

## Capítol

# 2

# La difracció del múscul

Aquest capítol revisa, en primer lloc, la teoria de la dispersió i difracció de raigs X, tot fent especial referència a les regions del meridià i l'equador del diagrama de difracció. A continuació, s'estudia el diagrama de difracció que produeixen les estructures helicoidals presents en el múscul i l'efecte que tenen sobre el meridià. De manera equivalent s'estudia l'efecte de l'estructura hexagonal transversal sobre l'equador. Finalment, es menciona l'efecte de la superxarxa del múscul al diagrama de difracció.



## 2.1. La difracció de raigs X

### 2.1.1. Introducció

**E**ls raigs X són ones electromagnètiques, com la llum visible o les ones de ràdio, definides, entre d'altres paràmetres, per una direcció de propagació i una intensitat. La direcció de propagació de l'ona és especificada pel *vector d'ona* o *moment*  $\mathbf{k}$ , de mòdul  $|\mathbf{k}| = k = 2\pi/\lambda$ , on  $\lambda$  és la longitud d'ona. Si  $\omega$  és la freqüència angular de l'ona, l'amplitud del camp electromagnètic  $A$  en un punt de l'espai  $\mathbf{r}$  i en un temps  $t$  ve definit per

$$A = A_0 e^{i(\mathbf{k}\cdot\mathbf{r} + \omega t)},$$

on  $A_0$  és el mòdul del camp elèctric, el valor quadràtic mitjà del qual ens dona la intensitat. A causa de la dualitat quàntica ona-corpúscle, a més d'ones electromagnètiques els raigs X poden ser representats com a fotons, amb els mateixos paràmetres característics. Usarem indistintament les dues representacions, segons convingui per a aclarir la imatge gràfica.

La difracció de raigs X, descoberta fa ja quasi un segle [Friedrich *et al.*, 1912; Bragg, 1913], és una de les tècniques més usades per l'anàlisi estructural a nivell atòmic. L'objectiu d'aquesta tècnica és determinar la mitjana temporal de la *densitat electrònica*,  $\rho(\mathbf{r})$ , en cada punt de la mostra mitjançant la interacció dels raigs X amb els electrons, a partir del coneixement dels raigs X entrants i dels sortints de la mostra. La difracció, a diferència de la dispersió, és conseqüència de l'ordenació de les partícules que componen la mostra.

La densitat electrònica és característica de l'estructura i, per tant, en principi, podem conèixer a partir d'ella la posició i tipus d'àtoms que componen la mostra. Els inevitables problemes experimentals i algunes limitacions teòriques, com el problema de les fases, fan que la tècnica no sigui d'aplicació tan directa, tot i que amb l'ajut de diferents mètodes aquestes dificultats poden ser superades.

Una altra característica important de la difracció de raigs X és la gran diversitat de mètodes existents (en pols, Laue, etc.) que fan que sigui aplicable a una immensa quantitat i varietat de mostres. Als darrers anys, l'ús d'aquesta tècnica s'ha generalitzat a l'estudi de macromolècules biològiques gràcies a l'accés a una nova font de raigs X, la llum de sincrotró (vegeu el capítol 3) i al desenvolupament de nous mètodes de difracció que aquesta nova font permet. En particular, la tècnica de difracció a angles baixos és la indicada per a l'estudi de mostres amb una cel·la elemental, o unitat de repetició, molt gran, com és el cas del teixit muscular [Vainshtein, 1966].

En aquest capítol introduïrem les expressions bàsiques de la difracció de raigs X, i les concretarem en el cas de les dues estructures presents en el múscul: l'estructura helicoidal, en la direcció axial del múscul, i l'estructura hexagonal en la direcció transversal. L'anàlisi d'aquestes dues estructures permetrà d'interpretar els resultats experimentals presentats al capítol 4.

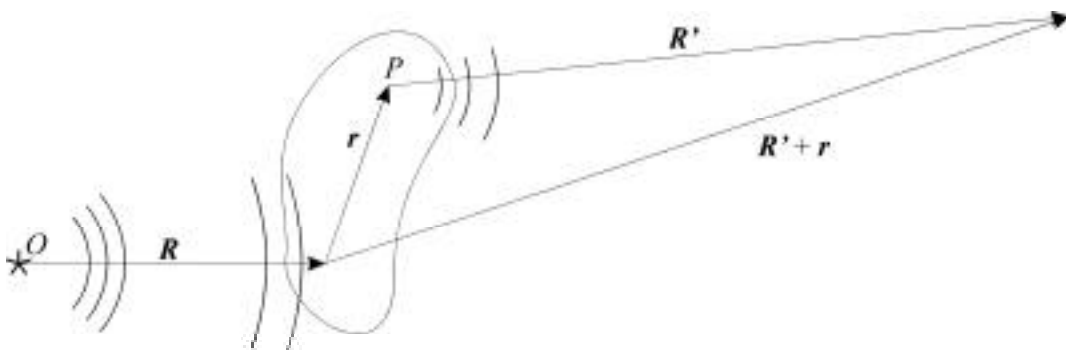
## 2.1.2. La dispersió de raigs X

### 2.1.2.1. La dispersió d'una partícula

En la descripció matemàtica convencional de la dispersió es fa la suposició bàsica de la dispersió simple dels raigs X, és a dir, un raig X pot ser dispersat per la mostra un sol cop com a màxim. La dispersió simple implica que l'ona incident indueix l'emissió d'ones esfèriques en cada punt material de la mostra amb una relació fixa de fases entre punts. Aquest tractament, també conegut per aproximació cinemàtica, correspon a la primera aproximació de Born de la teoria de la dispersió en la mecànica quàntica, i és plenament vàlid per al cas de radiació de raigs X i per a mostres amb un cert grau de desordre. La difracció del múscul entra plenament dins d'aquesta suposició.

A més, fem una segona suposició en considerar només el cas de dispersió elàstica, o *de Thompson*, en què la radiació dispersada no té pèrdues d'energia i la longitud d'ona  $\lambda$  del raig X es manté constant. Aquesta segona aproximació és exacta quan la densitat electrònica  $\rho(r)$  és constant en el temps típic d'interacció, com és, de fet, el nostre cas. En cas contrari, la densitat electrònica obtinguda mitjançant aquesta aproximació hauria de ser considerada com una mitjana temporal de la densitat electrònica.

Molt esquemàticament, la dispersió elàstica consisteix en l'absorció d'un fotó incident de moment inicial  $k_0$  per part d'una partícula o *centre de dispersió*, bàsicament un electró, que queda excitat a un nivell més energètic. Posteriorment, l'electró excitat retorna a l'estat fonamental original mitjançant l'emissió d'un fotó de raigs X de la mateixa energia, però de diferent moment  $k$  i, per tant, amb una direcció diferent. El resultat final del procés de dispersió és el canvi de la fase del fotó en  $p$ , i del moment en direcció, però l'energia i el mòdul del moment romanen constants [Jackson, 1975]. L'electró, finalment, resta en el mateix estat on era inicialment.



**Figura 2.1.** Definicions de les distàncies  $R$ ,  $r$  i  $R'$ . La font se suposa prou allunyada per a què a la mostra les ones esfèriques puguin ésser considerades planes ( $R \gg r$ ). La mateixa condició és assumida pel punt  $P$  de la mostra ( $R' \gg r$ ).

L'objectiu de la derivació de les expressions de la dispersió elàstica és trobar la forma analítica de l'amplitud del camp en el punt d'observació. De forma general, aquesta dependrà de la longitud d'ona de la llum incident, de l'estructura de la mostra, i de les posicions de la font de llum, la mostra il·luminada i el punt d'observació. En el

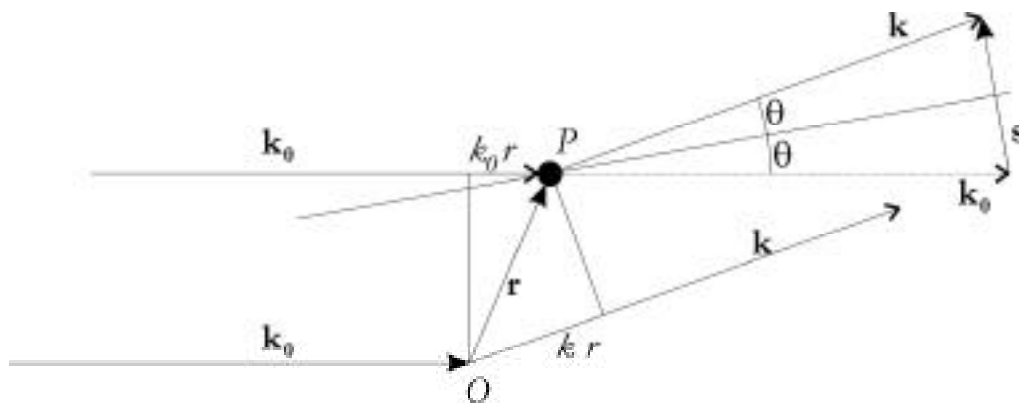
cas dels experiments de dispersió o difracció de raigs X, les distàncies entre la font, la mostra i el punt d'observació són molt més grans que la dimensió de la mostra, de tal manera que podem considerar paral·lels els raigs que arriben tant a la mostra com al punt d'observació (figura 2.1). Així, si aproximem les ones esfèriques, emeses per la font, per ones planes, l'amplitud del camp que arriba al punt  $P$  de la mostra és

$$A_P = A_0 e^{ik_0(R+r) + i\omega t},$$

on hem suposat que en l'origen ( $R + r = 0$ ) l'amplitud té una fase coherent, és a dir, ben definida per tot temps, i que es comporta com  $e^{i\omega t}$ . Cal notar, però, que aquesta coherència s'aplica únicament a un sol fotó emès i, per tant, es perd en fonts de llum, com les fonts de llum de sincrotró, que emeten fotons de forma no coherent. Aquesta no-coherència permet negligir, d'ara en endavant, la fase que depèn del temps.

L'ona plana que arriba al punt  $P$  és reemesa pels centres de dispersió en forma d'ona esfèrica en totes direccions, que per efecte de les llargues distàncies pot ser interpretada com una ona plana per a cada direcció  $k$ . La diferència de fase respecte l'origen de l'ona plana dispersada per un centre situat a  $r$  serà  $kr - k_0r = (k - k_0)r$  (figura 2.2). Si suposem que l'ona incident té amplitud unitària ( $A_0 = 1$ ) i definim  $s = (k - k_0)$  i  $S = s/2$ , l'ona en la direcció  $k$  generada pel centre serà

$$f e^{i(k-k_0)r} = f e^{iSr} = f e^{2\pi i S r}.$$



**Figura 2.2.** Ampliació de la figura anterior que mostra els paràmetres de la dispersió en un centre  $P$  situat a la posició  $r$ . La diferència de camí òptic entre l'origen  $O$  i el punt  $P$  és  $(k - k_0)r$ .

El factor  $f$ , anomenat *poder de dispersió* (*scattering power*), és un factor de proporcionalitat que indica la capacitat del centre per difondre l'ona incident. El factor  $f$  depèn, en general, de la direcció considerada,  $f = f(S)$ . En general la dispersió serà màxima quan  $s = 0$ , és a dir, en la direcció de la radiació incident. El mòdul del moment resultant  $s = k - k_0$  o, equivalentment,  $S = (k - k_0)/2$  serà

$$s = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad \text{o} \quad S = \frac{2 \sin\theta}{\lambda}. \quad (2.1)$$

### 2.1.2.2. L'amplitud de dispersió d'una mostra

Aquestes expressions, obtingudes per a un sol centre de dispersió situat a la posició  $r$  de l'origen, són generalitzables a una mostra qualsevol en què hi ha un nombre extraordinàriament gran de centres de dispersió, típicament de l'ordre del nombre d'Avogadro. L'ona resultant  $F(S)$  en una determinada direcció serà la suma de les ones provinents dels  $n$  centres situats a les posicions  $r_j$ ,

$$\sum_j^n f_j e^{2\pi i S r_j} = F(S). \quad (2.2)$$

$F(S)$  s'anomena amplitud de dispersió, o *scattering amplitude*, i de fet és una extensió del poder de dispersió  $f_j$  que amplia el concepte de poder de dispersió d'un centre de dispersió elemental a qualsevol sistema físic amb molts dispersors (electró, àtom, molècula, grup de molècules, etc.).

Com a incís, comentem que si es limita el sumatori als  $n$  electrons d'un àtom, l'amplitud de dispersió  $F(S)$  que en resulta s'anomena factor de forma (*form factor*), i depèn del canvi de moment  $S$  o, equivalentment, de la direcció d'observació. En aquest cas  $f$  representa el poder de dispersió d'un electró de l'àtom. Si, en canvi, el sumatori de l'expressió anterior es realitza sobre una unitat qualsevol, la repetició de la qual genera tota la mostra, l'amplitud de dispersió  $F(S)$  s'anomena factor d'estructura (*structure factor*), com veurem més endavant. Així, els conceptes d'amplitud de difracció, factor de forma i factor d'estructura són anàlegs, donat que vénen descrits per la mateixa expressió 2.2, i es diferencien solament en la naturalesa dels centres de dispersió sumats.

Atès que els raigs X són essencialment dispersats pels electrons, podem dir que el material dispersor és la mitjana temporal de la densitat electrònica  $\rho(r)$ , que té pics en les posicions dels àtoms i valors propers a zero entre ells. La densitat electrònica és característica de l'estructura de la mostra, i determina la posició i tipus d'àtoms que la componen, objectiu final dels estudis estructurals.

La densitat electrònica és definida en tots els punts del volum de la mostra i, per tant, l'amplitud de difracció que genera no pot ser expressada discretament amb un sumatori, sinó amb una integral sobre el volum de la mostra. D'aquesta manera, el factor de forma  $f$  i el sumatori sobre tots els centres de dispersió són substituïts per la densitat electrònica i la integral sobre tot el volum de la mostra  $V$ , respectivament. Amb aquesta substitució, si definim les components del vector  $S$  com  $(X, Y, Z)$ , la formulació contínua de l'amplitud de dispersió és

$$F(S) = \int_V \rho(r) e^{2\pi i S r} d^3r = \int_V \rho(r) e^{2\pi i (xX + yY + zZ)} dx dy dz. \quad (2.3)$$

Donada la simetria helicoidal dels filaments del sarcòmer, és útil expressar l'amplitud de difracció en coordenades cilíndriques,  $r, \psi, z$ , i les seves conjugades en l'espai recíproc,  $R, \Psi$  i  $Z$ . En aquest cas, la integral de Fourier (expressió 2.3) s'escriu en la forma [Klug *et al.*, 1958; Vainshtein, 1966]

$$F(R, \Psi, Z) = \int_0^{\infty} \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} \rho(r, \psi, z) e^{2\pi i (Rr \cos(\psi - \Psi) + zZ)} r dr d\psi dz . \quad (2.4)$$

L'amplitud de dispersió pot ser tractada bé físicament o bé matemàticament. D'una banda, físicament, la funció  $F(\mathbf{S})$  representa l'amplitud de l'ona dispersada dirigida a la direcció de l'espai a què apunta el vector  $\mathbf{S}$ . La magnitud física observable és, però, el quadrat de l'amplitud, la *intensitat*  $I$ ,

$$I(\hat{\mathbf{S}}) = F(\hat{\mathbf{S}})F^*(\hat{\mathbf{S}}) = |F(\hat{\mathbf{S}})|^2 . \quad (2.5)$$

Quan s'intercepta amb una pantalla un feix de raigs X dispersats, s'observa la intensitat en una regió limitada per les dimensions de la pantalla. S'obté així l'anomenat *diagrama de difracció*, que dependrà de l'orientació relativa entre el feix incident, la mostra i la pantalla, així com de les característiques d'aquests.

### 2.1.2.3. L'amplitud de difracció és la Transformada de Fourier de la densitat electrònica

D'altra banda, la funció  $F(\mathbf{S})$  pot ser considerada matemàticament com la *transformada de Fourier* (TF) de la densitat electrònica  $\rho(\mathbf{r})$  i, per tant, tota la teoria de la transformació de Fourier li és aplicable. La TF posa en correspondència la funció  $\rho(\mathbf{r})$  definida en l'espai dels vectors de l'espai real  $\mathbf{r}$  amb la funció  $F(\mathbf{S})$  definida en l'espai dels vectors  $\mathbf{S}$ , anomenat *espai recíproc*, a través de la integral de l'expressió 2.3. La funció  $F(\mathbf{S})$  és, per tant, la *imatge* en l'espai recíproc de  $\rho(\mathbf{r})$ , i inversament aquesta és la imatge de  $F(\mathbf{S})$  en l'espai real. La correspondència contrària, l'*antitransformada de Fourier*, de  $F(\mathbf{S})$  dona la densitat electrònica de la mostra

$$\rho(\hat{\mathbf{r}}) = \int_{X,Y,Z \in V^*} F(\hat{\mathbf{S}}) e^{-2\pi i (xX + yY + zZ)} dX dY dZ , \quad (2.6)$$

en què  $V^*$  és el volum de l'espai recíproc on  $F(\mathbf{S})$  és no nul·la. La integral 2.6 s'anomena *síntesi de Fourier*, i la seva resolució és l'objectiu dels experiments de difracció de raigs X pels anomenats *mètodes directes*. De manera més concisa, les relacions 2.3 i 2.4 es poden expressar simbòlicament com

$$F(\hat{\mathbf{S}}) = TF[\rho(\hat{\mathbf{r}})] \quad \text{i} \quad \rho(\hat{\mathbf{r}}) = TF^{-1}[F(\hat{\mathbf{S}})] , \quad (2.7)$$

respectivament. Així doncs, el diagrama de difracció, que enregistra la funció  $I(\mathbf{S})$ , és el quadrat de la TF de la projecció de la massa dispersora en la direcció de la llum incident. Les seves coordenades seran per tant les pròpies de l'espai recíproc.

Una relació que compleix la transformació de Fourier, i que serà utilitzada a bastament en tot el capítol, és l'anomenat *teorema de la convolució*. Segons aquest, la TF de la convolució de dues funcions (l'operació, notada amb el símbol  $\otimes$ , per la qual una funció  $f_1(x)$  es distribueix segons la llei especificada per una segona funció  $f_2(x)$ ) és igual al producte simple punt a punt de les TF de les dues funcions [Vainshtein, 1966]. Simbòlicament, el teorema s'expressa com

$$TF[f_1(x) \otimes f_2(x)] = TF[f_1(x)] \times TF[f_2(x)]. \quad (2.8)$$

Finalment, cal puntualitzar que, amb generalitat,  $F(\mathbf{S})$  és un nombre complex definit per una amplitud i una fase  $F(\mathbf{S}) = A e^{i\phi}$ . Tot i això, donat que en el diagrama de difracció únicament s'observa el seu quadrat,  $|F(\mathbf{S})|^2 = A^2$ , tota la informació respecte a les fases es perd, fet que impedeix determinar  $\rho(\mathbf{r})$  aplicant directament l'expressió (2.6). Aquesta pèrdua d'informació de les fases s'anomena genèricament *problema de les fases*.

Un altre problema que es presenta és que, en general, no es coneix la informació en tot l'espai recíproc, sinó solament de la regió assolible pel detector. Així, la integral 2.6 no pot ser determinada totalment, sinó únicament fins a una certa resolució, que vindrà caracteritzada per l'invers del mòdul de l'extrem de la regió considerada en l'espai recíproc.

### 2.1.3. La difracció de raigs X

La difracció de raigs X és el fenomen de dispersió espacialment coherent. Quan un front d'ona de moment  $\mathbf{k}_0$  incideix en una mostra, cada àtom (o més exactament els electrons de cada àtom) es converteix en un centre dispersor, i l'ona es distribueix en totes les direccions de l'espai. En un material desordenat, l'ona dispersada de cada centre arriba a un punt del detector amb una fase  $(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \cdot \mathbf{r} = 2\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}$ , sense relació amb la fase de l'ona dispersada per altres centres. En aquest cas la intensitat resultant és simplement la suma de les intensitats de cada centre, és a dir,  $I(\mathbf{S}) = \sum I_i(\mathbf{S})$ .

La situació canvia quan la mostra presenta una regularitat tal en la seva estructura que podem definir una *cel·la elemental*, la repetició de la qual, que cobreix tota la mostra, es pot descriure amb una *xarxa de Bravais* [Kittel, 1976]. Aquesta cel·la elemental serà considerada com unitat de difracció. La diferència de fases entre ones que provenen de diferents unitats guardarà una relació, que dependrà en general de la direcció  $\mathbf{S}$ . La suma de totes les ones no podrà ser d'intensitats, com en el cas anterior, sinó d'amplituds. Hi haurà unes determinades direccions en què les ones se sumaran constructivament, mentre que en d'altres direccions l'ona resultant no s'amplificarà, i fins i tot es podrà anul·lar. Quan el número de centres és molt gran, com és el cas físic real, les direccions on la interferència és constructiva es van delimitant, de tal manera que es formen pics molt localitzats d'una gran intensitat, els *pics de difracció*. En la resta de direccions de l'espai, les ones interfereixen destructivament i la intensitat és negligible.



La difracció, a més de la periodicitat de la mostra, també requereix una radiació incident adequada, d'una longitud d'ona  $\lambda$  similar o inferior a la distància mitjana entre centres veïns,  $r$ . Quan  $\lambda \gg r$ , la diferència de fase entre ones dispersades per diferents centres és la mateixa per totes les direccions de l'espai i, per tant, la intensitat és independent de l'angle i els pics no apareixen. En canvi, amb una longitud d'ona similar a la distància interatòmica, típicament entre 0.1 i 0.3 nm, apareix el fenomen d'interferència i, per tant, els pics de difracció. Aquestes longituds d'ona corresponen al rang dels raigs X, i són aquests els que, en definitiva, s'utilitzen als experiments de difracció.

### 2.1.3.1. Els factors de l'amplitud de difracció

La introducció de la periodicitat de la mostra permet de separar l'amplitud de difracció de la mostra en dos factors, que depenen de l'estructura interna del motiu de repetició i de la simetria de la xarxa de Bravais.

D'una banda, pel primer factor construïm l'amplitud de difracció que genera una cel·la elemental, anomenada factor d'estructura  $F_0(\mathbf{S})$ , a partir de l'expressió 2.2,

$$F_0(\mathbf{S}) = \sum_i^n f_i e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_i} . \quad (2.9)$$

El sumatori de l'expressió és limitat als  $n$  àtoms inclosos en una cel·la elemental, i  $r_i$  són les posicions dels àtoms dins de la cel·la. Amb aquesta definició, l'amplitud de difracció de tota la mostra serà la suma dels factors d'estructura de totes les  $N$  cel·les de la mostra corregides per la fase relativa entre elles,

$$F(\mathbf{S}) = \sum_j^N F_0(\mathbf{S}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}'_j} , \quad (2.10)$$

on  $r'_j$  és la distància de l'origen a la  $j$ -èsima cel·la elemental, és a dir, la posició del  $j$ -èsim nus de la xarxa de Bravais. Donat que en una xarxa de Bravais totes les cel·les elementals estan orientades d'igual manera, el factor d'estructura  $F_0(\mathbf{S})$  és constant en tota la mostra. La posició de totes les unitats queden definides per una certa funció de disposició (*disposition function*). L'amplitud de difracció d'aquesta funció és

$$B(\mathbf{S}) = \sum_j^N e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}'_j} . \quad (2.11)$$

Quan el nombre  $N$  de cel·les elementals és gran, la funció de disposició pren valors apreciablement no nuls només als punts  $\mathbf{S}$  que compleixen la condició

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}'_j = n , \quad (2.12)$$

on  $n$  és un nombre enter. Queda clar amb aquesta condició que, quan el nombre de repeticions és gran, tota la dispersió queda concentrada als punts que la compleixen. Aquests punts són els anomenats pics de difracció, ja introduïts anteriorment.

Així, amb aquesta darrera definició, l'amplitud de difracció de la mostra (relació 2.10) s'expressa de la forma

$$F(\mathcal{S}) = F_0(\mathcal{S}) B(\mathcal{S}) . \quad (2.13)$$

Aquesta expressió separa clarament l'amplitud de difracció en dues contribucions. D'una banda, l'amplitud de difracció de la funció de disposició  $B(\mathcal{S})$  depèn tan sols de la periodicitat de la mostra, dóna lloc a l'aparició dels pics de difracció i determina la seva posició. D'altra banda, el factor d'estructura  $F_0(\mathcal{S})$  només depèn de la distribució de masses dins la cel·la elemental, és a dir, en el cas que ens ocuparà, de la forma i l'orientació relativa de les proteïnes, i determina la intensitat relativa dels pics de difracció.

Notem, finalment, que en el cas general en què en el sarcòmer hi són presents diverses estructures, l'amplitud total de difracció és la suma de totes elles,

$$F(Z) = \sum_j^N F_j(Z) B_j(Z) , \quad (2.14)$$

on  $F_j(Z)$  és la transformada de Fourier de cada motiu de repetició (una proteïna que presenta periodicitat en el sarcòmer) i  $B_j(Z)$  és la seva funció de disposició. En aquest cas, la intensitat total observada pel detector és el quadrat de l'amplitud total de difracció (expressió 2.5).

### 2.1.3.2. La síntesi de Fourier de la densitat electrònica

La densitat electrònica de la cel·la elemental, que és l'objectiu de tot experiment de difracció de raigs X, de forma general s'obté amb la síntesi de Fourier (expressió 2.6), que inclou una complexa integral, la integral de Fourier, aplicada sobre el factor d'estructura  $F_0(\mathcal{S})$ , en lloc de tota l'amplitud de difracció, és a dir,

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{X,Y,Z \in V^*} F_0(\mathcal{S}) e^{-2\pi i (xX + yY + zZ)} dX dY dZ ,$$

on  $V^*$  és el volum de l'espai recíproc que ocupa la cel·la elemental. Sortosament, però, quan l'estructura és periòdica, la situació és molt més senzilla, donat que l'amplitud de difracció només és no nul·la als pics de difracció, que se situen a l'espai recíproc segons l'expressió 2.12. Per tant, per determinar la densitat electrònica  $\rho(\mathbf{r})$ , cal trobar el factor d'estructura  $F_0(\mathcal{S})$  solament als pics de difracció i no a tot el diagrama de difracció.

En el cas d'una sola dimensió, que suposarem a partir d'ara que serà la direcció de les fibres musculars  $z$  (o direcció axial), els pics de difracció apareixen als punts  $Z = l/C$ , on  $l$  és un nombre enter i  $C$  és la periodicitat de l'estructura. En aquests punts, el

factor d'estructura és un nombre complex, caracteritzat a cada punt per un mòdul  $F_l = |F(Z = l/C)|$  i una fase  $f_l = f(Z = l/C)$ ,

$$F_0(Z = l/C) = F_l e^{i\phi_l} . \quad (2.15)$$

Amb aquestes consideracions, la síntesi de Fourier és simplificada en gran mesura, ja que la integral pot ser substituïda per una sèrie. Així, la densitat electrònica en la direcció considerada és

$$\rho_z(z) = \sum_l F_l e^{2\pi i z \frac{l}{C} + i\phi_l} . \quad (2.16)$$

Aquesta expressió es simplifica per la relació del mòdul i la fase de les reflexions oposades  $l$  i  $-l$ . Mitjançant l'expressió 2.3 o la 2.13, es pot comprovar que aquestes reflexions compleixen les condicions

$$F_l = F_{-l} \quad \text{i} \quad f_l = -f_{-l} . \quad (2.17)$$

Amb aquestes dues relacions, quan s'inclouen al sumatori les reflexions  $l$  i  $-l$ , la síntesi de Fourier de la densitat electrònica axial (expressió 2.16) es redueix a

$$\rho_z(z) = \sum_l F_l \cos 2\pi z \frac{l}{C} + \phi_l . \quad (2.18)$$

Aquesta és una expressió fonamental en el nostre estudi, ja que és la que permet, en principi, calcular la densitat axial dels caps de miosina. A tal fi, els propers capítols descriuen els experiments i les aproximacions teòriques que permeten resoldre el sumatori d'aquesta expressió, és a dir, extreure els mòduls i les fases del factor d'estructura. Mitjançant l'anàlisi de l'estructura, es determinaran les fases (capítols 5 i 6) i els mòduls (capítol 7) de les reflexions que produeix la periodicitat dels caps de miosina.

## 2.2. El diagrama de difracció del múscul

### 2.2.1. El desordre del múscul

Com tot teixit biològic, el teixit muscular presenta una gran varietat de molècules i macromolècules, essencialment proteïnes, que conformen una estructura complexa i generalment desordenada. En aquestes condicions, la densitat electrònica  $r(r)$ , objectiu

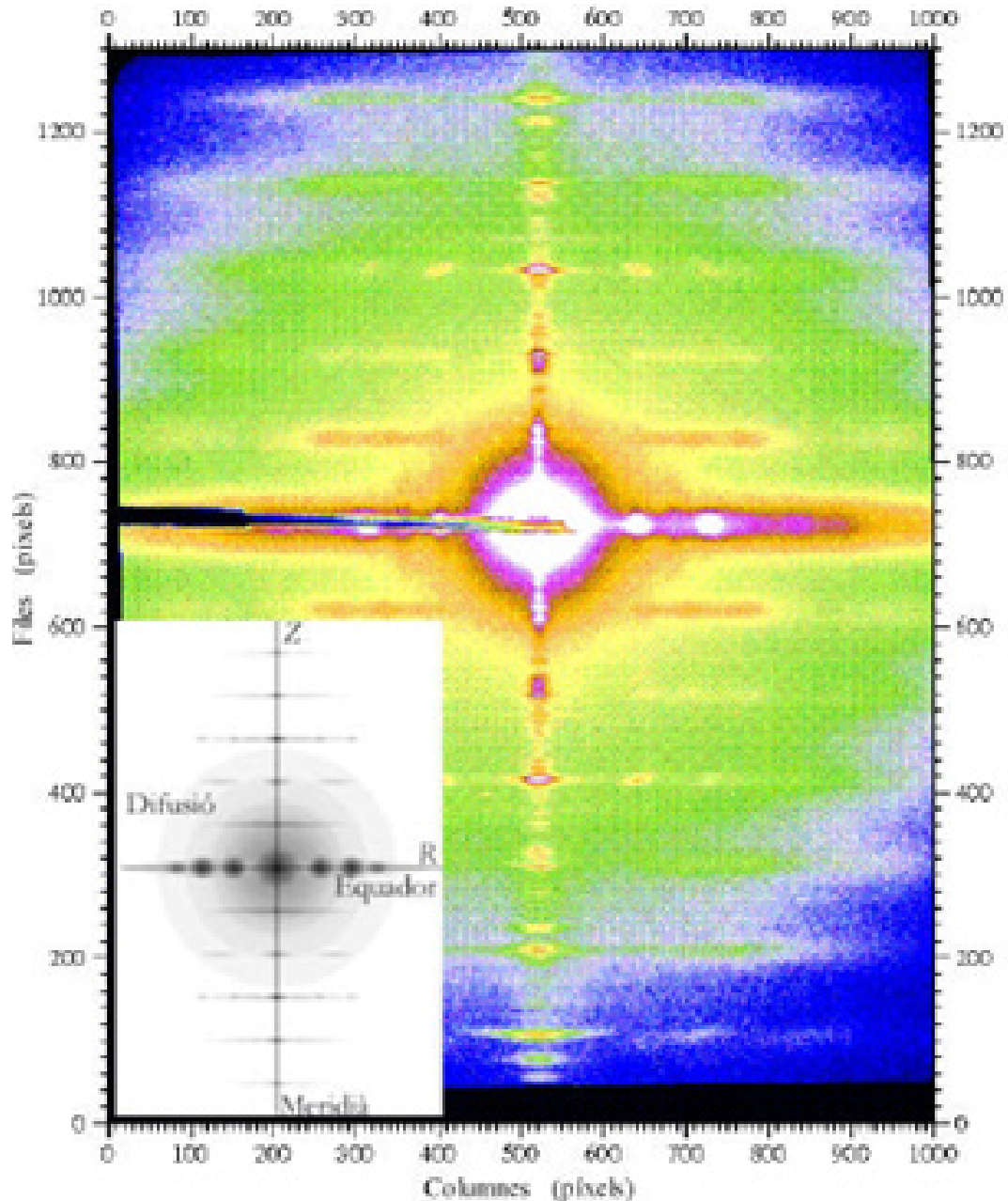
de la difracció de raigs X, té també una forma molt complexa i, en conseqüència, també la tindrà el diagrama de difracció que en resultarà. A la figura 2.3 trobem un diagrama de difracció típic de teixit muscular viu, on s'observa tota aquesta complexitat. De tota manera, com hem vist, la situació es simplifica molt quan hi ha algun tipus de simetria o d'ordre, ja que aquest deixa una empremta característica en el diagrama de difracció: els pics de difracció.

En l'estudi del múscul per difracció cal, per tant, distingir i identificar les contribucions ordenades i desordenades. La component desordenada és formada en gran mesura per aigua intersticial, col·lagen i altres elements que no actuen directament en la funció muscular. També hi contribueixen els elements del sarcòmer que, si bé tenen un cert ordre, no en tenen prou com per generar difracció a la resolució necessària en la zona del diagrama de difracció considerada. Tots aquests elements no originen pics de difracció, sinó que donen una intensitat de dispersió quasi-isòtropa amb un màxim en l'origen del diagrama de difracció (figura 2.3). Formen d'aquesta manera una *dispersió de fons* (*background*) que cal extreure en l'anàlisi posterior de les dades. Al capítol 3 exposarem els mètodes utilitzats de substracció d'aquesta dispersió de fons.

### 2.2.2. *El meridià i l'equador del diagrama de difracció*

Enmig del desordre inherent del múscul, el sarcòmer conté unes estructures ordenades, els filaments primers i els filaments gruixuts, que mostren prou periodicitat com per originar difracció. L'ordenació dels filaments es dona en les direccions axial i transversal al múscul.

En primer lloc, en la direcció axial, ambdós filaments presenten la simetria de tipus helicoidal descrita en el capítol 1. Com veurem seguidament, aquesta simetria fa aparèixer un seguit de *línies de difracció* perpendiculars a la línia anomenada *meridià*, la direcció en l'espai recíproc conjugada de la direcció de l'eix del múscul i que compleix la condició  $R = 0$  (figura 2.3).



**Figura 2.3.** Exemple de diagrama de difracció de teixit muscular en l'estat de descans, obtingut en la línia ID2 de l'*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF). S'observa especialment el fons de dispersió isotropa que prové de la part desordenada del múscul, els pics en l'equador i les línies de difracció (*layer lines*) en el meridià provinents de la simetria del filament gruixut. Aquests elements estan esquematitzats en el quadre inferior esquerre. En el meridià apareixen igualment moltes altres reflexions degudes a la simetria en d'altres proteïnes (tropomiosina, etc.) o bé per fenòmens d'interferència. La zona fosca en la part esquerra de l'equador és el suport de la peça de plom que atura el feix de llum de sincrotró (*beam stop*).

Finalment, la disposició transversal dels filaments a la banda A del sarcòmer també és regular, i segueix una simetria hexagonal. Comprovarem que aquesta simetria, al seu torn, origina un conjunt de pics en la anomenada línia de l'*equador*, perpendicular al meridià i que satisfà la condició  $Z = 0$ .

Cal remarcar, per la seva significació física, la informació que pot ser extreta del meridià i de l'equador. D'una banda, en el meridià, si partim de l'expressió 2.3, l'amplitud de difracció és

$$\begin{aligned}
 F_{mer}(0,0,Z) &= \int_{z \in V} \int_{x,y \in V} \rho(x,y,z) dx dy e^{2\pi i z Z} dz, \\
 &= \int_{z \in V} \rho_z(z) e^{2\pi i z Z} dz
 \end{aligned}
 \tag{2.19}$$

on  $r_z$  és físicament la projecció de masses sobre l'eix  $z$ , és a dir, la distribució de massa axial del múscul. L'amplitud de difracció del meridià correspon, per tant, a la TF de la projecció de masses axial. Així, en aquesta zona del diagrama de difracció s'han d'observar els canvis estructurals rellevants en la funció muscular, donat que la tensió i canvi de longitud del múscul es realitza en aquesta direcció.

Per altra banda, en l'equador, l'amplitud de difracció és

$$\begin{aligned}
 F_{eq}(X,Y,0) &= \int_{x,y \in V} \int_{z \in V} \rho(x,y,z) dz e^{2\pi i (xX + yY)} dx dy, \\
 &= \int_{x,y \in V} \rho_{xy}(x,y) e^{2\pi i (xX + yY)} dx dy
 \end{aligned}
 \tag{2.20}$$

on  $r_{xy}$  és físicament la projecció de masses sobre el pla  $xy$ , perpendicular a l'eix  $z$ . Amb tot, en estudis de difracció de teixits musculars, i en general per qualsevol material compost per fibres helicoidals, aquesta darrera equació resulta més convenientment expressada en coordenades cilíndriques. Això és així perquè les miofibril·les presenten totes les possibles orientacions a causa de la manca d'ordre azimuthal i, per tant, la integració de tots els filaments és equivalent a la integració d'una unitat. En aquestes coordenades, i mitjançant l'expressió 2.4, l'amplitud de difracció equatorial és

$$F_{eq}(R,0,0) = \int_0^{2\pi} \int_0^R \rho_B(r,\psi) e^{2\pi i R r \cos\psi} r dr d\psi, \tag{2.21}$$

en què  $r_B$  és la densitat electrònica del pla basal,

$$\rho_B(r,\psi) = \int \rho(r,\psi,z) dz. \tag{2.22}$$

En els dos sistemes de coordenades, cartesià i cilíndric, la massa és integrada en la direcció axial  $Z$  amb el càlcul de l'amplitud de difracció  $F_{eq}$  i, per tant, l'amplitud de difracció correspon a la TF de la projecció perpendicular als filaments. En conseqüència, l'equador és sensible solament a les periodicitats i moviments de massa

en la direcció radial o azimuthal del sarcòmer. En especial, serà sensible a moviments transversals dins la zona amb més massa i ordenació del sarcòmer, la banda A.

D'aquesta manera, el meridià i l'equador donen informació sobre la projecció axial i transversal, respectivament. Les informacions en les dues direccions són complementàries i necessàries per entendre el mecanisme de la contracció muscular.

La forma final del diagrama de difracció serà el resultat de la superposició de les diferents contribucions, tant ordenades com desordenades. Les properes seccions estan dedicades a trobar l'amplitud de difracció que resulta de la simetria helicoidal i de la simetria hexagonal que tenen els filaments. Hi afegim també l'efecte d'altres contribucions i desordres, i donem, finalment, l'explicació de l'aparença general del diagrama de difracció.

## 2.3. La difracció en estructures amb simetria helicoidal

Les expressions anteriors indiquen que els pics de difracció del diagrama són característics de la simetria de la mostra. En el cas del múscul i, més concretament, dels filaments del sarcòmer, els pics de difracció són producte de la simetria helicoidal en la direcció axial i de la simetria hexagonal en la direcció transversal.

En aquesta secció detallem les expressions que caracteritzen la difracció de les estructures amb simetria helicoidal del sarcòmer. D'entrada, estudiem la difracció que produeix una hèlix contínua ideal, per introduir, després, l'efecte de la discontinuïtat de l'hèlix. Finalment, les expressions obtingudes es concreten al cas dels dos tipus de filament presents en el sarcòmer.

### 2.3.1. L'hèlix contínua

Aproximem l'estructura d'un filament del sarcòmer a una hèlix contínua, de radi  $r = r_0$  i pas de rosca, o distància  $C$  de repetició (*pitch*) (figura 2.4). En una hèlix, la coordenada axial  $z$  és proporcional a l'azimutal  $\psi$  i, per tant, es compleix la condició  $\psi = 2\pi z/C$ . Excepte un factor de proporcionalitat, la densitat electrònica és

$$\rho(r, \psi, z) = \delta(r - r_0) \delta\left(\psi - \frac{2\pi z}{C}\right), \quad (2.23)$$

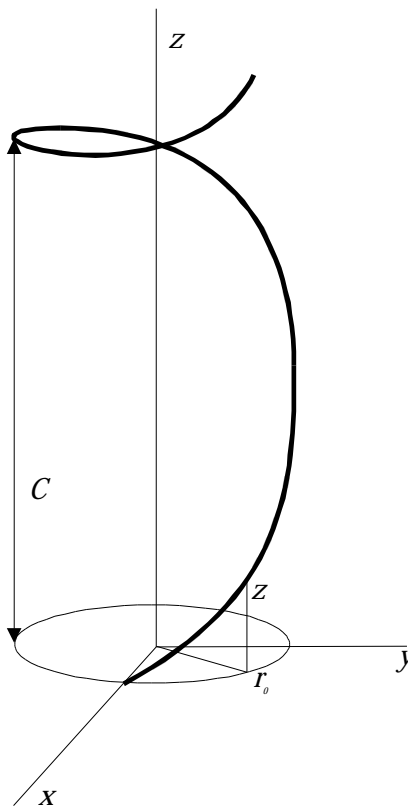
on la funció  $\delta(r - r_0)$  és la funció delta de Dirac, que és nul·la excepte quan l'argument és 0, que pren el valor 1. Si s'introdueix aquesta densitat electrònica en l'expressió general de la integral de Fourier en coordenades cilíndriques (expressió 2.4), després d'operar i identificar termes, trobem la forma general de la integral de Fourier per a estructures helicoidals,

$$F_n(R), \frac{n}{C} = 2\pi r_0 J_n(2\pi r_0 R) e^{in\psi + \frac{\pi}{2}}, \quad (2.24)$$

on  $J_n(2\pi r_0 R)$  és la funció de Bessel d'ordre  $n$ , essent  $n$  un nombre enter. Aquesta és l'expressió general de la intensitat i posició dels pics de difracció generats per una hèlix contínua. De l'expressió 2.24 s'extreuen característiques rellevants comunes als diagrames de difracció d'hèlix contínues.

L'efecte més destacat de la simetria helicoidal és que la discretització només apareix en la direcció  $Z$ . L'amplitud de difracció només és no nul·la als valors  $Z = n/C$ , amb  $n$  sencer. Al diagrama, per tant, apareixeran línies de difracció (*layer lines*) en la direcció horitzontal (figura 2.3), en lloc de punts de difracció, com seria d'esperar si la discretització ocorregués també radialment.

En segon lloc, ressaltem la dependència de l'amplitud de difracció amb l'angle azimutal  $\psi$ , present únicament en la fase. En el diagrama de difracció, en què s'observa solament  $|F(\mathbf{S})|^2$ , la dependència desapareix i, per tant, és invariant sota rotacions en la direcció  $\psi$ . Aquest punt és comprensible intuïtivament ja que tals rotacions són equivalents a una translació axial, que té com a conseqüència la introducció d'una fase en la transformada de Fourier.



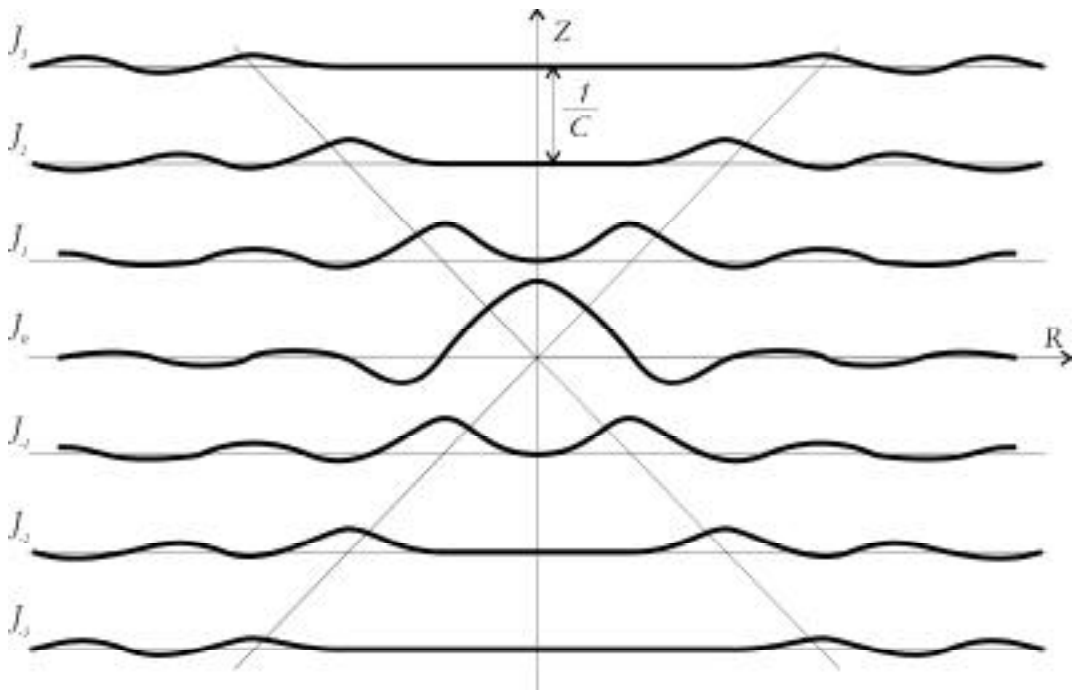
**Figura 2.4.** Definició de les coordenades axial ( $z$ ), radial ( $r$ ) i azimutal ( $\psi$ ) que defineixen una hèlix contínua de radi  $r_0$  i pas de rosca (*pitch*)  $C$  (expressió 2.23).

Finalment, convé notar que la distribució radial de cada línia ve definida per una funció de Bessel,  $|F_n|^2 = (2\pi r_0)^2 |J_n(2\pi r_0 R)|^2$ . Les funcions de Bessel presenten la forma general d'unes oscil·lacions esmorteïdes, amb el seu primer pic allunyant-se de l'origen  $R = 0$  segons l'ordre  $n$  (figura 2.5) i el radi  $r_0$  del centre de masses.



De les consideracions anteriors es dedueix que el diagrama de difracció que genera l'expressió 2.24 té una característica forma d'aspa (figura 2.5), que és pròpia de totes les estructures amb simetria helicoidal. L'angle de l'aspa vindrà determinat per la distància  $DZ = 1/C$  entre línies de difracció i pel radi  $r_0$  del centre de masses de l'hèlix.

La discretització en la direcció  $Z$  defineix clarament una orientació del diagrama de difracció de les estructures helicoidals. La direcció perpendicular a les línies de difracció s'anomena direcció *meridional*, mentre que la paral·lela és la direcció *equatorial*. El meridià del diagrama de difracció és, per tant, la línia en la direcció  $Z$  que passa per l'origen ( $R = 0$ ), mentre que l'equador és la línia en la direcció  $R$  que passa igualment per l'origen ( $Z = 0$ ). La localització de les línies al meridià del diagrama revela les periodicitats en la direcció axial a l'hèlix (en el nostre cas, axial al múscul).



**Figura 2.5.** Representació esquemàtica de l'amplitud de difracció  $F(S)$  d'una hèlix contínua en l'espai recíproc. En la direcció axial  $Z$  hi ha una quantificació que forma les línies de difracció (*layer lines*), definides per l'expressió 2.24, i amb una separació entre elles de  $\Delta Z = 1/C$ , on  $C$  és el pas de rosca, o *pitch*, de l'hèlix. La línia en la direcció  $Z$  que passa per l'origen és anomenada *meridià*. El quadrat de cada funció dona la intensitat vista en el diagrama de difracció.

### 2.3.2. Deducció intuïtiva de la difracció de l'hèlix contínua

Donada la importància que té per aquest treball el diagrama de difracció que genera una hèlix contínua, en donarem a continuació una deducció intuïtiva. Aquesta explicació complementa la demostració que hem esbossat en els apartats anteriors.

L'explicació està esquematitzada en la figura 2.6. Tal i com s'ha dit en l'anterior apartat, el diagrama de difracció és la transformada de Fourier (TF) de la projecció de masses en la direcció de la llum incident.

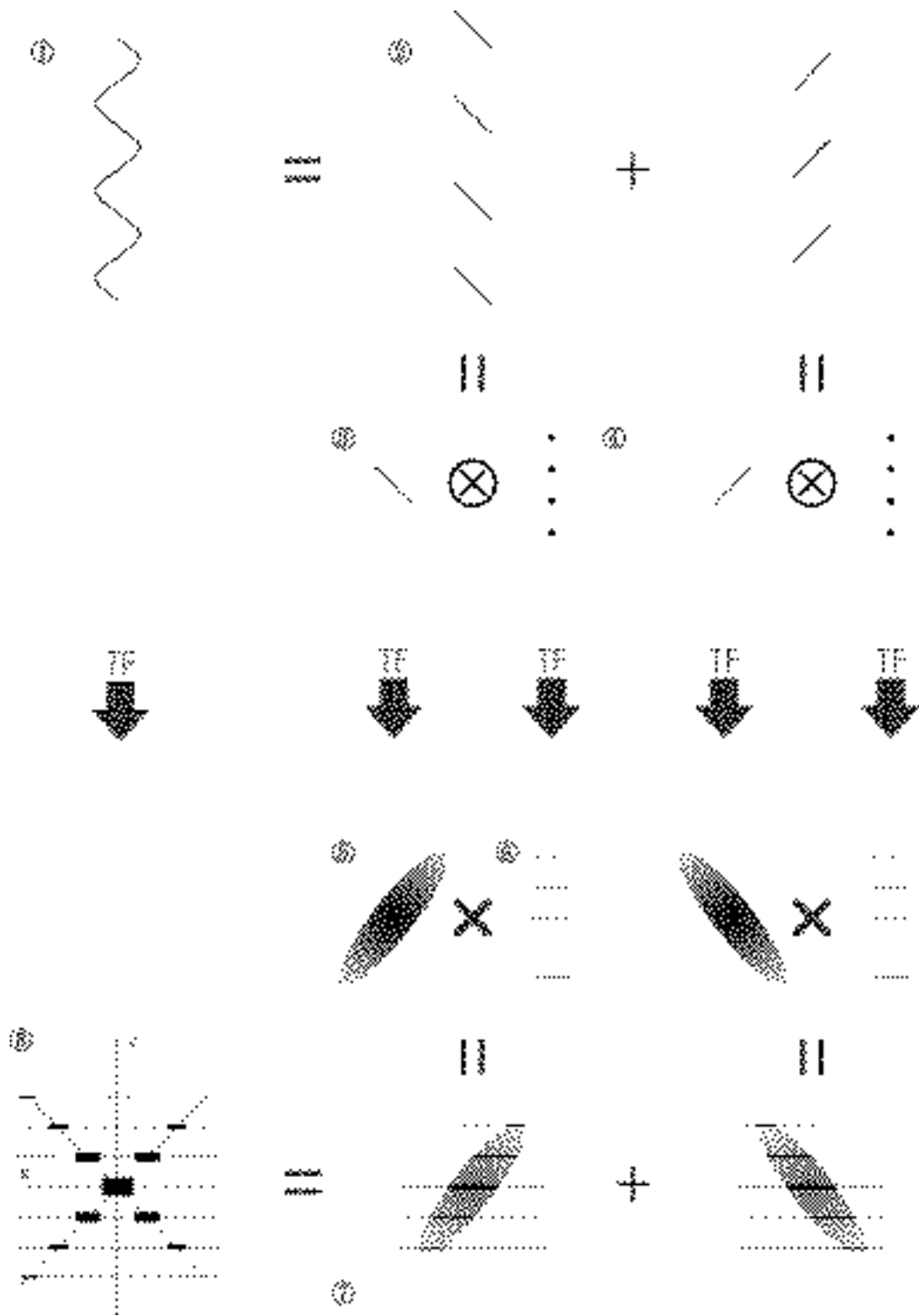
A causa del muntatge experimental, els filaments amb simetria helicoidal són il·luminats lateralment pels raigs X i, per tant, cal trobar el diagrama de difracció que originen amb aquesta projecció. El diagrama de difracció obtingut és la TF de la projecció lateral de l'hèlix, que té una distribució de massa semblant a la d'una dent de serra ( ). Les dents de serra es poden descompondre en dues successions de segments ( ), amb llurs segments equiespaiats i orientats de manera inversa. Al seu torn, cada una d'aquestes successions es pot interpretar com la convolució entre un segment ( ) i una successió de punts equiespaiats ( $\mu$ ). Recordem que la convolució és la distribució d'una funció (en aquest cas el segment) seguint una altra "funció portadora" (la successió de punts) (vegeu la secció 2.1.2.3).

Segons el teorema de la convolució (expressió 2.8), la TF d'una successió de segments serà el producte de la TF d'un sol segment per la TF de la sèrie de punts equidistants per separat. D'una banda, la TF del conjunt de punts és un conjunt de plans amb una separació inversa a la del conjunt de punts ( ). D'altra banda, la TF d'un segment amb costats  $a$  i  $b$ , amb  $a \gg b$ , és un altre segment ( ) de costats  $1/a$  i  $1/b$ , i per tant amb  $1/a \ll 1/b$ , que apareix rotat  $90^\circ$ . El producte dels dos elements anteriors dona una sèrie de segments equidistants horitzontals disposats en diagonal ( ), que defineixen les anomenades *línies de difracció* (*layer lines*). Anàlogament, l'altra successió de segments dona una figura de difracció idèntica i orientada especularment a aquesta, com a conseqüència de l'orientació especular dels segments difractors.

Finalment, la suma o superposició d'ambdues successions genera una característica creu de difracció ( ), típica de totes les estructures helicoidals. L'amplitud de difracció de la creu està representada esquemàticament en la figura 2.5.

### 2.3.3. L'hèlix discontinua

Donem ara un pas més considerant que els filaments, en lloc de tenir una estructura contínua i idèntica en tots els seus punts, estan compostats d'unitats (els monòmers de proteïna o fragments de miosina, segons el filament) que es repeteixen tot mantenint la simetria del filament. La simetria és, en conseqüència, la d'una hèlix discontinua o discreta. Suposarem, de moment, que els monòmers són puntuals, amb el centre de masses situat sobre l'hèlix. Més endavant corregirem aquesta suposició amb l'introducció del factor d'estructura corresponent.



**Figura 2.6.** Explicació intuïtiva del diagrama de difracció típic de les estructures helicoidals. El diagrama de difracció, que matemàticament és la transformada de Fourier de la projecció de masses, és exposat gràficament en quatre etapes (vegeu el text). Els símbols + i × representen la suma i el producte punt a punt en l'espai, la convolució entre dues funcions i TF la transformació de Fourier.

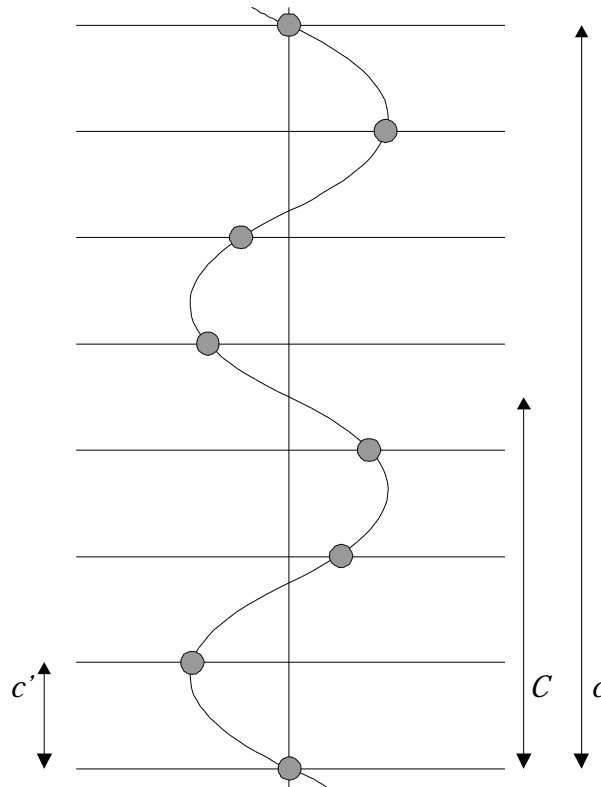
La simetria d'una hèlix discontinua amb monòmers puntuals ve definida per dos paràmetres: l'avanç axial  $c'$  (*pitch*), és a dir, la separació axial entre monòmers

consecutius, i la simetria, caracteritzada pel nombre de monòmers  $p$  presents en  $q$  voltes de l'hèlix, i definida pel nombre (figura 2.7)

$$M = \frac{P}{q}. \quad (2.28)$$

Com se segueix de la definició de  $M$ , el pas de rosca  $C$  i l'avanç axial  $c'$  satisfaran la relació  $M = C/c'$ . Per la seva banda, la distància de repetició  $c$  de l'hèlix discontinua, que és la distància entre dues unitats idèntiques, serà  $q$  vegades  $C$ , o equivalentment  $p$  vegades  $c'$ . En el cas que  $M$  sigui enter tenim  $c = C$ .

El conjunt de monòmers que formen l'hèlix discontinua poden ser interpretats com la intersecció (és a dir, el producte) d'una hèlix contínua i un conjunt de plans separats per una distància constant  $c'$  entre ells (figura 2.7). Els punts d'intersecció representen els centres de massa del monòmer de proteïna o fragment de proteïna. El resultat del producte és que cada punt sobre l'hèlix té, respecte del punt anterior, un desplaçament de  $c'$  en la direcció axial i una rotació azimuthal de  $\psi = 2\pi/M$ .



**Figura 2.7.** Visió lateral d'una hèlix discontinua, amb  $M = 7/2$ , que conté 7 unitats en 2 voltes.  $c'$  és el desplaçament axial (*axial rise*),  $C$  el pas de rosca (*pitch*) i  $c$  la distància de repetició de l'hèlix discontinua (*repeat*). Els punts on es localitzen els monòmers se situen en la intersecció de l'hèlix amb la successió de plans paral·lels. Cal remarcar que una altra nomenclatura estàndard del camp nota  $p$ ,  $P$  i  $C$  les tres magnituds mencionades, respectivament [Squire, 1981].

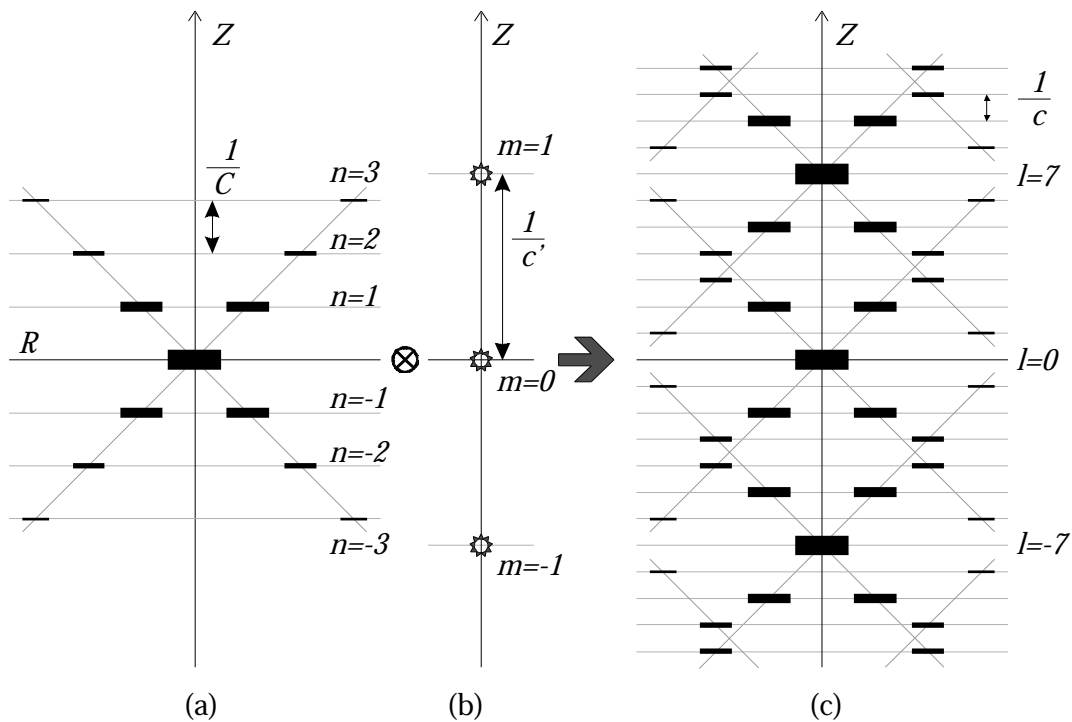
Com s'ha exposat anteriorment, l'amplitud de difracció és la TF de la distribució de massa. En el cas de l'hèlix discontinua, l'amplitud de difracció a què dona lloc és la TF

del producte de l'hèlix contínua amb el conjunt de plans que defineix la posició dels monòmers. Per teorema de la convolució (equació 2.8), això és equivalent a convolucionar les TF de cada un dels dos factors per separat (figura 2.8). Per una banda, la TF de l'hèlix contínua no és sinó l'expressió 2.24, amb la característica forma d'aspa (figura 2.8a). D'altra banda, la TF d'un conjunt de plans separats per una distància  $c'$  és un conjunt de punts alineats segons la normal als plans i situats a

$$Z = \frac{m}{c}, \quad X = 0, \quad Y = 0 \quad (2.29)$$

on  $m$  és enter (figura 2.8b).

El resultat de la convolució de les dues TF és la repetició, amb una periodicitat de  $1/c'$ , de l'aspa de l'hèlix contínua en la direcció de l'eix de l'hèlix (figura 2.8c). Com s'observa a la figura 2.8 en el cas particular de  $M = 7/2$ , a conseqüència d'aquesta convolució les línies de difracció permeses per l'estructura estaran situades a



**Figura 2.8.** Formació del diagrama de difracció d'una hèlix discontinua amb  $M = 7/2$  a partir de les transformades de Fourier d'una hèlix contínua i d'una successió de plans. (a) Diagrama de difracció d'una hèlix contínua amb una distància de repetició  $C$ . (b) Diagrama de difracció d'una sèrie de plans paral·lels separats una distància  $c'$ . (c) Convolució dels dos anteriors diagrames de difracció. La regla de selecció per hèlix discontinues (expressió 2.31) en aquest cas pren la forma  $l = 7m + 2n$ , amb  $l, n$  i  $m$  enters.

$$Z = \frac{m}{c} + \frac{n}{C} = \frac{l}{c}, \quad (2.30)$$

amb  $m$ ,  $n$  i  $l$  enters. Així doncs, un cop sabem l'avanç axial  $c'$  d'una unitat, el pas de rosca  $C$  de l'hèlix, i la distància  $c$  de repetició, la simetria queda ben definida i podem localitzar les línies de difracció. Si operem sobre aquesta expressió i introduïm la relació  $C/c' = p/q = M$ , de l'expressió 2.30 s'obté la regla de selecció que han de complir  $l$ ,  $m$  i  $n$

$$l = pm + qn . \tag{2.31}$$

D'aquesta manera, qualsevol línia de difracció s'identifica amb un ordre de difracció a partir de dos índexs  $(n, m)$  que representen, respectivament, l'ordre en la creu contínua (és a dir, l'ordre de la funció de Bessel) i l'ordre de la discretització en plans paral·lels. Aquest ordre de difracció  $(n, m)$  se situarà en la línia de difracció  $l$  que compleixi la regla de selecció 2.31.

Analíticament, en una hèlix contínua, cada línia de difracció ve caracteritzada per una única funció de Bessel (expressió 2.24). En el cas discontinu, en canvi, cada línia de difracció és formada per diferents funcions de Bessel, cadascuna d'un ordre  $n$ , que provenen de creus de difracció centrades en diferents ordres  $m$ . Per exemple, en el cas  $M = 7/2$  de la figura 2.8, en què la regla de selecció és  $l = 7m + 2n$ , la línia  $l = 1$  té, entre altres, les contribucions  $(1,-3)$  i  $(-1,4)$ , que són funcions de Bessel d'ordre  $-3$  i  $4$ , i que provenen de les creus centrades a  $m = 1$  i  $m = -1$ , respectivament. Les dues contribucions compleixen la regla de selecció  $1 = 7 \cdot 1 + 2 \cdot (-3)$  i  $1 = 7 \cdot (-1) + 2 \cdot 4$ . Matemàticament, aquesta multiplicitat s'expressa en la forma

$$\left( \begin{array}{l} F_l R, \frac{l}{C} = 2\pi r_0 \sum_n J_n(2\pi r_0 R) e^{in\pi + \frac{\pi}{2}} \\ l = pm + qn \end{array} \right. \tag{2.32}$$

El sumatori que es realitza sobre  $n$  introdueix, en teoria, infinites contribucions per a cada línia de difracció  $l$  atès que, un cop fixats  $p$  i  $q$  per la simetria de l'hèlix, hi ha infinits parells  $(n,m)$  que compleixen la regla de selecció. A la pràctica, però, els desordres i el soroll de fons, entre altres factors, no permeten detectar les contribucions amb un ordre  $n$  de funció de Bessel alt.

Hi ha casos en què les hèlixs discontinues estan formades per diferents cordes, és a dir, per més d'un monòmer a cada pla. Aquest és, de fet, el cas del filament gruixut, que presenta  $N = 3$  parells de caps de miosina a cada corona (figura 1.7). La presència de  $N$  unitats de difracció en un mateix punt de l'eix  $z$  provoca l'aparició d'un eix de simetria d'ordre  $N$ , que modifica l'amplitud de difracció 2.32. Per raons de simetria i mitjançant relacions entre funcions de Bessel, en el cas d'una hèlix discontinua de  $N$  cordes, les línies de difracció tenen una amplitud de difracció i una regla de selecció

$$\left( \begin{array}{l} F_l R, \frac{l}{C} = 2\pi r_0 \sum_k J_{kN}(2\pi r_0 R) e^{ikN\pi + \frac{\pi}{2}} \\ l = pm + qn \end{array} \right. \tag{2.33}$$

$$l = pm + q \frac{n}{N}.$$

Finalment, cal puntualitzar que, mentre que una simetria d'una hèlix discontinua origina unívocament un diagrama de difracció, a la inversa no és així, i es produeix una indeterminació. Efectivament, en la regla de selecció 2.31, els paràmetres físics d'una línia de difracció són  $l$  (el número de línia de difracció) i  $n$  (l'ordre de la funció de Bessel). El paràmetre restant,  $m$ , representa l'ordre de la creu d'on prové aquesta reflexió, que pot ser establert arbitràriament canviant el paràmetre  $M$ . Així, per exemple, les línies de difracció de la figura 2.8c, a més de la simetria de  $M = 7/2$  considerada fins ara, poden ser explicades mitjançant una simetria de  $M = 7/5$  o  $M = 7/9$ .

### 2.3.4. *L'amplitud de difracció d'una proteïna amb simetria helicoidal*

Les expressions 2.32 i 2.33 són les expressions generals de l'amplitud de difracció originada per una hèlix discontinua ideal, sense desordres i amb unitats de repetició puntuals. Aquesta, però, no és la situació en el múscul, ja que els components físics que formen les estructures helicoidals són proteïnes amb una determinada forma i disposició. Aquesta situació es pot tractar, de manera general, definint un conjunt de fragments de proteïna (que poden ser els propis àtoms) que segueixen la simetria helicoidal amb un radi  $r_j$ , un desplaçament azimutal  $\psi_j$  i un desplaçament axial  $z_j$ ,

$$\left\{ \begin{array}{l} F_l(R, \frac{l}{C}) = 2\pi r_0 \sum_n F_{nl}(R) e^{in} \\ l = pm + qn, \end{array} \right. \quad (2.34)$$

en què s'ha definit

$$F_{nl}(R) = \sum_j 2\pi r_j f_j J_n(2\pi r_j R) e^{-in\psi_j - \frac{\pi}{2} + 2\pi i \frac{lz_j}{C}},$$

on  $f_j$  és el factor de forma de l'àtom  $j$  en cas que el sumatori es realitzi sobre els àtoms de la proteïna, o el factor d'estructura del fragment  $j$ , en cas que el sumatori sigui sobre fragments de proteïna. A més, en cas d'una simetria helicoidal composta de diverses cordes, sobre aquesta expressió s'han de fer els canvis equivalents als de l'expressió 2.33, tant en la fórmula de la funció de Bessel com en la regla de selecció.

D'altra banda, convé destacar que, al meridià ( $R = 0$ ), la contribució principal a l'amplitud de difracció  $F_l$  prové de la funció de Bessel d'ordre 0, que assoleix un màxim en aquest punt.

Aquestes expressions permeten calcular el perfil radial de les línies de difracció, que serà utilitzat al capítol 7 per trobar les amplituds de difracció que s'empraran en el càlcul de les projeccions axials de massa. Això no obstant, hi ha altres factors, com ara desordres de diversa naturalesa, que influiran també en el perfil radial i que hauran de ser igualment tinguts en compte.

## 2.4. La simetria helicoidal del múscul

### 2.4.1. La simetria del filament prim

Si bé en el diagrama de difracció hi ha una presència certa de línies de difracció que provenen de l'estructura helicoidal del filament prim, aquest no té una simetria definida, donat que la distància de repetició no es correspon amb un nombre enter de monòmers d'actina. A més, aquesta simetria canvia segons l'estat del múscul.

De tota manera, una simetria aproximada i utilitzada convencionalment és la d'una hèlix de mà esquerra de nombre  $M = 13/6$ , és a dir, que conté 13 monòmers en 6 voltes. El pas de rosca  $C$  d'aquesta simetria és ca. 5.9 nm i l'avanç axial  $c'$  val ca. 2.7 nm, dels quals resulta una distància de repetició  $c$  de ca. 36.5 nm (vegeu la secció 1.2.3). Això dona un diagrama de difracció amb línies de difracció situades a  $l/36.5 \text{ nm}^{-1}$  que provenen de creus característiques de la simetria helicoidal centrades a  $m/2.7 \text{ nm}^{-1}$ . La línia  $n$ -èsima de la  $m$ -èsima creu de difracció, segons l'expressió 2.32 se situarà a

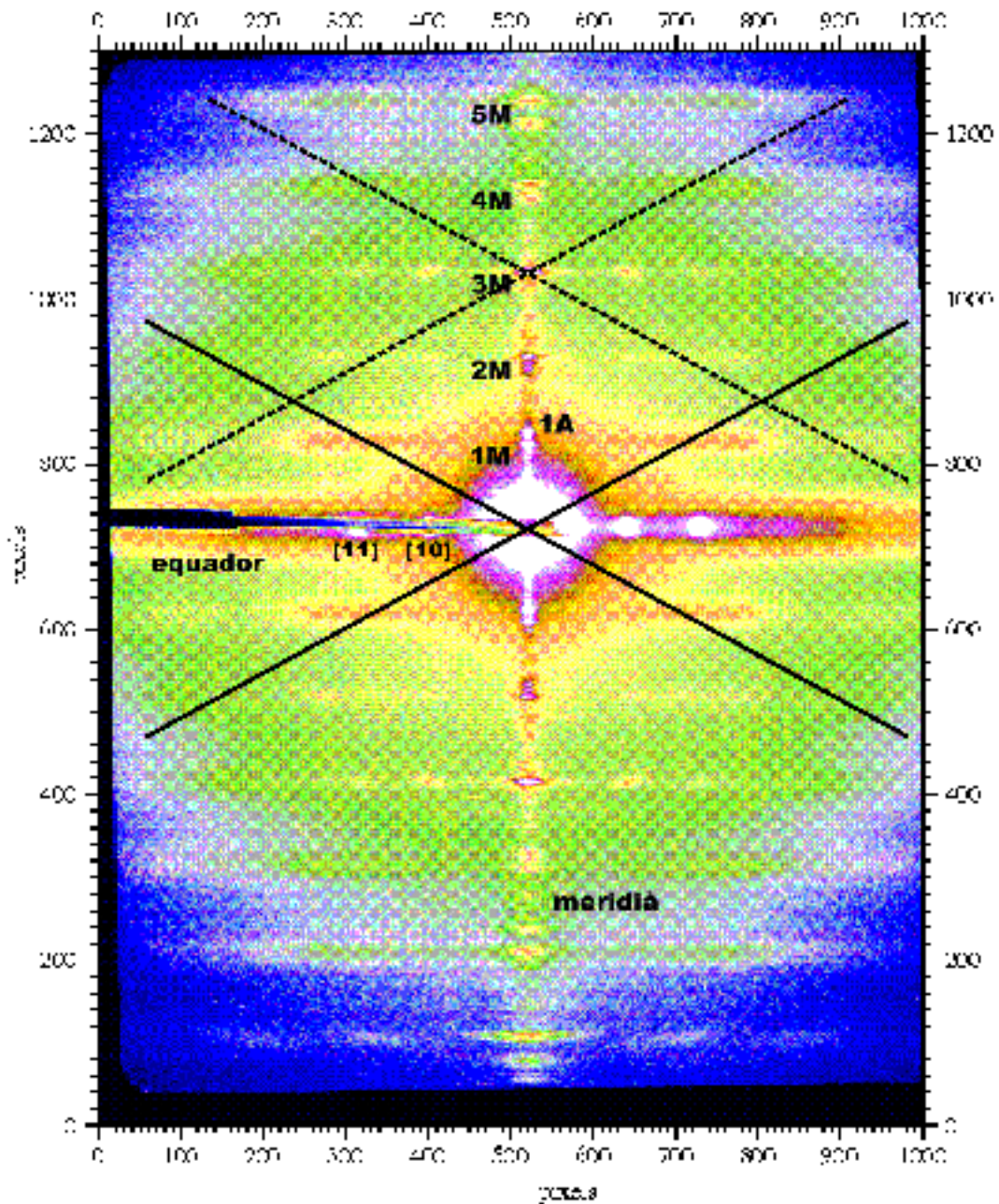
$$Z = \frac{m}{2.7} + \frac{n}{5.9} \quad [\text{nm}^{-1}], \quad (2.35)$$

amb un número de línia de difracció definida per la regla de selecció

$$l = 13m + 6n. \quad (2.36)$$

Cal tornar a remarcar, però, que la simetria considerada és solament una aproximació, de manera que l'expressió 2.35 i la regla de selecció 2.36 no situen exactament les línies de difracció de l'actina.





**Figura 2.9.** Exemple de diagrama de difracció de teixit muscular en l'estat de descans. Es mostren les creus de difracció del filament gruixut per  $m = 0$  (línies contínues) i per  $m = 1$  (línies discontinües), les reflexions més importants de l'equador, (10) i (11) i les reflexions presents en el meridià en què els caps de miosina hi poden contribuir. (1M, 2M...). Les reflexions *prohibides* (no múltiples de 3) no queden incloses en cap creu de difracció, fet que indica que la simetria del filament gruixut es trenca lleugerament. Fora del meridià són especialment intenses les reflexions 1M i 1A, que queden superposades. La zona fosca en la part esquerra de l'equador és el suport de la peça de plom que atura el feix de llum de sincrotró (*beam stop*).

La intensitat de cada línia de difracció depèn del factor d'estructura de la unitat de difracció (el monòmer d'actina), així com de l'ordre de les funcions de Bessel de les diferents contribucions a la línia. Generalment, la intensitat serà major com més massa difracti de forma coherent en aquella reflexió, i com més petit sigui l'ordre  $n$  de la

funció de Bessel associada. La línia d'ordre zero que trobem detectable a baixos angles és  $l = 13$  ( $m = 1, n = 0$ ) a l'espaiat de  $1/2.7 \text{ nm}^{-1}$ . De primer ordre trobem la  $l = 6$  ( $m = 0, n = 1$ ) a l'espaiat de  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  i la  $l = 7$  ( $m = 1, n = -1$ ) a l'espaiat de  $1/5.1 \text{ nm}^{-1}$ . Finalment, també destaquem la línia de segon ordre  $l = 1$  ( $m = 1, n = -2$ ), amb espaiat  $1/31.9 \text{ nm}^{-1}$ , que se superposa amb la línia de difracció 1M (figura 2.9).

Les altres contribucions a les línies de difracció són dèbils, o simplement inexistents, donat l'ordre més alt de la respectiva funció de Bessel. Així, per exemple, a la línia  $l = 2$ , la teoria indica que hi ha una funció de quart ordre ( $m = 2, n = -4$ ), i a la línia  $l = 3$  una de sisè ordre ( $m = 3, n = -6$ ), si bé experimentalment no són observades. Cal remarcar igualment que, malgrat que en general cada línia té diferents contribucions, les d'ordre superior són prou dèbils com per ser ignorades. Així, per exemple, a la línia  $l = 13$  també hi apareix, en principi, la contribució de  $m = -5, n = 13$ , però queda emmascarada per la contribució d'ordre zero.

### 2.4.2. La simetria del filament gruixut

Les unitats de difracció en el filament gruixut són els parells de caps de miosina que sobresurten regularment del cos del filament amb una simetria  $M = 3/1$  i amb un avanç axial  $c'$  de ca.  $14.3 \text{ nm}$ , de manera que resulta una distància de repetició  $c$  de ca.  $43 \text{ nm}$  (vegeu la secció 1.2.2). A cada nivell el filament presenta 3 parells de caps, i per tant l'hèlix té l'aparença de 3 cordes ( $N = 3$ ). Com a resultat de tot plegat, la posició en el diagrama de difracció i la regla de selecció de la  $l$ -èsima línia de difracció seran

$$Z = \frac{m}{14.3} + \frac{n}{43} \quad [\text{nm}^{-1}] \quad (2.37)$$

$$l = 3m + \frac{n}{3} .$$

A causa de la regla de selecció, les línies de difracció generades pel filament gruixut (que anomenarem d'ara en endavant  $lM$ , e.g.  $1M, 2M$ , etc.) només han de tenir contribucions de funcions de Bessel d'ordre  $n$  múltiple de 3. La regla de selecció també comporta que les línies de difracció múltiples de 3 ( $3M, 6M$ , etc.), que apareixen a intervals de  $1/14.3 \text{ nm}^{-1}$ , tinguin una gran contribució de la funció de Bessel d'ordre zero, i tinguin relativament una gran intensitat.

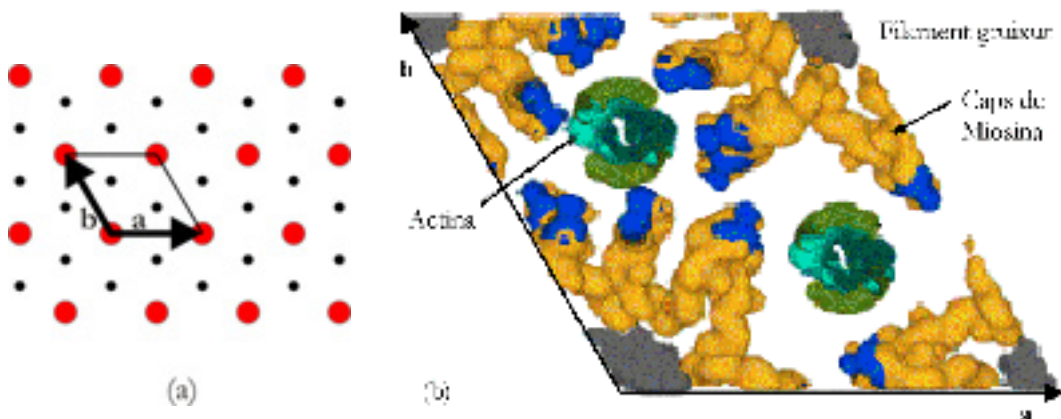
De tota manera, a més d'aquestes, en el diagrama de difracció en l'estat de descans, experimentalment s'observa la presència de reflexions en el meridià, les anomenades reflexions *prohibides*, en les línies de difracció d'ordre  $l$  diferent a un múltiple de 3 ( $1M, 2M, 4M, 5M$ , etc.) (figura 2.9). Atès que les reflexions *prohibides* no són permeses per la simetria helicoidal, la simetria del filament gruixut ha de presentar alteracions respecte de la simetria ideal. Aquestes alteracions, que provoquen que el filament gruixut tingui una certa simetria cilíndrica [Stewart i Kensler, 1986], seran discutides més endavant.

## 2.5. La simetria transversal del múscul

### 2.5.1. La simetria hexagonal

La simetria helicoidal descrita en l'anterior secció, present en la direcció axial dels filaments del sarcòmer, no és l'única existent al múscul. També la disposició lateral dels filaments, especialment a la banda A (la zona de superposició d'aquests), és molt regular, com ho demostra la microscòpia electrònica i, per tant, susceptible d'originar difracció. Aquesta secció tracta dels pics de difracció que genera l'estructura transversal a la banda A del sarcòmer i, en especial, els filaments gruixuts, on són presents els caps de miosina.

A la banda A, el sarcòmer presenta una secció transversal molt regular en què els filaments gruixuts, fixats per proteïnes estructurals de la línia M, es disposen en els nodes d'una xarxa hexagonal bidimensional (figura 2.10). Per la seva banda, els filaments primers se situen en les posicions trigonals d'aquesta xarxa. La cel·la elemental és definida pels vectors  $\mathbf{a}$  i  $\mathbf{b}$ , els quals formen un angle de  $120^\circ$  i tenen igual mòdul,  $a = b$ . El valor del mòdul varia segons el grau d'entrecruament dels filaments i l'espècie, si bé típicament és ca. 41 nm per als músculs utilitzats. La cel·la elemental comprèn un filament gruixut i dos filaments primers [Squire, 1980].



**Figura 2.10.** (a) Simetria hexagonal de la banda A. La cel·la fonamental queda definida per les posicions dels filaments gruixuts (punts vermells). Els filaments primers (actina) se situen en les posicions trigonals. (b) Modelització de la distribució de massa en la cel·la fonamental. Les orientacions dels caps de miosina són solament indicatives. [Hudson *et al.*, 1996].

Sobre aquesta estructura, el feix de raigs X incideix amb una direcció continguda en el pla de la xarxa,  $z = 0$ . Aquesta configuració provoca l'aparició de línies de difracció perpendiculars al pla. Efectivament, a partir de l'expressió 2.3, trobem que l'amplitud de difracció és

$$F_{hex}(X, Y, Z) = \int \rho(r) e^{2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}} d\vec{r} = \int \rho_{xy}(x, y) e^{\sqrt{3}\pi i (xX + yY)} dx dy, \quad (2.38)$$

on hem definit la projecció en la direcció axial de la densitat electrònica,

$$\rho_{xy}(x, y) = \int \rho(x, y, z) dz. \quad (2.39)$$

L'amplitud de difracció  $F_{hex}(X, Y)$  no depèn de la coordenada  $Z$  i, per tant, el seu valor resta constant en aquesta direcció de l'espai recíproc. La integral és nul·la en quasi tots els punts  $(X, Y)$  de l'espai recíproc, excepte en els punts que compleixen les condicions

$$X = \frac{2}{\sqrt{3}} \frac{h}{a} \quad \text{i} \quad Y = \frac{2}{\sqrt{3}} \frac{k}{a}, \quad (2.40)$$

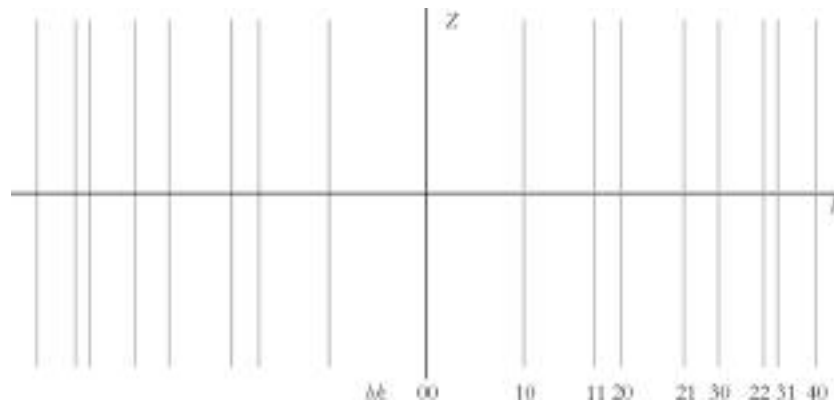
en què  $h$  i  $k$  són nombres enters. El parell d'enters  $(hk)$  són els anomenats índexs de Miller de l'estructura hexagonal, que caracteritzen unívocament dels punts en l'espai recíproc on l'amplitud de difracció no és nul·la. Més endavant, en considerar l'efecte conjunt de les simetries hexagonal i helicoidal, el parell d'índexs anteriors es completen amb un tercer que caracteritza la discretització de la simetria helicoidal en la direcció axial.

Cal notar que aquestes condicions imposades per la xarxa hexagonal tenen el mateix paper que la condició 2.30, imposada per la simetria helicoidal en la direcció axial. Amb l'ús de coordenades cilíndriques, les dues condicions 2.40 es redueixen a una sola condició que s'aplica a la coordenada radial,

$$R = \frac{1}{a} \sqrt{\frac{4}{3} (h^2 + hk + k^2)}. \quad (2.41)$$

En el diagrama de difracció que en resulta (figura 2.11) apareixen una sèrie de *bandes* de difracció paral·leles a l'eix  $Z$  i que compleixen la condició 2.41. Cada banda de difracció és caracteritzada pels índexs de Miller  $(hk)$ , i correspondrà a un espaiat  $d$  de repetició invers a la coordenada radial  $R$ , és a dir,

$$d = \frac{a}{\sqrt{\frac{4}{3} (h^2 + hk + k^2)}}. \quad (2.42)$$



**Figura 2.11.** Bandes de difracció que origina per una estructura hexagonal en fer-hi incidir un feix de raigs X. Tant el pla  $xy$  de l'estructura com el feix són perpendiculars a l'eix del múscul. En el múscul, les bandes només apareixen en les interseccions amb les línies de difracció de l'estructura helicoidal.

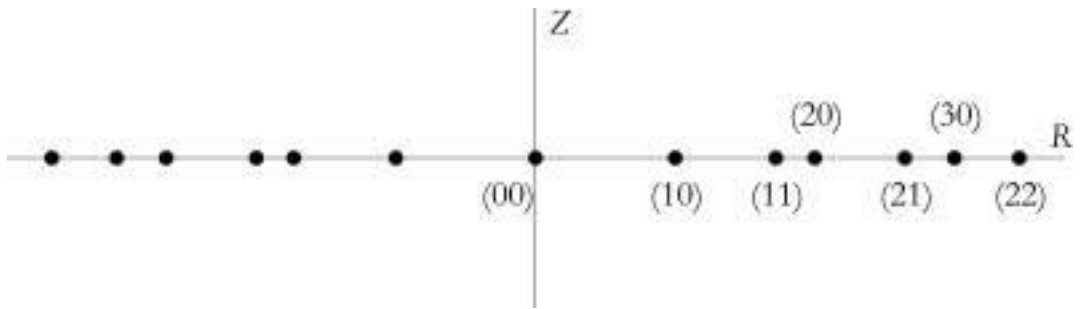
Finalment, cal puntualitzar que aquestes expressions són vàlides únicament per a la banda A del sarcòmer, on hi ha presència de filaments gruixuts. Fora d'ella, a la banda I, només hi ha presència de filaments prim, que perden la simetria hexagonal imposada pels filaments gruixuts i gradualment passen a tenir la simetria de la línia Z [Knappeis i Carlsen, 1962; HE Huxley, 1963; Reedy, 1964]. La simetria d'aquesta banda és aproximadament quadrada (figura 1.4a), amb un paràmetre de xarxa d'entre 20 i 25 nm, si bé està parcialment indeterminada a causa de la incertesa en les rotacions relatives dels filaments [Pringle, 1968]. De tota manera, atesa la regió de diagrama d'interès per a l'anàlisi posterior (el meridià), la menor massa del filament prim, el major desordre i el gran solapament dels filaments existent en el muntatge experimental, la xarxa de la banda I i la línia Z té poca rellevància en els diagrames de difracció obtinguts, i pot ser negligida.

### 2.5.2. El mostratge de les línies de difracció

Fins ara hem considerat els diagrames de difracció d'estructures amb simetria helicoidal i hexagonal separatament. No obstant això, el múscul presenta en cada punt de la xarxa hexagonal un filament amb simetria helicoidal i, per tant, les dues estructures es troben convolucionades.

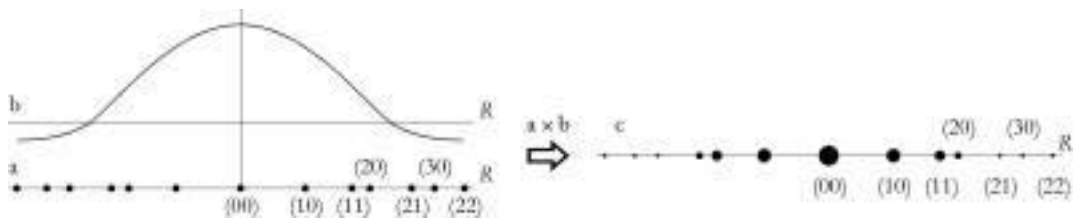
L'amplitud de difracció total que resulta d'aquesta situació, segons el teorema de la convolució (expressió 2.8), és el producte de l'amplitud de difracció de les dues estructures. Per tant, la condició 2.41, que caracteritza la localització de les bandes de difracció de l'estructura hexagonal, i la condició 2.30, que assenyalava la discretització a causa de la simetria helicoidal, s'han d'acomplir simultàniament.

A conseqüència de la simultaneïtat de condicions, les línies de difracció, que eren contínues segons la simetria helicoidal, es veuen ara reduïdes a pics, de diversa amplada, en els punts que compleixen la condició 2.41. Aquest efecte, anomenat *mostratge* (*sampling*), dona peu a l'aparició de pics de difracció definits pels índexs de Miller ( $hkl$ ), en què els dos primers índexs, ( $hk$ ), són determinats per la simetria hexagonal i el darrer,  $l$ , per la simetria helicoidal. En definitiva, cada línia de difracció té una aparença com la mostrada en la figura 2.12.



**Figura 2.12.** Mostratge ideal d'una línia de difracció dels caps de miosina per part de la xarxa hexagonal de la banda A. Els índexs representats són els dos primers índexs de Miller ( $hk$ ).

Els punts a cada línia de difracció que origina el mostratge de la xarxa hexagonal no tenen, però, la mateixa intensitat, a causa del producte de l'amplitud de difracció de la xarxa hexagonal amb la de l'estructura helicoidal (figura 2.13). En cada línia de difracció, els punts mostrejats tindran una amplitud de difracció definida per 2.32 i 2.33. El resultat és que, de tots els punts possibles del mostratge, únicament les reflexions (10) i (11) són remarcables al diagrama de difracció (figura 2.9).



**Figura 2.13.** Els pics de difracció d'una línia són modulats per l'amplitud de difracció d'un filament. El producte de l'amplitud de difracció de la línia ( $a$ ) pels pics que origina la xarxa hexagonal ( $b$ ) (figura 2.12) porta a la l'afebliment dels pics espaiat més petit ( $c$ ). Únicament destaquen les reflexions (10) i (11).

### 2.5.3. Els pics equatorials

Els pics que presenta l'equador del diagrama de difracció del múscul són el resultat del mostratge de la línia de difracció d'ordre zero ( $l = 0$ ) i, per tant, la seva localització queda també determinada per l'expressió 2.41. De tota manera, a l'equador no solament hi ha els pics originats per la xarxa hexagonal, sinó també hi són presents traces d'altres estructures, especialment la línia Z i la xarxa quadrada, esmentada abans, que formen els filaments primers.

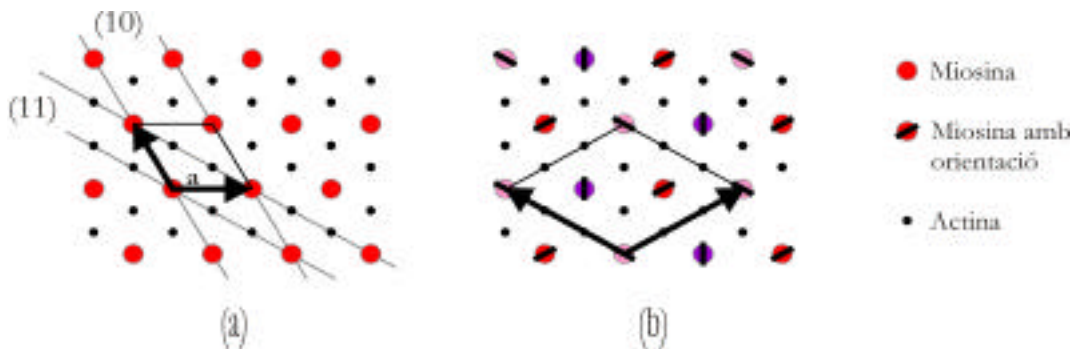
Com s'ha dit a la secció anterior, els pics més intensos són els de més gran espaiat, essencialment els pics (10) i (11), ambdós amb una clara significació física. D'una banda, el pla (10) és un pla de gran densitat on solament hi ha filaments gruixuts o



filaments prims, excloents entre ells (figura 2.14a), i, per tant, és indicatiu de la quantitat de massa que no participa en les interaccions entre actina i miosina.

D'altra banda, el pla (11) rau en la línia entre filaments prims i gruixuts, i estima, per tant, la quantitat de massa que participa en les interaccions. Els canvis en intensitat d'ambdues reflexions són indicatius del grau de solapament i del moviment de masses entre aquests dos filaments. Així, en l'estat muscular de contracció isomètrica la reflexió (10) s'afebleix i la (11) es fa més forta respecte a l'estat de descans [Elliott *et al.*, 1963].

La localització dels filaments prims en les posicions trigonals de la cel·la elemental fa augmentar sensiblement la densitat en el pla (11) de la xarxa, mentre que el pla (10) no es veu afectat [Elliott *et al.*, 1963]. La reflexió (11) és més intensa com més solapament es produeix entre filaments, fet que indica que els filaments prims estan desordenats fora de la zona de solapament amb els filaments gruixuts (banda I), i que són aquests els darrers responsables del manteniment de la xarxa hexagonal.



**Figura 2.14.** Esquema de la secció transversal de la banda A del sarcòmer, on es dona el solapament dels filaments gruixuts (miosina) i els prims (actina). La banda presenta una estructura hexagonal, la cel·la base de la qual es pot definir (a) sense tenir en compte la rotació relativa entre filaments gruixuts, i (b) tenint en compte aquesta rotació. Si es té en compte la rotació relativa, els filaments gruixuts que abans eren idèntics, són ara diferents. Les posicions relatives dels filaments no simètrics no són constants, sinó que segueixen unes regles bàsiques que fan que els filaments siguin estadísticament simètrics. La definició usada convencionalment és la de la cel·la simple. Es mostren els plans (10) i (11) d'aquesta, que donen les dues reflexions més intenses en l'equador del diagrama de difracció.

## 2.6. La superxarxa del múscul

Com mostra la condició 2.41, el mostratge que provoca la xarxa hexagonal ideal ha de ser idèntic en totes les línies de difracció (figura 2.11). Caldria esperar, per tant, la mateixa successió de pics de difracció en la direcció radial en totes les línies. Amb tot, els experiments de difracció amb múscul sartori de granota demostren que els pics en les línies de difracció d'ordre múltiple de 3 (equador, 3M, 6M, etc.) no segueixen la mateixa successió que els de les línies d'ordre no múltiple de 3 (1M, 2M, 4M, etc.) [Huxley i Brown, 1967] (figura 2.15).

L'explicació d'aquest fet és el trencament de la simetria hexagonal simple en favor d'una cel·la més complexa que inclou les noves pertorbacions (figura 2.14b). La nova

cel·la, la successió de la qual en el pla forma la *superxarxa* del sarcòmer, és igualment hexagonal, i amb un paràmetre de xarxa 3 vegades més gran que el paràmetre de xarxa anterior.

Amb l'adopció d'aquesta nova xarxa, els índexs de Miller dels pics apareixen canviats respecte a la xarxa hexagonal simple (figura 2.15). En la superxarxa, el mostratge de les línies de difracció segueix una nova regla de selecció,

$$2h + k + l = 3N, \quad (2.43)$$

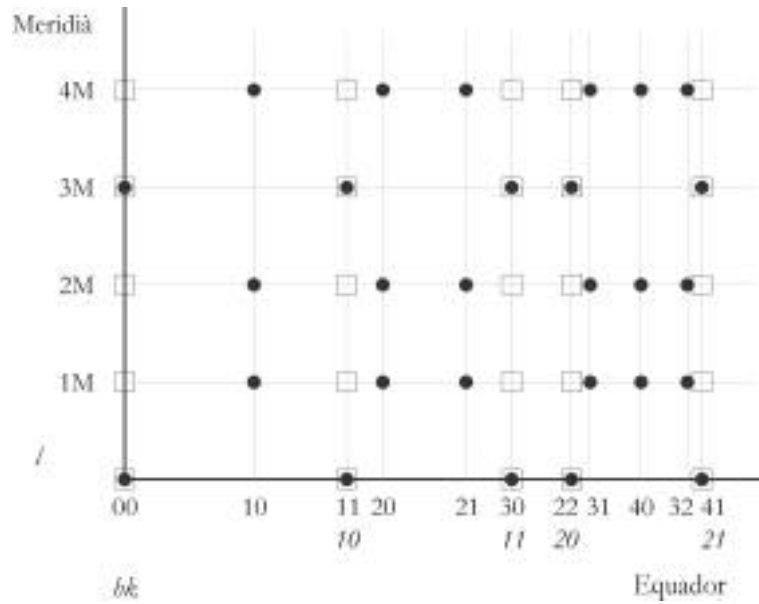
on  $(hk)$  són els índexs de Miller de la superxarxa,  $l$  l'índex de la línia de difracció meridional i  $N$  qualsevol nombre sencer. Aquesta regla de selecció reflexa el fet que els filaments gruixuts tenen un gir azimutal relatiu o, equivalentment, un desplaçament axial relatiu [Elliott i Lowy, 1968; HE Huxley, 1968]. Amb aquest gir o desplaçament, l'esquelet cilíndric del filament gruixut roman en la mateixa posició, mentre que els caps de miosina presenten una orientació diferent. Així, els filaments gruixuts deixen de ser tots idèntics i, en conseqüència, tenen posicions diferents en la nova superxarxa.

Dins d'aquesta nova cel·la, diverses configuracions dels filaments gruixuts compleixen la regla de selecció 2.43, fet pel qual l'estructura de la superxarxa ha de ser determinada amb l'ajut de tècniques complementàries a la difracció de raigs X [Squire, 1981]. Les més rellevants han estat la microscòpia electrònica [Trinick, 1973; Davey i Graafhuis, 1976]; la microscòpia d'interferència [HE Huxley i Hanson, 1957]; l'electroforesi i les tècniques bioquímiques [Marston i Tregear, 1972; Tregear i Squire, 1973], que poden determinar el contingut de molècules de miosina en un filament gruixut, i, finalment, les consideracions de simetria [Squire, 1981]. Aquests elements, a despit d'algunes discrepàncies, permeten afirmar que hi ha 3 cordes per filament gruixut, i que els filaments poden estar en 3 posicions, desplaçats un múltiple de l'avanç axial de la unitat de repetició del filament.

La nova cel·la que surt d'incloure aquest desplaçament relatiu entre filaments gruixuts és igualment hexagonal, amb un paràmetre de xarxa 3 vegades més gran que el paràmetre de xarxa anterior (figura 2.14b), que s'ajusta al que s'observa experimentalment.

Els trencaments de la simetria hexagonal simple són, de fet, la regla general dels músculs fins ara estudiats. El tipus de trencament i l'ordre de la nova xarxa són molt dependents de l'espècie i del múscul considerats [Squire, 1981]. En particular, el múscul sartori de la granota *Rana esculenta*, l'espècie que s'utilitza en aquest treball (vegeu el capítol següent), presenta tres posicions no equivalents dels filaments gruixuts a la cel·la elemental (figura 2.14b). No obstant això, aquestes posicions no són ocupades pel un filament gruixut amb el mateix desplaçament, sinó que hi ha un intercanvi estadístic de posicions, que segueixen unes regles bàsiques, anomenades *no three alike* [Luther i Squire, 1980].





**Figura 2.15.** Mostratge de les línies de difracció 1M-4M, pel múscul *sartorius* de granota [Squire, 1981]. En la xarxa hexagonal simple (índexs en cursiva), totes les línies tenen el mateix mostratge (quadrats blancs). No obstant això, les reflexions observades (cercles negres) només poden ser explicades mitjançant una superxarxa (índexs en rodona) que compleixi la regla de selecció 2.43.

Malgrat tot, la xarxa simple continua essent vàlida amb tota generalitat en l'equador, ja que aquest és resultat de la difracció de la projecció de masses en el pla transversal  $r_{xy}(x, y)$ , insensible, per tant, als desplaçaments axials. La xarxa simple també és vàlida en el meridià, ja que els desplaçaments axials que expliquen la superxarxa són múltiples del paràmetre  $c'$ , l'avanç axial de la unitat de repetició del filament. Per tant, en el treball posterior es considerarà la cel·la simple, si bé convé tenir constància de la superxarxa subjacent.