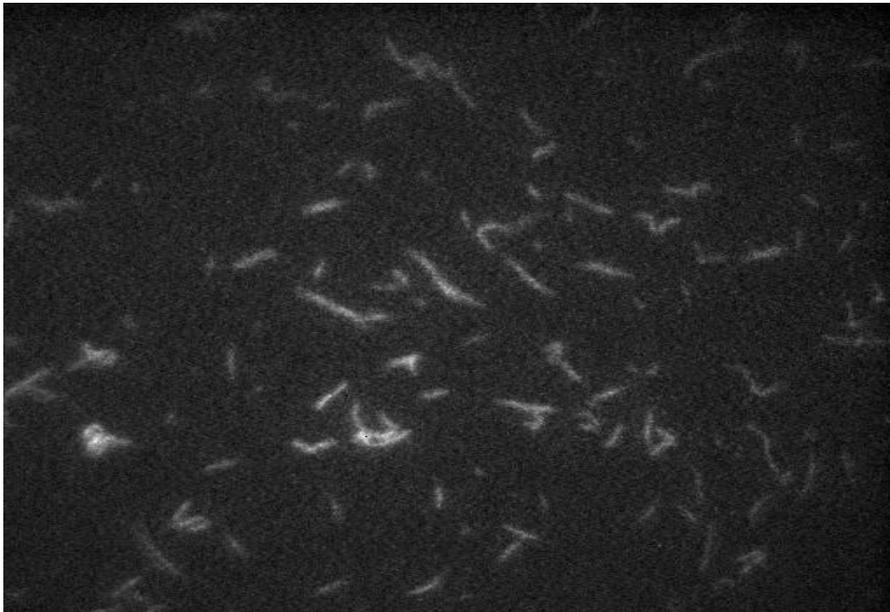
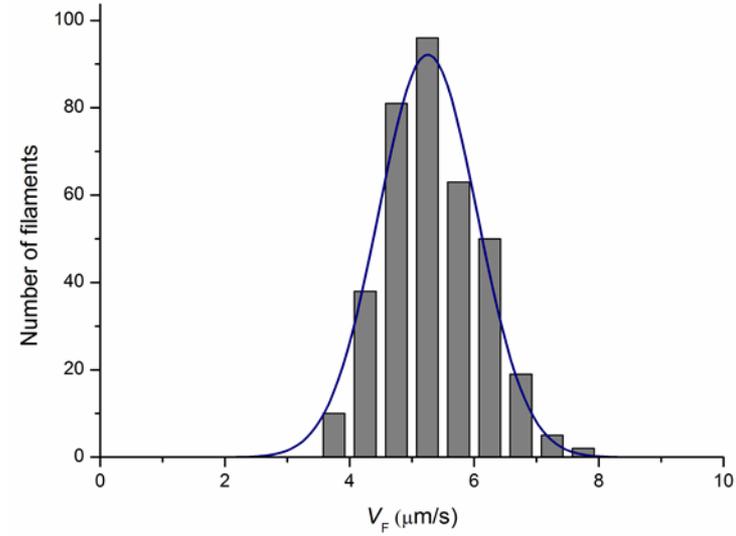
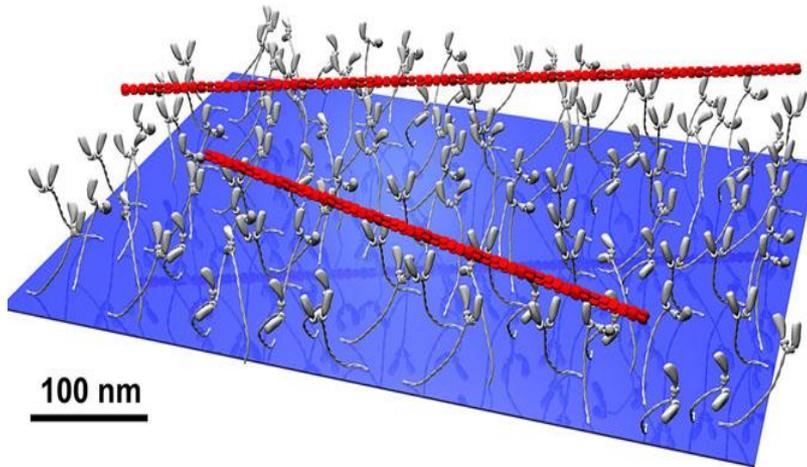
Il sistema sfrutta la forza di intrappolamento che si genera quando su una microbiglia di polistirene (con indice di rifrazione maggiore del mezzo circostante) viene focalizzato un raggio laser. La forza è proporzionale alla distanza dal fuoco del laser ( $\Delta x$ )



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



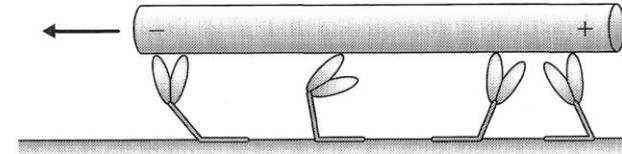
Frog myosin  
(22 °C, pH 7.5,  
[Mg<sup>2+</sup>] 1mM, [MgATP] > 2mM)

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))

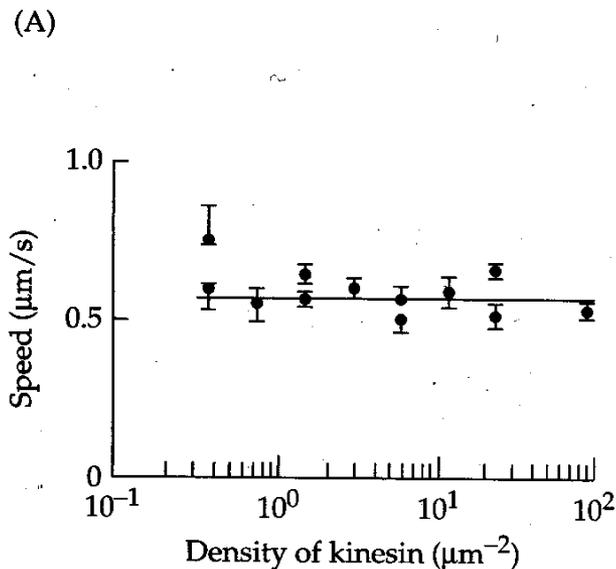
# Tramite IVMA si può definire il grado di processività di un motore molecolare

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  $\mu\text{m}$  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  $\tau_{\text{on}}$ .

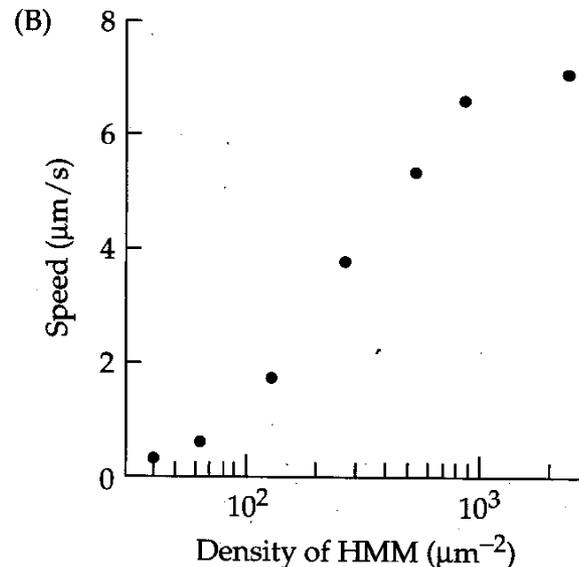
- Chinesine, dineine citoplasmatiche e miosine non sarcomeriche sono motori processivi e operano da sole o in piccoli numeri.
- La miosina muscolare e la dineina assonemica non sono processivi e operano in schiere estremamente numerose



Per la **chinesina**, la velocità del movimento del microtubulo non dipende dal numero di motori che partecipano (il carico è  $<0.2$  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.

# Il grado di processività di un motore dipende dal *Duty Ratio*

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

$$r = \tau_{\text{on}} / (\tau_{\text{on}} + \tau_{\text{off}}) = \text{dove: } (\tau_{\text{on}} + \tau_{\text{off}}) = \tau_0$$

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

$\tau_{\text{on}}$  è il tempo in cui il motore sta attaccato al filamento ed esegue il *working stroke*,

$\tau_{\text{off}}$  è il tempo in cui il motore è staccato e recupera la conformazione iniziale.

$r$  è anche definito come il rapporto tra i motori attaccati e il numero totale di motori a disposizione ( $= n_a/N$ )

Per avere un movimento continuo (**processività**) bisogna che ad ogni tempo almeno un motore sia attaccato. Se i motori lavorano in modo coordinato (come le due porzioni motrici del dimerico della chinesina) il

numero minimo di motori che ci vuole per avere processività ( $N_{\text{min}}$ ) varia con  $r$  secondo la relazione:  $N_{\text{min}} = 1/r$  ( $N_{\text{min}} r = 1$ ). Un dimerico è processivo se  $r \geq 0.5$ .

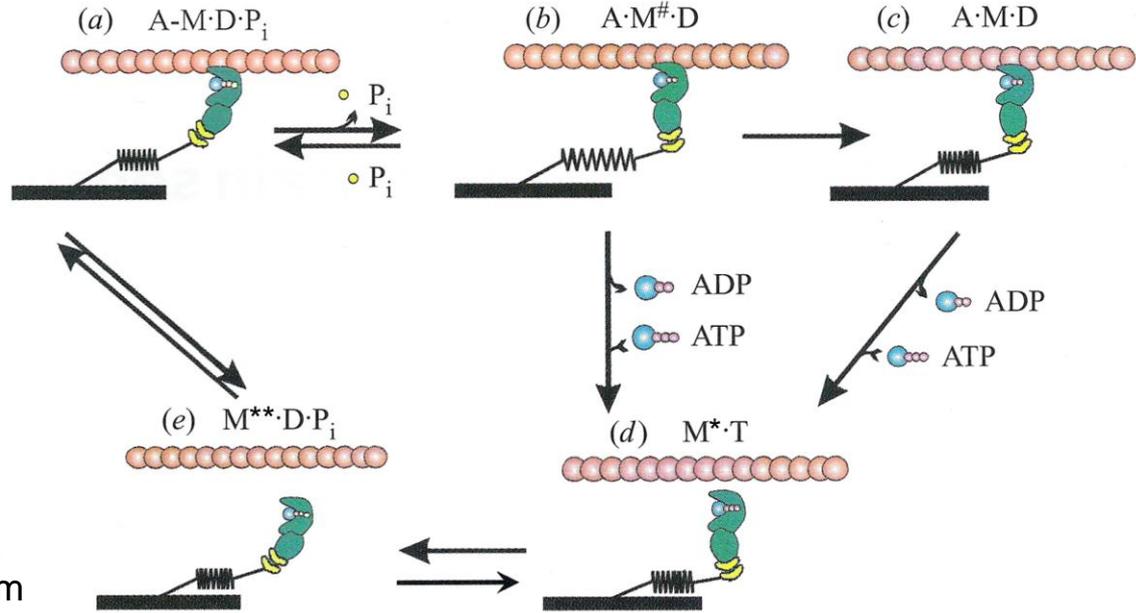
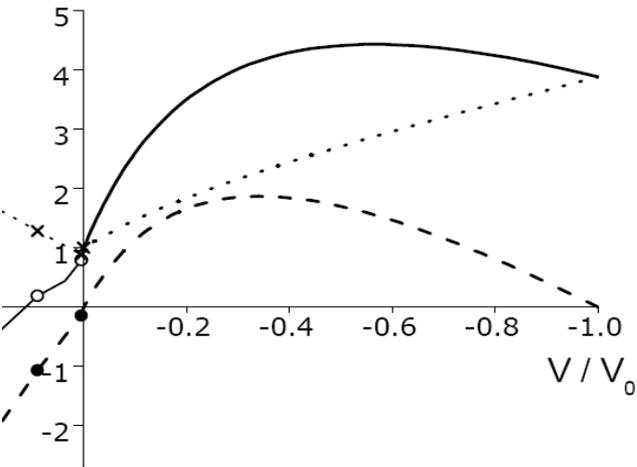
**Chinesina, miosina V e dineina citoplasmatica (dimeri capaci di movimento continuo):  $r = 0.5$**

**Dineina assonemica e miosina II muscolare (lavorano in schiere):  $r \ll 0.5$  (a basso carico come in IVMA)**

- 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  $n_{\text{min}}$  è:  $r \cdot N_{\text{min}} \sim 3$ . Più precisamente la condizione che la velocità di scorrimento è massima quando almeno un motore è attaccato ad ogni tempo è definita dalla relazione  $V = V_0 [1 - (1 - r)^M]$ ;  $V > 0.95 V_0$  quando  $r \cdot N = 3$  (significa che ci devono essere almeno 3 motori attaccati in media perché almeno uno sia attaccato ad ogni tempo).

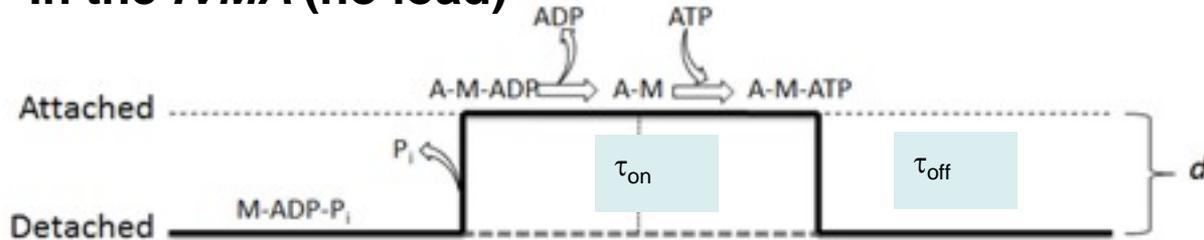
- Nel saggio *in vitro* con motori miosina II con metilcellulosa si mantengono i filamenti di actina a contatto con il letto di miosine e la perdita di processività si misura dalla caduta di  $V$
- sono necessarie almeno 60 teste di miosina perché ci sia movimento continuo di un filamento di actina di  $2 \mu\text{m}$  ( $V > 0.95 V_0$ ), ne deriva  $r = 3/60 = 0.05$ .

# Muscle myosin is a non-processive motor with $r$ dependent on the load



$\tau_0$  and  $\tau_{on}$  decrease with the reduction of the load, but  $\tau_{on}$  decreases more; thus  $r = \tau_{on} / \tau_0$  decreases with the reduction of the load, from  $\sim 0.3$  (isometric contraction) to  $\sim 0.05$  (unloaded contraction)

## In the *IVMA* (no load)



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

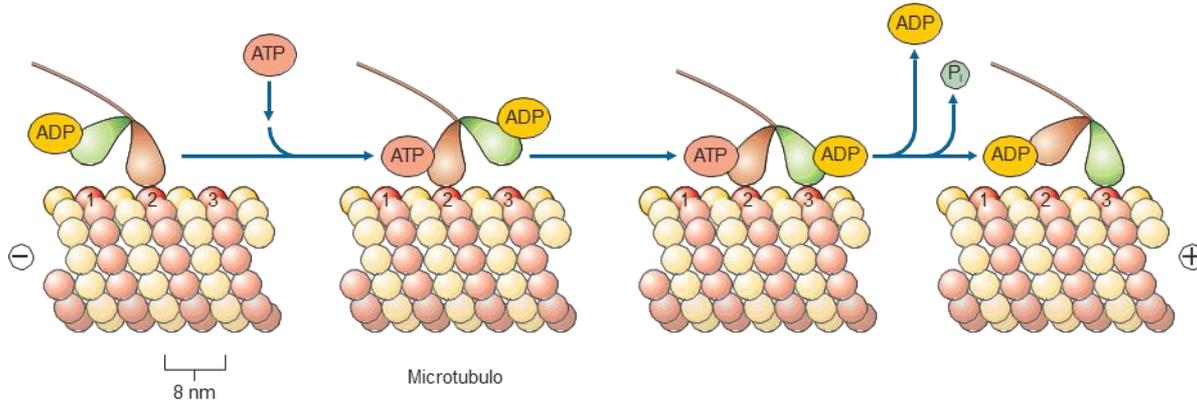
$$r (\text{duty ratio}) = \tau_{on} / \tau_0 = 0.02-0.05$$

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

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

in single molecule experiments the  $[ATP]$  is reduced to increase  $\tau_{on}$  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:

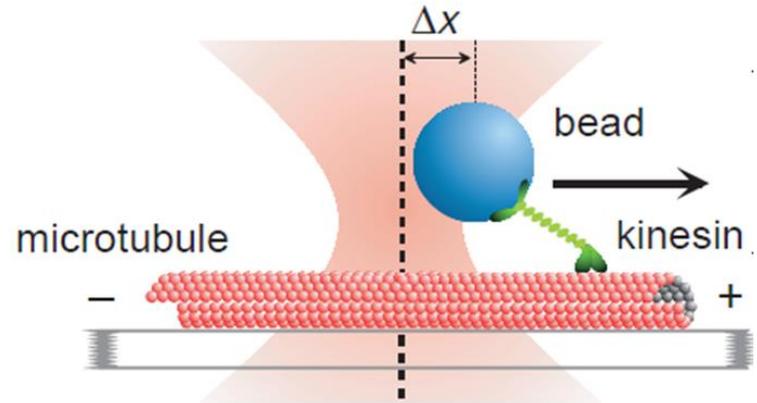
- Hydrolysis in the trailing head, together with the working stroke in the leading head, promotes unbinding of the trailing head from microtubule,
- ATP binding promotes the working stroke in the leading head
- Microtubule binding of the trailing head to the next heterodimer is promoted by the working stroke of the leading head (coordination between heads)
- Microtubule re-binding of the green (now leading) head stabilised by 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

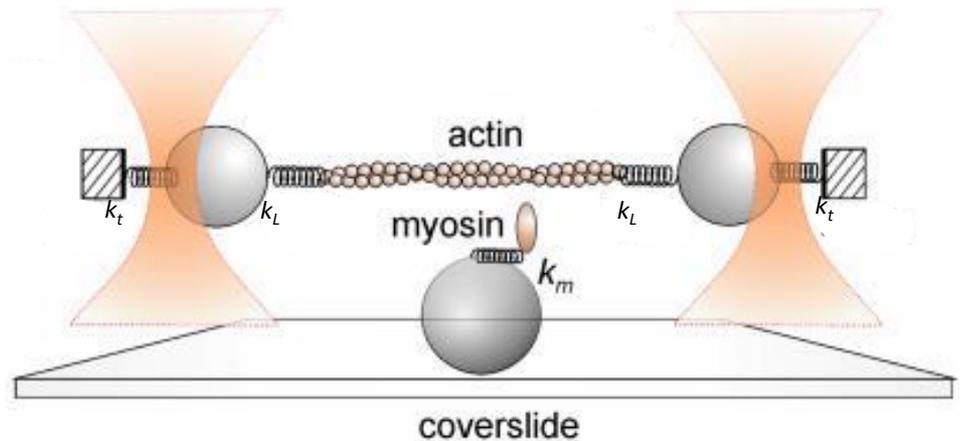
## Motori processivi

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 ( $\Delta x$ )



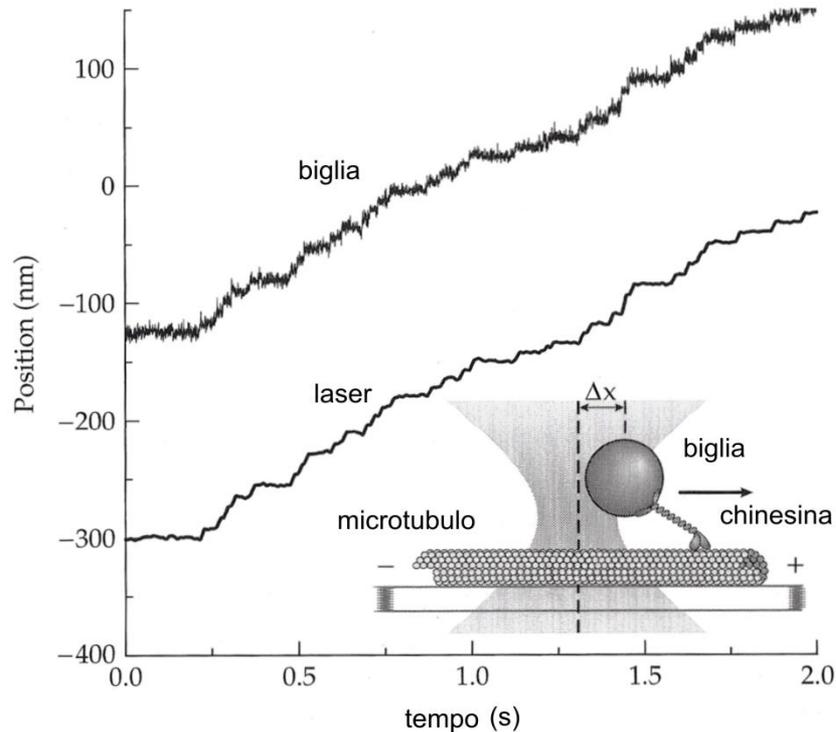
## Motori non processivi

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).

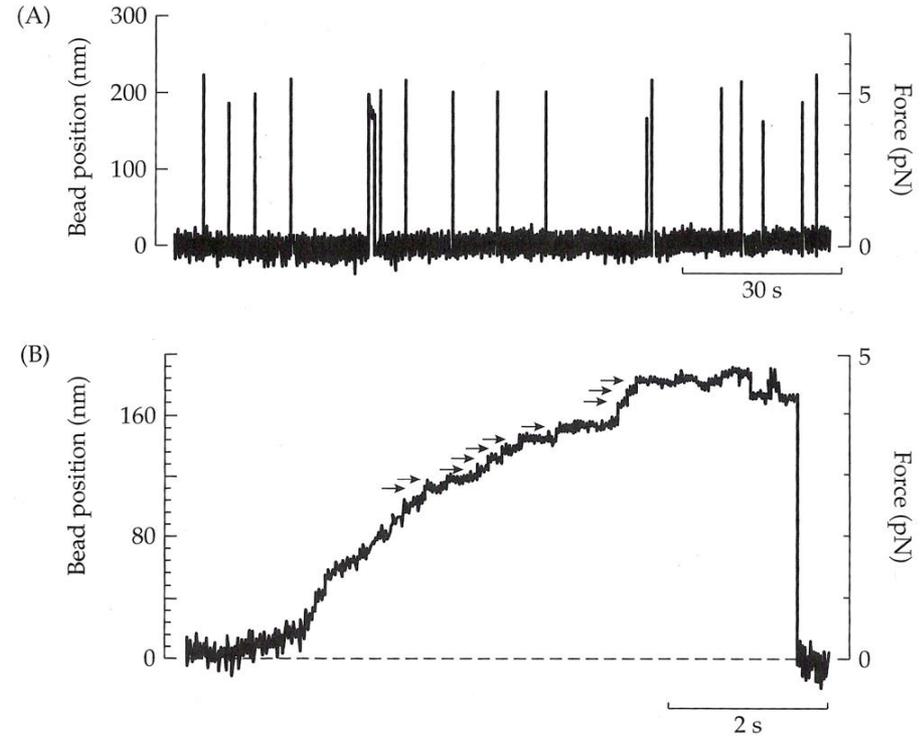


# Misura con la trappola ottica dell'ampiezza dello step di lunghezza e di forza nella chinesina del trasporto assonico

## Registrazione in clamp di forza



## Registrazione in clamp di posizione

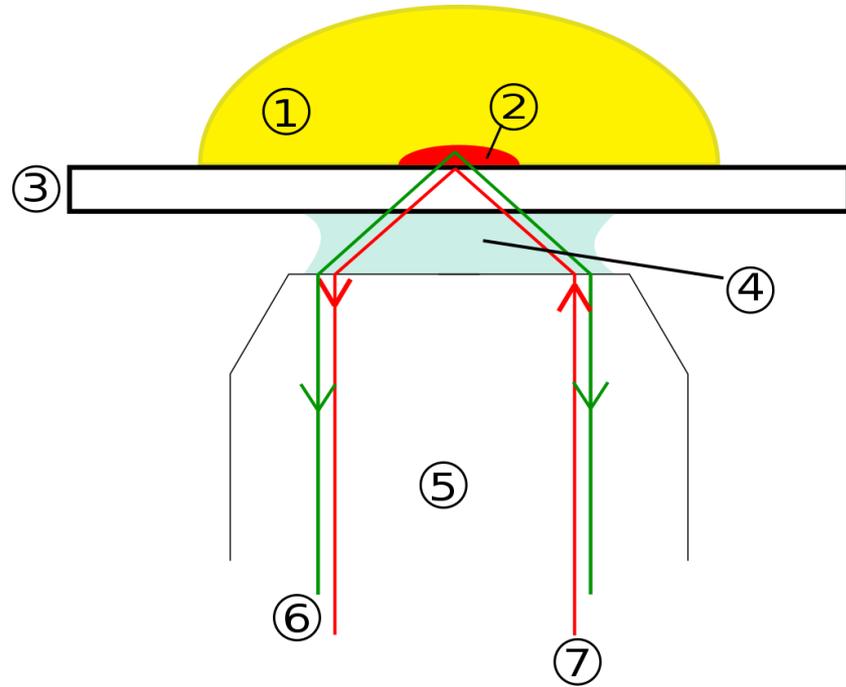


Clamp di forza: La chinesina dimerica si muove procedendo in maniera rettilinea lungo lo stesso protofilamento in step di **8 nm** (corrispondenti alla distanza tra dimeri successivi), con le due teste che si alternano alla guida coprendo ognuna una distanza di 16 nm, in modo simile all'avanzamento alternato 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  $48 \text{ zJ}$  ( $\sim \frac{1}{2} \Delta G_{\text{ATP}}$ , simile alla miosina muscolare).

**Average velocity  $\sim 170 \text{ nm/s}$ ; Max power  $\sim 0.17 \mu\text{m/s} \cdot 6 \text{ pN} = 1 \text{ aW}$**

# Total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM)

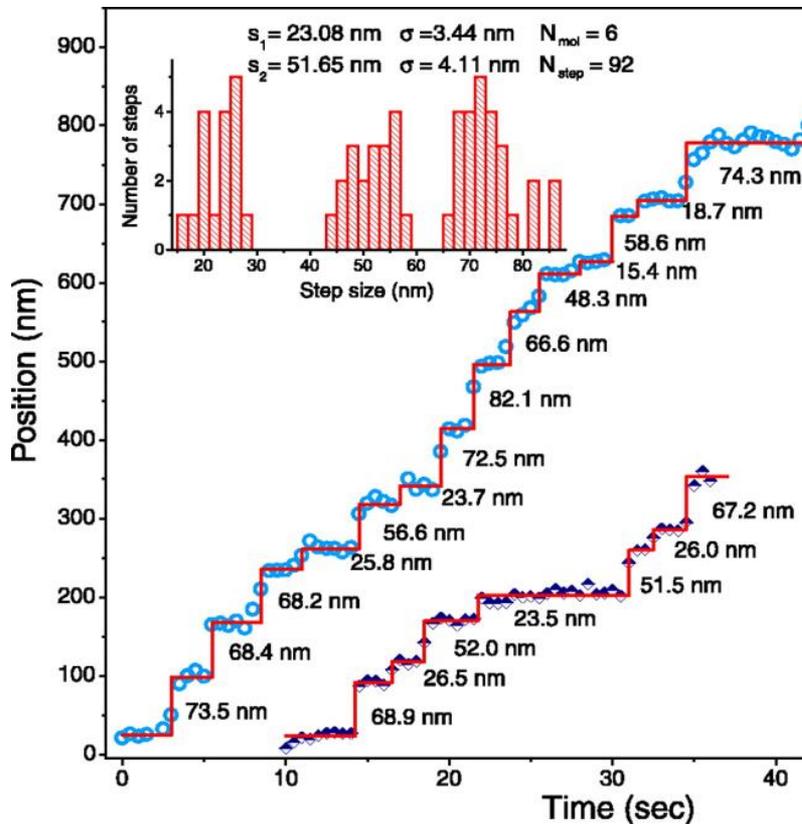
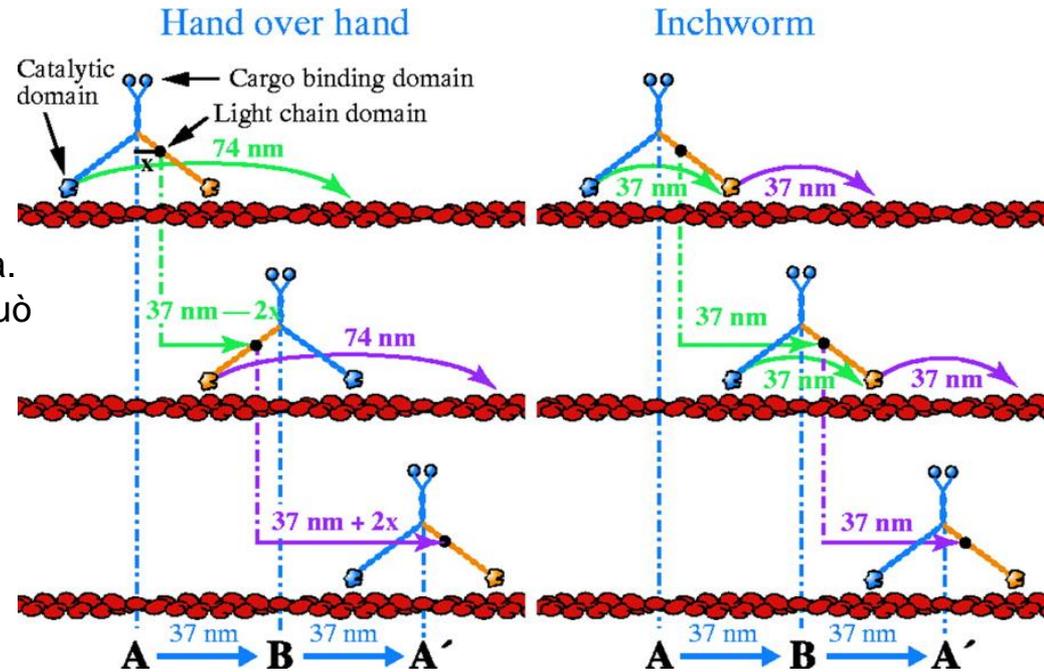


1. Specimen
2. Evanescent wave range
3. Cover slip
4. Immersion oil
5. Objective
6. Emission beam (signal)
7. Excitation beam

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

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

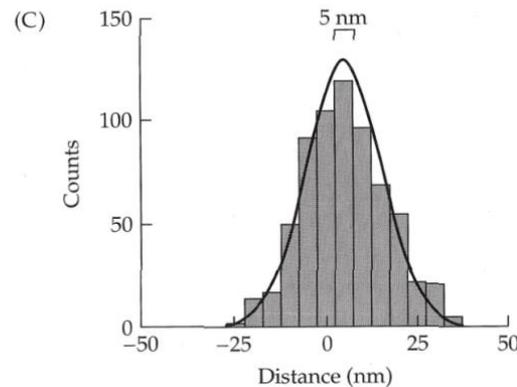
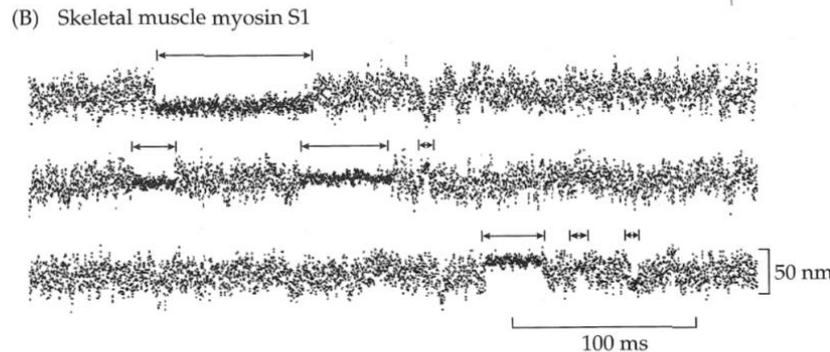
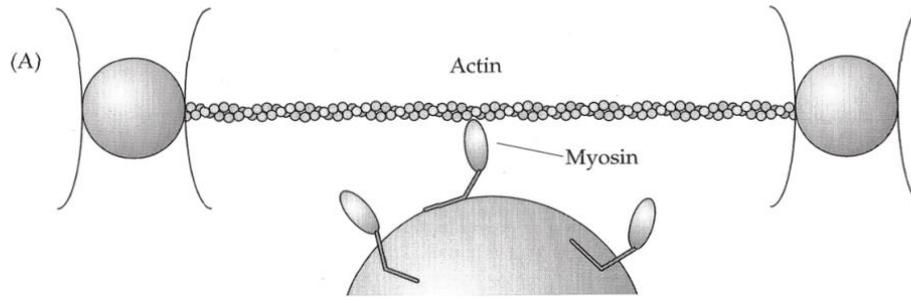
La miosina V è un motore processivo che ha un dominio delle catene leggere (il braccio di leva) costituito da 6 motivi IQ (~30 nm) e muove il carico lungo il filamento di actina in step di 37 nm (simili al semiperiodo della doppia elica). Il motore procede in modo rettilineo lungo il filamento di actina. 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  $(37 + 2x)$  nm e step di  $(37 - 2x)$  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.  
**Average velocity ~20 nm/s**

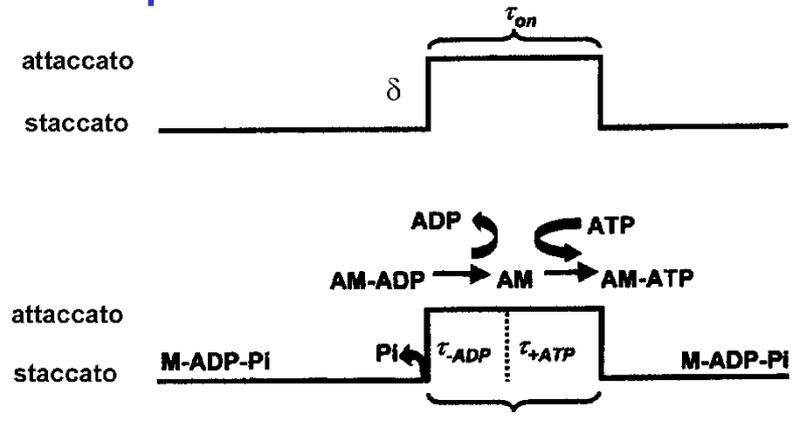
# Misure di singola molecola sulla miosina muscolare

## 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 ( $\delta$ ) di 5 nm.  $\delta$  rappresenta la distanza di scorrimento indotto dall'azione del motore. (**step di lunghezza**)
- Con [ATP] fisiologico ( $\geq 2$  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

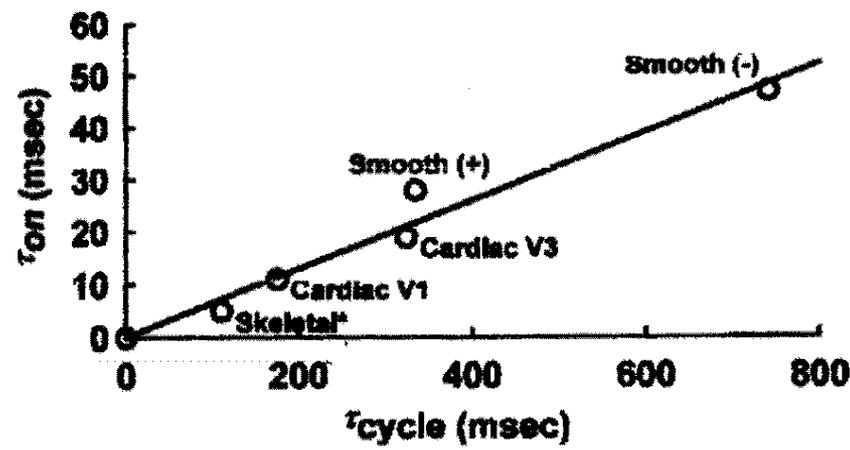


La **durata dello step** ( $\tau_{on}$ ) è il risultato della somma di due processi, la liberazione dell'ADP (con una costante di tempo  $\tau_{ADP}$ ) e la formazione del legame con l'ATP (con una costante di tempo  $\tau_{+ATP}$ ):

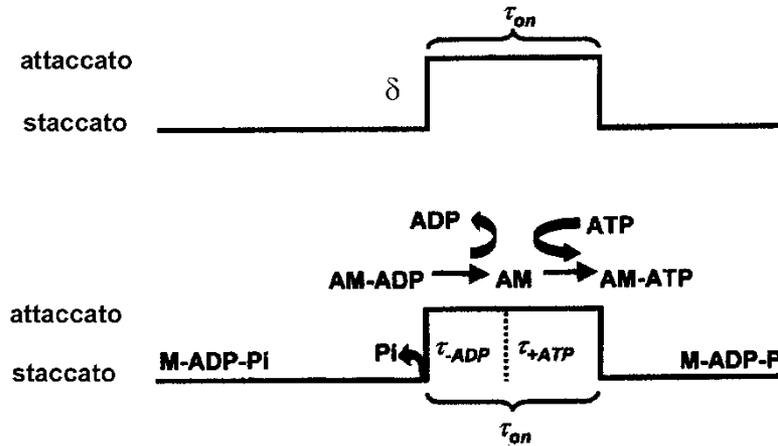
- $\tau_{on} (=1/k_{off}) = \tau_{ADP} + \tau_{+ATP} = 1/k_{ADP} + 1/([ATP] \cdot k_{+ATP})$ ,  
 per [ATP] fisiologico (saturante):  $k_{off} = k_{ADP}$ ; infatti in vivo in condizioni fisiologiche  $V_0 \propto g_2 (= k_{ADP})$  **che è la costante di velocità per il distacco**.  $\tau_{on}$  si può aumentare riducendo [ATP] perché  $\tau_{+ATP} = 1/([ATP] \cdot k_{+ATP})$
- $\tau_0 (=1/k_{cat})$  è il tempo impiegato da una molecola di miosina per idrolizzare una molecola di ATP (si ricava dalla cinetica in soluzione).
- $r (= \tau_{on}/\tau_0)$  nella miosina muscolare ai bassi carichi di queste misure (dovute alla cedevolezza della trappola  $\sim 5\text{nm/pN}$ ) è estremamente basso (0.05), comparabile con unloaded shortening in situ,

## 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  $\tau_0$  che varia di dieci volte, il rapporto  $\tau_{on}/\tau_0$ , **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 ( $\delta$ )** e la lunghezza della leva. Ciò prova che il working stroke è basato sulla rotazione della regione delle catene leggere che funziona da leva.

