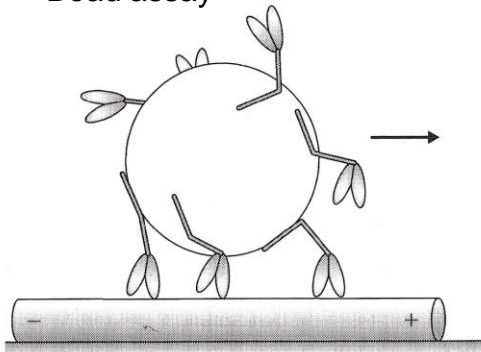


Contrazione muscolare e motilità cellulare

Proprietà dovute all'azione di **motori molecolari**, proteine che convertono l'energia libera dell'idrolisi dell'ATP in lavoro e calore, agendo su **supporti filamentosi** che funzionano da binario.

Bead assay



Motilità cellulare

motore molecolare:

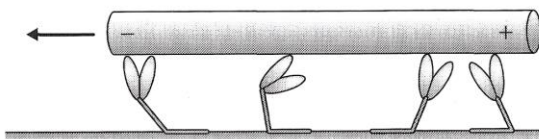
miosine non muscolari,
dineine, chinesine

supporto:

filamenti di actina, microtubuli

- Endocitosi, esocitosi, traslocazione e crescita cellulare, movimento delle ciglia e dei flagelli negli eucarioti, divisione cellulare.
- Posizionamento di strutture subcellulari, trasporto di sostanze e organuli (trasporto assonico), formazione del fuso mitotico.

Gliding assay



Contrazione muscolare

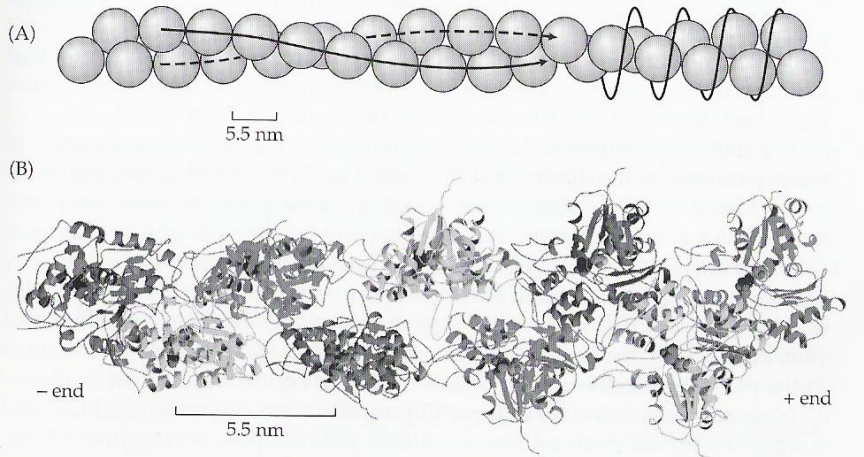
motore molecolare:

miosina di classe II in schiera

supporto:

filamenti di actina

Struttura dei supporti



Filamento di actina

Polimerizzazione di una proteina globulare (G actina, $d = 5.5 \text{ nm}$) in una singola elica sinistrorsa (ruota in senso antiorario) con rotazione per monomero di 166° (2.17 monomeri per giro, passo dell'elica 5.9 nm , 2.75 nm per monomero).

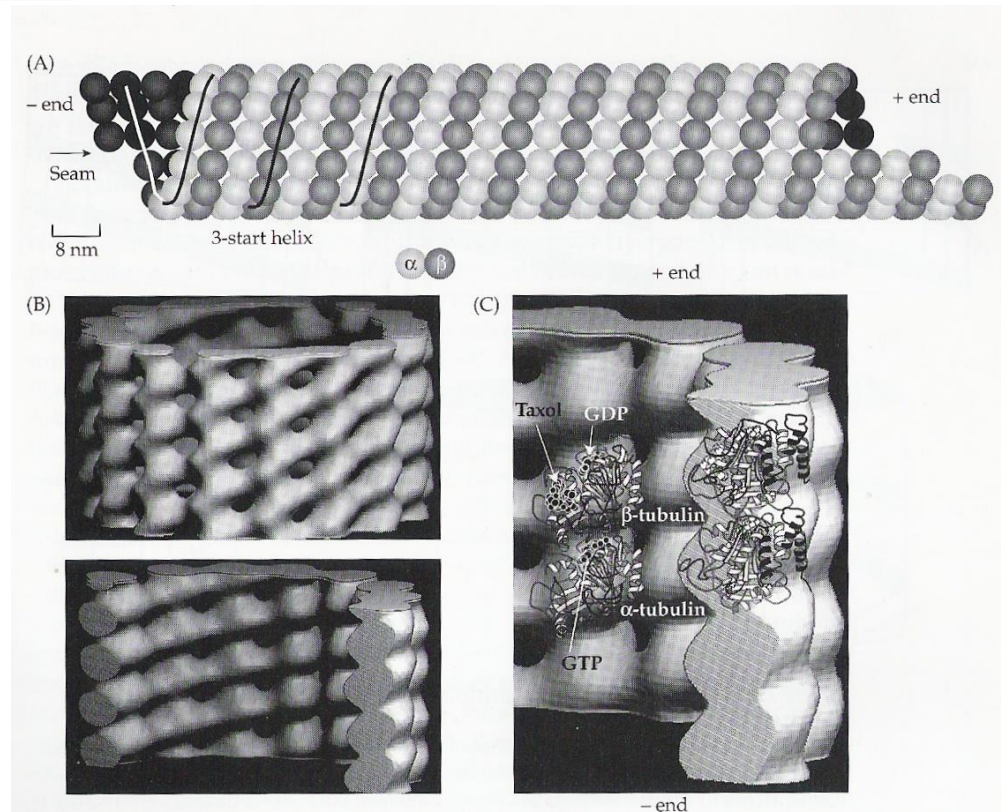
Apparenza globale: doppia elica destrorsa con passo $\sim 72 \text{ nm}$ (13 monomeri per passo dell'elica, 5.5 nm per monomero). Monomeri con lo stesso azimut ogni 36 nm .

Microtubulo

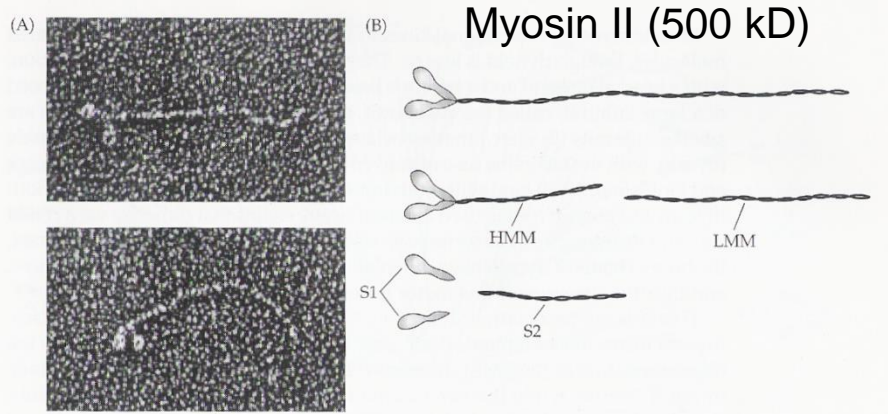
Polimerizzazione di una proteina globulare dimerica ($\alpha\beta$ tubulina, lunghezza: $4 \times 2 = 8 \text{ nm}$) in una triplice elica (mostrata dalle tre linee). Apparenza globale: 13 protofilamenti con periodicit  tra eterodimeri 8 nm .

I monomeri sono asimmetrici per cui i filamenti sono polari: l'estremit  che polimerizza pi  rapidamente   detta + ed   la direzione verso cui si muovono convenzionalmente i motori molecolari (movimento anterogrado):

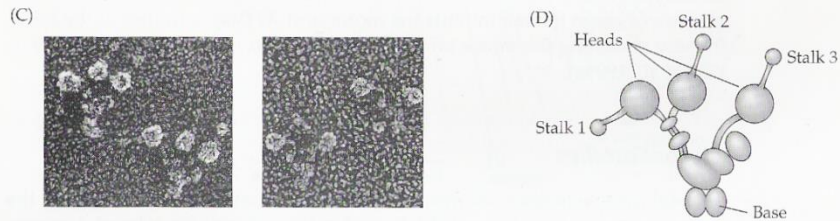
1. Actina, verso la linea Z
2. Microtubulo, verso la periferia della cellula



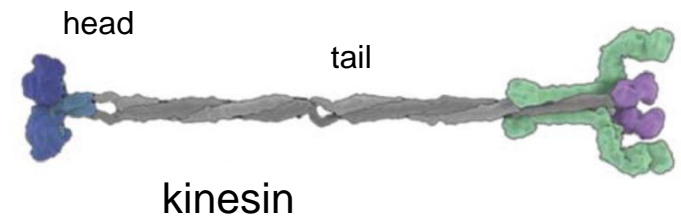
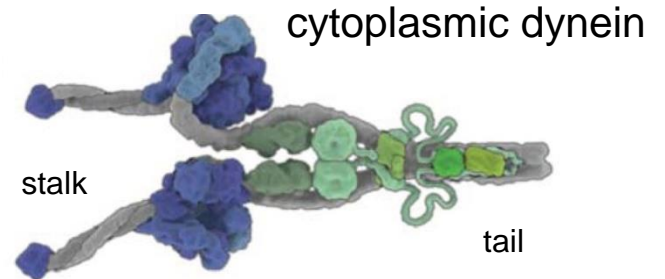
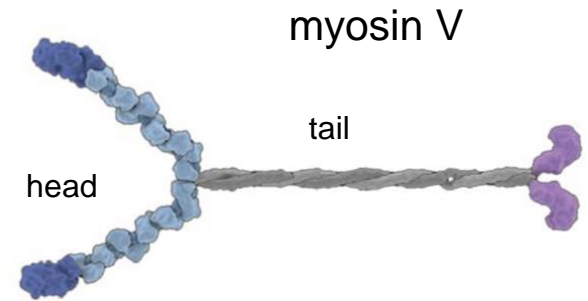
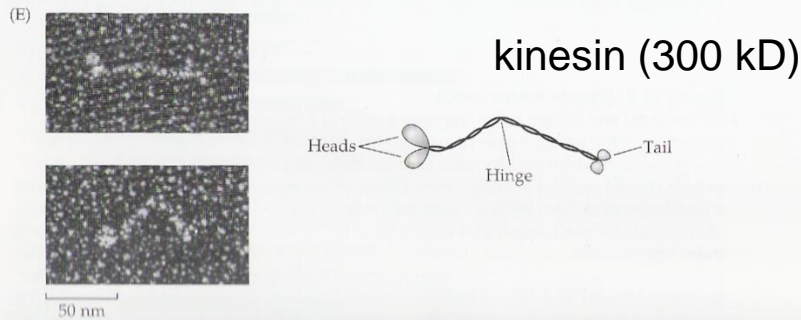
Structure of motors



axonemal dynein (2 MD)

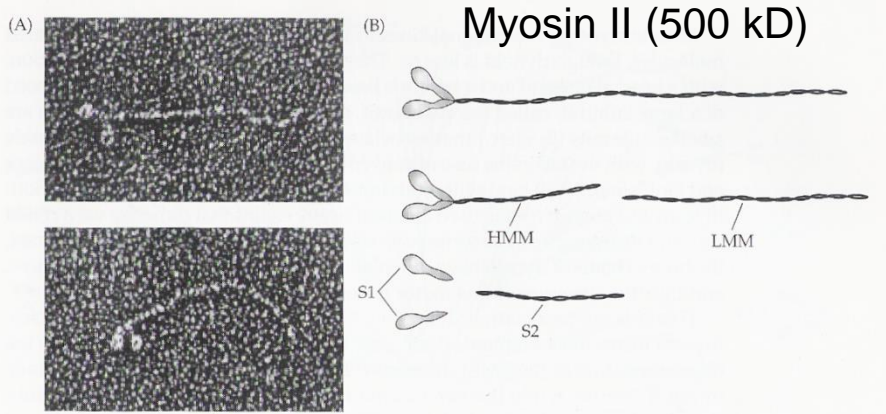


50 nm

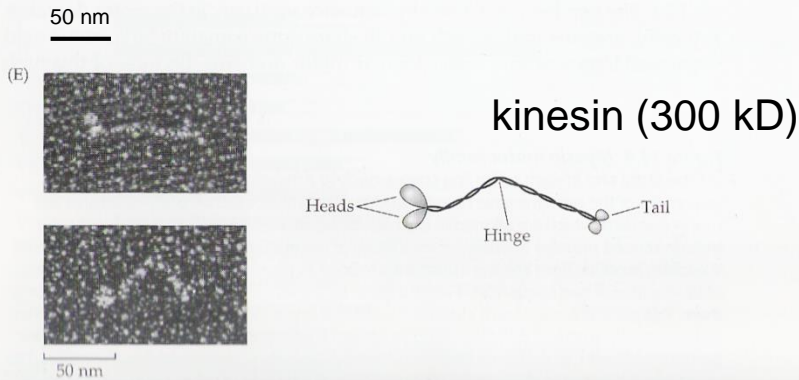
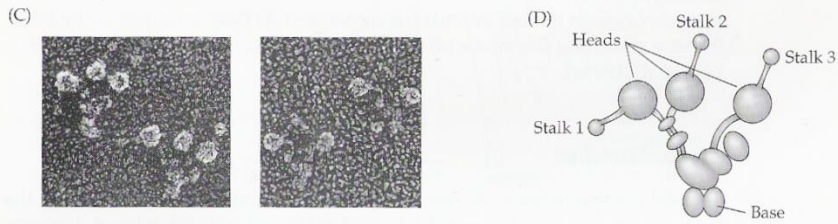


Globular domain (head): motor domain with the catalytic site and the track binding site
Tail: dimerization, binding to cargo; in the muscle myosin II polymerization into the thick filament

Structure of motors

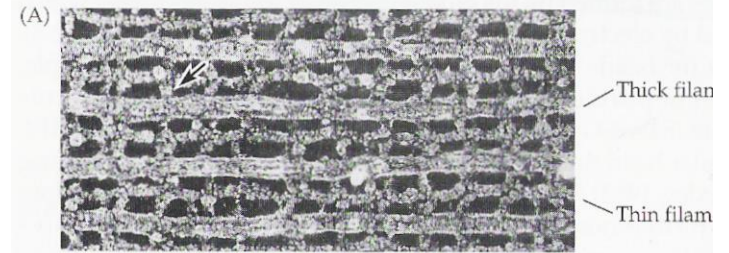


axonemal dynein (2 MD)

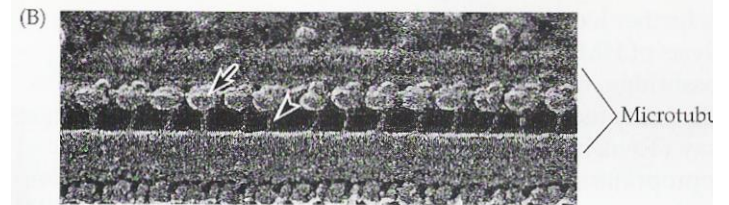


Motor systems

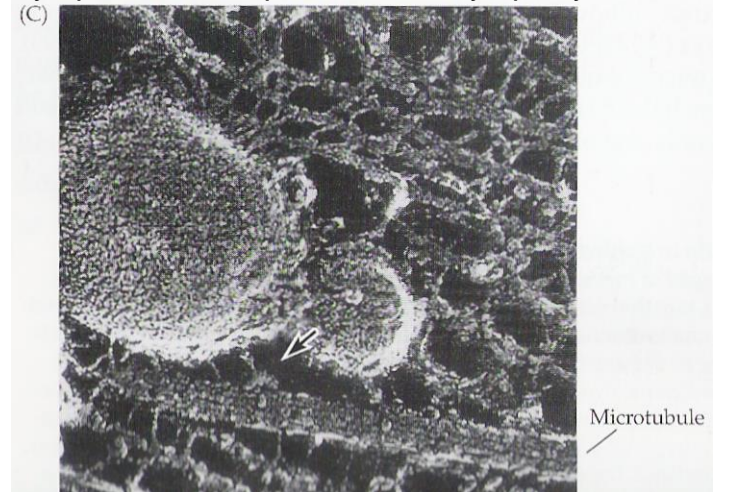
Sarcomere: myosin in array on the thick filament



Axoneme: dynein in array

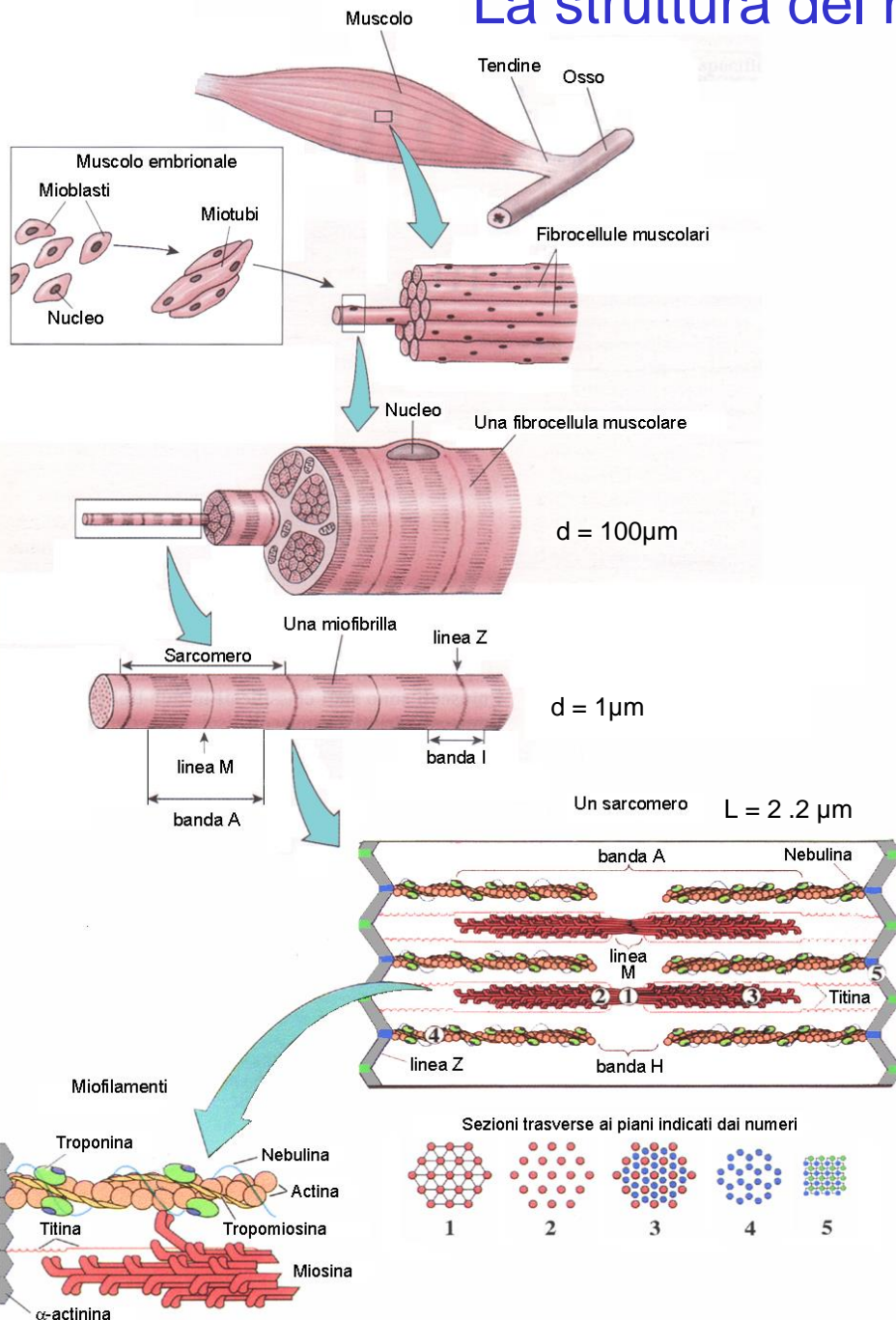


Cytoplasmic transport: kinesin, cytopl. dynein



Globular domain (head): motor domain with the catalytic site and the track binding site
Tail: dimerization, binding to cargo; in the muscle myosin II polymerization into the thick filament

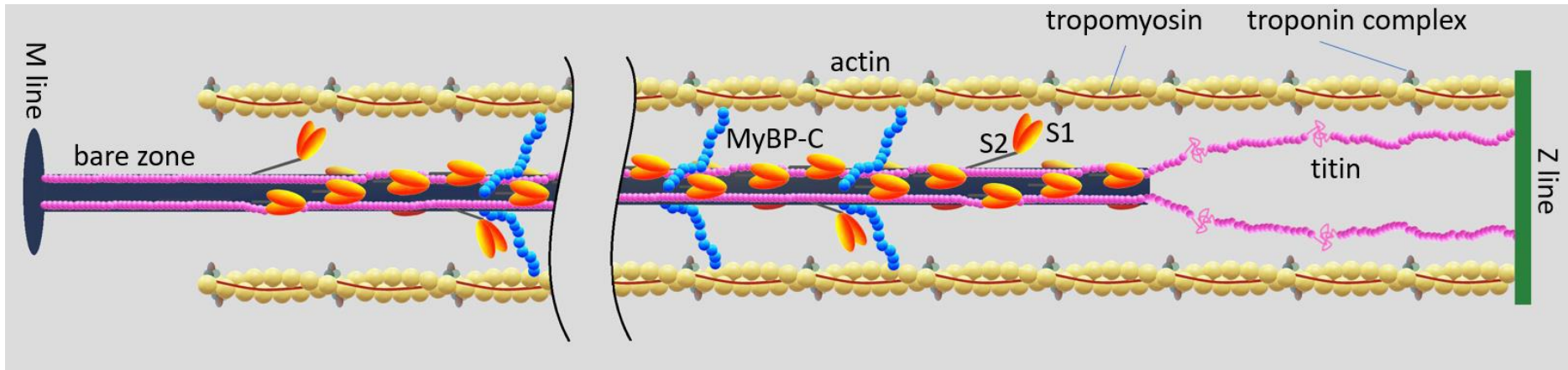
La struttura del muscolo: dal tessuto alle molecole



Principali proteine nella miofibrilla

Proteina	Posizione	PM ($\times 10^{-3}$)	%
Miosina	Filamento spesso	500	44
Actina	Filamento sottile	42	22
Tropomiosina	Filamento sottile	66	5
Troponina	Filamento sottile	70	5
TnC		18	
TnI		21	
TnT		31	
Titina	Dalla linea Z alla linea M	~2000	10
Nebulina	Filamento sottile	700	5
Proteina C	Filamento spesso	135	2
Miomesina	Linea M	170	2
α -actinina	Linea Z	190	2

Proteins in the sarcomere



Contractile proteins

- Actin (Thin filament)
- Myosin (Thick filaments)

Regulatory proteins

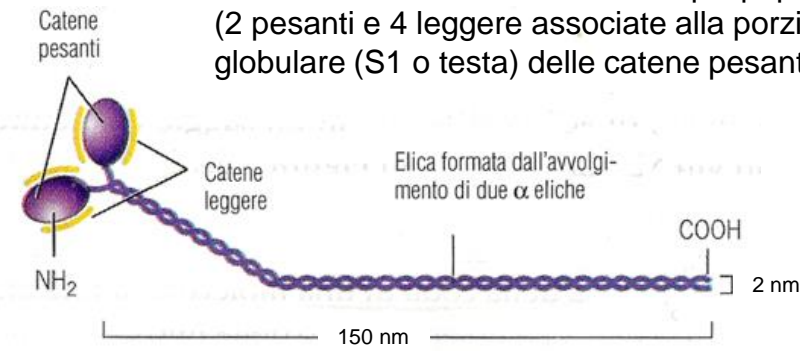
- Tropomyosin
- Troponins
- MyBP-C

Cytoskeleton proteins

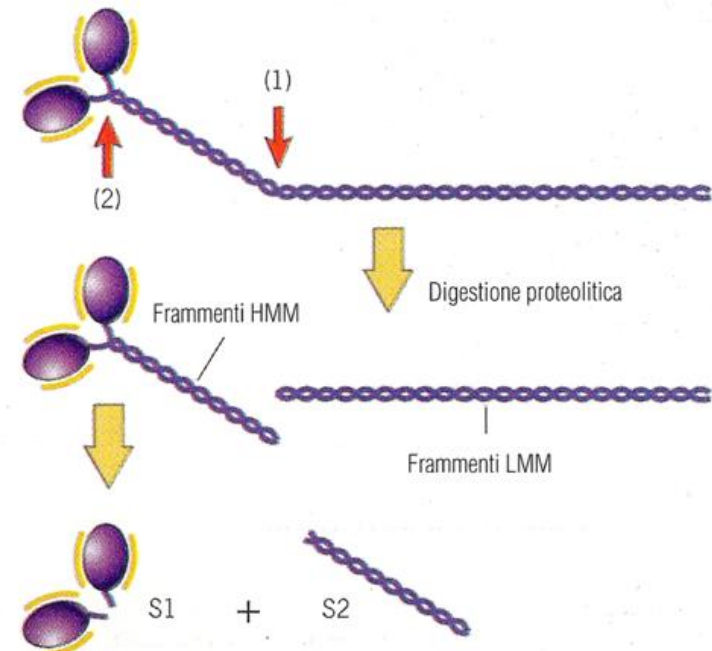
- Titin
- Nebulin
- Myopalladin
- Desmin
- α actinin

Il motore miosinico e la sua organizzazione nel filamento spesso

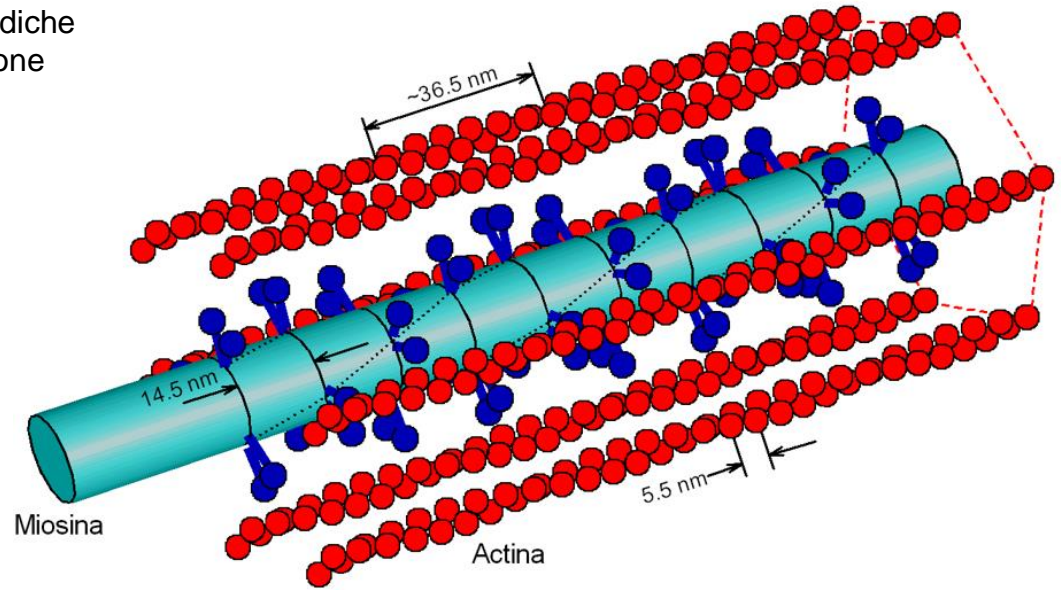
La molecola è fatta da sei catene polipeptidiche (2 pesanti e 4 leggere associate alla porzione globulare (S1 o testa) delle catene pesanti)



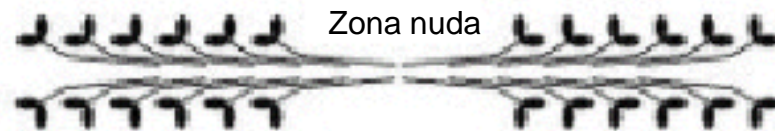
(a)



(b)



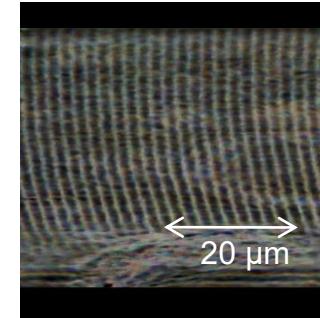
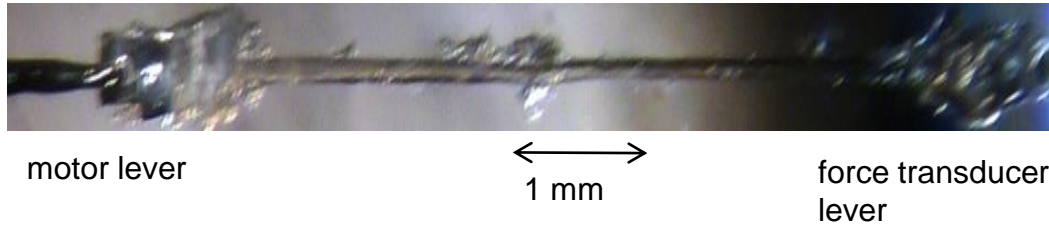
Le porzioni S1 (teste della miosina) emergono in corone di tre paia ogni 14.5 nm . Corone successive sono ruotate di 40°, così da formare una struttura elicoidale con periodo 43 nm. Ci sono 49 corone per emifilamento e quindi un numero totale di 294 motori per emifilamento.



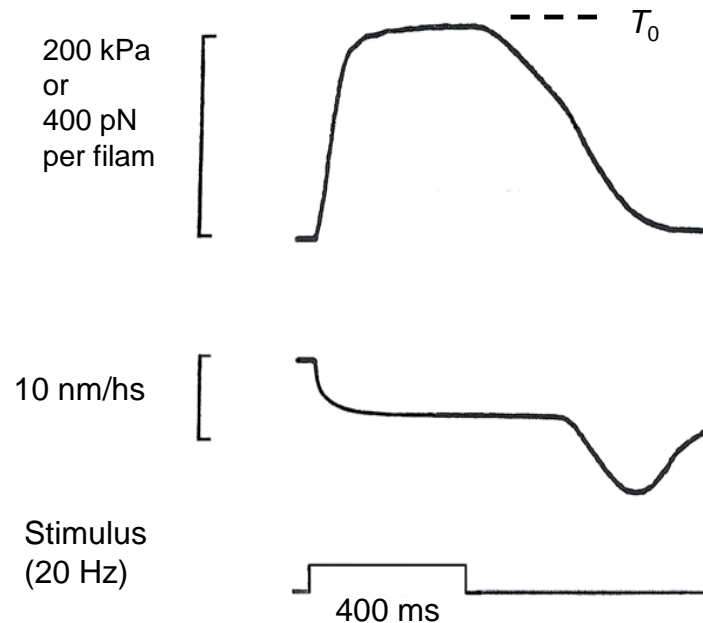
Il filamento di miosina è bipolare. Le code della miosina si aggregano in direzione antiparallela a partire dal centro del filamento spesso, lasciando al centro una zona priva di teste (zona nuda) lunga ~170 nm

Mechanical output of an active muscle cell

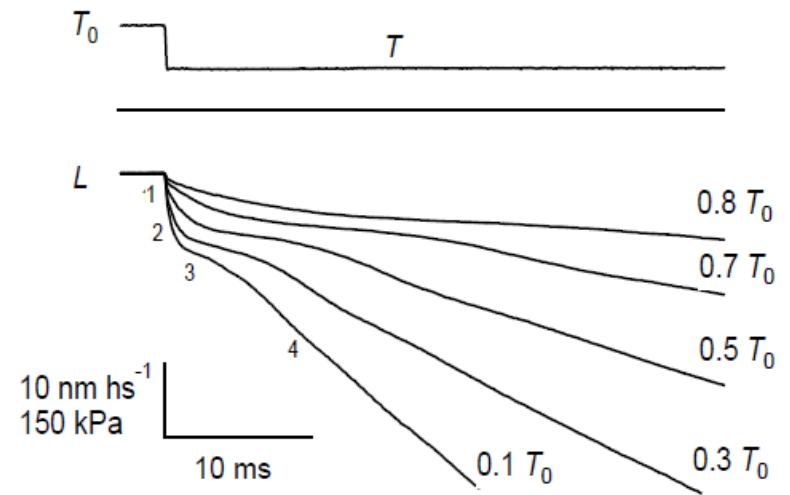
frog muscle fibre (l_0 6 mm), sarcomere length 2.2 μm , 4 °C,



Isometric contraction



Isotonic contraction



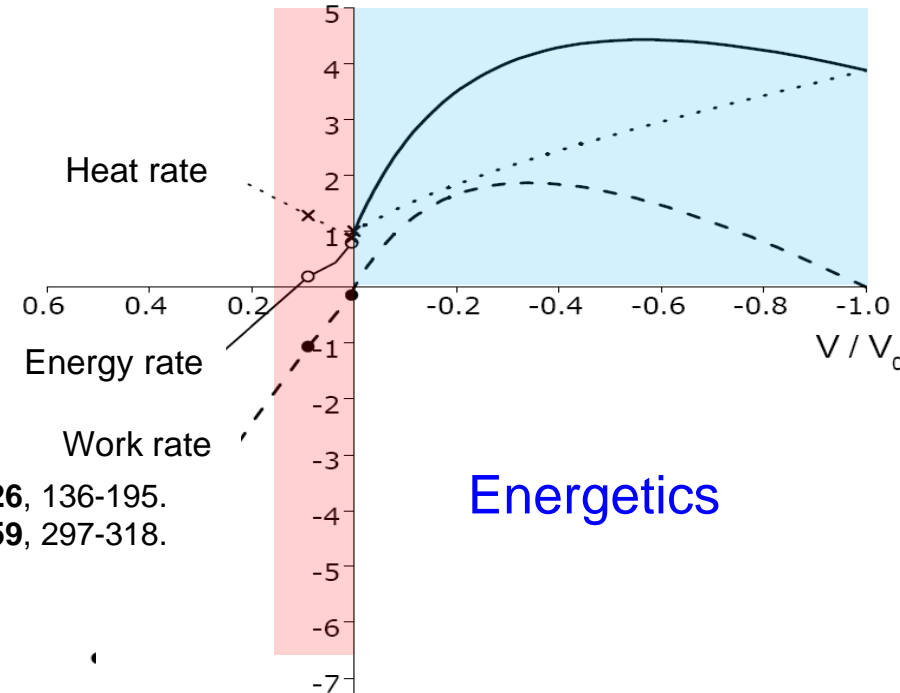
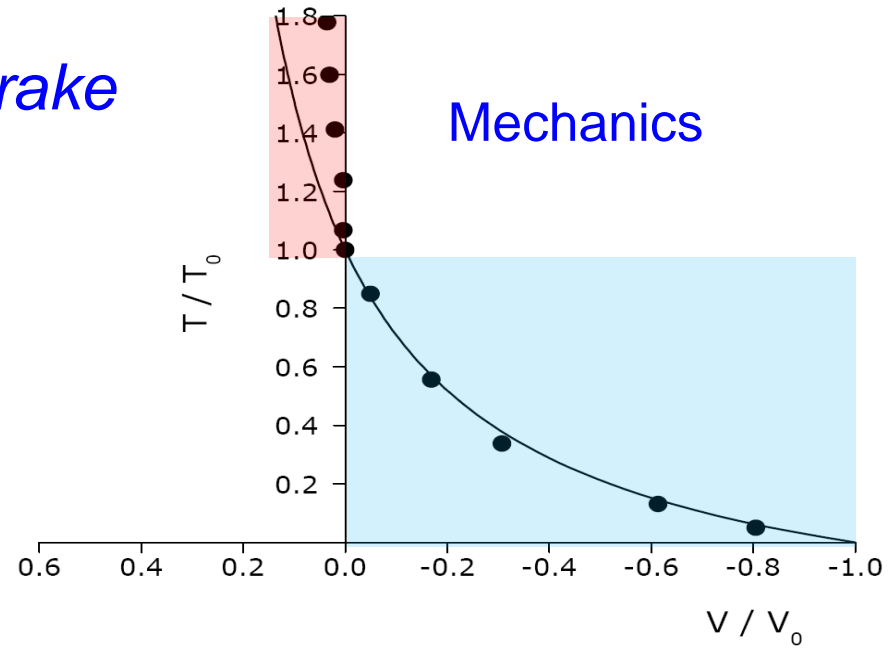
The muscle as a motor and as a brake

Muscle as a motor converts chemical energy into mechanical work at a rate that increases with reduction of the load (Fenn effect)

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

Muscle as a brake generates high resistance at low metabolic cost

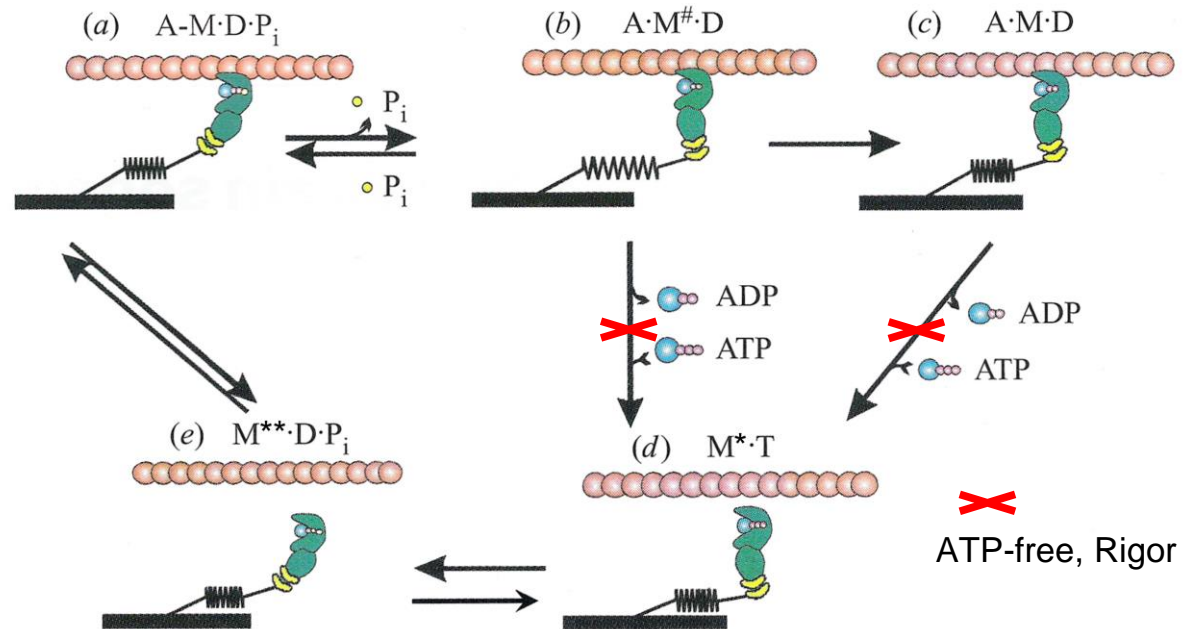
Hill, A.V. (1938). *Proc. R. Soc. B* **126**, 136-195.
 Hill, A.V. (1964). *Proc. R. Soc. B* **159**, 297-318.



Cinetica delle proteine in soluzione

1. La miosina è capace di idrolizzare rapidamente l'ATP in assenza dell'actina, ma la liberazione dei prodotti dell'idrolisi, fosfato inorganico (Pi) e ADP, è lenta. Il ciclo ATPasico diventa 50-100 volte più rapido (10-20/s per testa di miosina) se l'actina si lega alla miosina;
2. Il complesso actomiosinico, una volta privo dei prodotti dell'idrolisi, ha una grande affinità per l'ATP e il legame con l'ATP causa una rapida dissociazione del complesso actomiosinico;
3. La miosina, una volta dissociata dall'actina, idrolizza l'ATP solo dopo una modifica conformazionale (*recovery stroke*) che è rivelata da un aumento nella fluorescenza del triptofano presente nel dominio motore ($M^* \rightarrow M^{**}$);
4. La massima variazione di entalpia (misurata con la calorimetria) si ha con la liberazione del P_i . Ciò suggerisce che a questo step è associato il *working stroke*.

Schema del ciclo dell'ATPasi actomiosinica responsabile della trasduzione chemomeccanica



La cinetica delle proteine in soluzione non corrisponde a quella *in situ*:

Per esempio la costante di equilibrio combinata della formazione del legame actomiosinico forte e della liberazione del P_i , K_{P_i} è: $([P_i][AM \cdot D])/[AM \cdot D \cdot P_i] \sim 10^2$ M; dato che $[P_i]_{\text{cell}} = 10^{-3}$ M, in soluzione il rapporto $[AM \cdot D]/[AM \cdot D \cdot P_i] \sim 10^5$ e la reazione è praticamente irreversibile.

Nel sarcomero l'equilibrio della reazione dipende dalle condizioni meccaniche. Nella contrazione isometrica $K_{P_i} \sim 10^{-3}$ M (10^{-5} volte K_{P_i} in soluzione) e il rapporto $[AM \cdot D]/[AM \cdot D \cdot P_i] \sim 1$; la reazione è reversibile.

Meccanismo molecolare della contrazione

Durante il ciclo di interazione tra la miosina II e il filamento di actina, il dominio motore della miosina produce la modifica conformazionale (*working stroke*) che tira l'actina verso il centro del sarcomero mentre una molecola di ATP viene idrolizzata. La descrizione del meccanismo molecolare di questo processo implica la definizione dei passi biochimici e meccanici del ciclo (*accoppiamento chemomeccanico*) e delle corrispondenti modifiche strutturali nel motore miosinico. **La funzione muscolare dipende dalla combinazione delle proprietà del singolo motore e dalla sua disposizione in schiera nell'emisarcomero.** Lo studio di questo **motore collettivo** coinvolge una vasta gamma di metodologie:

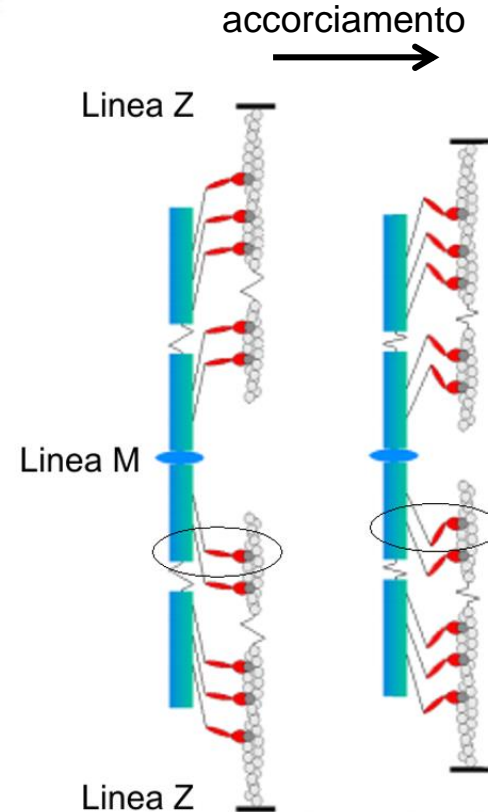
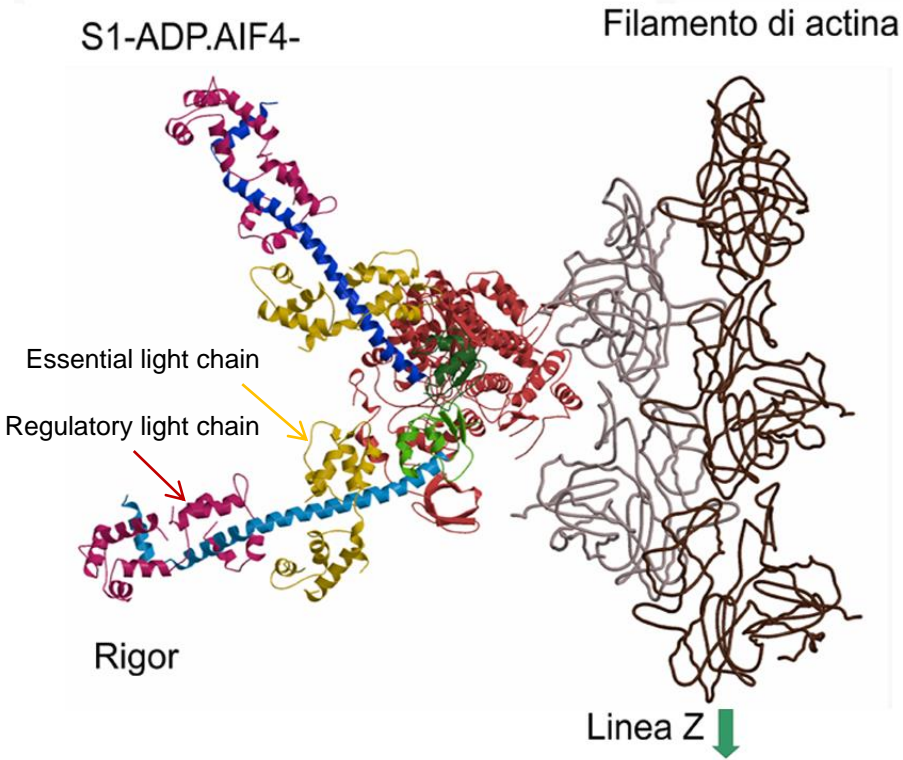
- 1. Cristallografia di proteine e mappe di densità elettronica***
- 2. Accoppiamento chemomeccanico in vitro ed in fibre demembrate***
- 3. Studi meccanici e strutturali in fibre intatte***
- 4. Saggi di motilità in vitro (IVMA) e meccanica di singola molecola***
- 5. Macchina di sintesi basata sulla miosina muscolare***

I metodi 1, 2, 4 presuppongono la purificazione di proteine e quindi prescindono dalla organizzazione del motore muscolare nel sarcomero. Perciò sono comuni ai metodi usati per lo studio dei motori non muscolari e permettono analisi comparative anche con motori generati con l'ingegneria genetica. Il metodo 5 combina i vantaggi di usare proteine purificate o ingegnerizzate la possibilità di misurare le proprietà emergenti dall'azione collettiva.

1. Il modello cristallografico del working stroke della miosina II

Rayment et al. (1993) *Science* **251**, 50-58

Dominguez et al. (1998) *Cell* **94**, 559-571



Il *working stroke* associato alla liberazione dei prodotti dell'idrolisi, ADP e Pi, dal dominio catalitico (CD, rosso) consiste in una rotazione di $\sim 70^\circ$ del *converter* (verde) intorno al CD che funziona da fulcro. La rotazione, amplificata dal braccio di leva costituito dal dominio che lega le catene leggere (LCD, blu, un' α elica lunga 9.5 nm), induce un movimento assiale di 11 nm a livello della connessione testa-coda, che è il sito di attacco al filamento di miosina.

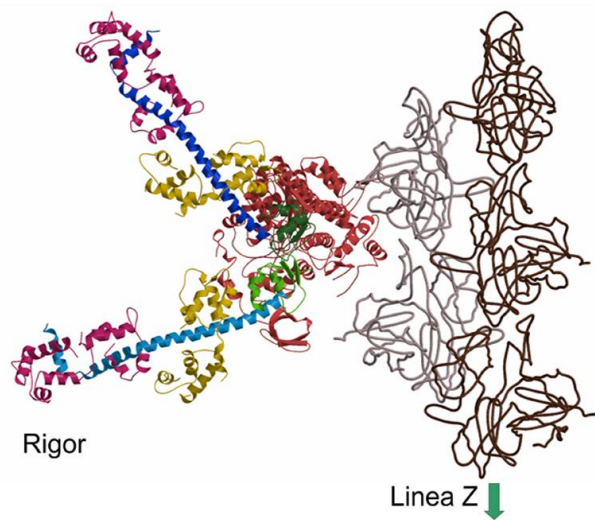
Data la disposizione bipolare delle teste di miosina nelle due metà del filamento spesso, i due emifilamenti di actina sono tirati verso il centro del sarcomero e uno scorrimento tra filamento spesso e sottile di 10 nm per working stroke implica un accorciamento del sarcomero di 20 nm

La rotazione del dominio LCD dipende dallo stato biochimico

Cryoelectron micrographs of actin decorated with the S1 fragment of chicken smooth muscle myosin. The left-hand image is in the presence of ADP and the right-hand one is in the absence of nucleotide. The assignments of the actin monomer (A), the motor subdomain (Mt), and the essential (E) and regulatory (R) light chains of the light-chain binding domain are made by fitting the atomic structures to the helically averaged electron microscopic images. The dissociation of ADP is associated with a movement of the distal tip of the light-chain binding domain through 3.5 nm toward the plus end of the actin filament (bottom of the figure). The black and dashed lines denote the positions of the essential and regulatory light chains in the two different nucleotide conditions. (From Whittaker et al., 1995)

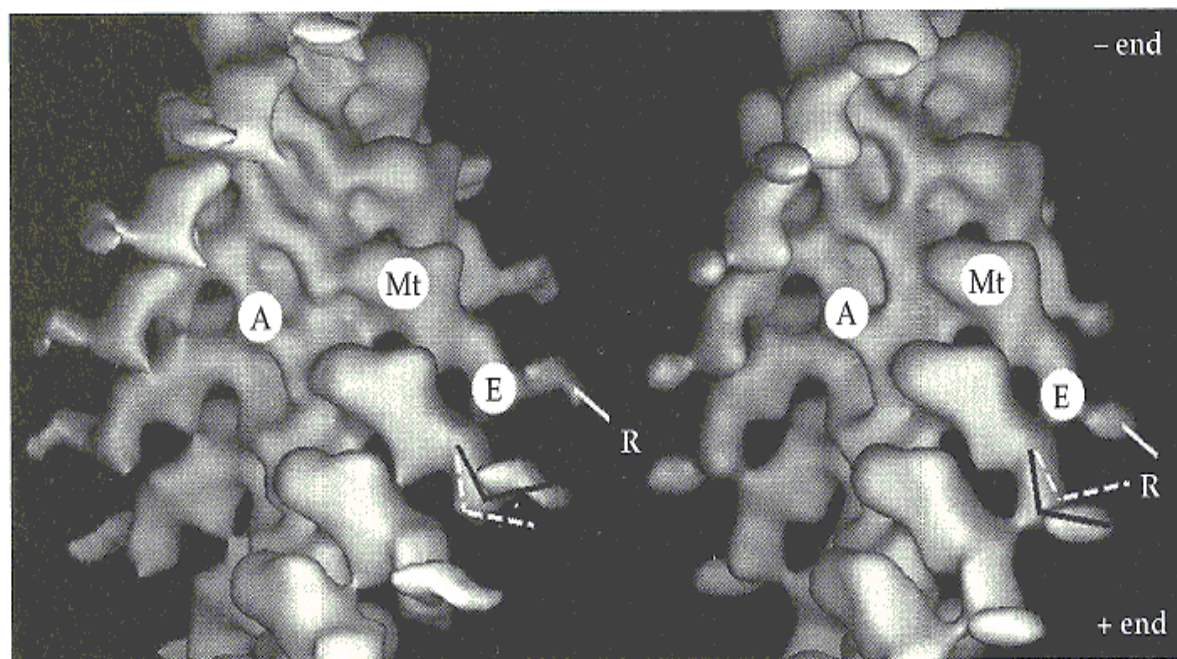
S1-ADP.AIF4-

Filamento di actina

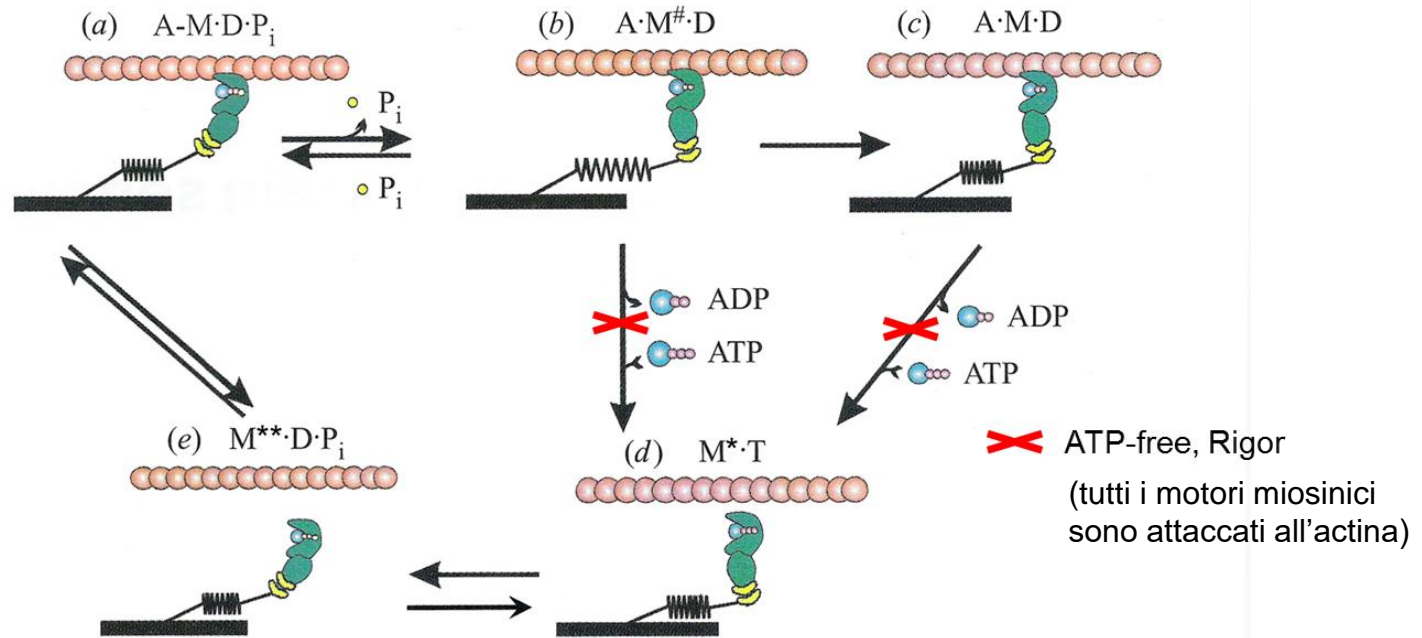


AM.ADP

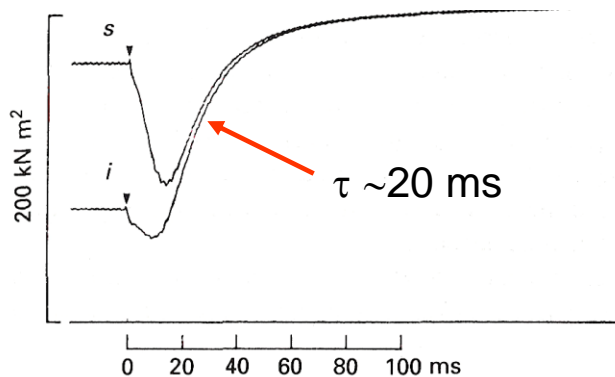
AM (rigor)



2. Ciclo dell'ATPasi actomiosinica *in vitro* ed *in situ*



L'accoppiamento tra passi meccanici e passi chimici può essere studiata *in situ* in fibre **demembranate** con la tecnica della fotolisi del composto ingabbiato, per eliminare l'effetto del tempo di diffusione.



quindi (in presenza di Ca^{++}) sviluppo di forza caratterizzati da cinetiche relativamente rapide (50/s) rispetto alla velocità del ciclo completo dell'ATPasi actomiosinica in condizioni isometriche (3-10/s). Quindi il passo limitante l'ATPasi è successivo alla generazione di forza (distacco dell'ADP alla fine del passo di forza).

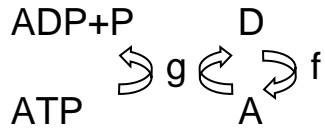
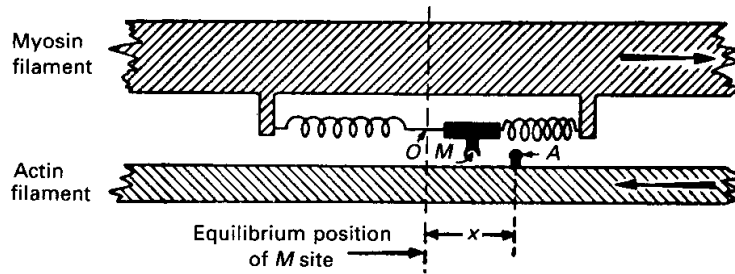
- Se si concede al muscolo di accorciarsi l'attività ATPasica aumenta (equivalente biochimico dell'effetto Fenn): la costante di velocità del distacco dell'ADP (k_{ADP}) dipende dal carico (= dalla conformazione della testa o dal suo grado di stiramento).

Goldman Y, *Ann. Rev. Physiol.* **27**, 37-60, 1987 • Nota che il carico modula la cinetica non l'equilibrio dell'idrolisi dell'ATP

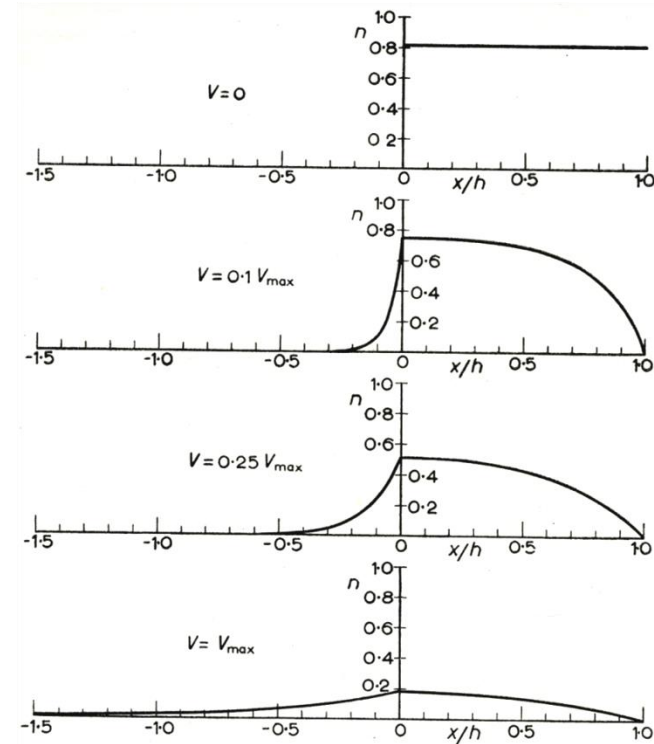
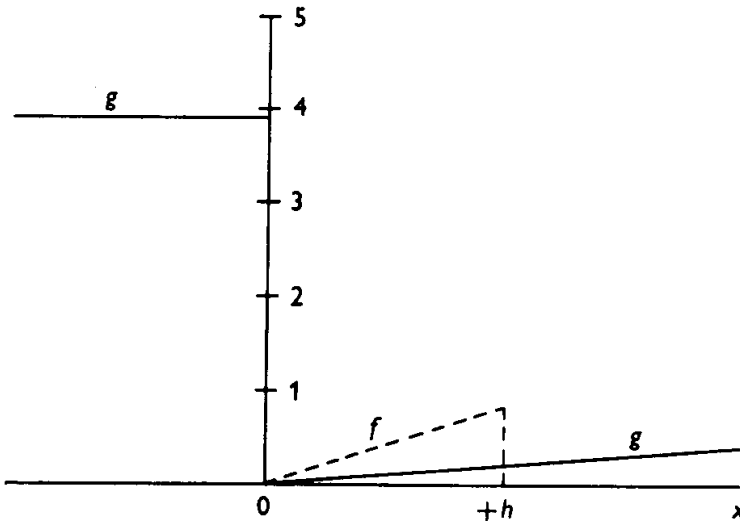
Molecular basis of the mechanics/energetics of muscle contraction:

A.F. Huxley's 1957 Model

A.F. Huxley *Prog. Biophys.* **7**, 257-318 (1957)



$$n = f/(f+g) \\
 dn/dt = (1-n)f - ng$$



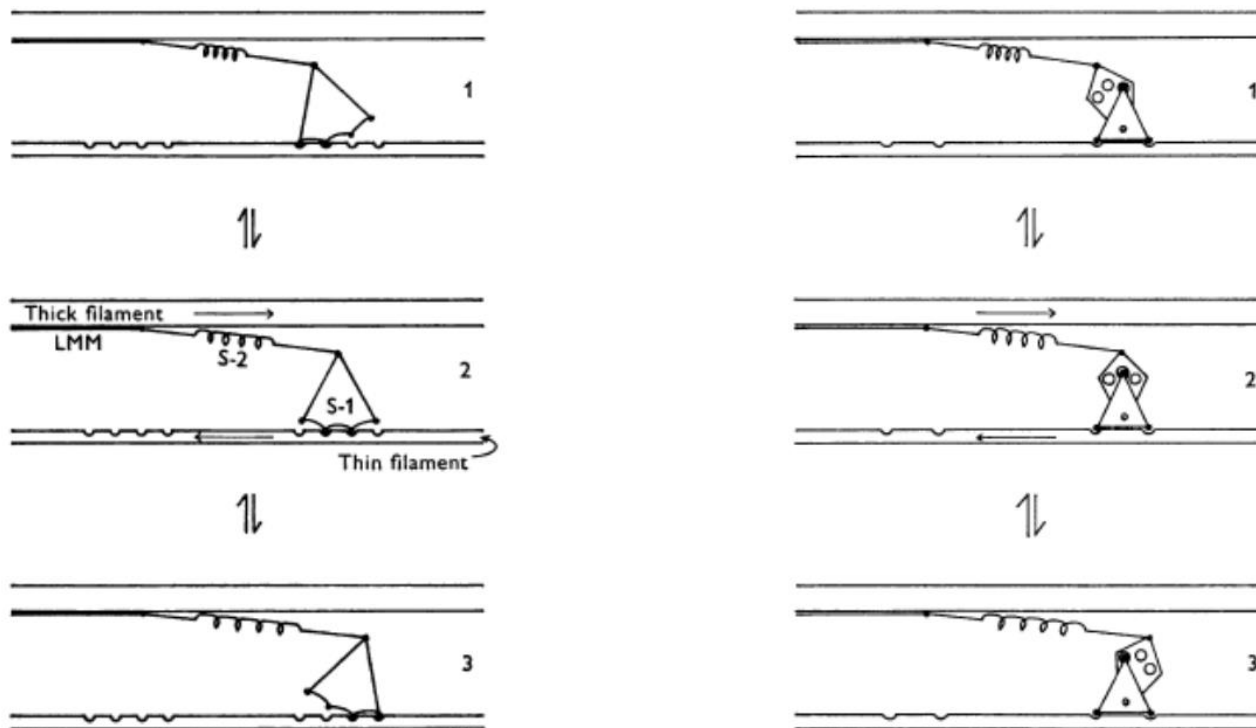
1. Force in the attached state of the cross-bridge is due to the mechanical energy of thermal agitation of the detached cross-bridge captured with the attachment (thermal ratchet).
2. The strain dependency of the rate constants for attachment and detachment provides the first molecular explanation of the macroscopic mechanical and energetic properties of muscle.
3. Increase of shortening velocity decreases force (for the reduction in number and strain of motors) and increases the energy rate (Fenn effect)

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)
- Rigidità del motore miosinico (ϵ): 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:
 $W = \frac{1}{2} \epsilon D^2 = 150 \text{ zJ } (\sim 2 \times \Delta G_{ATP})$.

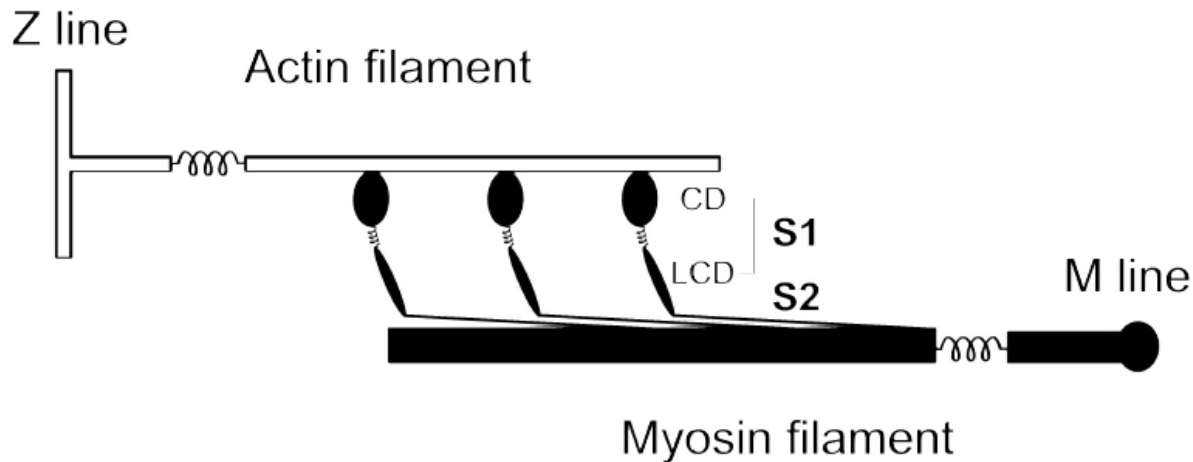
Modello cinetico della generazione di forza di Huxley e Simmons (1971)

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



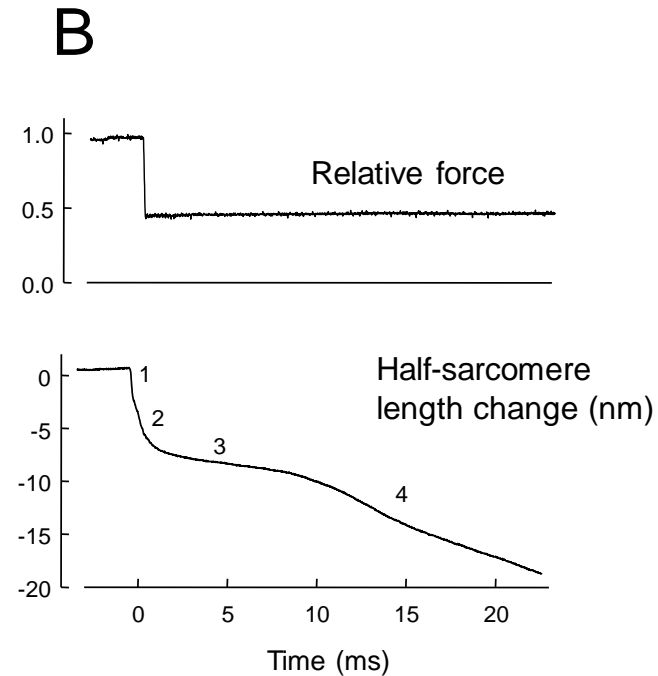
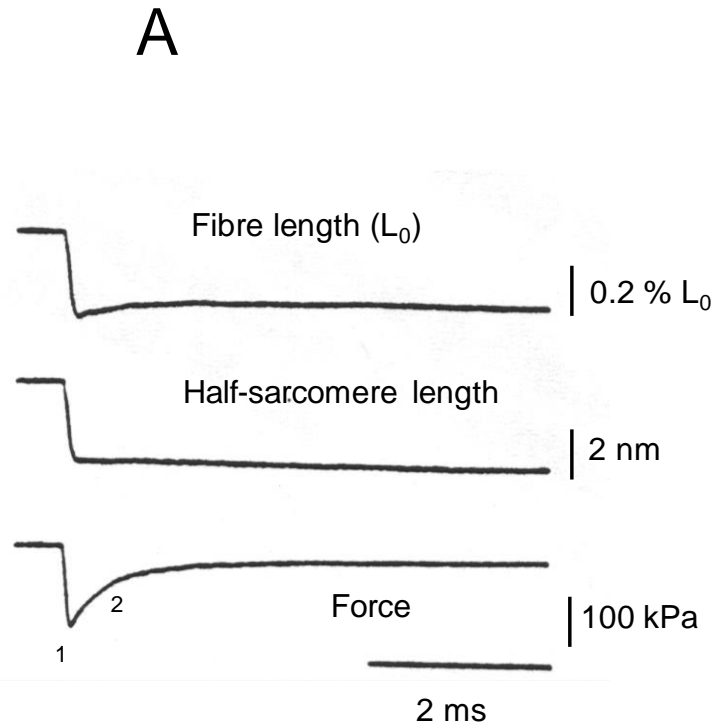
Mechanics at the half-sarcomere level allows the study of the myosin motor in situ

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 by cyclic asynchronous interactions.

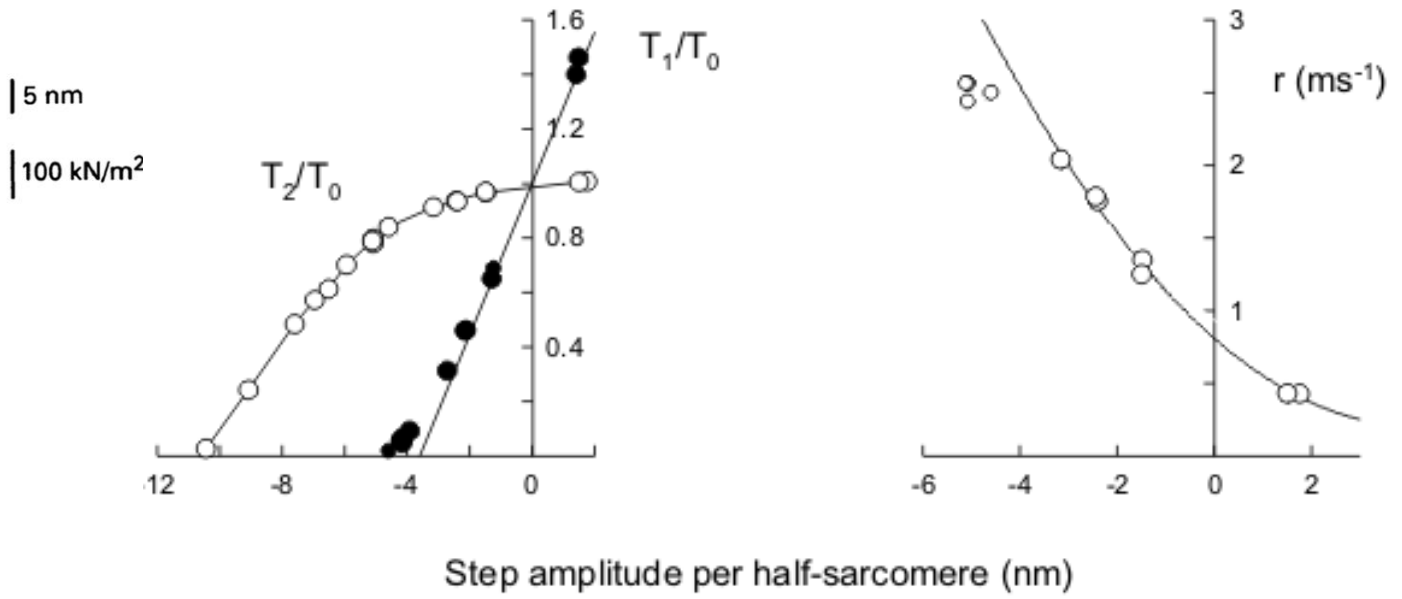
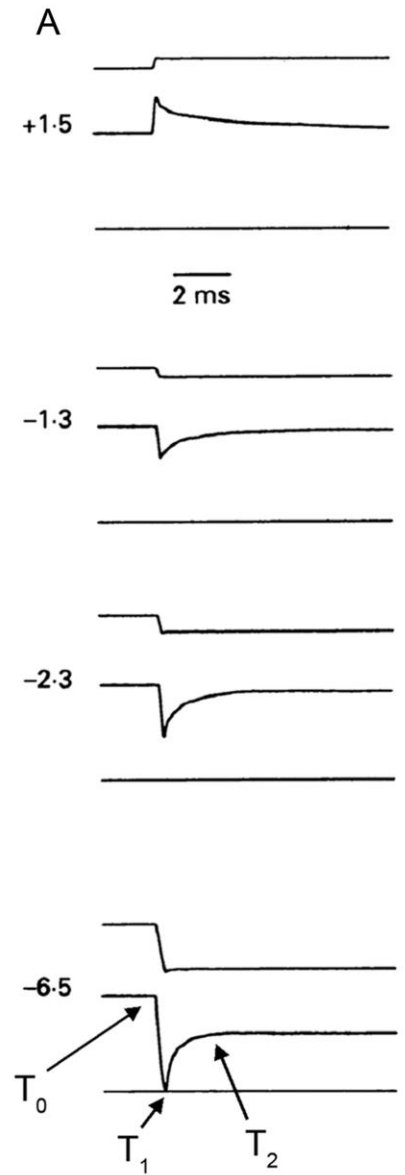
Half-sarcomere mechanics in single intact fibres



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.

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



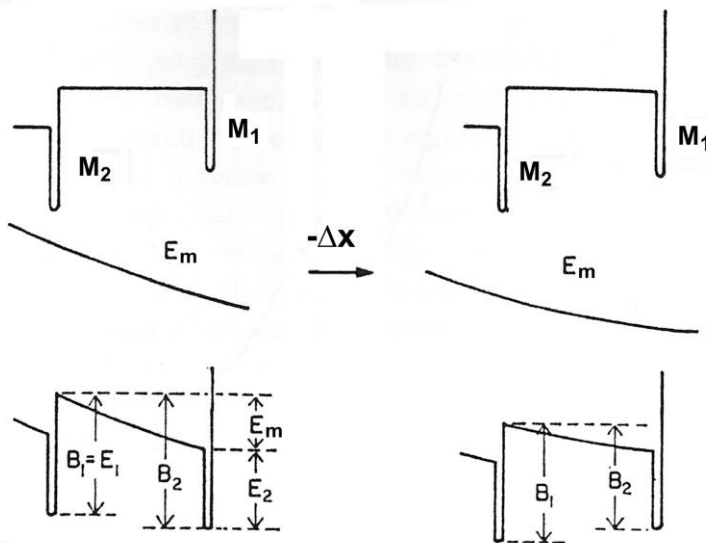
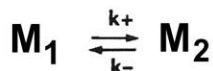
- The T_1 abscissa intercept, ~ 4 nm per hs, measures the strain in the hs elasticity at T_0 .
- The T_2 abscissa intercept, ~ 11 nm per hs, measures the extent of sliding accounted for by the working stroke.
- The rate of T_2 recovery (r) increases with the size of the release.
- The non-linearities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