

Capítol

3

Instrumentació i disseny dels experiments

A continuació s'exposen la instrumentació i els protocols experimentals que permeten enregistrar els diagrames de difracció de diversos estats musculars. En la instrumentació, especifiquem les prestacions necessàries de la font de raigs X (la llum de sincrotró) i del detector, així com les característiques de l'equip que sosté el múscul en condicions adequades. Pel que fa als protocols, mostrem les condicions de tensió i longitud, entre d'altres paràmetres, dels diferents estats musculars estudiats.

3.1. La llum de sincrotró

Les partícules amb càrrega elèctrica accelerades perden energia a causa de l'emissió de radiació electromagnètica. En els acceleradors de partícules circulars, aquesta pèrdua és molt rellevant, donat que imposa un límit a l'energia que poden tenir les partícules. A aquest efecte no desitjat dels primers acceleradors, aviat se'n va trobar la utilitat: aquella radiació s'esqueia en una àmplia banda de l'infraroig als raigs X, era molt intensa, molt col·limada i polaritzada. S'havia descobert la *llum de sincrotró* (LS), una nova font de raigs X amb un potencial d'utilització que s'aniria ampliant fins a abastar un enorme rang d'aplicacions.

A l'annex A hi ha una descripció més detallada de l'origen de la LS i les seves propietats. Actualment, aquestes han convertit la LS en la millor i quasi única font de raigs X de què es disposa per realitzar experiments en mostres biològiques i, en particular, en difracció a baixos angles de teixit biològic. Els experiments exposats en aquest treball, per tant, han estat realitzats utilitzant aquesta font.

3.1.1. Les instal·lacions de llum de sincrotró

La generació de llum de sincrotró requereix un accelerador d'electrons o positrons que porti aquestes partícules a energies molt elevades, de l'ordre de pocs GeV d'energia, i les mantingui el temps necessari per a la realització dels experiments. Les anomenades *instal·lacions de llum de sincrotró* (figura 3.1) assoleixen aquestes condicions mitjançant un sistema d'acceleració de les partícules i un anell d'emmagatzematge (*storage ring*) construït especialment per proporcionar les condicions òptimes als experiments (figura 3.2). A l'annex B es pot trobar una explicació més extensa de les instal·lacions de llum de sincrotró, així com de les aplicacions de la LS en diferents camps de la ciència i la indústria.



Figura 3.1. Vista aèria de la instal·lació europea de llum de sincrotró ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*), situada a Grenoble (França) i utilitzada per dur a terme els experiments. L'anell d'emmagatzematge, de 820 m de circumferència, conté prop de 40 línies de llum que aprofiten els raigs X que emeten els electrons [ESRF, 2000a].

A l'anell d'emmagatzematge hi ha emplaçats els *imants dipolars*, a on els electrons corben la seva trajectòria emetent tangencialment la LS. Addicionalment als imants dipolars, les actuals instal·lacions de llum de sincrotró, anomenades de tercera generació, han incorporat uns nous elements de producció de LS, els anomenats *dispositius d'inserció* (*insertion devices*). Un dispositiu d'inserció és una successió d'imants de pols alternats (permanents o electroimants) disposats en una secció recta de l'anell. Els electrons en passar, pels dispositius d'inserció, oscil·len emetent una llum molt més intensa i ajustable a les necessitats de l'experiment. Les propietats d'aquestes fonts de LS, els imants dipolars i els dispositius d'inserció, són exposades amb més detall a l'apèndix B.

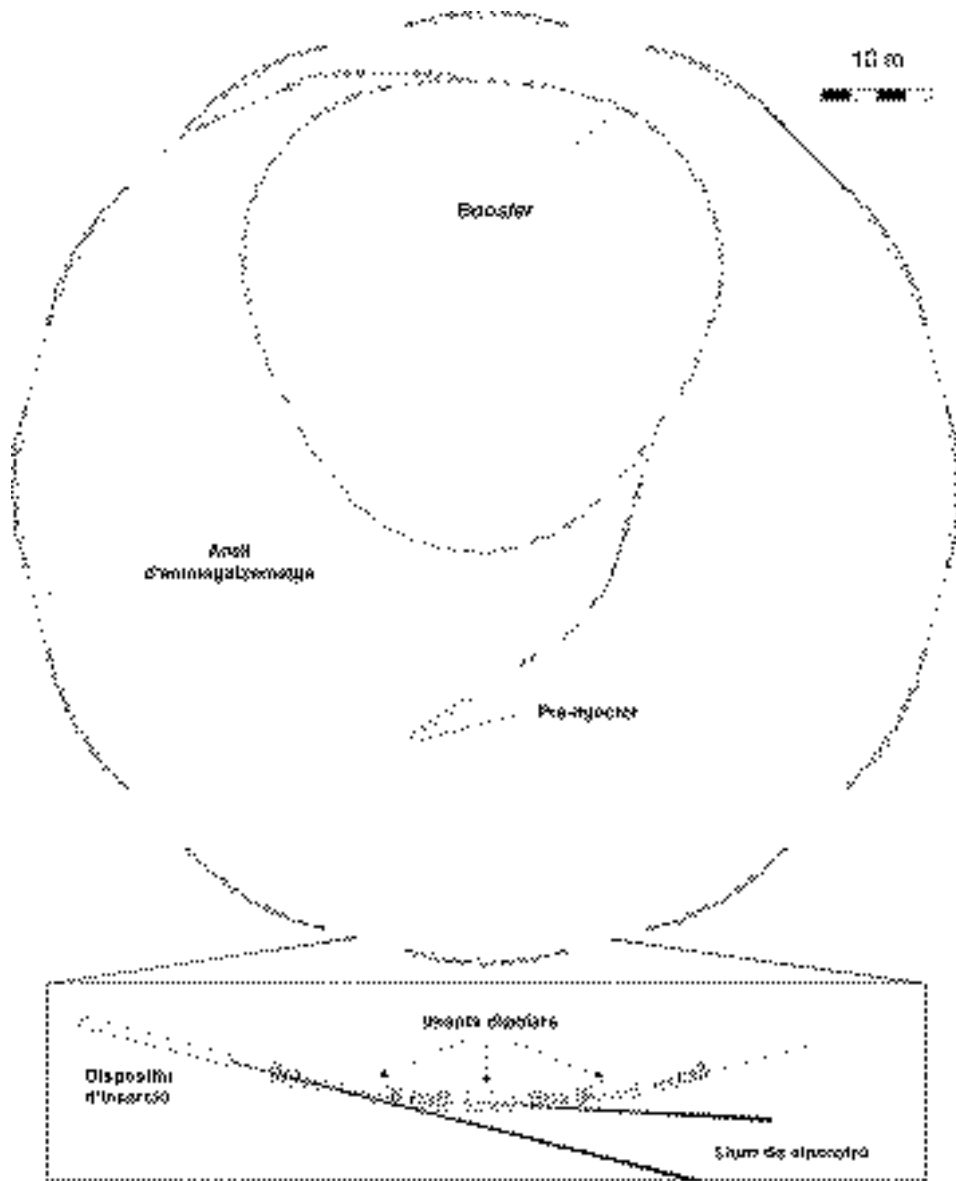


Figura 3.2. Principals parts d'una instal·lació de llum de sincrotró. Els electrons, accelerats en el pre-injector i posteriorment en el *booster*, circulen dins l'anell d'emmagatzematge durant hores, emetent llum de sincrotró en els imants dipolars i els dispositius d'inserció [LLS, 1997].

La llum emesa de les fonts (ímants dipolars i dispositius d'inserció) de l'anell d'emmagatzematge és recollida per les *línies de llum* (*beamlines*), que l'adapten a les necessitats de l'experiment. Les línies de llum, mitjançant miralls, monocromadors i esclatxes, entre d'altres elements òptics, adapten específicament per a un experiment concret la llum emesa per aquells en divergència, punt focal, longitud d'ona, resolució, brillantor i flux.

3.1.2. Prestacions requerides a la línia de llum

Donat que calen unes característiques de la LS concretes per a molts dels nombrosos experiments realitzats en les instal·lacions de llum de sincrotró, les línies de llum s'especialitzen en un rang més o menys limitat d'experiments. El nostre cas, lluny de ser una excepció, demana de la línia de llum unes propietats molt estrictes com a conseqüència de la peculiaritat del *material* estudiat.

La geometria dels experiments que aquí s'exposen és típica dels experiments de difracció a baixos angles (figura 3.3). En aquest tipus d'experiments, el feix de raigs X incideix perpendicularment a l'eix del múscul i del detector, i es focalitza en el pla d'aquest darrer. L'objectiu principal de l'experiment és identificar els pics que apareixen al diagrama de difracció i, per tant, cal determinar les característiques òptimes de la línia de llum en funció de la resolució espacial D_x .

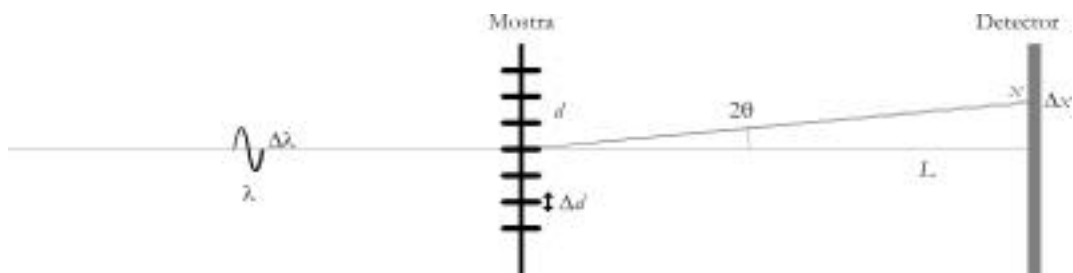


Figura 3.3. Definicions dels paràmetres que intervenen en les especificacions de la línia de llum.

3.1.1.1. El límit de la resolució espacial

En l'estat actual de la tecnologia, la resolució espacial queda limitada principalment per les dimensions de la font de llum, és a dir, del feix d'electrons al seu pas per l'ímant dipolar o el dispositiu d'inserció. En la direcció vertical (la direcció rellevant en els nostres experiments), la font de llum típicament és de l'ordre de centenars de micres. La millor font europea actualment disponible és l'ESRF (figura 3.1), amb una focalització vertical de 200 mm FWHM.

Convé puntualitzar que és possible reduir, en principi, la dimensió de la font al punt focal, que és el punt on se situa el detector. Això no obstant, en aquest cas, la divergència de feix es fa més gran i, a més, els elements òptics introdueixen aberracions que fan augmentar el punt focal. El punt òptim s'aconsegueix quan la dimensió de la font de llum (els electrons en el seu pas pel dispositiu d'inserció) és igual a la dimensió

del punt focal (al detector). Les línies de llum de l'ESRF dedicades a la difracció a baixos angles compleixen aquesta condició i, per tant, tenen un punt focal de 200 mm FWHM.

A més de la font de llum, un segon factor que limita la resolució espacial és la resolució del detector. La tecnologia actual dels *comptadors proporcionals* (*multiwire proportional chambers, MWPC*) i de les càmares CCD permet una resolució espacial x de ca. 200 μ m, molt similar a la dimensió de la font de llum. La resolució total del diagrama de difracció, que és la suma quadràtica dels dos factors serà, per tant, inferior a l'original de la font.

En canvi, el procés d'enregistrament i tramat de les *plaques de raigs X* (*image plates*) actualment permet una resolució màxima de 100 μ m, sensiblement millor a la dels detectors anteriors. Aquesta resolució és superior a la deguda a la dimensió finita de la font de llum i, per tant, la resolució total del diagrama de difracció és limitada solament per aquesta darrera contribució. Així doncs, pel que fa a la resolució espacial, la placa de raigs X ha de ser el mètode de detecció escollit als experiments.

3.1.1.2. Les dimensions de la línia i el detector

Un cop fixada la resolució espacial, cal determinar la discriminació entre els pics del diagrama de difracció de què ha de ser capaç la línia de llum on es portin a terme els experiments. La discriminació entre pics es calcula mitjançant la llei de Bragg, que a baixos angles, on es compleix $\sin\theta \approx \theta$, estableix la relació

$$\lambda = 2d\theta \quad , \quad (3.1)$$

on λ és la longitud d'ona de la llum incident, d l'espaiat corresponent a la reflexió que es vol estudiar a la mostra i θ l'angle de Bragg (figura 3.3). Amb la relació $2\theta = x/L$, on L és la distància entre la mostra i el detector de raigs X, i x la distància sobre el detector entre el feix directe i el punt de la reflexió, la llei de Bragg es pot expressar com

$$\frac{\lambda}{d} = \frac{x}{L} \quad . \quad (3.2)$$

Aquesta expressió es pot aplicar a dos pics propers d'espaiat mitjà d , de tal manera que pren una forma incremental,

$$\lambda \frac{1}{d} = \frac{x}{L} \quad , \quad (3.3)$$

on $(1/d)$ és la diferència dels inversos dels espaiats dels dos pics i x és llur separació sobre el detector. Com sabem a partir de literatura prèvia (vegeu el capítol següent), la forma dels pics és modelada per un fenomen d'interferència entre dues unitats separades ca. 1 mm. Així, segons l'expressió 3.3, amb una longitud d'ona típica λ de 0.1 nm, i amb l'objectiu d'assolir una discriminació espacial x de 1 mm per evitar

l'efecte de la dimensió finita de la font de llum, els pics provocats per aquesta interferència queden separats quan la distància L és de 10 m. Aquesta distància suposa una restricció important, donat que és relativament llarga, i redueix molt el nombre de línies de llum adequades pels nostres experiments.

Al seu torn, la gran distància L entre la mostra i el detector necessària per a la discriminació dels pics, al seu torn, imposa condicions sobre les dimensions del detector. Com es desprèn de l'expressió 3.2, amb la longitud d'ona i la distància entre mostra i detector anteriors, per a l'enregistrament de la reflexió 15M, que correspon a un espaiat d de ca. 2.8 nm, cal una dimensió del detector de ca. 360 mm, una longitud considerable que deixa fora de rang els comptadors proporcionals i les càmares CCD. Per contra, les plaques de raigs X disponibles més grans, de dimensions de l'estàndard DIN-A3 (420×297 mm), poden abastar correctament aquesta longitud (vegeu la secció 3.2).

Així doncs, en resum, les plaques de raigs X poden oferir una millor resolució, tant pel que fa a la dimensió de píxel com a les dimensions de la zona de detecció.

3.1.1.3. La font de llum és monocromàtica

Un possible factor que, a priori, pot influir en la resolució és la manca de monocromaticitat de la font de llum. En les condicions en què hem realitzat els experiments, però, aquest factor no intervé, donat que el límit de la resolució espacial associat a la manca de monocromaticitat és superior a l'associat a la font de llum o a la resolució del detector. Efectivament, suposem una dispersió de la longitud d'ona λ del feix de raigs X incidents sobre la mostra i un espaiat de la mostra d ideal. En relació amb aquests paràmetres, el pic de difracció s'estén sobre una regió x en el detector que ve donada per la formulació incremental de l'expressió 3.2,

$$\frac{\lambda}{d} = \frac{x}{L}. \quad (3.4)$$

La tecnologia actual permet una resolució λ de $2 \cdot 10^{-5}$ nm a la longitud d'ona típica usada en difracció de 0.1 nm amb l'ús de la reflexió Si(111) en un monocromador de doble cristall [DuMond, 1937; Bonse i Hart, 1965; Hart i Rodrigues, 1978; Matsushita i Hashizume, 1983]. La resolució espacial x que s'obté per a la reflexió 15M, l'última reflexió que s'espera mesurar, és ca. 70 mm. En reflexions d'ordre més baix, el límit de resolució espacial causada per la monocromaticitat de la font és com més va més baix.

En definitiva, aquest límit de la resolució espacial és clarament superior als causats per la dimensió finita de la font de llum i la resolució del detector i, per tant, la font dels raigs X emprada als experiments pot ser considerada a tots els efectes com a monocromàtica.

3.1.2. La línia de llum ID2 de la font ESRF

La conclusió extreta de l'apartat anterior és que, per a la realització dels experiments, cal una línia de llum muntada sobre la instal·lació de llum de sincrotró amb la màxima focalització possible, amb una distància entre mostra i detector de 10 m aproximadament, i preparada per l'ús de plaques de raigs X. Només unes poques

línies de llum a tot el món compleixen aquestes característiques que, d'altra banda, són generalitzables a d'altres experiments de dispersió de raigs X a baixos angles (*SAXS*, *small angle X-ray scattering*).

La línia de llum escollida pels experiments és la línia ID2 (BM4) de l'ESRF (figura 3.4), les característiques de la qual són tabulades a la taula 3.1 [Boesecke *et al.*, 1995]. Els experiments han estat portats a terme prèvia acceptació de la proposta d'investigació per part del comitè d'avaluació de l'ESRF. Les característiques principals de la línia estan llistades a la taula 3.1.

La línia de llum ID2 es proveeix de la LS que produeixen dos onduldors, U26 i U46, situats sobre la mateixa secció recta de l'anell d'emmagatzematge de l'ESRF (figura 3.4). L'ondulador U46, utilitzat en els experiments presentats en aquest treball, està optimitzat per oferir una LS amb una longitud d'ona de 0.1 nm, si bé permet una variació contínua entre 0.073 nm i 0.155 nm.

L'òptica de la línia de llum consisteix en un monocromador de doble cristall que treballa sobre la reflexió Si(111), i un mirall toroidal que focalitza en les dues direccions (figura 3.4). Disposa igualment d'una vàlvula ràpida (*shutter*) que permet o barra el pas de la llum de sincrotró en un temps <3 ms, així com d'una càmera de buit que cobreix la distància de la mostra al detector per evitar la dispersió dels raigs X en l'aire.

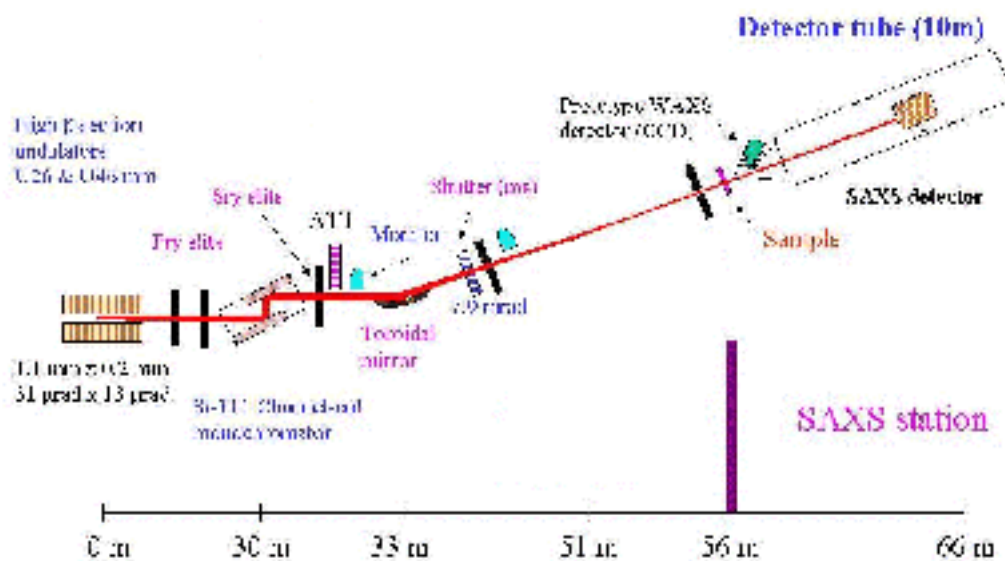


Figura 3.4. La línia ID2 de l'ESRF vista en alçada [ESRF, 2000b]. Només es mostra l'estació dedicada a experiments de SAXS (*SAXS station*), on es localitzen la mostra (*sample*) i la càmera del detector de 10 m de longitud. S'observen els dos elements òptics principals de la línia, el monocromador de doble cristall, basat en la reflexió Si(111), i el mirall toroidal (amb recobriment de Rh, 0.35 m de longitud i 7.9 mrad d'angle de reflexió). A més, la línia conté diverses esclertes (*slits*) i una vàlvula ràpida (*shutter*) que permeten controlar el pas de llum a la mostra.

Sobre els mateixos elements òptics s'hi instal·len dues estacions experimentals, dedicades a experiments de WAXS/D (*Wide Angle X-ray Scattering/Diffraction*, no mostrada a la figura 3.4) i SAXS/D (*Small angle X-ray Scattering/Diffraction*), respectivament. Aquesta darrera estació, utilitzada als nostres experiments, conté tres detectors: un *comptador proporcional* (*Multiwire proportional gas chamber*, MWPC), una càmera CCD i una placa de raigs X (*image plate*). Tots els detectors estan inclosos dins

d'una immensa càmera de buit de 10 m de longitud que evita l'efecte de la dispersió dels raigs X en l'aire.

L'estació permet variar la distància entre la mostra i la placa de raigs X entre 0.75 m i 10 m. Aquesta màxima distància és la utilitzada als experiments per les raons exposades a la secció 3.1.2.2. Això permet optimitzar el compromís entre la regió de l'espai recíproc enregistrada i la resolució aconseguida.

Taula 3.1. Característiques calculades experimentalment de la línia ID2 [ESRF, 2000b]. Per a l'explicació dels paràmetres vegeu l'annex A.

Període magnètic de l'ondulador	46 mm
Rang de longitud d'ona	0.25 nm
K_{\max}	2.03
Dimensions de la font	$1.03 \times 0.21 \text{ mm}^2$ (H×V) FWHM
Divergència de la font	$0.043 \times 0.027 \text{ mrad}^2$ (H×V) FWHM
Brillantor de pic (en con central)	$1.42 \cdot 10^{17} \text{ ph/s/mrad}^2/\text{mm}^2/0.1\%bw/0.1 \text{ A}$ (a 12 keV)
Densitat de potència (a 30 m)	20 W/mm^2
Dimensions del feix (a 55 m)	$0.95 \times 0.21 \text{ mm}^2$ (a 12 keV)
Divergència del feix (a 65 m)	$0.069 \times 0.025 \text{ mrad}^2$ (H×V)
Rang espectral	0.073 – 0.155 nm (8 – 17 keV)
Resolució en $\Delta\lambda/\lambda$	$2.0 \cdot 10^{-4}$ (a 12 keV)
Flux a través de la mostra	8.10^{12} ph/s (a 12 keV)

3.2. El detector: la placa de raigs X

La placa de raigs X (*image plate*) és un mètode de detecció dels raigs X en 2D basat en la impressió i emmagatzematge d'una imatge de raigs X en una placa, anàlogament a la fotografia convencional. Tot i ser un dels primers mètodes de detecció de raigs X, només darrerament les prestacions han estat prou perfeccionades com per convertir-lo en un sistema competitiu [Takahashi *et al.*, 1984; Amemiya *et al.*, 1987]. La línia de llum ID2 de l'ESRF disposa de plaques de raigs X de diverses dimensions (Molecular Dynamics Ltd.).

La placa de raigs X consisteix en una superfície plàstica, de dimensions estàndard DIN-A4 o DIN-A3, recoberta d'una capa de 0.15 mm de gruix de cristalls de fòsfor (BaPBr:Eu²⁺), combinada amb un fixador orgànic transparent als raigs X. Amb l'exposició als raigs X, el fòsfor absorbeix una fracció de l'energia de forma quasiestable. Quan posteriorment la placa és exposada a un làser amb una radiació en el rang visible o infraroig, el fòsfor emet luminiscència fotoestimulada (*Photostimulated*

luminiscence, PSL) amb una intensitat proporcional al nombre de fotons de raigs X (figura 3.5).

Segons aquest principi, la imatge dels raigs X enregistrada temporalment és llegida per un lector proveït d'un làser He-Ne, amb una longitud d'ona de 633.8 nm, que estimula el fòsfor. La PSL del fòsfor és recollida per un tub fotomultiplicador, el senyal del qual és amplificat per cobrir l'ampli rang dinàmic i digitalitzat per ser tractat convenientment. En aquest procés de *revelatge*, realitzat per un escàner, el lector làser és desplaçat per tota la superfície de la placa, enregistrant seqüencialment tots els punts de la trama. El revelatge porta finalment a una imatge de la placa amb una trama especificada per l'escàner. A la taula 3.2 hi ha la llista de les principals prestacions que ofereix el sistema. Finalment, amb una exposició d'entre 10 i 15 minuts a la llum visible, la imatge residual és eliminada de la placa i aquesta pot ser de nou utilitzada.

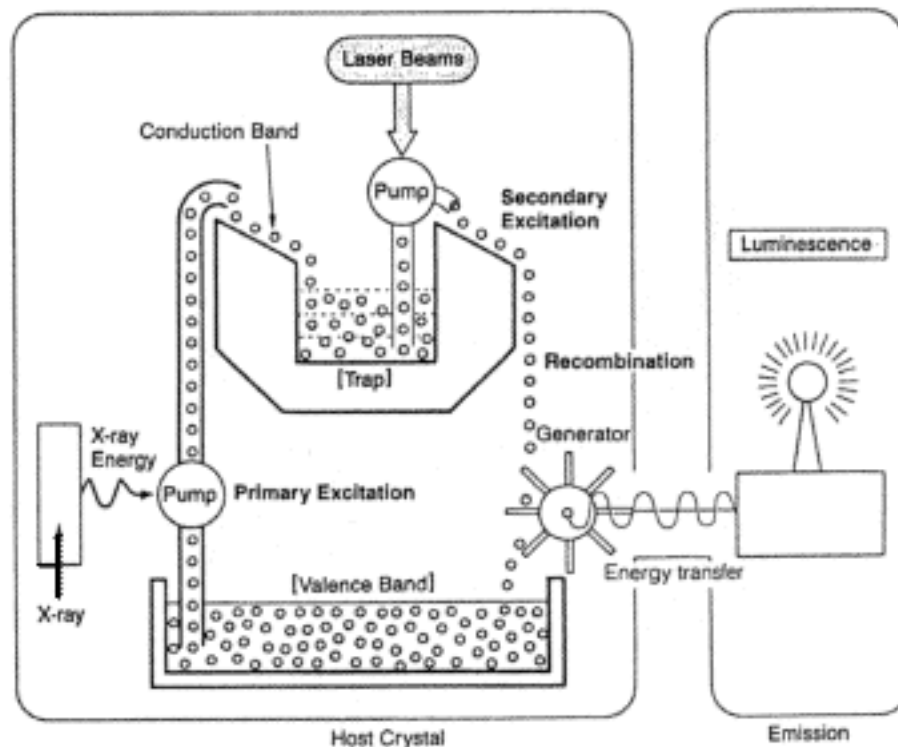


Figura 3.5. Principi d'operació de les plaques de raigs X [Amemiya, 1988]. L'absorció dels raigs X produeix el pas dels electrons de la banda de valència (*valence band*) a la de conducció (*conduction band*), tornant a la primera mitjançant l'estimulació làser de l'escàner, tot emetent luminiscència, que és recollida i quantificada.

Com a inconvenients fonamentals, cal citar especialment la impossibilitat de fer estudis en resolució temporal amb la mateixa mostra, donat que el procés de revelatge i inicialització de la placa dura aproximadament 30 minuts. El motor utilitzat per l'escàner per desplaçar el làser per tota la placa també introdueix distorsions sistemàtiques que alteren la trama, més importants com més gran és la placa revelada. Aquestes distorsions, però, poden ser corregides amb l'ús d'una màscara de referència.

A més, la resolució pot estar limitada per la dispersió de la llum del làser provocada pel plàstic que recobreix la placa, així com pel temps que es triga en fer el comptatge,

de l'ordre de minuts. Aquest temps fa que els primers punts tinguin una major intensitat a causa de l'emissió espontània, que té un decaïment temporal de tipus exponencial. Aquests dos factors fan que el nivell de soroll de fons sigui relativament alt en comparació amb d'altres detectors.

Per contra, la bona resolució espacial, d'aproximadament 100 μm i millor a la dels actuals comptadors proporcionals, és un factor decisiu que ha portat a la utilització de les plaques de raigs X. També importants pels presents experiments són l'extensa superfície de detecció i el gran rang dinàmic, necessaris per a la detecció simultània de pics separats de molt diferent intensitat.

Taula 3.2. Principals prestacions de les plaques de raigs X.

Resolució espacial	88 μm
Soroll de fons	750 fotons/ mm^2
Superfície màxima de detecció	420×297 mm
Rang dinàmic	10 ⁵

3.3. Preparació de les mostres

Els experiments s'han realitzat amb músculs sartoris (*sartorius*) sencers, disseccionats amb tendons i membrana externa, de granotes sanes de l'espècie *Rana temporaria*. Aquest múscul té forma de semifus i s'estén des del genoll a la pelvis, amb dimensions que varien segons l'exemplar, típicament de 30 mm de llarg, 8 mm d'ample i 1 mm de gruix. Aquest tipus de múscul s'ha escollit per la regularitat, el paral·lelisme entre fibres, la facilitat de dissecció i les adequades dimensions.

Els músculs dissecats són atrapats per una grapa de material plàstic en la zona pèlvica i lligats a un ganxo d'acer inoxidable amb fil de cotó per l'extrem distal, i posteriorment muntats en una cel·la feta de perspex (figura 3.6). Els músculs són alineats perpendicularment al feix de raigs X tot mantenint-ne l'eix en posició vertical. Atès que tot l'experiment depèn de la condició del múscul, en tot moment, tant a fora com a dins de la cel·la, aquest ha de ser oxigenat i regat amb solució Ringer (115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, i tampons per aconseguir un pH neutre) per reproduir les condicions fisiològiques. La subjecció i alineament de la cel·la respecte a la línia de llum i el feix de llum de sincrotró s'aconsegueix amb un trípede (figura 3.7a). La cel·la ha estat ja provada amb èxit en d'altres experiments anteriors [Bordas *et al.*, 1994; Martín-Fernández *et al.*, 1995; Bordas *et al.*, 1999a].

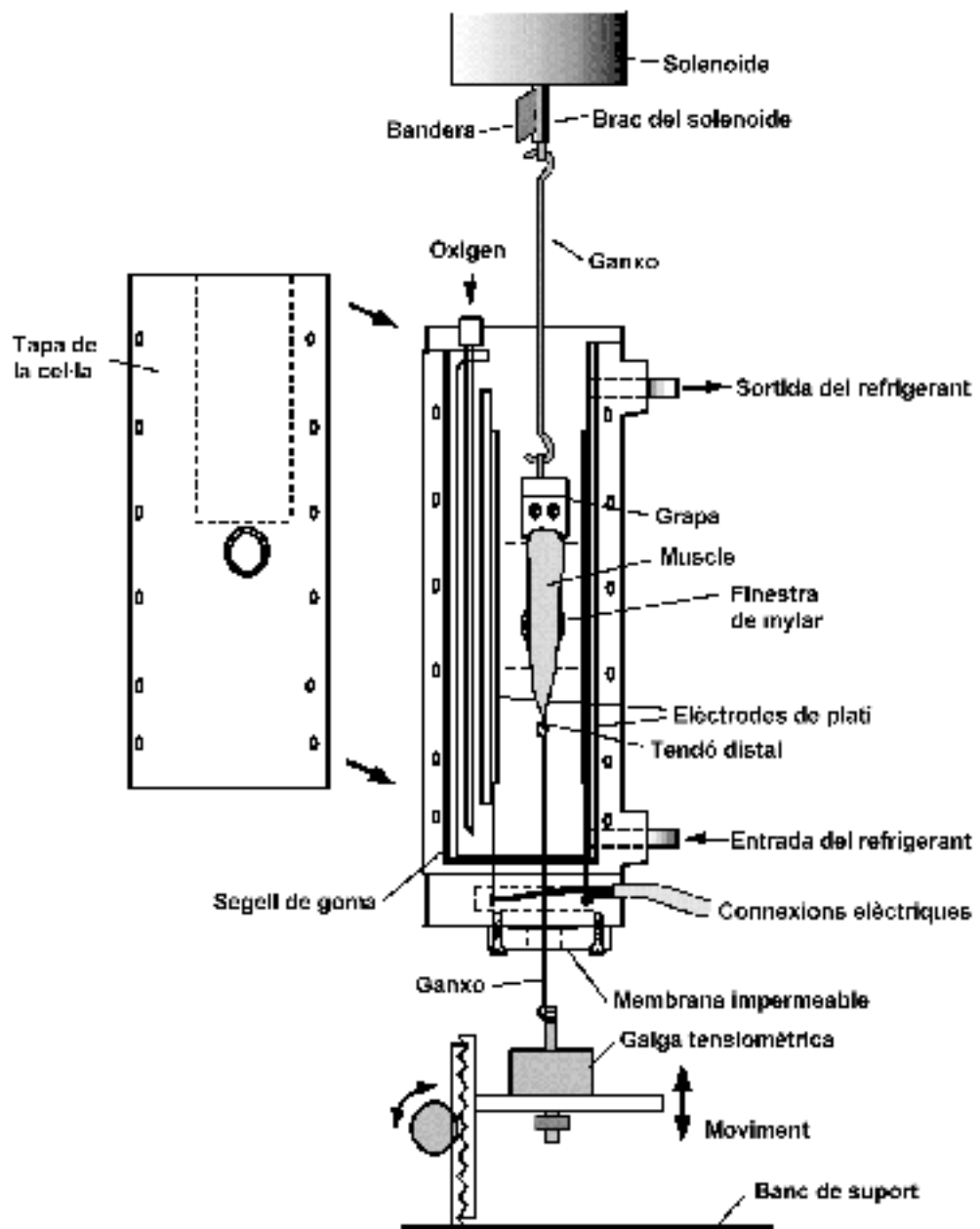


Figura 3.6. Components de la cel·la i mètode de subjecció del múscul. El feix de llum de sincrotró incideix perpendicularment al pla del paper per les finestres de mylar, irradiant el múscul [Gandy, 1997].

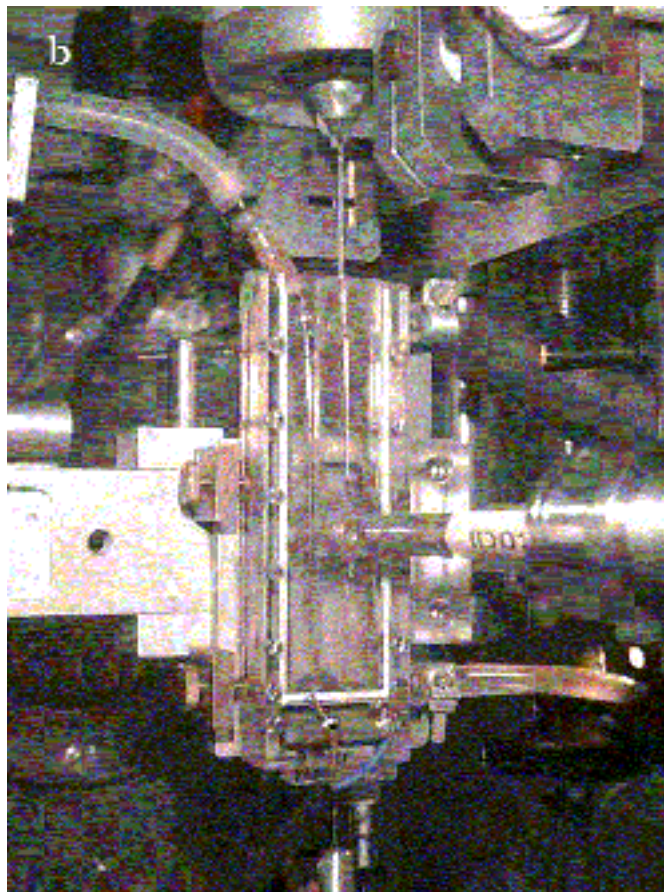
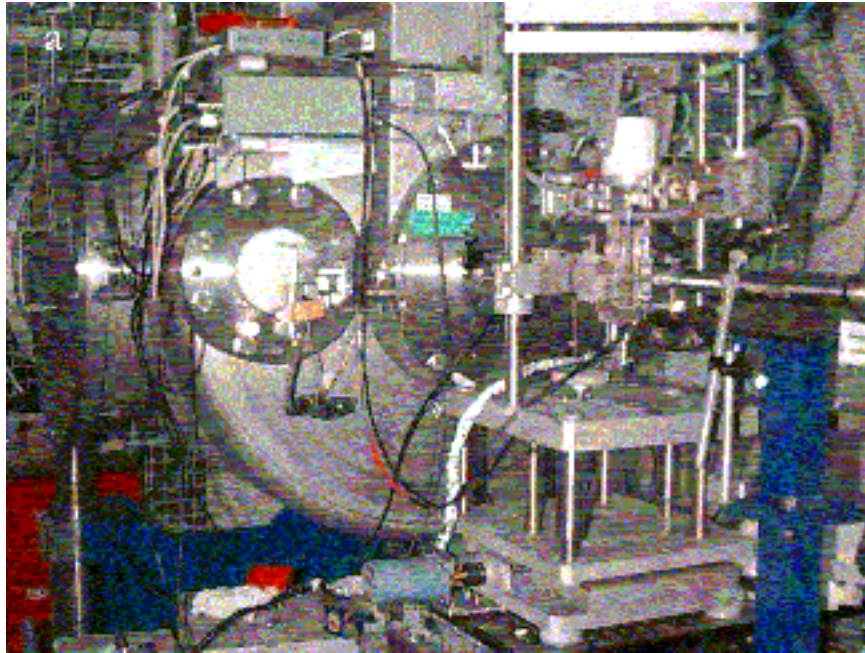


Figura 3.7. (a) Muntatge de la cel·la en la línia de llum ID2 de l'ESRF, on es veu el trípede que sosté la cel·la, i la càmera de buit, d'aproximadament 10 m de longitud, que conté la placa de raigs X. (b) Detall de la cel·la. Els elements que la componen estan mostrats en la figura 3.6. S'observa part del sistema òptic que controla la posició del múscul en els laterals del solenoide, així com el tub de buit per on passa la llum de sincrotró davant de la finestra.

L'estimulació que porta el múscul a l'estat de tètanus (vegeu la secció 1.3.1) s'obté a través de dos elèctrodes de platí, emplaçats verticalment a l'interior de la cel·la, i connectats a un estimulador que genera polsos bipolars que imiten el senyal provinent del sistema nerviós (figura 3.8). L'estimulador permet variar el potencial màxim, la freqüència i el temps d'ocupació (*duty ratio*) dels polsos, essent els seus valors típics 20 V, 50 Hz i 20% respectivament. Amb aquestes condicions, la força exercida pels músculs és aproximadament 3 N, si bé depèn de l'espècimen.

Durant l'enregistrament de la placa, la temperatura del múscul es manté constant a 8°C mitjançant un bany tèrmic, donat que la tensió de tètanus P_0 en depèn molt. Abans d'iniciar l'experiment cal comprovar que la temperatura ha quedat estabilitzada estimulant el múscul unes quantes vegades. L'enregistrament de cada placa de raigs X, juntament amb les proves inicials, requereix una multitud de contraccions i exposicions a la llum de sincrotró que provoquen el cansament del múscul. Per aquesta causa, el múscul és substituït quan el valor màxim de la tensió ha baixat al 75% del valor màxim inicial.

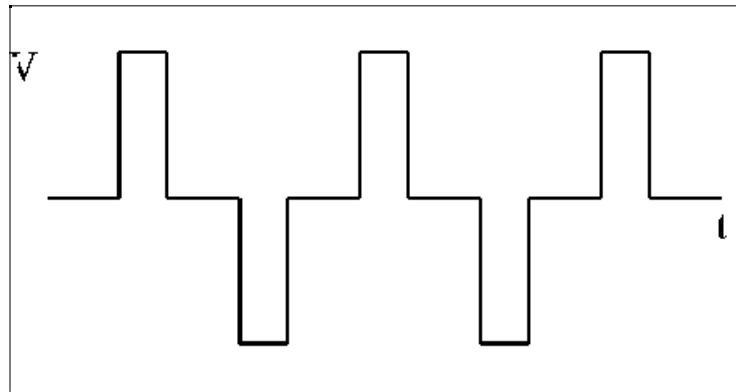


Figura 3.8. Pols bipolar generat per l'estimulador que reproduïx el senyal nerviós del múscul viu.

3.4. El control dels experiments

L'equip experimental bastit pot enregistrar i controlar simultàniament la posició i la tensió instantànies del múscul (figura 3.9). La longitud i velocitat del múscul són controlades mitjançant un solenoide de gran acceleració i de 5 mm de recorregut (Ling Dynamics, model V201), unit a la grapa de plàstic que subjecta la zona pèlvica del múscul. La posició del solenoide, i per tant del múscul, és enregistrada i controlada amb un servosistema basat en una bandera que segons la posició cobreix amb major o menor grau el senyal d'un diode LED d'infrarojos. El senyal infraroig que deixa passar la bandera és recollit per un receptor, que mesura així la posició de la bandera i, per tant, del múscul [Beltran, 1999]. L'ús d'infrarojos en lloc del visible permet minimitzar el soroll de fons que arriba al diode receptor.

El senyal rebut pel diode receptor és comparat en el sistema de control del solenoide amb el senyal provinent d'un generador d'ones arbitrari (HP 33120A). La diferència entre senyals dona el senyal de *feedback* que després de ser convenientment amplificat és entrat com a alimentació del solenoide. El sistema és calibrat per

minimitzar la diferència entre el senyal de sortida $V(\text{posició})$ de la posició del múscul i el senyal ideal $V(\text{gen})$ donat pel generador d'ones (figura 3.9). L'experiment té així un sistema de control que minimitza efectes pertorbadors.

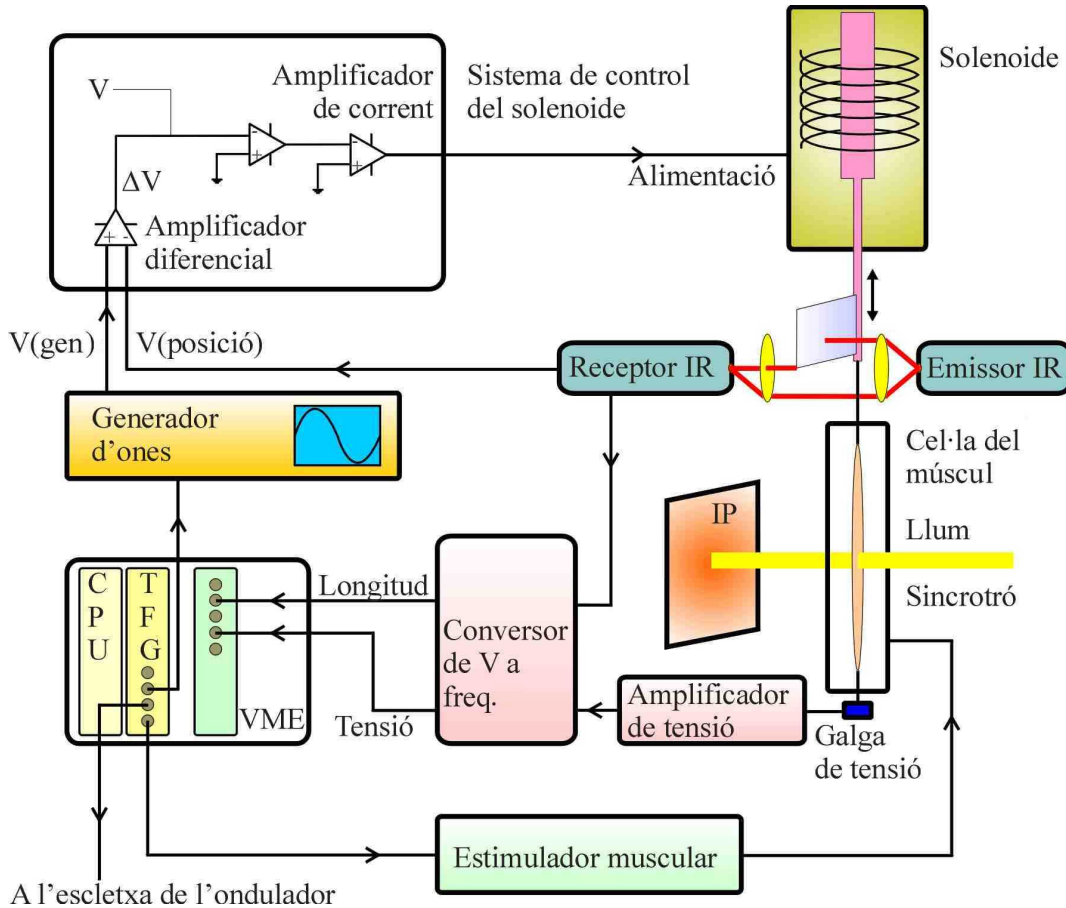


Figura 3.9. Esquema del muntatge experimental.

Per altra banda, el ganxo de l'extrem distal del múscul és unit a una galga de tensió (ALD-0.5-Mini-UTC, de A.L.Design Inc., Buffalo, EUA), el senyal de la qual és també amplificat i digitalitzat. Els senyals de la posició i la tensió són, després d'haver estat convertits de voltatge a freqüències, emmagatzemats a 24 bits en temps real en una targeta de memòria (EC738, 32 Channel Scaler) muntada sobre un processador VME (Motorola 68060) amb sistema operatiu OS-9. De forma paral·lela, per tal de tenir més accessibilitat a les dades durant els experiments, les traces de la posició i la tensió enregistrades per l'oscil·loscopi (HP 54600B) són emmagatzemades en un ordinador personal via bus RS232 i LabView.

La temporalització de l'experiment s'aconsegueix a escala inferior a $10 \mu\text{s}$ mitjançant un generador de marcs temporals (*time frame generator*, TFG) (EC740, Daresbury Laboratory). Aquesta targeta, muntada com a esclau sobre el processador VME, envia un pols activador (*trigger*) TTL als diferents dispositius segons la programació de l'experiment. Els dispositius controlats són la vàlvula ràpida (*fast shutter*), l'estimulador del múscul i el generador d'ones. En els experiments que

involucren l'estimulació del múscul el processador envia, un cop estabilitzada la temperatura a 8°C, un senyal que inicia el protocol programat cada 3 minuts, deixant temps per a la seva recuperació. Cada 10 o 20 contraccions hi ha igualment un temps suplementari d'espera de 15 minuts durant el qual els músculs són desplaçats verticalment 1 mm per repartir la zona irradiada i disminuir el dany per radiació. Segons el protocol utilitzat, un múscul pot resistir fins a 60 exposicions. El feix central de llum no dispersada és absorbida per una peça de plom (*beam stop*) situada entre la mostra i el detector.

En els experiments en l'estat de descans s'utilitza el mateix muntatge experimental, tot desconnectant l'estimulació. En aquest estat, el múscul té un desgast menor i, per tant, els temps d'exposició poden ser molt més llargs.

3.5. Els protocols experimentals

Els protocols experimentals utilitzats a l'ESRF han estat ideats per enregistrar les dades en diferents estats musculars: descans (*rest*), contracció isomètrica (*isometric contraction*) i contracció isotònica i no isomètrica (*isotonic contraction*). Malgrat que en aquest treball s'analitzen únicament els estats de descans i contracció isomètrica, també es mostra un protocol en un estat de contracció isotònica no isomètrica, el d'escurçament actiu, a tall d'il·lustració, donat que al capítol 10 ens referirem a recents experiments que involucren aquests tipus d'estats. Tots els estats musculars considerats han estat ja descrits a la secció 1.3.1 i, per tant, aquí únicament presentarem la configuració de la instrumentació necessària per obtenir els seus diagrames de difracció característics.

El protocol elaborat per a cada estat muscular ha estat seguit rigorosament, però amb la flexibilitat necessària per adaptar-lo a les diferències entre espècimens. Cada protocol té els seus punts particulars, si bé hi ha consideracions comunes a tots ells que cal tenir en compte.

Un primer punt important és l'efecte de la radiació en el múscul. La destrucció de l'estructura del sarcòmer que provoca l'exposició a la llum de sincrotró és un factor que limita molt l'aprofitament d'un múscul. Hem comprovat que una exposició de prop de 0.5 s sobre la mateixa zona del múscul provoca danys sensibles a l'estructura, i amb 1 s la zona exposada queda ja quasi totalment desfigurada [Bordas *et al.*, 1996].

Per disminuir la dosi de radiació en una zona del múscul, l'equip experimental és mogut verticalment quan l'exposició total en la zona superava els 300 ms, exposant d'aquesta manera diferents zones del múscul. El recorregut màxim permès fou de 4 mm. Un desplaçament més gran hauria portat el feix de raigs X fora dels límits de la finestra de la cel·la, i també hauria comportat un canvi substancial del paral·lelisme entre fibres musculars, atès que el múscul té forma de semifus, ample de l'extrem la pelvis i prim de en l'extrem del genoll.

Un altre punt crític dels experiments fou la longitud de la càmera del detector, ja discutit a la secció 3.1.2.2. Atès que cal la màxima resolució possible, la longitud ha estat fixada com la màxima possible en la línia de llum, 10 m de distància entre la mostra i la placa de raigs X. Aquesta llarga distància redueix la zona de l'espai recíproc abastat, fet que porta a escollir les màximes dimensions possibles de la placa de raigs X, les dimensions de l'estàndard DIN-A3, 420×297 mm.

3.5.1. Protocol en l'estat de descans

A fi d'obtenir el diagrama de difracció en descans, el múscul no és estimulat durant l'exposició i, per tant, la tensió produïda és nul·la. La longitud del múscul, mentrestant, es manté constant (figura 3.10), i igual a la que té, amb l'anca formant un angle recte, abans de ser disseccionat. Aquesta longitud, anomenada *longitud de descans* (*rest length*), correspon a l'entrecruament dels filaments màxim sense que es produeixi una situació destensada dels filaments (*floppy*) i, en el cas del múscul sartori de *Rana esculenta*, equival a una longitud del sarcòmer de 2.3 mm [HE Huxley, 1968].

A tall d'incís, remarquem que, en anteriors experiments, la longitud òptima del sarcòmer s'havia calculat usant un làser He-Ne, que la mesurava per difracció òptica. Aquesta tècnica, però, ha estat descartada a causa dels problemes d'espai que comporta el seu acoblament amb l'experiment, així com per la dispersió que produeix en els músculs més gruixuts. El nivell de precisió que s'obté amb la regla experimental de la longitud de descans, aproximadament 0.05 mm, és suficient per satisfer les condicions de reproductibilitat de l'experiment.

L'exposició a la radiació del múscul en descans fou limitada, com a màxim, a 500 ms per exposició. Amb aquesta exposició, i atès que el diagrama de difracció en descans és relativament intens, l'estadística és significativa, sobretot en les línies de difracció d'espaiat més petit que la reflexió 6M. En les línies de més gran espaiat, l'estadística s'ha obtingut sumant diferents diagrames després del procés d'alineament.

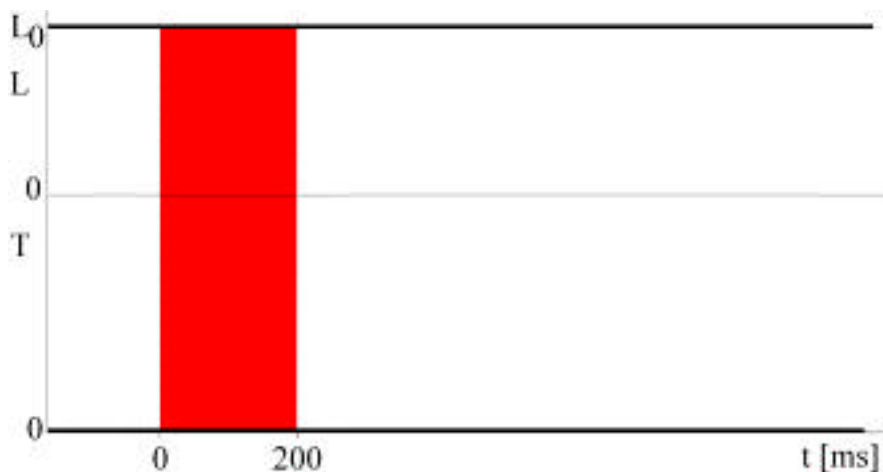


Figura 3.10. Protocol de la longitud (L) i la tensió (T) del múscul en els experiments en descans. Les dues magnituds es mantenen constants a $L_0 = 2.3$ mm i tensió nul·la, respectivament. El temps d'exposició, mostrat en fosc, pot variar segons el múscul, si bé sempre és inferior a 500 ms.

3.5.2. Protocol en l'estat de contracció isomètrica

L'estat de contracció isomètrica s'assoleix amb l'estimulació del múscul mitjançant un pols bipolar, tot mantenint constant la longitud (vegeu la secció 1.3.1). L'estimulació consisteix en una sèrie de polsos bipolars amb una freqüència tal que

provoca que el múscul faci una tensió constant, T_0 , i arribi així a la situació de tètanus. És en aquest punt que exposem el múscul als raigs X (figura 3.11). El perfil de tensió assolit té un petit soroll de fons, principalment a causa de l'amplificació del senyal de la galga de tensió i, per tant, no és experimentat pel múscul.

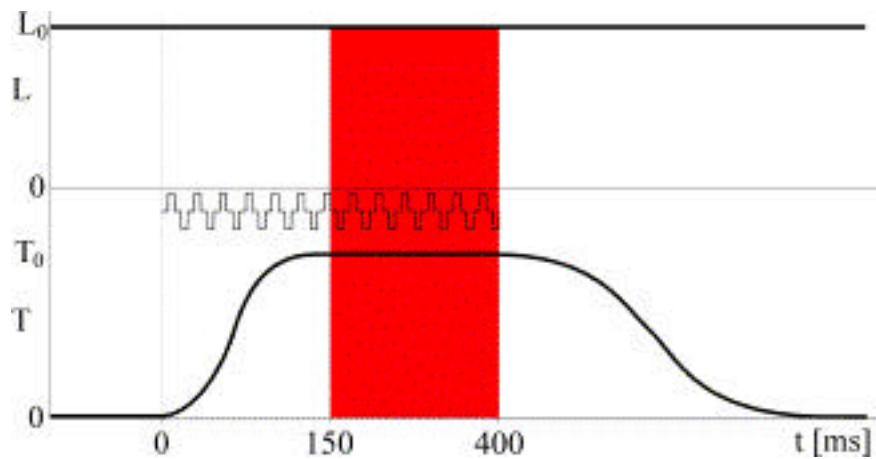


Figura 3.11. (A dalt) Protocol de l'estimulació, longitud (L) i tensió (T) dels experiments de contracció isomètrica. El temps d'estimulació està simbolitzat per un pols bipolar. Aproximadament 200-250 ms després del seu inici, el múscul arriba a l'estat de tètanus i podem exposar-lo a llum de sincrotró. El temps d'exposició pot variar segons el múscul. (A baix) Perfil típic de tensió de la contracció isomètrica assolida als experiments. El soroll és principalment causat per l'amplificació del senyal de la galga de tensió.

3.5.3. Protocol en l'estat de escurçament actiu

L'estat d'escurçament actiu és un estat no isomètric de contracció isotònica, en què la tensió produïda és nul·la mentre el múscul es manté estimulat (figura 3.12). Això s'aconsegueix escurçant la longitud del múscul amb una velocitat que depèn de la relació de Hill (vegeu la secció 1.3.1). Atès que el solenoide utilitzat per variar la

longitud del múscul té un recorregut limitat, el temps durant el qual es poden mantenir aquestes condicions és limitat, aproximadament 40-50 ms.

La longitud del múscul és tal que, en el moment d'escurçament màxim, els filaments estan en la posició de màxima superposició (ca. 2.3 mm, vegeu la secció 3.5.1). Aquesta condició s'aconsegueix definint la longitud inicial del múscul de manera que sigui aproximadament 4 mm més llarga que en l'estat de descans definit anteriorment.

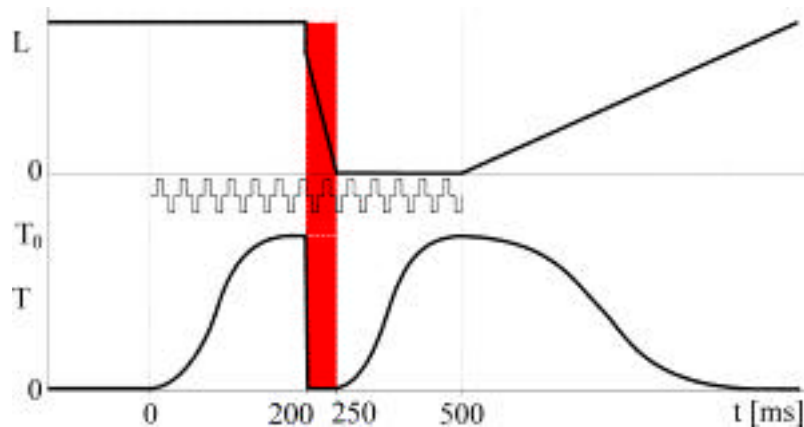


Figura 3.12. (A *dalt*) Protocol de l'estimulació, longitud (L) i tensió (T) dels experiments de contracció isotònica. El temps d'estimulació està simbolitzat per un pols bipolar. Després d'assolir la contracció tetànica, el múscul és escurçat de tal manera que perd la tensió. Aquest estat només es pot mantenir 40-50 ms, depenent del múscul. (A *baix*) Perfil típic de tensió de la contracció isotònica assolida als experiments. El soroll és principalment causat per l'amplificació del senyal de la galga de tensió.

La tensió assolida en aquest estat (figura 3.12, a baix) té més soroll de fons que la tensió en contracció isomètrica, donat que, als anteriors sorolls d'aquesta, s'afegeix el soroll provocat pel servosistema que permet canviar la longitud del múscul. Malgrat que el solenoide genera vibracions mecàniques que són experimentades pel múscul i, per tant, afecten realment el seu estat, la font principal de soroll prové dels senyals del solenoide i de la galga de tensió, que no l'afecten.

3.6. El processament de les dades

3.6.1. L'escanejament de les plaques de raigs X

Les plaques de raigs X són mostrejades amb un escàner d'alta resolució (Molecular Dynamics) amb una trama de 100 μm . El braç de l'escàner que sosté el làser He-Ne i el detector de fosforescència introdueixen desviacions inevitables en la trama durant el recorregut per tota la longitud de la placa. Aquestes desviacions han de ser corregides posteriorment mitjançant una màscara foradada amb forats de 1.0 mm de diàmetre esquespaiats 4.0 mm, mecanitzats amb alta precisió. Els diagrames de difracció han de ser igualment corregits per la lleugera no linealitat en la resposta dels cristalls de fòsfor de la placa de raigs X. A tal efecte, la intensitat en cada punt de la placa es normalitza respecte de la intensitat en la placa produïda en aquell punt per la dispersió uniforme d'una cinta de material plàstic amorf.

L'escàner crea un fitxer binari de 24 bits per punt de trama, cobrint així més de 7 ordres de magnitud. Els diferents fitxers obtinguts són emmagatzemats al disc dur i en cintes DAT. Donat que cada placa té 3544×4316 píxels, els fitxers tenen aproximadament 60 MB, una mida considerable que dificulta les transformacions i motiva l'ús d'estacions de treball per al processament.

Només han estat processats els fitxers amb dades obtingudes seguint el protocol sense alteracions. La qualitat de cada fitxer ha estat valorada en funció del quocient entre el pic secundari i la vall en la reflexió 6M en els fitxers en l'estat de descans (figura 4.4), i en la 3M en els fitxers de contracció isomètrica (figura 4.12).

3.6.2. L'extracció dels espaiats i intensitats dels pics de difracció

El processament i anàlisi de dades han estat realitzats utilitzant el programa FIT2D [Hammersley *et al.*, 1994] i BSL [Mant i Bordas, 1996] per les dades 2D, i OTOKO [Koch i Bendall, 1981] per les dades 1D. Cada diagrama de difracció 2D ha estat alineat i centrat amb translacions i rotacions, utilitzant les reflexions (10) i (11) de l'equador, i la 3M del meridià com a referències. Posteriorment, els diferents diagrames de difracció obtinguts en cada estat muscular (descans i contracció isomètrica) se sumen per augmentar el comptatge de les reflexions, obtenint així un fitxer 2D total per a cada estat.

Per a l'estudi del meridià, els píxels més propers a aquest són sumats, tot generant un fitxer 1D, físicament la projecció axial del fitxer 2D. La quantitat de píxels sumats de cada fila és un compromís entre la necessitat de tenir un alt comptatge, i l'efecte d'arquejament (*arching*) de les línies de difracció a l'allunyar-se del meridià. El punt òptim va ser considerat com la sumació de 25 píxels. Posteriorment a l'obtenció del fitxer 1D del meridià, el fons provinent de la dispersió va ser substret a partir d'una selecció de nodes. Finalment, l'espaiat i intensitat dels pics de referència foren trobats mitjançant un ajustament amb pics gaussians, optimitzat amb el mètode de Levenberg-Marquardt [Press *et al.*, 1994], amb el programa FIT [Denny, 1995].

Finalment, un punt a tenir en compte en l'anàlisi de les dades és la dificultat de la comparació de les intensitats dels pics de difracció entre diferents estats musculars. Les intensitats depenen no tan sols de l'estructura que adopta el sarcòmer a cada estat sinó, a més, del nombre i condició dels músculs utilitzats per obtenir la suma dels diagrames de difracció de cada estat muscular. Per observar canvis d'intensitat causats únicament per diferències estructurals, cal la comparació de diagrames de difracció obtinguts amb el mateix múscul i el mateix temps d'exposició. Això no és possible amb l'ús de la placa de raigs X (sí ho seria, en principi, amb els comptadors proporcionals o les CCD), si bé, amb diferents correccions, es poden establir relacions significatives entre les intensitats de les reflexions en els diferents estats musculars. Aquestes correccions són, essencialment, la normalització de la intensitat dels diagrames dels estats musculars i la substracció de possibles pics que no provenen dels caps de miosina.

3.6.3. El càlcul d'errors

3.6.3.1. Els ajustaments per extreure la fase i el mòdul dels factor d'estructura

L'anàlisi de les dades implica l'ajustament d'aquestes a unes aproximacions teòriques per a l'extracció de la fase i el mòdul del factor d'estructura de les reflexions considerades (vegeu els capítols 5 i 6, i 7, respectivament) i, per tant, es fa necessari un criteri de la bondat de l'ajustament. Els criteris emprats usualment, però, amb el càlcul de residuals [Sañé, 1997], no són vàlids en aquest cas, donada la naturalesa sistemàtica dels errors involucrats. L'origen dels errors sistemàtics és múltiple i depèn, a més, de cada reflexió en particular.

En primer lloc, cal destacar la desviació entre les dades experimentals i les aproximacions teòriques que provoca la disposició periòdica d'altres proteïnes que aquests no consideren. La inclusió d'aquestes periodicitats és difícil, atès que són nombroses i de paràmetres molt incerts. La presència d'altres proteïnes al diagrama de difracció és especialment evident al diagrama de difracció en l'estat de descans. El soroll de fons, a més, complica l'optimització de les aproximacions a les dades als ordres alts.

Un altra causa d'errors sistemàtics prové de la suma de diagrames de difracció obtinguts amb diferents músculs. Els músculs són susceptibles de tenir configuracions lleugerament diferents que poden causar lleugeres diferències en els pics de difracció. Aquest cas s'ha donat, per exemple, en el doblet del primer ordre de la troponina (1T, vegeu la secció 4.2.3), que presenta diferents pesos relatius dels dos pics als diversos diagrames de difracció [Campmany, 2000]. No obstant això, aquestes variacions entre músculs, causades probablement pel diferent estat de les fibres musculars, són petites, especialment en les reflexions causades per periodicitats presents al filament gruixut.

Per tot això, el criteri dels ajustaments no pot ser analític amb l'ús d'un residual calculat mitjançant tots els punts de la reflexió que es considera, sinó que ha de ser sintètic. En lloc de residuals, s'utilitzaran sistemàticament dos criteris. En primer terme, es recorre a la inspecció visual per descartar els ajustaments que, malgrat que puguin tenir associat uns residuals baixos, l'aspecte dels pics no s'amotlli a la forma que poden adoptar els pics experimentals sense les possibles alteracions sistemàtiques.

En segon terme, convé objectivitzar l'anterior criteri per als diferents ajustaments que es realitzen en aquest treball. D'una banda, en el cas dels ajustaments per a l'extracció de les fases (capítols 5 i 6), s'estableix que, per a què un ajustament pugui ser considerat òptim, la discrepància entre els dos pics modelats principals de la reflexió i la distància entre els dos mateixos pics experimentals no pot ser major de 1 píxel. D'altra banda, en els ajustaments dels perfils radials, utilitzats per a l'extracció de les intensitats de les reflexions, el criteri adoptat és que el model ha d'igualar el pendent de la reflexió a mitja altura.

3.6.3.2. L'ajustament de la projecció axial de masses

A diferència dels ajustaments anteriors, l'orientació de l'estructura cristal·logràfica, que ha de reproduir la projecció axial obtinguda a partir de la síntesi de Fourier (vegeu el capítol 8 i 9, pels estats de descans i contracció isomètrica, respectivament), pot ser ajustada mitjançant l'ús de residuals, en el supòsit que la projecció no té errors sistemàtics. El residual que s'utilitzarà és

$$R^2 = \frac{\sum_i^N (I_i^c - I_i^o)^2}{\sum_i^N (I_i^o)^2}, \quad (3.5)$$

on I_i^c i I_i^o són les intensitats calculada i experimental del punt i , respectivament, i N és el nombre de punts de l'ajustament.

És important remarcar, però, que la significació d'aquest residual està molt condicionat a l'absència de errors sistemàtics notables de la projecció axial de massa. Donat que no podem assegurar aquesta condició, convé prendre el valor de R solament com orientatiu.

Malgrat totes les prevencions que es tenen en el càlcul d'errors, cal destacar que es disposa de les fases del factor d'estructura extretes amb un mètode directe per a la determinació de la densitat axial de massa. Aquest fet relaxa considerablement la necessitat d'un tractament exhaustiu dels errors, característic de moltes branques de la cristal·lografia.