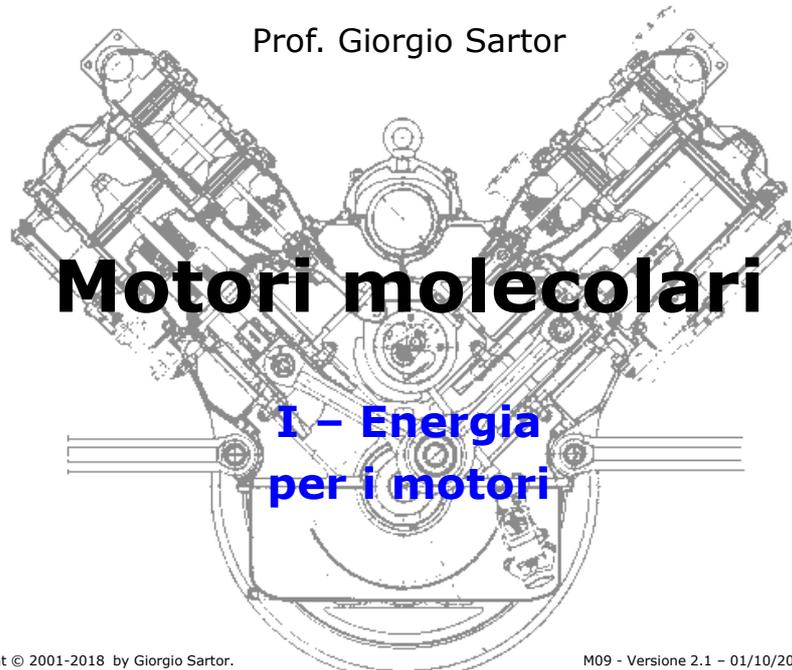


Prof. Giorgio Sartor



Copyright © 2001-2018 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

M09 - Versione 2.1 - 01/10/2018 08:46:36

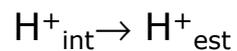
Movimento!!!

- Tutti gli organismi si muovono (Singole cellule e organismi complessi)
 - Verso le sorgenti di energia (cibo, luce, ecc.)
 - Lontano dai pericoli
 - ... dovunque serva ...



Ipotesi chemiosmotica

- Viene generato un gradiente protonico:



- Che crea una polarizzazione della membrana:

$$\Delta G = RT \ln ([H^+]_{\text{citosol}}/[H^+]_{\text{matrice}}) + F\Delta\Psi$$

$$\Delta\Psi = 0.18 \text{ V}$$

$$\Delta\text{pH} = 1$$

$$\Delta G = 2.3 RT + F 0.18 = 23.3 \text{ kJ}$$

- Quindi per trasportare un H^+ verso l'interno:

$$\Delta G = -23.3 \text{ kJ}$$

Controllo respiratorio

- Il trasporto di elettroni è accoppiato alla estrusione di H⁺ dalla matrice.
- Il fatto che questa reazione accoppiata sia spontanea dipende dai gradienti elettrico ($\Delta\Psi$) di pH.

Reazione	ΔG
Trasferimento e ⁻	Negativo $\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ} = -218 \text{ kJ/mol per } 2 \text{ e}^{-} \text{ NADH} \rightarrow \text{O}_2$
Estrusione H ⁺ dalla matrice	Positivo (dipende dal gradiente protonico) Per estrarre un H ⁺ dalla matrice $\Delta G = RT \ln ([\text{H}^+]_{\text{citofosol}}/[\text{H}^+]_{\text{matrice}}) + F\Delta\Psi$ $\Delta G = 2.3 RT (\text{pH}_{\text{matrice}} - \text{pH}_{\text{citofosol}}) + F\Delta\Psi$
Reazione accoppiata	Somma algebrica

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 5 -

Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:

$$\Delta\text{pH}/\Delta\Psi$$

Gradiente ionico (H⁺) → ATP

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 6 -

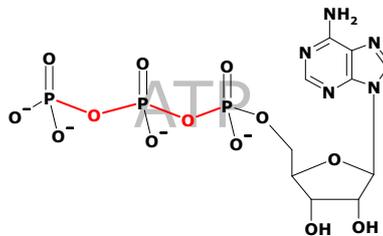
Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:

ATP

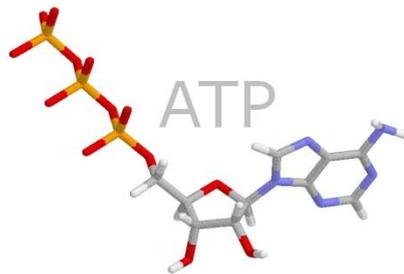
Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:



Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:



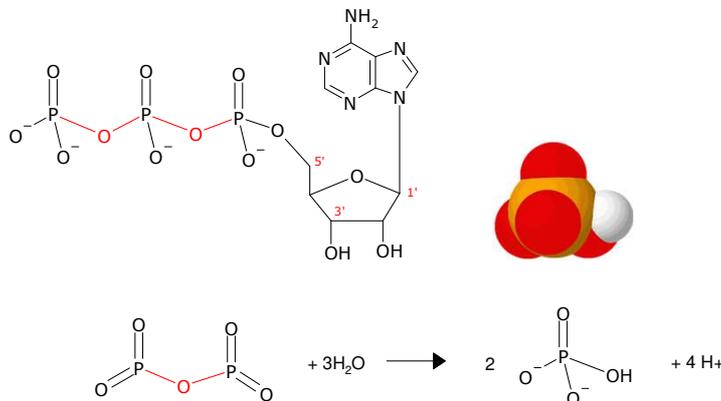
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 9 -

Nucleotidi liberi

- I legami che tengono insieme i residui di fosfato sono legami di tipo **anidridico**.



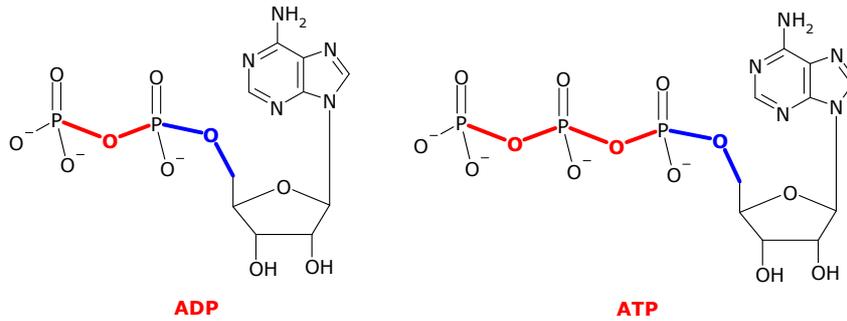
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 10 -

ADP e ATP

- Legami di tipo **anidridico**
- Legami di tipo **fosfoestereo**

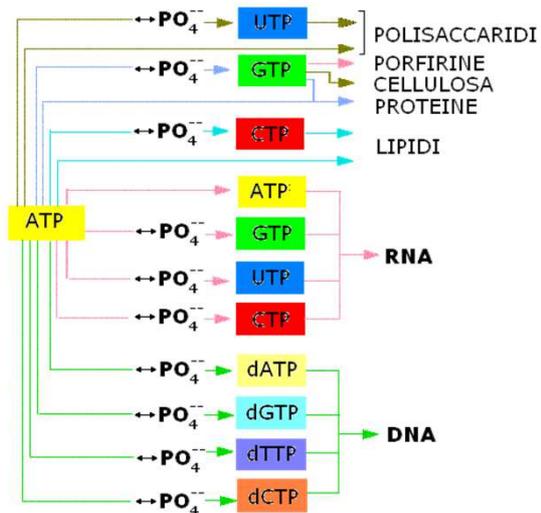


v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 11 -

A cosa servono i nucleotidi



- Trasporto di energia
- Acidi nucleici
- Sintesi di polisaccaridi e proteine
- Sintesi lipidi
- Segnali intracellulari
 - cAMP
- Trasporto di equivalenti ridotti
 - NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH
 - FAD/FADH₂
- Trasporto di acili
 - CoA

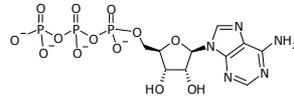
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

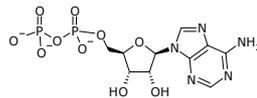
- 12 -

Trasporto di energia

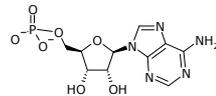
- ATP



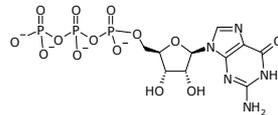
- ADP



- AMP



- GTP

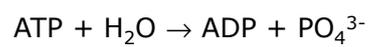


v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

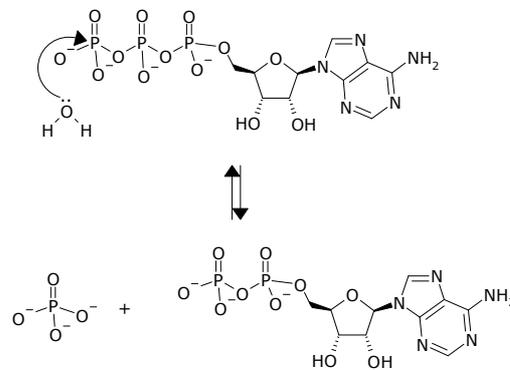
- 13 -

Trasporto di energia



$\Delta G^{\circ'} = -7.3 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$ ($-30.6 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$) a pH 7

$\Delta G^{\circ} = -10 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$ ($-42 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$) a pH 9



v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

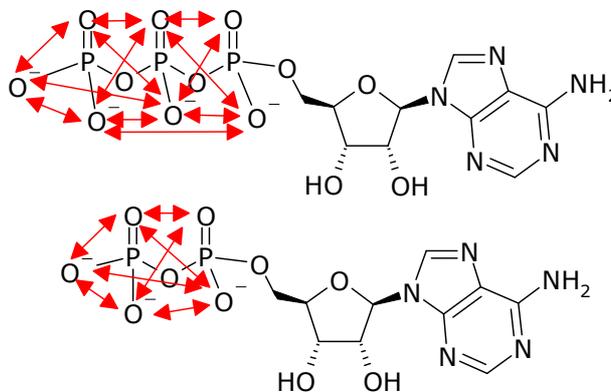
- 14 -

ΔG

- Il valore di ΔG dipende da:
 - Forza ionica
 - Concentrazione di Mg^{++}
 - Concentrazione di Ca^{++}
- Nelle normali condizioni cellulari vale circa:
 $-12 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$
- I nucleotidi sono contemporaneamente:
 - Stabili
 - Solubili
 - Carichi
 - Reattivi

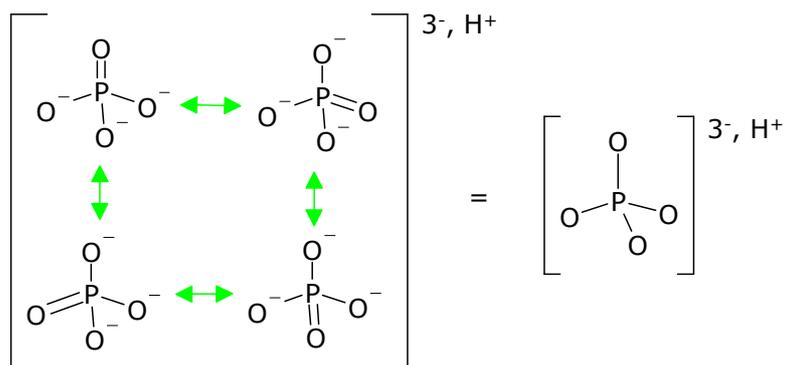
Perché il ΔG° dell'ATP vale $-30.6 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$?

- **Repulsione tra cariche**
 - Maggiore in ATP che in ADP



Perché il ΔG° dell'ATP vale $-7.3 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$?

- Stabilizzazione per risonanza
– Del fosfato

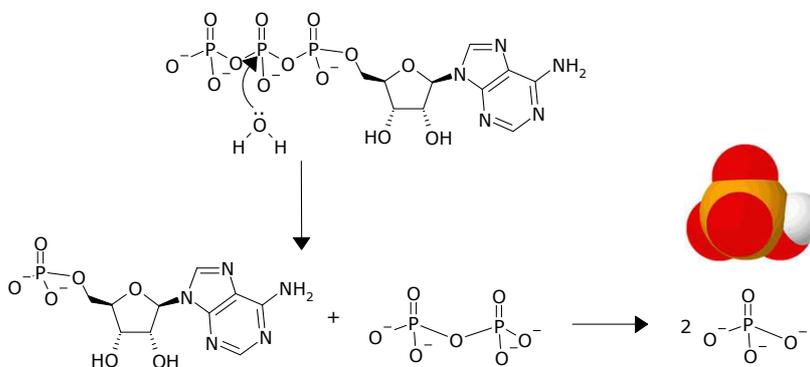
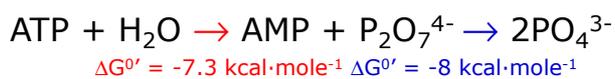


v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 17 -

Trasporto di energia



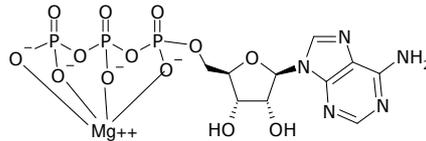
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 18 -

ATP e Mg⁺⁺

- Nella cellula l'ATP è spesso complessato con lo ione Mg⁺⁺



- Per formare uno ione complesso.

Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:

$$\Delta pH / \Delta \Psi$$

Gradiente ionico (H⁺) → ATP

Movimento!!!

- Il meccanismo molecolare che permette il movimento sia nel grande (muscolo scheletrico) che nel piccolo (dentro la singola cellula) sfrutta la stessa sorgente di energia:

$$\Delta pH / \Delta \Psi$$

Gradiente ionico (H^+) \rightarrow ~~ATP~~

Union Pacific Railroad's t 4000 class 4-8-8-4 Mallet articulated steam locomotives 1941- 1944



Attività enzimatica

- Le proteine che convertono l'energia chimica dell'ATP in movimento appartengono alla famiglia delle:

P-loop NTPases

AAA o AAA+ (ATPases Associated with diverse cellular Activities)

<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.d.fb.b.bi.html>

AAA

- Condividono un modulo comune formato da circa 230 aminoacidi
- La loro attività consiste nel cambiamento di conformazione (unfolding) di un substrato macromolecolare associato all'idrolisi di ATP. Questo è associato ad un cambiamento conformazione della proteina.
- Sono coinvolte in molti processi:
 - Degradazione di proteine
 - Fusione di membrane
 - Gestione dei microtubuli
 - Biogenesi dei perossisomi
 - Trasduzione del segnale
 - Regolazione dell'espressione genica
 - ...

AAA

- Le AAA si assemblano in oligomeri (esameri) per formare un anello con un "poro" centrale.
- Accoppiano l'idrolisi dell'ATP con cambiamenti conformazionali che si propagano lungo il polimero agendo sul substrato rimodellandolo o traslocandolo.

  					
Search Journal List BioRxiv Central this article search submit a manuscript register					
Table 1					
Classification and localization of AAA+ proteins					
Classification			Cellular localization and evolutionary distribution		
Group	Clade	Family	Localization	Distribution*	General function
Extended AAA	Classical AAA	FtsH	Chloroplast, mitochondria and bacterial membrane	E/B	Protein unfolding and degradation
		Katanin	Cytosol	E	Microtubule severing and disassembly
		NSF/CDC48	Cytosol	E/A	Membrane fusion/ubiquitin system
		Pex1/6	Peroxisome	E	Peroxisome biogenesis
		Bcs1p	Mitochondria	E	Cytochrome <i>bc₁</i> assembly
		PAAA	Cytosol/nucleus	E/A	Proteasome-associated protein unfolding and degradation
	Other	Rubisco activase	Chloroplast	E	Activation of Rubisco
		Rvb	Cytosol and nucleus	E/A	Diverse (for example, DNA recombination/repair, transcription, snoRNP assembly)
		ClpAB-D1	Cytosol, mitochondria and chloroplast	E/A/B	Protease-associated protein unfolding and degradation/protein disaggregation
		SpoVK	Cytosol	B	Unknown (sporulation associated)
		Ycf2	Chloroplast	E	Unknown
		AFG1	Mitochondria	E/B	Unknown
		Viral helicase	Virus	Viruses	DNA recombination and repair
HEC	Clamp loader	HolB/DnaX	Cytosol	B	DNA replication and repair
		RFC	Nucleus	E/A	DNA replication and repair
	Initiation	WHIP	Cytosol and nucleus	E/B	DNA replication and repair
		DnaA/C	Cytosol	B	DNA replication
	Other	ORC/Cdc6	Cytosol and nucleus	E/A	DNA replication
		RuvB	Cytosol	B	DNA recombination
		IstB	Cytosol	B	DNA transposition
		HolA	Cytosol	B	DNA replication and repair

Table 1

Classification and localization of AAA+ proteins

Classification			Cellular localization and evolutionary distribution		
Group	Clade	Family	Localization	Distribution*	General function
PACTT	HCL	HelU/CipX	Cytosol and mitochondria	E/B	Protease-associated protein unfolding and degradation
		CipAB-D2/Torsin	Cytosol, mitochondria, ER and chloroplast	E/A/B	Protease-associated protein unfolding and degradation/protein disaggregation/ER complex assembly
	Helix 2 insert	LonA	Cytosol and mitochondria	E/B	Protein unfolding and degradation
		MCM	Cytosol and nucleus	E/A	DNA replication (helicase activity)
		MrB/Unc-53	Cytosol and nucleus	E/A/B	DNA restriction/unknown
		Midasin	Nucleus	E	Maturation and nuclear export of ribosomes
		MoxR	Cytosol	A/B	Protein complex assembly
		Chelatase	Cytosol and chloroplast	E/A/B	Metal insertion
		σ^{54} Activator	Cytosol	B	Transcriptional activation
	Other	YifB	Cytosol	B	Unknown
		ComM	Cytosol	B	Unknown
		Dynein heavy chain	Cytosol	E	Molecular transport and cilia/flagellar movement
		LonB	Membrane	A	Protein unfolding and degradation
		ExeA	Cytosol	B	Type II secretion
STAND	Varied	E/A/B	Varied		

*A, B and E refer to archaea, bacteria and eukaryotes, respectively.

From: Genome Biol. 2008; 9(4): 218.
Published online 2008 April 30; doi: 10.1186/gb-2008-9-4-218.

Copyright © 2008 BioMed Central Ltd

Genome Biology 2008, Volume 9, Issue 4, Article 216

Table 1

Classification and localization of AAA+ proteins

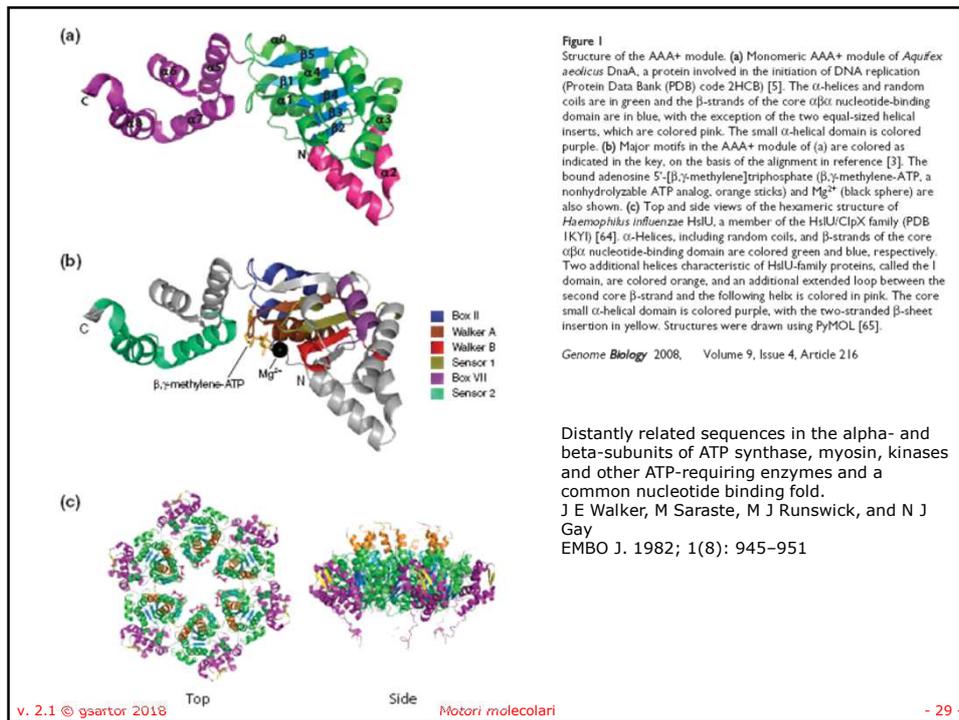
Classification			Cellular localization and evolutionary distribution		
Group	Clade	Family	Localization	Distribution*	General function
PACTT	HCL	HelU/CipX	Cytosol and mitochondria	E/B	Protease-associated protein unfolding and degradation
		CipAB-D2/Torsin	Cytosol, mitochondria, ER and chloroplast	E/A/B	Protease-associated protein unfolding and degradation/protein disaggregation/ER complex assembly
	Helix 2 insert	LonA	Cytosol and mitochondria	E/B	Protein unfolding and degradation
		MCM	Cytosol and nucleus	E/A	DNA replication (helicase activity)
		MrB/Unc-53	Cytosol and nucleus	E/A/B	DNA restriction/unknown
		Midasin	Nucleus	E	Maturation and nuclear export of ribosomes
		MoxR	Cytosol	A/B	Protein complex assembly
		Chelatase	Cytosol and chloroplast	E/A/B	Metal insertion
		σ^{54} Activator	Cytosol	B	Transcriptional activation
	Other	YifB	Cytosol	B	Unknown
		ComM	Cytosol	B	Unknown
		Dynein heavy chain	Cytosol	E	Molecular transport and cilia/flagellar movement
		LonB	Membrane	A	Protein unfolding and degradation
		ExeA	Cytosol	B	Type II secretion
STAND	Varied	E/A/B	Varied		

*A, B and E refer to archaea, bacteria and eukaryotes, respectively.

From: Genome Biol. 2008; 9(4): 218.
Published online 2008 April 30; doi: 10.1186/gb-2008-9-4-218.

Copyright © 2008 BioMed Central Ltd

Genome Biology 2008, Volume 9, Issue 4, Article 216

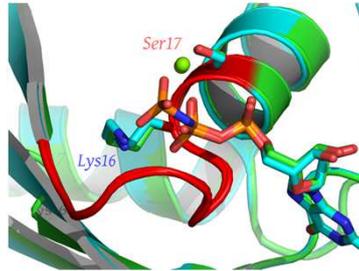


Motivi conservati in AAA

- **Walker A**, detto anche P-loop (phosphate-binding loop), è un motivo GXXXXGK(T/S);
- Il residuo di Lisina (K) è cruciale per il legame del nucleotide;
- Il motivo è un loop ricco di glicina preceduto un β -strand e è seguito dal un' α -elica;
- Interagisce con i gruppi fosfato del NTP e con uno ione Mg^{++} che coordina il fosfato β e γ del nucleotide.

v. 2.1 © gsartor 2018 - 30 -

Motivi conservati in AAA



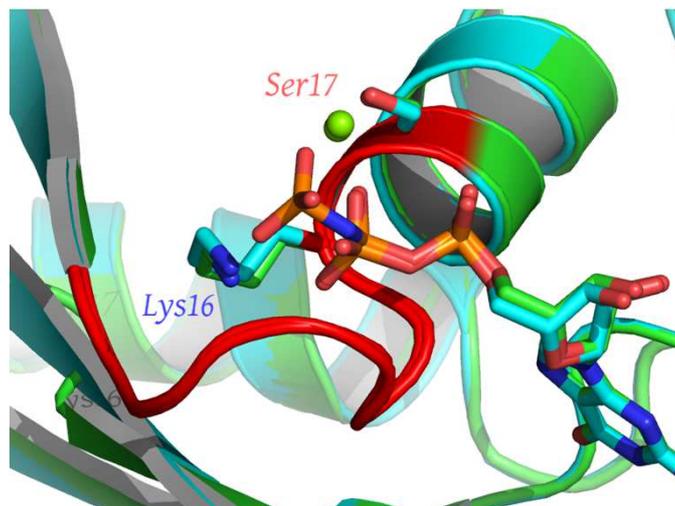
- **Walker A**, detto anche P-loop (phosphate-binding loop), è un motivo GXXXXGK(T/S);
- Il residuo di Lisina (K) è cruciale per il legame del nucleotide;
- Il motivo è un loop ricco di glicina preceduto un β -strand e è seguito da un α -elica;
- Interagisce con i gruppi fosfato del NTP e con uno ione Mg^{++} che coordina il fosfato β e γ del nucleotide.

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 31 -

P-loop

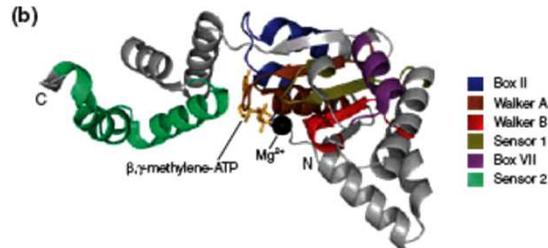


v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 32 -

Motivi conservati in AAA



- **Walker B** la sequenza consenso è (R/K)XXXXGXXXXLhhhhD, (h sono aminoacidi idrofobici) e un aspartato finale;
- Più recentemente la sequenza è stata ridotta a hhhhDE, con glutamato in più;
- L'aspartato e il glutamato formano anche parte del motivo DEAD/DEAH in elicasi;
- Il residuo di aspartato coordina il Mg⁺⁺ e il glutamato è essenziale per l'idrolisi di ATP;
- C'è una certa variabilità nel motivo che però possiede sempre un residuo carico negativamente che segue una serie di aminoacidi idrofobici.

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 33 -

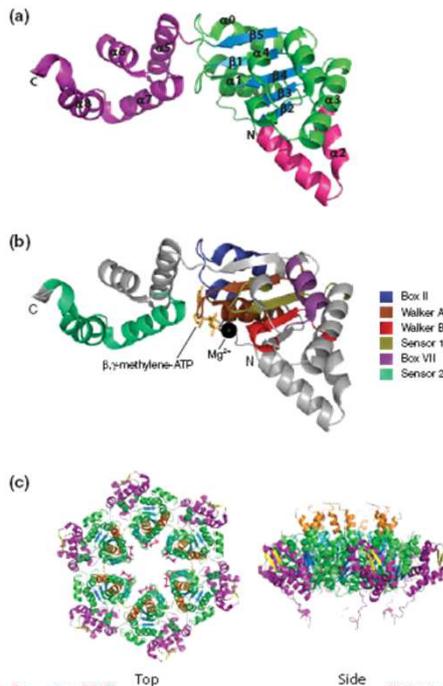


Figure 1

Structure of the AAA+ module. (a) Monomeric AAA+ module of *Aquifex aeolicus* DnaA, a protein involved in the initiation of DNA replication (Protein Data Bank (PDB) code 2HCB) [5]. The α -helices and random coils are in green and the β -strands of the core α/β nucleotide-binding domain are in blue, with the exception of the two equal-sized helical inserts, which are colored pink. The small α -helical domain is colored purple. (b) Major motifs in the AAA+ module of (a) are colored as indicated in the key, on the basis of the alignment in reference [3]. The bound adenosine 5'-[β,γ -methylene]triphosphate (β,γ -methylene-ATP, a nonhydrolyzable ATP analog, orange sticks) and Mg²⁺ (black sphere) are also shown. (c) Top and side views of the hexameric structure of *Haemophilus influenzae* HslU, a member of the HslU/ClpX family (PDB 1KY1) [64]. α -Helices, including random coils, and β -strands of the core α/β nucleotide-binding domain are colored green and blue, respectively. Two additional helices characteristic of HslU-family proteins, called the I domain, are colored orange, and an additional extended loop between the second core β -strand and the following helix is colored in pink. The core small α -helical domain is colored purple, with the two-stranded β -sheet insertion in yellow. Structures were drawn using PyMOL [65].

Genome Biology 2008, Volume 9, Issue 4, Article 216

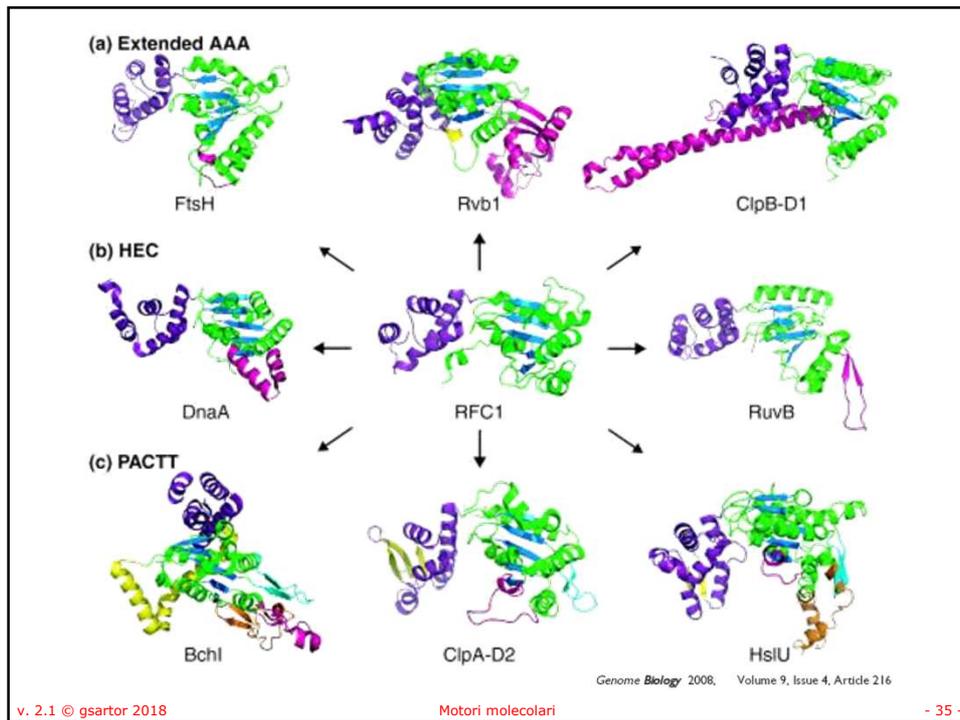
Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.

J E Walker, M Saraste, M J Runswick, and N J Gay
EMBO J. 1982; 1(8): 945-951

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

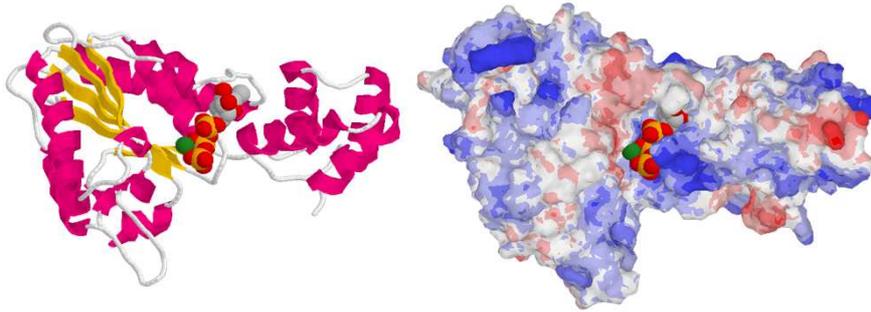
- 34 -



Struttura

- Le AAA Possiedono un dominio N-terminale non ATPasico seguito da uno o due domini ATPasici (D1 e D2)
- In alcune proteine i due domini sono conservati (Cdc48/p97)
- In altre sono meglio conservati i domini D1 (Pex1p and Pex6p) o D2 (Sec18p/NSF)

N-ethylmaleimide-sensitive factor



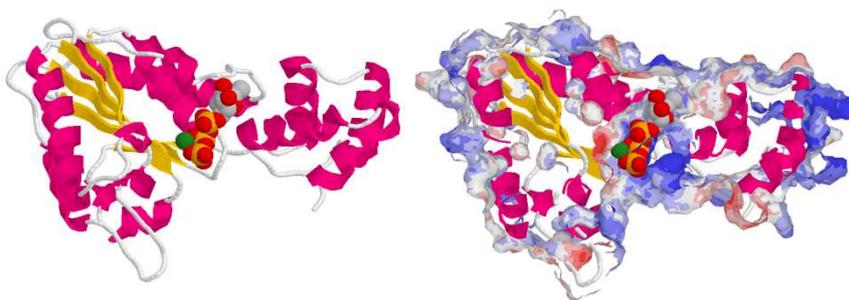
1nsf

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 37 -

N-ethylmaleimide-sensitive factor



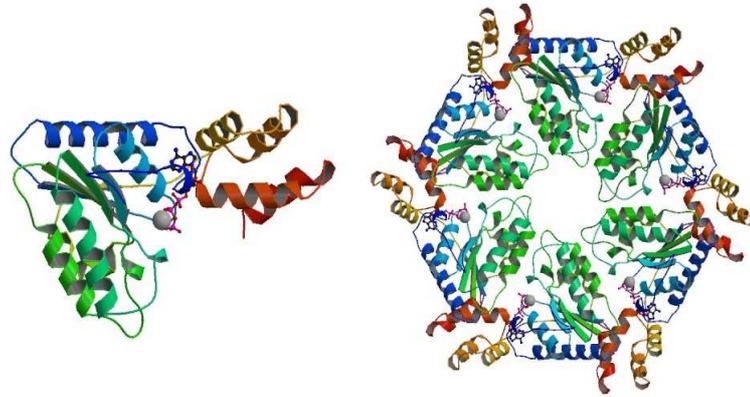
1nsf

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 38 -

N-ethylmaleimide-sensitive factor



1nsf

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 39 -

Elicasi

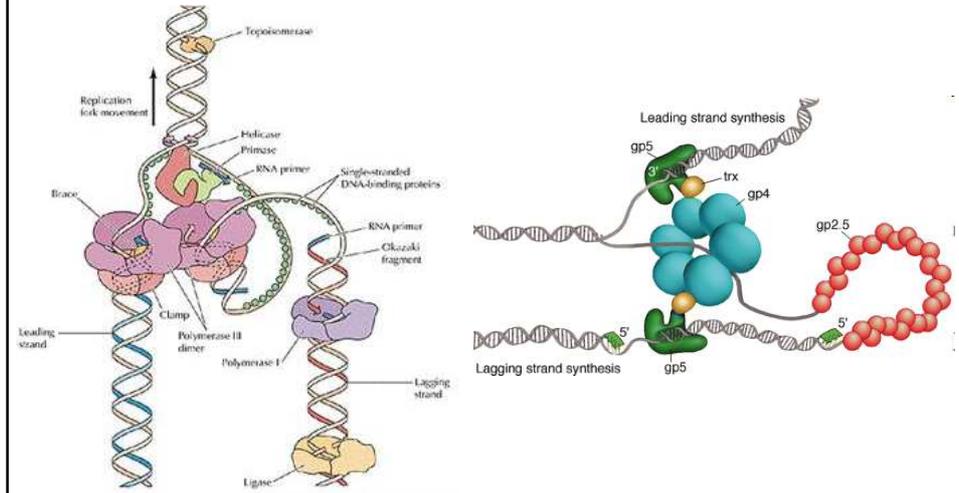
- Le DNA elicasi sono dei motori molecolari che svolgono e separano due eliche del DNA
- “Cammina” lungo il DNA e converte l’energia chimica (ATP o NTP) in energia meccanica.

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 40 -

Elicasi



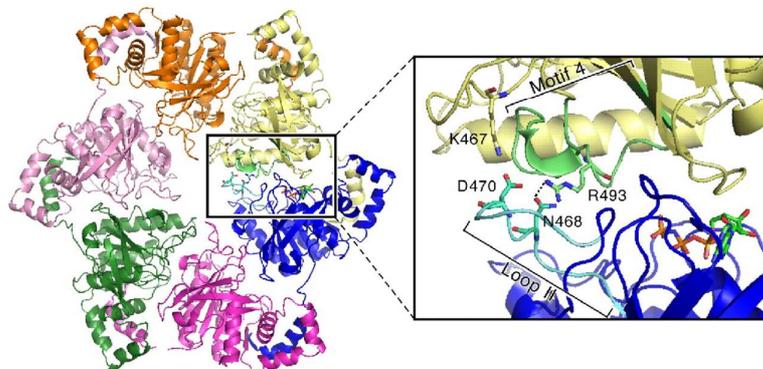
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 41 -

Elicasi

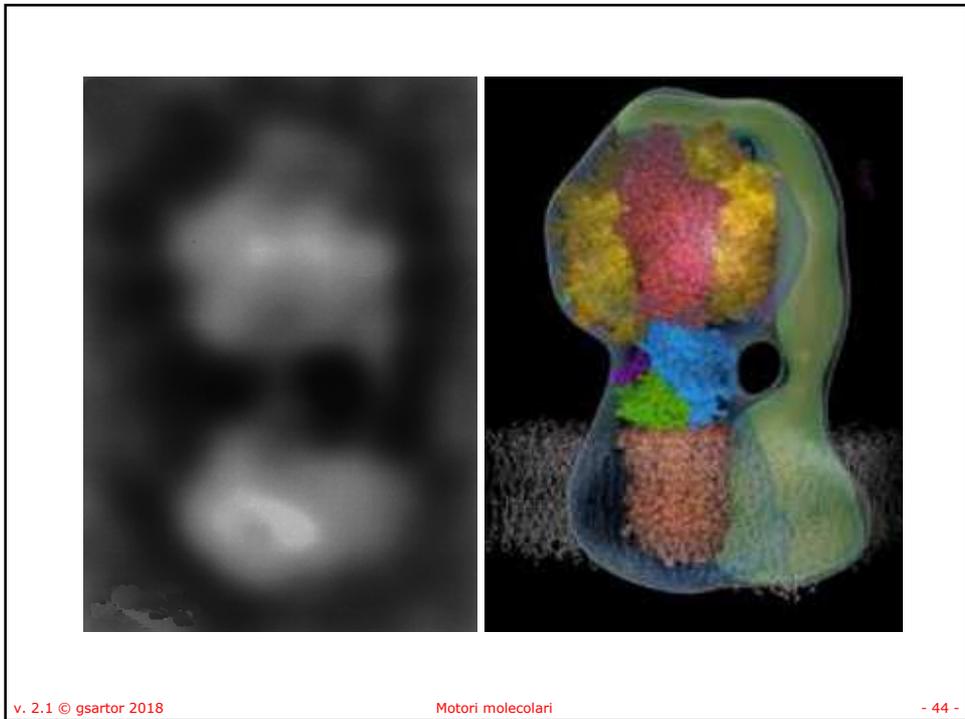
	Loop II (464-475)	Motif 4 (481-500)
T7	---VVICHLK ⁴⁶⁸ NPDKGKAHEEGRPV	SITDLRGSGALR ⁴⁹³ QLSDTIIALE---
E. coli	SQLNRSLEQRAD	V-NSDLRESGSIEQDADLIM
B. stea.	SQLSRGVEQRQD	M-MSDIRESGSIEQDADIVA
H. pylo.	VQLNRSLENRDD	I-LSDIKDSGGIEQDADIVL
T4	AQVGRQAWDSSD	N-MSDIAESAGLPATADFML



v. 2.1 © gsartor 2018

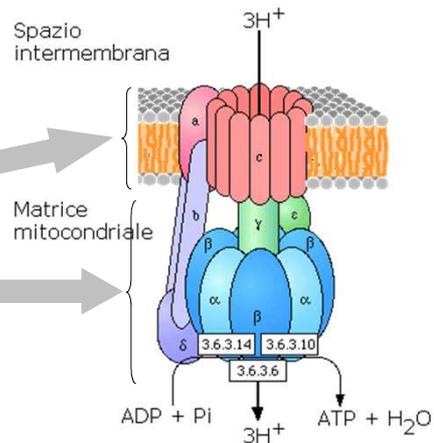
Motori molecolari

- 42 -



Complesso V – ATP sintasi

- La ATP sintasi, presente nella membrana interna mitocondriale.
- È composta di sue principali unità catalitiche:
 - F_0 : proteina di membrana che gestisce il trasporto di protoni.
 - F_1 : costituita da cinque polipeptidi con stechiometria $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$.



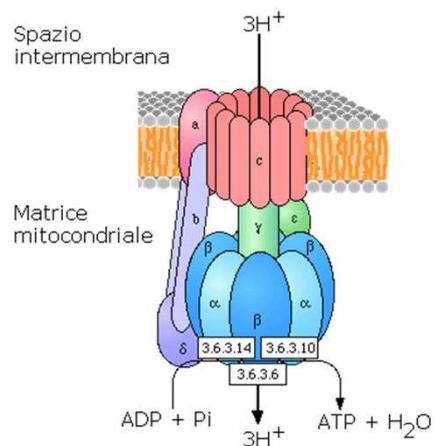
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 45 -

Complesso V – ATP sintasi

- Le due unità F_1F_0 accoppiano la sintesi di ATP con il trasporto di H^+ dallo spazio intermembrana alla matrice.
- Per convertire una mole di ADP in ATP è richiesto il trasporto di tre moli di H^+ .
- Il numero di tre moli di H^+ viene dedotto da:
 - Il ΔG per la sintesi di ATP in condizioni cellulari.
 - Il ΔG per trasferire ogni H^+ nella matrice dato il gradiente elettrochimico (energia disponibile per H^+).



v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 46 -

Controllo respiratorio

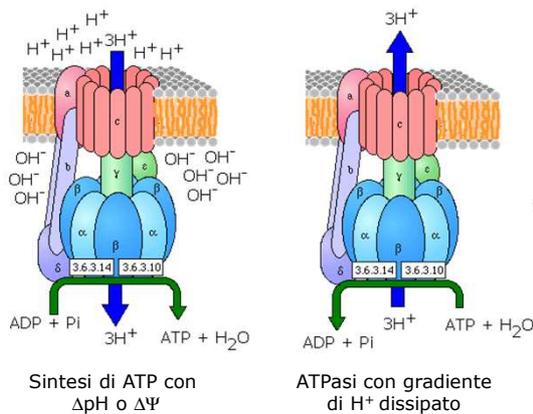
- In assenza di ADP, i H^+ non possono fluire attraverso F_0 . ΔpH e $\Delta\Psi$ sono massimi. Il valore assoluto del ΔG per l'estrusione H^+ aumenta avvicinandosi a quello del trasporto di e^- .
- Quando la reazione accoppiata non è più spontanea ($\Delta G > 0$) la respirazione si ferma.
- Quindi in assenza di ADP la velocità di respirazione è fermata (o bassa a causa del leak di H^+).
- Quando si aggiunge ADP riprende la sintesi di ATP, gli H^+ entrano nella matrice via F_0 . Si riducono ΔpH e $\Delta\Psi$.
- Il ΔG dell'estrusione di H^+ diminuisce.
- La reazione accoppiata ridiventa spontanea ($\Delta G < 0$).
- La respirazione riprende (è stimolata).

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 47 -

F_1F_0 ATP Sintasi di mitocondri, cloroplasti, batteri



- Quando il ΔpH o il $\Delta\Psi$ sono favorevoli, F_1F_0 accoppia la sintesi di ATP al flusso spontaneo di H^+ verso la parte della membrana dove si protrude F_1 (matrice mitocondriale).
- Se non c'è ΔpH o $\Delta\Psi$ per pilotare la reazione accoppiata viene favorita l'idrolisi dell'ATP (ATPasi).

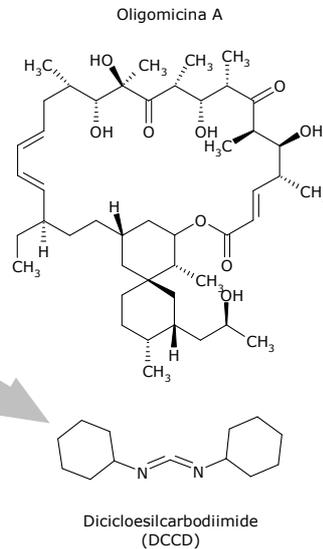
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 48 -

Inibitori ATP sintasi

- Bloccano il trasporto di H^+ accoppiato alla sintesi o all'idrolisi di ATP.
 - Oligomicina A, un antibiotico.
 - Dicioesilcarbodiimide (DCCD) è un reagente dei gruppi carbonilici in ambiente idrofobico per formare un addotto covalente.
- Entrambi bloccano il flusso di H^+ nella membrana inibendo la sintesi di ATP attraverso l'interazione con F_o .

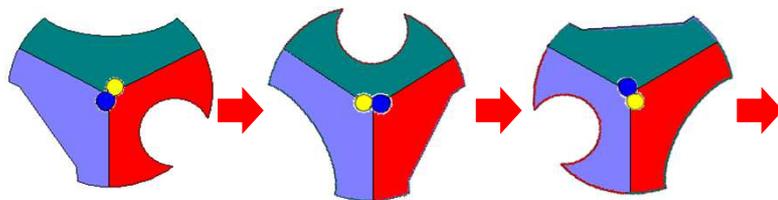


v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 49 -

Meccanismo di sintesi



- Il meccanismo di legame e di sintesi accoppiata è stata proposta da Boyer e Walker (Nobel).
- Per semplicità sono riportate solo le subunità catalitiche b.
 - È stato proposto che una struttura proteica di forma irregolare (g) sia legata a F_o e ruoti relativamente alle tre subunità catalitiche b.
 - La rotazione di g è pilotata dal flusso protonico attraverso F_o .

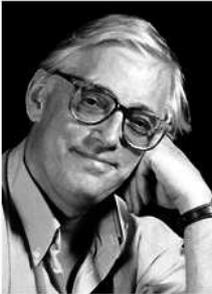
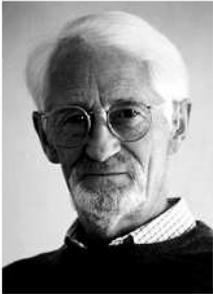
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 50 -

 The Nobel Prize in Chemistry 1997
Paul D. Boyer, John E. Walker, Jens C. Skou

The Nobel Prize in Chemistry 1997	▼
Nobel Prize Award Ceremony	▼
Paul D. Boyer	▼
John E. Walker	▼
Jens C. Skou	▼

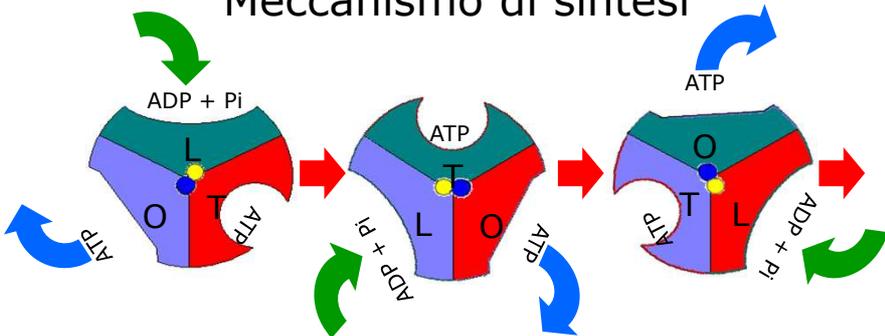




Paul D. Boyer
John E. Walker
Jens C. Skou

The Nobel Prize in Chemistry 1997 was divided, one half jointly to Paul D. Boyer and John E. Walker *"for their elucidation of the enzymatic mechanism underlying the synthesis of adenosine triphosphate (ATP)"* and the other half to Jens C. Skou *"for the first discovery of an ion-transporting enzyme, Na⁺, K⁺ -ATPase"*.

v. 2.1 © gsartor 2018
Motori molecolari
- 51 -

Meccanismo di sintesi

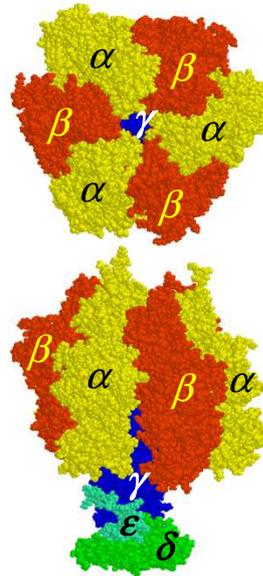


- La conformazione di ogni subunità catalitica β cambia sequenzialmente a seguito dell'interazione con la subunità γ che ruota (al centro).
- Ogni subunità catalitica β ha una conformazione diversa per ogni passo del ciclo catalitico
- Per esempio la subunità verde è sequenzialmente:
 - In conformazione L (loose) nella quale il sito attivo lega debolmente ADP + Pi
 - In conformazione T (tight) nella quale il substrato è legato fortemente e si forma ATP.
 - In conformazione O (open) nella quale viene rilasciato l'ATP.

v. 2.1 © gsartor 2018
Motori molecolari
- 52 -

Struttura di F₁

- Nei mammiferi F₁ consiste di cinque polipeptidi con stechiometria α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ (in ordine decrescente di peso molecolare).
- Le subunità α e β sono omologhe.



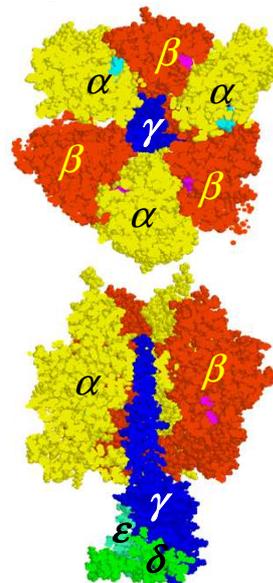
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 53 -

Struttura di F₁

- Nei mammiferi F₁ consiste di cinque polipeptidi con stechiometria α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ (in ordine decrescente di peso molecolare).
- Le subunità α e β sono omologhe.



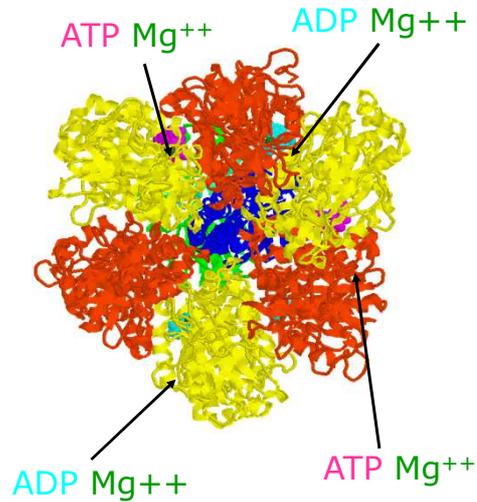
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 54 -

Struttura di F₁

- Ci sono tre siti catalitici.
- Sono localizzati alle interfacce $\alpha\beta$ con predominanza nella subunità β .
- Ognuna delle tre subunità α contiene un ATP legato alla proteina ed inattivo nella catalisi.
- I nucleotidi adenilici si legano alle subunità α e β complessati con Mg^{++} .



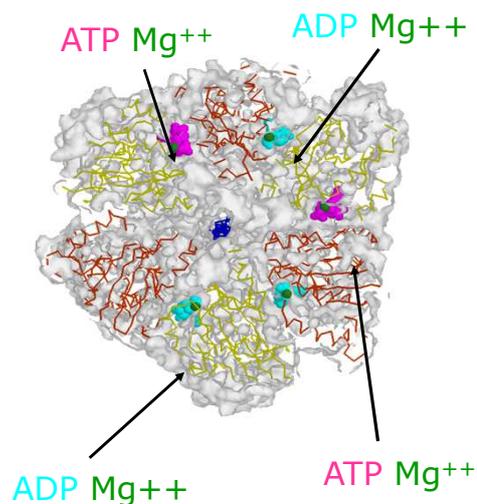
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 55 -

Struttura di F₁

- Ci sono tre siti catalitici.
- Sono localizzati alle interfacce $\alpha\beta$ con predominanza nella subunità β .
- Ognuna delle tre subunità α contiene un ATP legato alla proteina ed inattivo nella catalisi.
- I nucleotidi adenilici si legano alle subunità α e β complessati con Mg^{++} .



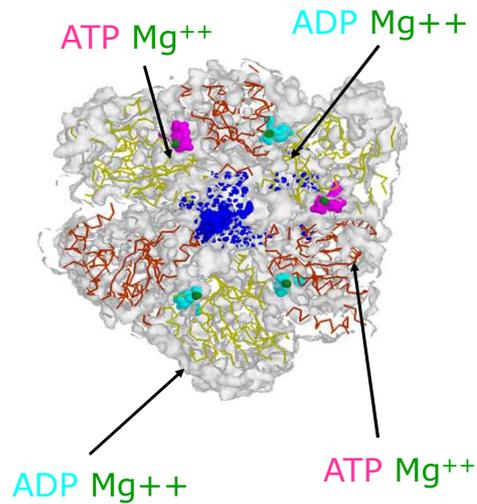
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 56 -

Struttura di F₁

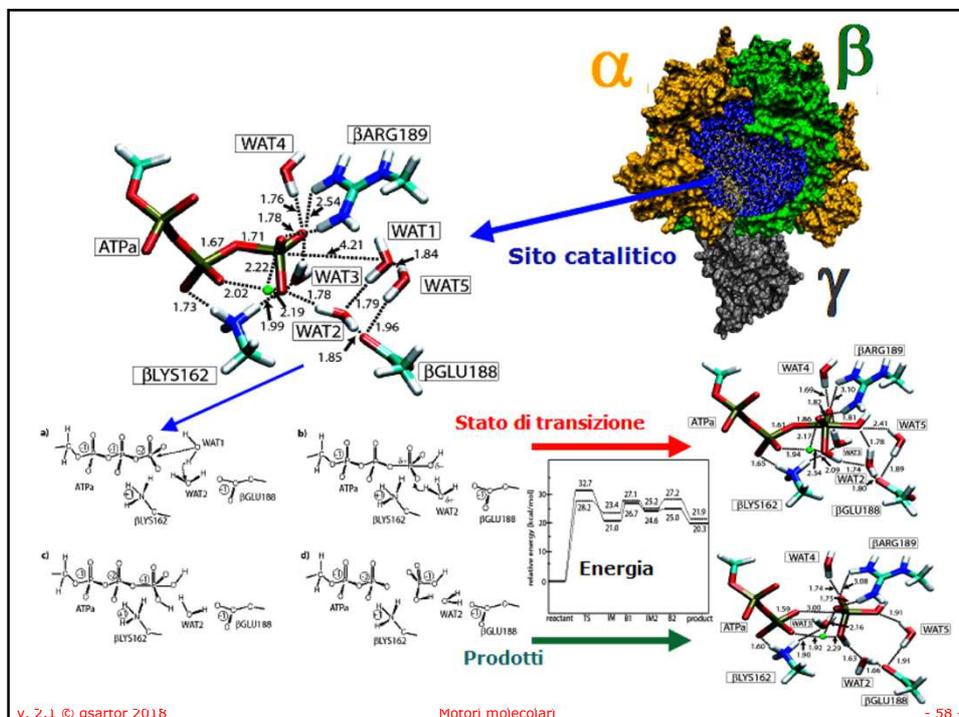
- Ci sono tre siti catalitici.
- Sono localizzati alle interfacce $\alpha\beta$ con predominanza nella subunità β .
- Ognuna delle tre subunità α contiene un ATP legato alla proteina ed inattivo nella catalisi.
- I nucleotidi adenilici si legano alle subunità α e β complessati con Mg^{++} .



v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 57 -



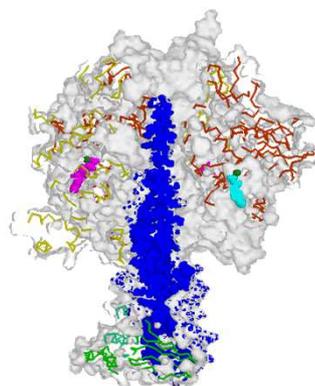
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 58 -

Struttura di F₁

- La subunità γ include un ripiegamento dell'elica che costituisce una "camma" incastrata tra le subunità α e β .



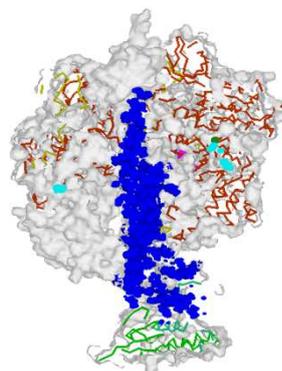
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 59 -

Struttura di F₁

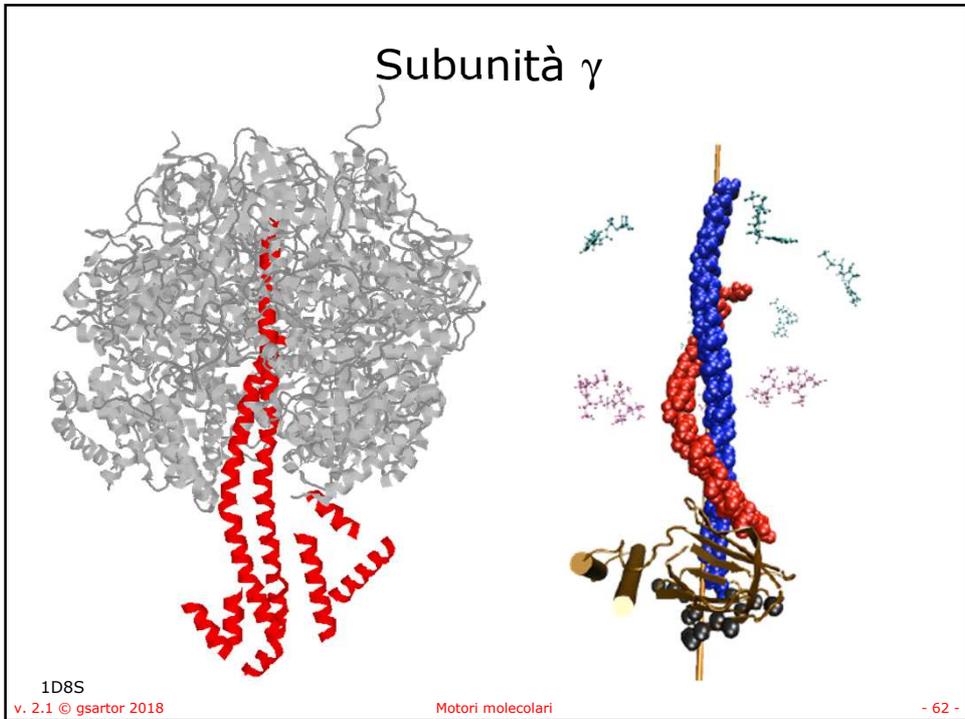
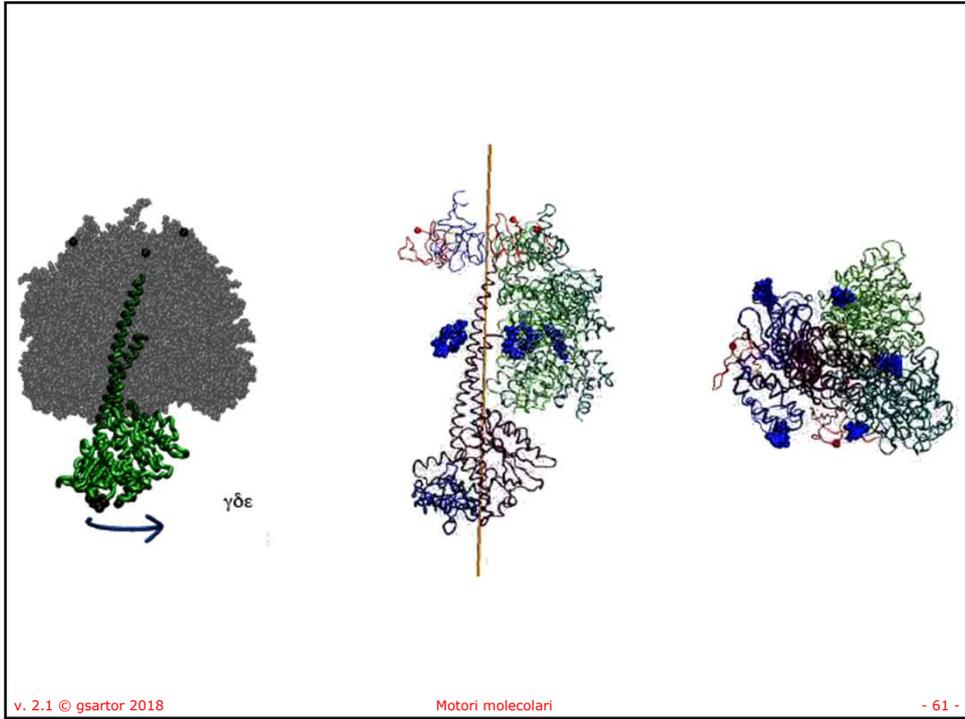
- La subunità γ include un ripiegamento dell'elica che costituisce una "camma" incastrata tra le subunità α e β .

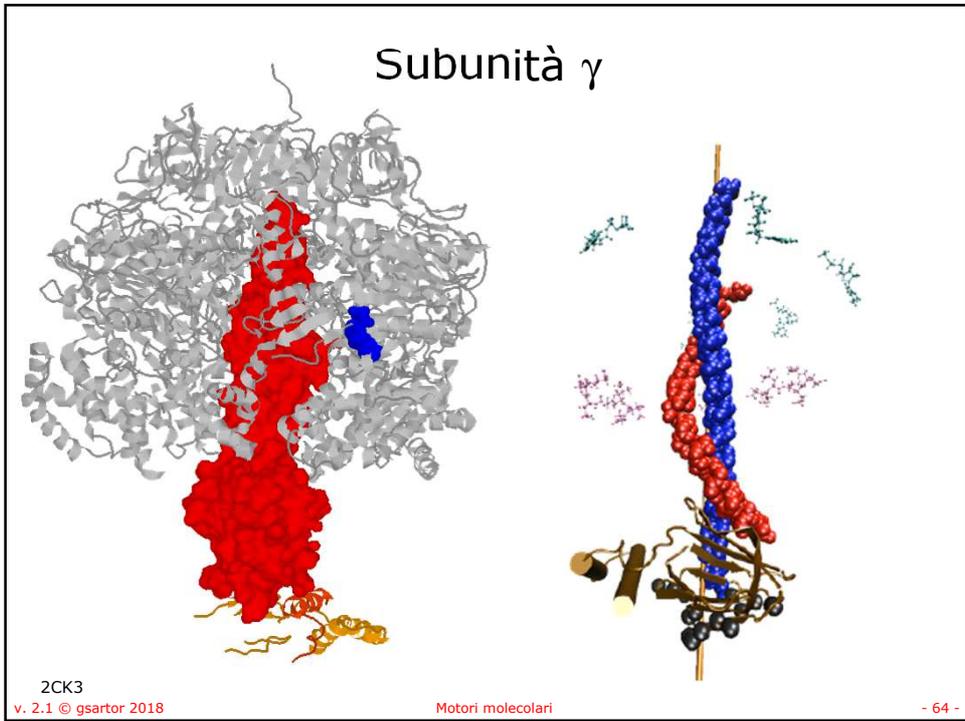
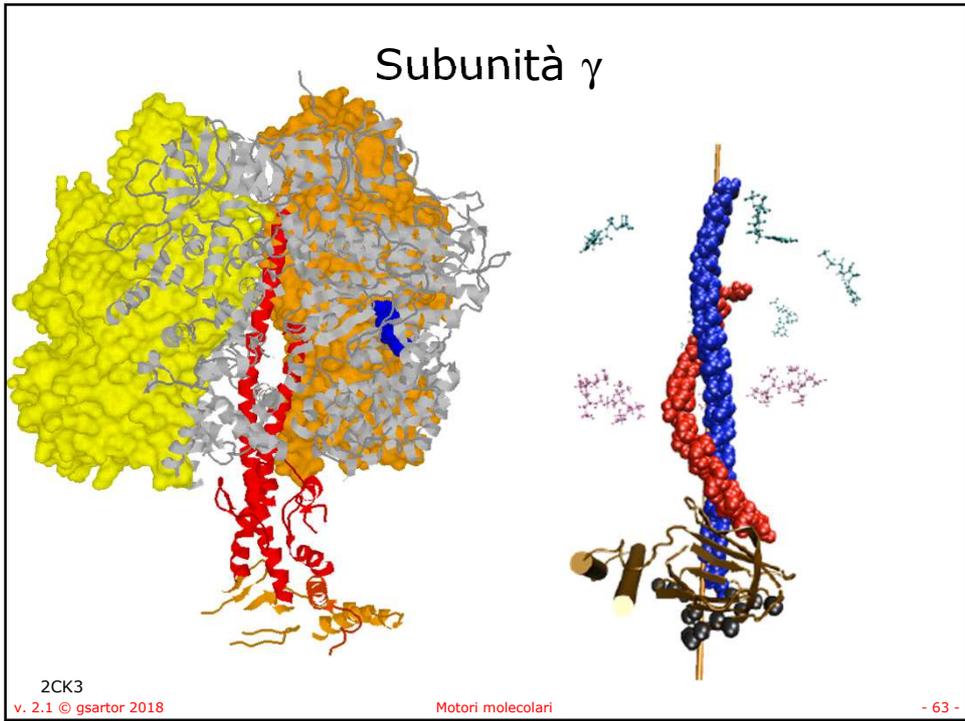


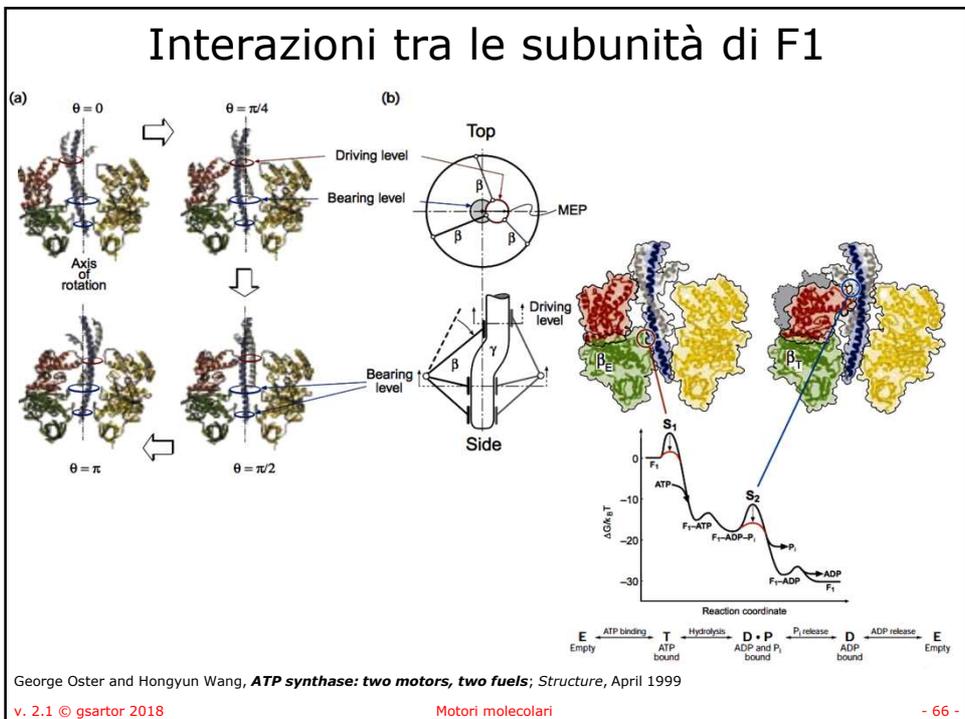
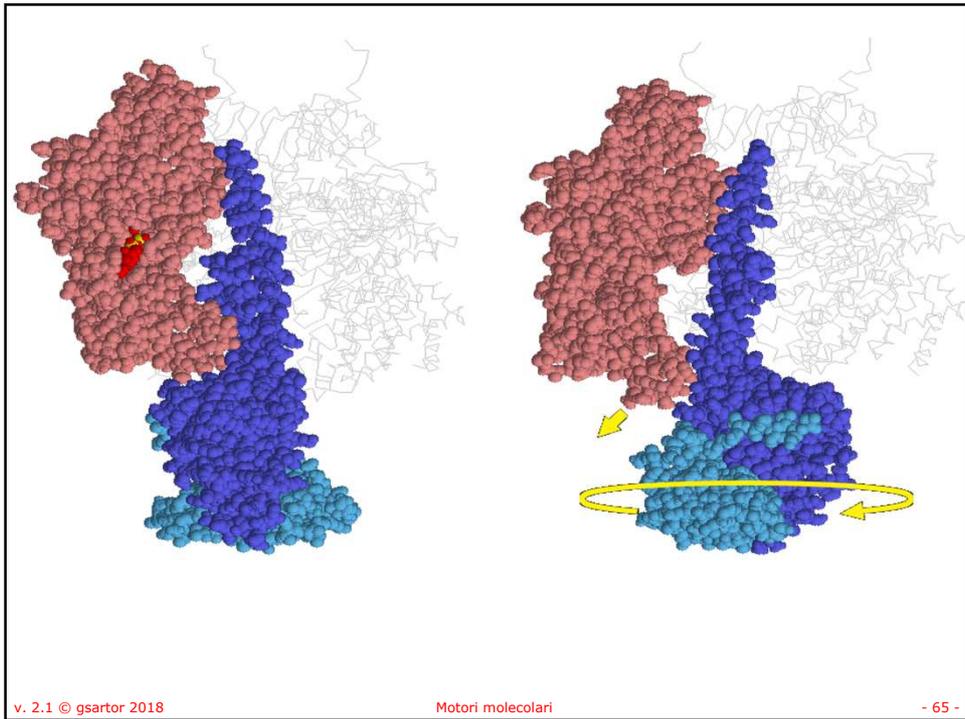
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 60 -

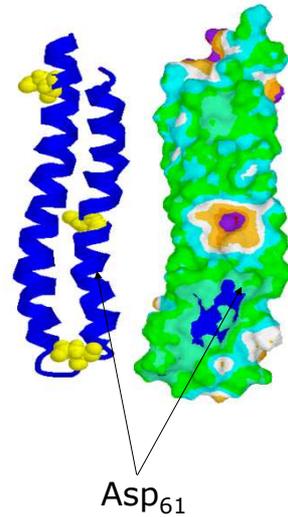






Subunità F_o

- Ciascuna subunità c di F_o ha una struttura ripiegata (hairpin) con due α -eliche transmembrana connesse da un corto loop.
- È un peptide molto idrofobico.
- Una delle due α -eliche ha un residuo acido (Asp o Glu) che è il sito di reazione del DCCD.
- Tale residuo è essenziale per il trasporto dei H⁺ attraverso F_o.



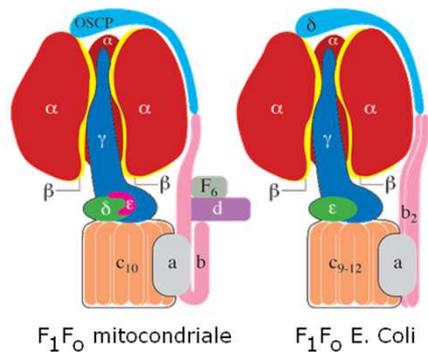
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 67 -

Struttura F_oF₁

- F_o è un complesso di proteine integrali di membrana.
 - La stechiometria in *E. Coli* è a, b_2, c_{10} .
- Negli eucarioti F₁F_o è un poco più complessa che nei batteri.
- Nei diversi organismi le subunità hanno nomi diversi.
 - La subunità δ nei mammiferi è omologa alla subunità ϵ in *E. Coli*.
 - La subunità "OSCP" nei mammiferi è omologa alla subunità δ in *E. Coli*.
 - La subunità ϵ nei mammiferi è unica.



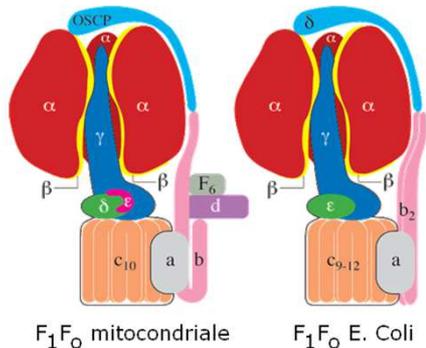
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 68 -

Struttura F_0F_1

- Si ritiene che le subunità b di F_0 includano una α -elica transmembrana e un dominio α -elica molto polare che si estenda al di fuori della membrana.
- Lo "statore" del motore molecolare consiste quindi in un anello di tre subunità $\alpha\beta$ di F_1 , la subunità a di F_0 e le varie subunità che le legano insieme (b , d , F_6 e $OSCP$ nel F_1F_0 mitocondriale o due b e δ in $E. coli$).
- Il "rotore" consisterebbe in un anello di dieci subunità c , la "camma" nella parte interna di F_1 (γ , δ , ϵ nei mitocondri; γ e ϵ in $E. coli$).



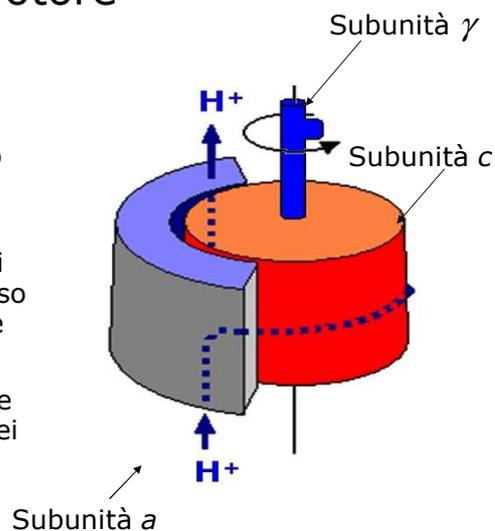
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 69 -

Il rotore

- È stato proposto che la subunità a di F_0 formi due mezzi canali per il trasporto dei protoni.
- Il trasporto avverrebbe attraverso la ionizzazione di gruppi ionizzabili o attraverso molecole d'acqua contenute nei canali.
- La variazione di ionizzazione (Asp61 in c) al passaggio dei protoni indurrebbe il movimento rotatorio del rotore trasmesso poi, attraverso γ a F_1 .

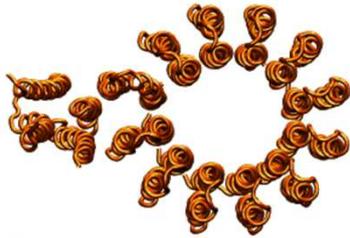


v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 70 -

Modelli strutturali di F_0



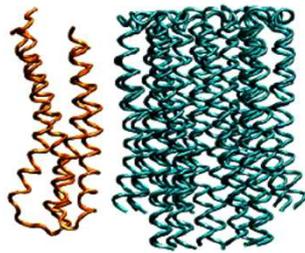
a_1c_{12} (Rastogi & Girvin, 1999, NMR)

+



c_{10} (Fillingame et al, 1999, NMR)

=

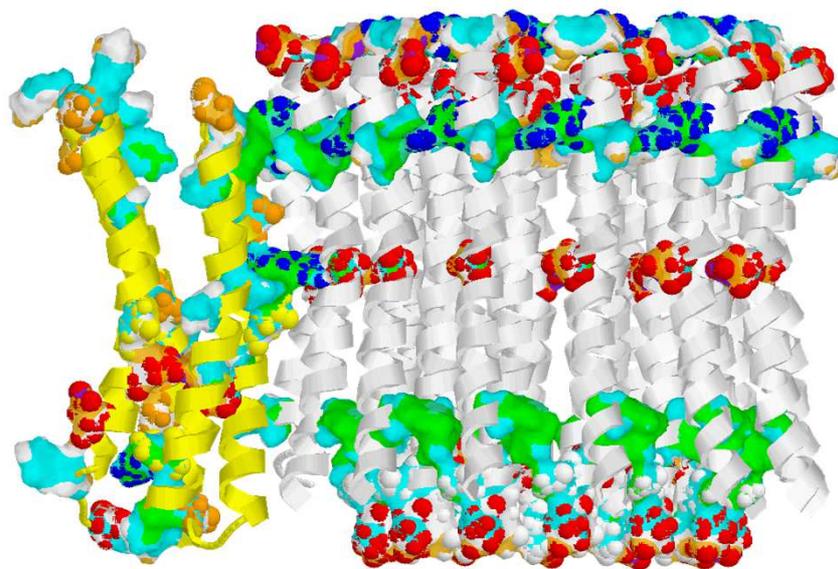


a_1c_{10} (2001-2002, modeling)

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 71 -

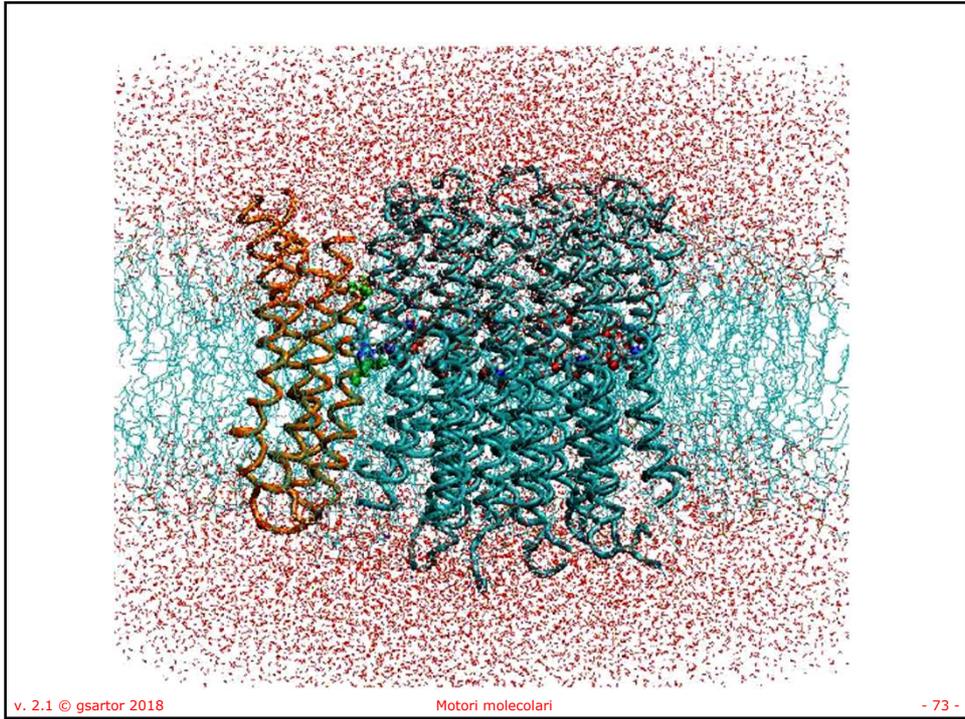


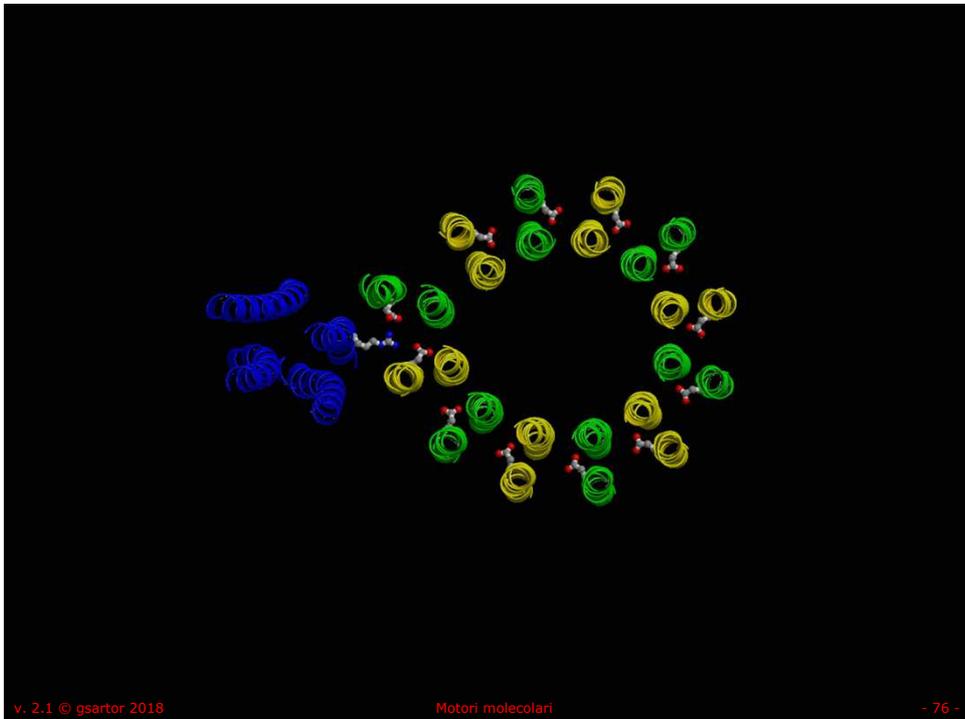
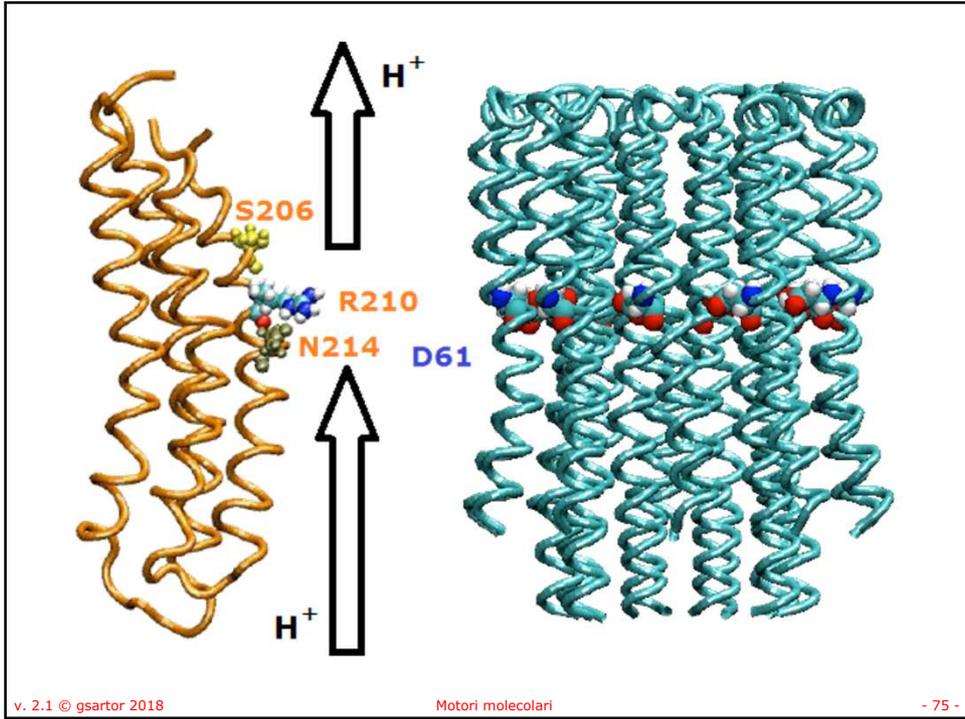
1C17

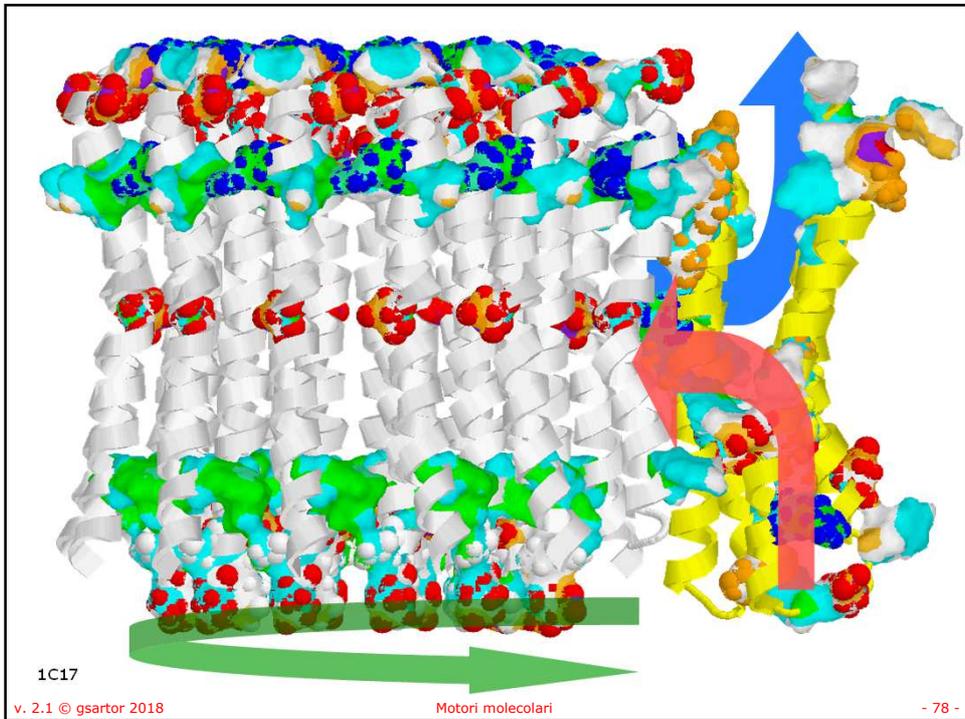
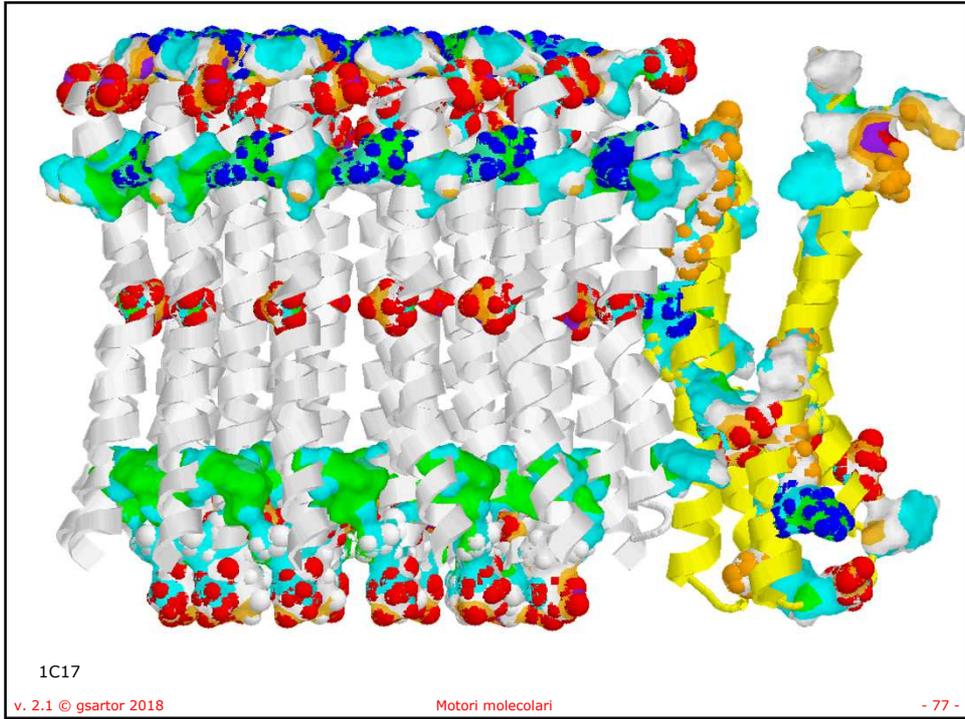
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

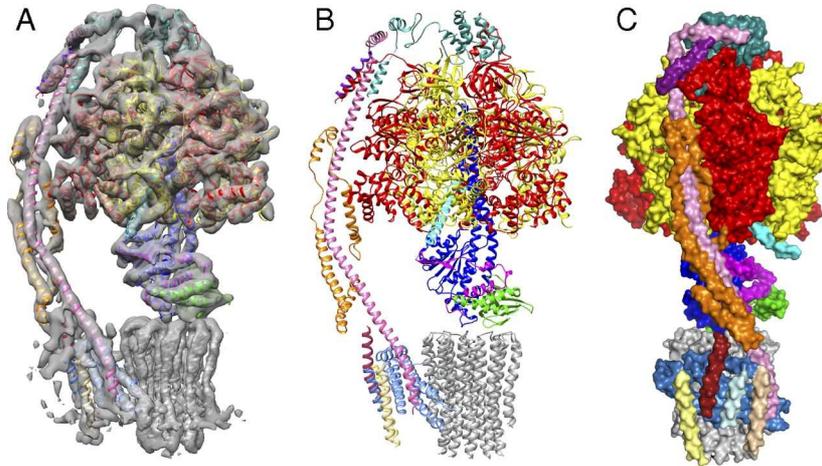
- 72 -







The structure of the F-ATPase from *P. angusta*.

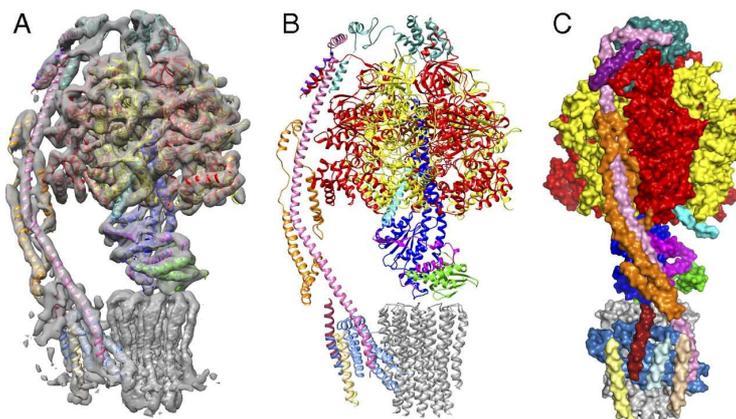


Kutti R. Vinothkumar et al. PNAS 2016;113:12709-12714

©2016 by National Academy of Sciences

PNAS

The structure of the F-ATPase from *P. angusta*.



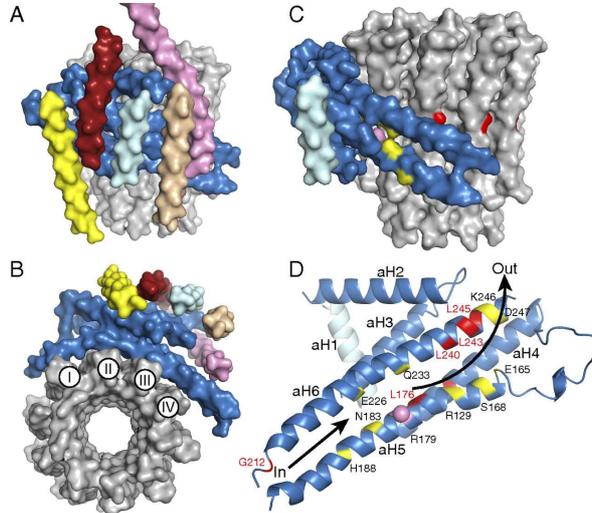
The structure of the F-ATPase from *P. angusta*. The enzyme was inhibited with residues 1–60 of the bovine inhibitor protein IF1. (A) The cryo-EM map of state 1 and structural model viewed from the side, with the peripheral stalk on the left, the catalytic domain at the top, attached by the central and peripheral stalks to the membrane domain below. (B and C) Side views of the enzyme-inhibitor complex in cartoon and surface representation, respectively. C is rotated to the right by 90° relative to A and B. The α -, β -, γ -, δ -, and ϵ -subunits forming the membrane extrinsic catalytic domain are red, yellow, royal blue, green, and magenta, respectively; the inhibitor protein is cyan; and the peripheral stalk subunits OSCP, b, d, and h are sea-green, pink, orange, and purple, respectively. In the membrane domain, the c10-rotor is gray, the resolved region of the associated subunit a is corn-flower blue. Chains Ch1–Ch4 are pale yellow, brick-red, pale cyan, and beige, respectively, and have been assigned as transmembrane α -helices in subunit f and, in ATP8, as aH1 and bH1, respectively. In *SI Appendix*, Fig. S5, the identities of subunits are placed directly on an enlarged version of C.

Kutti R. Vinothkumar et al. PNAS 2016;113:12709-12714

©2016 by National Academy of Sciences

PNAS

The membrane domain of the F-ATPase from *P. angusta*.

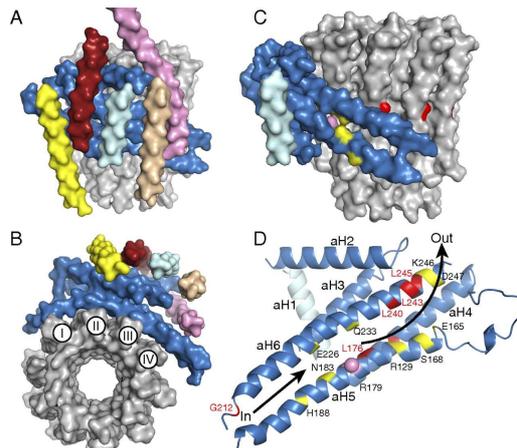


Kutti R. Vinothkumar et al. PNAS 2016;113:12709-12714

©2016 by National Academy of Sciences

PNAS

The membrane domain of the F-ATPase from *P. angusta*.

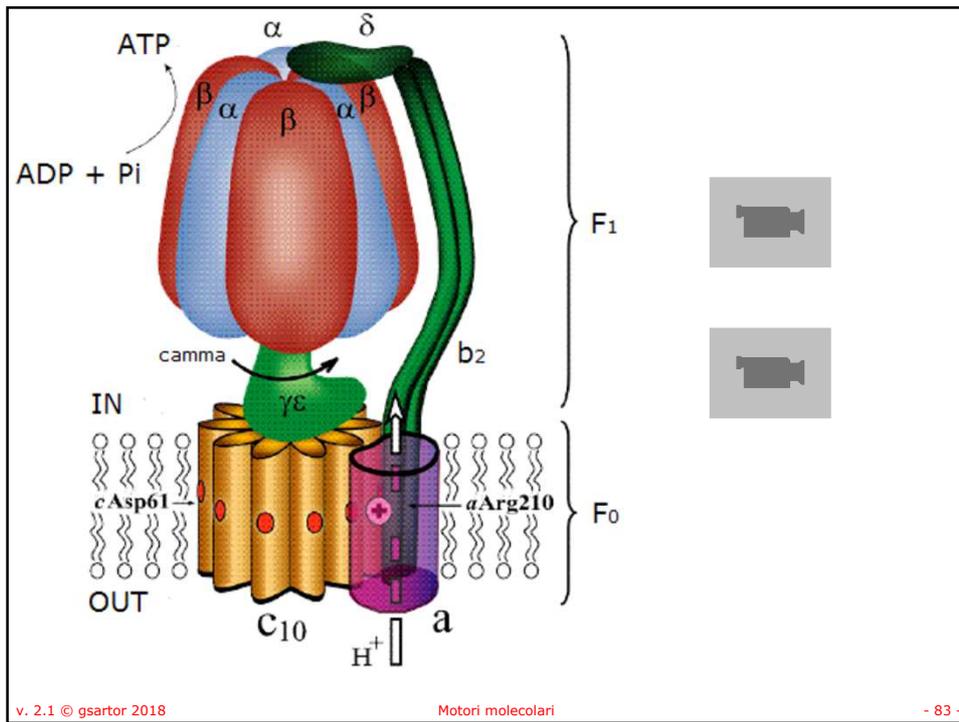


The membrane domain of the F-ATPase from *P. angusta*. In A–D, the a-subunit is corn-flower blue. (A and B) Views in solid representation from the side and below the membrane domain. The c10-ring is gray, the b-subunit (upper part not shown) is pink, and the pale yellow, brick-red, light cyan, and beige segments are transmembrane α -helices, Ch1–Ch4 assigned to subunit f, ATP8, aH1, and bH1, respectively. In the c-ring, I–IV indicate the four transmembrane C-terminal α -helices in contact with subunit a. (C and D) Views of the a-subunit in solid and cartoon representation viewed from outside and looking out from the interface with the c-ring, respectively, with aH1 in pale cyan. Conserved polar residues are yellow; the positions of human mutations associated with pathologies (SI Appendix, Table S1) are red. The pink sphere denotes the conserved Arg-179 in aH5 that is essential for proton translocation. The lower arrow indicates the inlet pathway for protons that transfer to Glu-59 in the C-terminal α -helix-II of the c-ring. They are carried around the ring by anticlockwise rotation, as viewed from above, until they arrive at Arg-179 where they enter the exit pathway, denoted by the upper arrow.

Kutti R. Vinothkumar et al. PNAS 2016;113:12709-12714

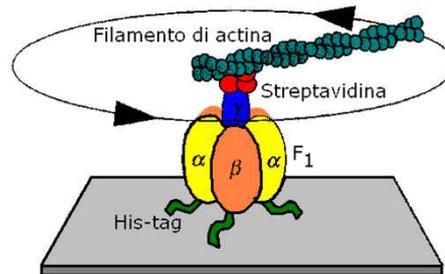
©2016 by National Academy of Sciences

PNAS



Motori molecolari

- Che la rotazione di una parte della proteina avvenga in seguito all'idrolisi di ATP è stato dimostrato sperimentalmente:
 - Le subunità β di F_1 sono state "saldate" ad una superficie.
 - Un filamento di actina opportunamente marcato con colorante fluorescente è stato legato alla porzione di γ che protrude dalla F_1 .
 - Fornendo ATP nella soluzione si ha la rotazione (visibile) del braccio di actina in senso antiorario.

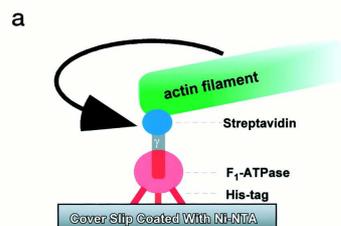


v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 85 -

The direct observation of the γ rotation in the F1 motor.



Noji H, Yoshida M J. Biol. Chem. 2001;276:1665-1668

©2001 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology

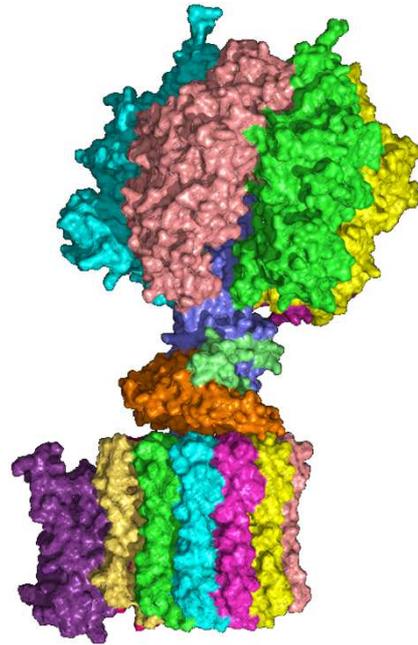
Motori molecolari

jbc

- 86 -

Struttura

- Questo è il massimo di risoluzione ottenuta fino ad ora della definizione della intera struttura dell'ATP sintasi.



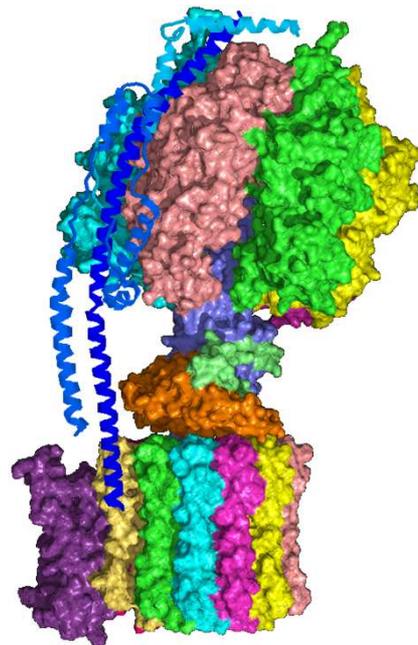
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 87 -

Struttura

- Questo è il massimo di risoluzione ottenuta fino ad ora della definizione della intera struttura dell'ATP sintasi.
- Struttura della subunità b di F₀ (2CLY)



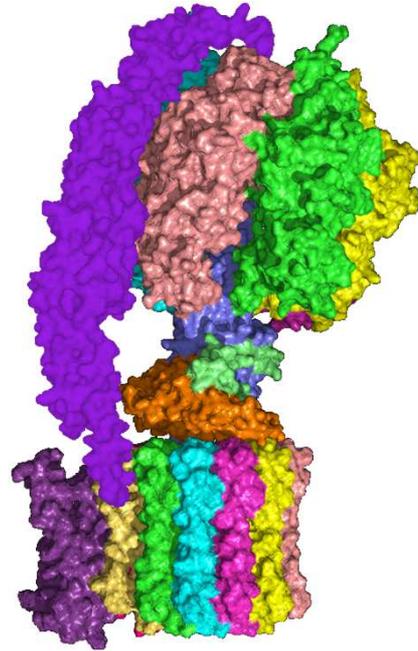
v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 88 -

Struttura

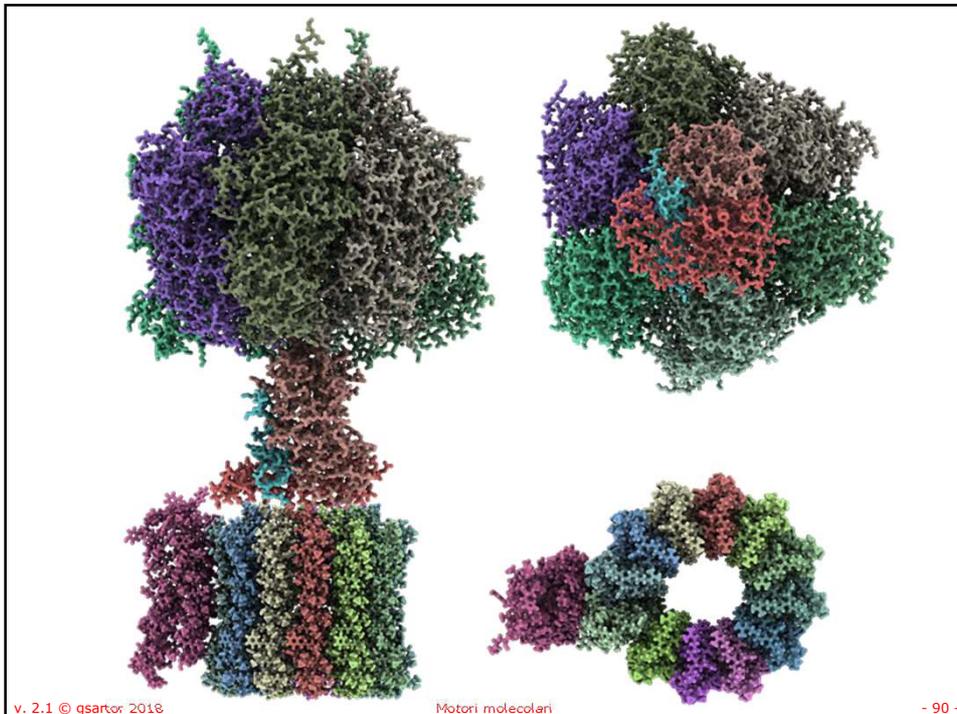
- Questo è il massimo di risoluzione ottenuta fino ad ora della definizione della intera struttura dell'ATP sintasi.
- Struttura della subunità b di F_0 (2CLY)



v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

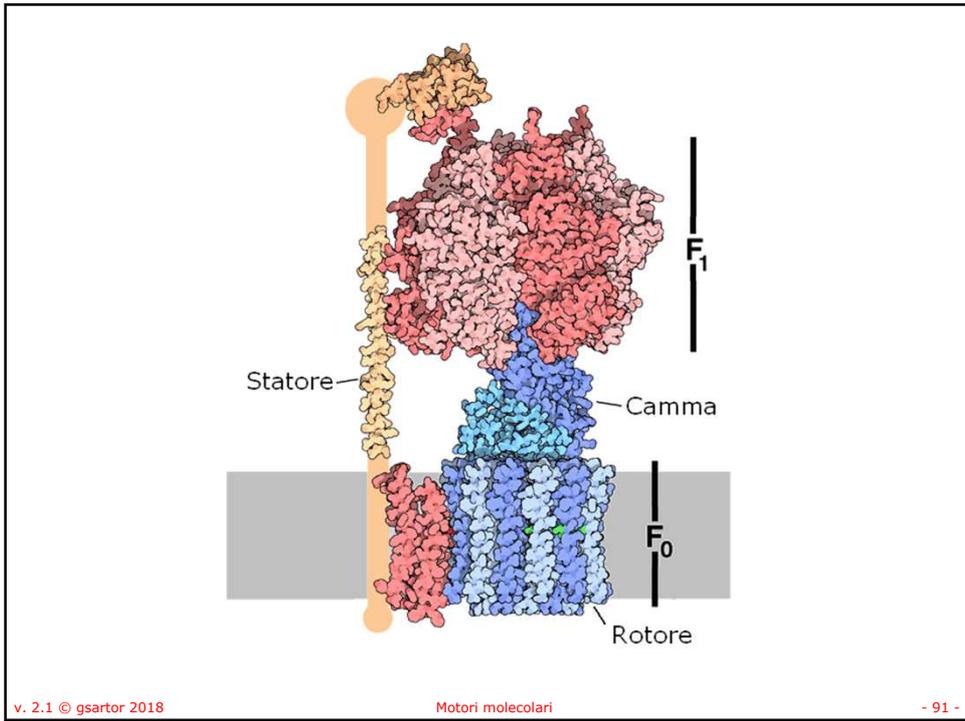
- 89 -



v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

- 90 -



Eucarioti

- Tre famiglie di proteine che funzionano come motori:
 - Miosina
 - Kinesina
 - Dineina

Eucarioti

- Tre famiglie di proteine che funzionano come motori:
 - Miosina
 - Kinesina
 - Dineina

si muove lungo l'actina (contrazione muscolare)

Eucarioti

- Tre famiglie di proteine che funzionano come motori:

- Miosina
- Kinesina
- Dineina



Eucarioti

- Tre famiglie di proteine che funzionano come motori:

- Miosina
- Kinesina
- Dineina

- I binari:

- Actina
- Microtubuli

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
 - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] - Zanichelli
 - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
 - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
 - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
 - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Rensselaer Polytechnic Institute:
<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:

<http://www.gsartor.org/pro>

Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor

Università di Bologna a Ravenna

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it

v. 2.1 © gsartor 2018

Motori molecolari

97

