

Capítol

4

Resultats experimentals

En aquest capítol es presenten els diagrames de difracció obtinguts als experiments descrits anteriorment. Dels diagrames, es remarquen especialment els perfils meridionals i radials de les línies de difracció dels caps de miosina.

4.1. Introducció

Com hem vist als capítols precedents, els caps de miosina generen en el diagrama de difracció unes línies que són característiques de la simetria aproximadament helicoïdal que segueixen. L'anàlisi d'aquestes línies en una determinada direcció ha d'aclarir l'estructura dels caps de miosina en la mateixa direcció.

Les línies de difracció dels caps de miosina, i d'altres proteïnes presents al múscul amb simetria cilíndrica o també helicoïdal, apareixen perpendiculars a l'eix del múscul, és a dir, horitzontals en la nostra geometria, i equiespaiades en la direcció axial. De tota la longitud radial de les línies de difracció, la regió més rellevant per al nostre estudi és la regió més propera al meridià, donat que les expressions que es dedueixen als capítols següents en permeten extreure el mòdul i la fase del factor d'estructura (vegeu la secció 2.1.3.2).

Així doncs, exposem a continuació els perfils a prop del meridià de les línies de difracció susceptibles de contenir una contribució dels caps de miosina en les dues direccions rellevants: meridional (axial) i radial.

Les reflexions estudiades es situen a una coordenada axial recíproca Z aproximadament igual a $1/43 \text{ nm}^{-1}$. De tota manera, per simplificar la notació, les reflexions són caracteritzades pel seu espaiat d en l'espai real, en lloc de la posició Z equivalent en el meridià. La relació entre les dues magnituds és inversa, és a dir,

$$d = \frac{1}{Z} \quad (4.1)$$

Així, segons aquesta relació, l'ordre l -èsim d'una periodicitat d se situa al meridià a lZ , i té un espaiat equivalent de d/l .

Finalment, cal remarcar que les línies de difracció estudiades, amb una periodicitat d de 43 nm, són notades com M (e.g. 1M, 2M, 3M, etc.) per simplificar la notació, malgrat que puguin tenir altres contribucions per part de diverses proteïnes que influeixin de manera important en la intensitat final de la línia de difracció. Si bé aquesta notació suposa un cert abús de llenguatge, per raons històriques és la notació convencional en aquest camp. D'altra banda, quan aquestes altres contribucions són clarament distingibles de les reflexions dels caps de miosina, es noten de manera específica. Així, les reflexions de l'actina es noten per IA , les de la troponina per IT i, finalment, les de la proteïna C per IC .

4.1.1. Obtenció del diagrama de difracció bidimensional

El perfil del meridià en cadascun dels dos estats musculars considerats (descans i contracció isomètrica) és el resultat la suma dels 6 millors diagrames de difracció, cadascun d'ells obtingut mitjançant un múscul diferent i amb 0.5 s d'exposició a la llum de sincrotró. La qualitat dels diagrames de difracció s'ha avaluat mitjançant el quocient entre l'altura del segon pic més intens i l'altura de la vall entre els dos pics

més intensos de la reflexió 3M, per als estats de descans i contracció isomètrica, respectivament (vegeu més endavant, figures 4.4 i 4.12).

Les condicions experimentals són lleugerament diferents per a cada múscul de manera inevitable a causa de la mecànica de l'experiment. Això porta a que cadascun dels diagrames de difracció, obtinguts de manera independent, tingui un origen i una inclinació també lleugerament diferents. Per evitar errors sistemàtics en fer la suma, els diferents diagrames de difracció han de ser centrats i orientats idènticament. D'una banda, l'origen es determina calculant el punt mig de les reflexions equatorials (10) i (-10), i (11) i (-1-1). D'altra banda, en l'angle d'inclinació s'utilitzen també aquestes reflexions equatorials, així com les reflexions 3M i 6M, de les quals s'ha utilitzat la mitjana ponderada dels diversos pics que les conformen (vegeu les seccions 4.2.2 i 4.3.1).

La desviació mitjana dels centres dels diagrames de difracció respecte del centre ponderat resulta ser de 2 píxels, mentre que la desviació en la inclinació és d'unes poques dècimes de grau. Per tant, la regió abastada per tots els diagrames de difracció és, essencialment, la mateixa, excepte per a la reflexió 18M en l'estat de descans, situada molt a l'extrem de la placa de raigs X. Aquestes petites diferències en l'origen i, especialment, en l'angle d'inclinació provoquen que la reflexió 18M, no s'inclouï en la seva totalitat en alguns diagrames de difracció i, per tant, aquesta ha de ser descartada per a l'anàlisi posterior (vegeu la secció 4.2.2)

Finalment, després de l'alineament, els diagrames de difracció se sumen, resultant un diagrama final equivalent a un únic diagrama realitzat amb 3 s de temps d'exposició.

4.1.2. Extracció del meridià

El meridià s'extreu, a partir del diagrama de difracció final, mitjançant la integració sobre 25 píxels ($\Delta Z = 0.00025 \text{ nm}^{-1}$). Aquest valor és un compromís entre l'estadística i els errors d'arquejament (*arching*). D'una banda, una integració sobre menys píxels implica una disminució de l'estadística. D'altra banda, una integració més ampla fa importants els errors provocats per l'arquejament de les línies de difracció a causa del desordre angular de les fibres del múscul (vegeu el capítol 3).

Amb aquesta regió d'integració, es substreu el fons del meridià que prové de la dispersió del material desordenat del múscul, en la manera descrita en el capítol anterior. El resultat del procediment és un meridià que inclou únicament els pics presents al meridià, amb suficient comptatge com per poder ser analitzats (figura 4.1).

Finalment, un cop determinada la posició de l'origen del diagrama de difracció, cal donar una reflexió de referència per calibrar-lo. De manera estàndard, en l'estat de descans, s'assumeix que el pic més intens de la reflexió 3M té un espaïat de 14.340 nm [Huxley i Brown, 1967].

Title:
meridian_land.eps
Creator:
juanhuix@lsbsun1 with xmgr
Preview:
This EPS picture was not saved
with a preview included in it.
Comment:
This EPS picture will print to a
PostScript printer, but not to
other types of printers.

Figura 4.1. Intensitat del meridià en els estats de descans i de contracció isomètrica, aquesta darrera dividida per 2 per diferenciar les dues corbes. Sota la corba de la intensitat en contracció isomètrica estan marcats els ordres permesos per la simetria helicoidal dels caps de miosina (3M, 6M, etc.) i els ordres principals de l'actina (6A, 7A i 13A). Per sobre de la intensitat en l'estat de descans s'assenyalen els ordres prohibits per aquesta simetria. S'observa igualment el perfil del fons de dispersió, lleugerament diferent en els dos estats, que no pot ser descrit amb una forma analítica senzilla.

A fi de trobar l'espaiat de la resta de reflexions del meridià en l'estat de descans, cal saber la relació entre la coordenada axial recíproca i la pixelació, és a dir, establir la relació $Z = Z(\text{pix})$. Aquesta relació ha de ser aproximadament lineal, però la resposta del detector o l'escanejament poden provocar desviacions. La manera de determinar experimentalment aquesta relació és mitjançant una màscara a on s'ha mecanitzat amb precisió una malla de punts (*grid*). Situada sobre la placa de raigs X, i amb el coneixement de l'espaiat dels punts, es pot traçar $Z(\text{pix})$ mitjançant un remapejat (*remapping*), és a dir, mitjançant interpolacions entre els punts en tota la regió de l'espai recíproc d'interès.

Aquest procediment calibra la relació entre l'espaiat i els píxels per a tots els diagrames de difracció situats a una mateixa distància, com és el cas de tots els diagrames que hem enregistrat. Per tant, utilitzem també la definició de referència en l'estat de descans i el remapejat amb la malla en els diagrames enregistrats en contracció isomètrica, de manera que, per aquest estat muscular, s'obté la mateixa calibració que en descans. Amb aquest procediment, la mitjana ponderada del conjunt de pics de la reflexió 3M té un espaiat de 14.550 nm, que servirà de referència per a totes les altres reflexions en contracció isomètrica.

Finalment, cal afegir que qualsevol possible error en el valor de l'espaiat de la reflexió 3M en descans, la referència inicial, es propaga sistemàticament als valors de tots els pics i, per tant, no afecta als espaiats relatius.

Seguidament donem una descripció detallada del meridià en els dos estats musculars considerats i, en particular, de la contribució dels caps de miosina als pics del meridià.

4.2. El meridià en l'estat de descans

4.2.1. La complexitat del meridià

El meridià en l'estat de descans té una estructura molt complexa, amb una gran multitud de reflexions (figura 4.1, figura 4.2). D'aquestes, en destaquen les reflexions múltiples d'una periodicitat de ca. 42.9 nm (1M, 2M, etc.), que inclouen, entre d'altres, la contribució dels caps de miosina [Huxley i Brown, 1967]. La reflexió més intensa és la 3M, que és, justament, l'emprada com a referència per calibrar els diagrames de difracció.

La quantitat i definició d'aquestes reflexions són molt altes a baixos angles, fins la 6M ($Z < 0.014 \text{ nm}^{-1}$). En la regió entre la 6M i la 12M ($0.014 \text{ nm}^{-1} < Z < 0.028 \text{ nm}^{-1}$), els pics són menys abundants, intensos i definits, a causa del soroll de fons, que comença a ser important. En aquesta regió destaquen per la seva relativa intensitat i definició les reflexions 8M i 11M. Finalment, per sobre de la 12M, les traces són molt dèbils, de les quals únicament en destaquen les reflexions 15M i 13A.

El fet que la reflexió més notable sigui la 3M indica que els caps de miosina es disposen tot seguint, aproximadament, una simetria helicoidal d'ordre 3. No obstant això, la important presència de línies de difracció no múltiples de 3 en el meridià, línies prohibides segons aquesta simetria, indica que hi ha distorsions importants en la simetria [Huxley i Brown, 1967].

Taula 4.1. Espaiats presents en el meridià en l'estat de descans. L'error correspon a la desviació típica dels 6 meridians, i inclou únicament els errors estadístics no sistemàtics. L'espaiat d es calcula amb l'invers de la posició en el meridià, $d = 1/Z$. L'origen de les reflexions mostrat en aquesta taula és una primera atribució basada en la literatura, i pot ser matisat més endavant. Els pics marcats en negreta són els més intensos de la reflexió; els pics en cursiva tenen una interpretació dubtosa.

Espaiat [nm]	Intensitat [u.a.]	Possible origen	Espaiat [nm]	Intensitat [u.a.]	Possible origen
53.084 ± 0.184	1157		8.304 ± 0.002	123	
49.601 ± 0.055	2717		7.1780 ± 0.005	1625	6M
46.819 ± 0.190	1188		7.121 ± 0.002	1075	6M
44.228 ± 0.077	14298	1C	6.245	38	7C
41.513 ± 0.162	2896	1C	6.206	8	
39.512 ± 0.070	3390	1T	6.151 ± 0.002	196	7M
38.242 ± 0.076	3355	1T	6.105 ± 0.002	33	7M
36.915 ± 0.059	785	1A	6.073 ± 0.003	20	
35.319 ± 0.101	992	1A	5.968 ± 0.004	827	6A
23.761 ± 0.056	1210		5.793	77	
23.070 ± 0.034	1896		5.745	67	
22.276 ± 0.028	3159	2C	5.537 ± 0.003	49	<i>8C</i>
21.478 ± 0.022	5514	2M	5.484 ± 0.003	152	8C
20.979 ± 0.015	1046	<i>2M</i>	5.388 ± 0.003	255	<i>8M</i>
14.565 ± 0.023	1555	3M	5.350 ± 0.002	375	8M
14.340 ± 0.004	19214	3M	5.312 ± 0.002	95	8M
14.131 ± 0.006	4055	3M	5.131	41	7A
11.480 ± 0.012	78		5.097 ± 0.004	146	7A
11.366 ± 0.012	120		5.063 ± 0.005	80	7A
11.171 ± 0.008	638	<i>4C</i>	4.901	24	9C
10.967 ± 0.011	769	<i>4C</i>	4.860	40	9C
10.815 ± 0.003	169	<i>4M</i>	4.815 ± 0.003	53	8T
10.671 ± 0.002	1892	4M	4.783 ± 0.002	80	9M
9.108 ± 0.002	764		4.746 ± 0.002	42	<i>9M</i>
8.989 ± 0.005	601		4.308	200	
8.689 ± 0.006	822	<i>5C</i>	4.289 ± 0.002	320	10M
8.574 ± 0.004	2690	5M	4.278	69	
8.493 ± 0.002	500		4.044	30	11C
8.417 ± 0.002	296		4.020	20	11C

Les periodicitats sense error han estat obtingudes amb la mitjana de tots els meridians considerats a causa de la debilitat que tenen i, per tant, no disposen d'estadística.

Taula 4.1. (cont.) Espaiats de les reflexions presents al meridià en l'estat de descans.

Espaiat [nm]	Intensitat [u.a.]	Possible origen	Espaiat [nm]	Intensitat [u.a.]	Possible origen
3.944	72	11M	3.549	35	12M
3.918 ± 0.003	237	11M	2.865	80	15M
3.896 ± 0.002	437	11M	2.853	56	15M
3.875 ± 0.002	242	11M	2.389	16	18M
3.661	51	10A	2.385	40	18M
3.642	77	10A	2.379	41	18M
3.622	34	10A	2.385	40	18M
3.566	69	12M	2.379	41	18M

Les periodicitats sense error han estat obtingudes amb la mitjana de tots els meridians considerats a causa de la debilitat que tenen i, per tant, no disposen d'estadística.

L'alta resolució amb què s'han obtingut les dades permet observar que les reflexions basades en la miosina no són simples, tal i com apareixen a baixa resolució [Huxley i Brown, 1967]. Lluny d'això, cadascuna de les reflexions és, de fet, un conjunt de pics (*cluster*), amb una forma i nombre de pics variable segons l'ordre. A la taula 4.1 es llisten els pics més prominents, així com els més propers als diferents ordres de la repetició de la miosina, i llur interpretació segons les periodicitats de la miosina, la proteïna C, l'actina i la troponina. La forma complexa de les reflexions del meridià són, principalment, degudes a dos factors, que tot seguit descrivim.

4.2.1.1. Les diverses periodicitats presents al meridià

D'una banda, la complexitat del meridià en l'estat de descans és deguda a d'altres proteïnes que, a l'igual que els caps de miosina, presenten una gran periodicitat en la seva disposició en el sarcòmer. A continuació mencionem les principals periodicitats que s'observen al meridià que es mostren a la figura 4.2.

Proteïna C

La proteïna C es disposa regularment en el filament gruixut (vegeu el capítol 1), amb una repetició de ca. 44 nm, molt similar a la dels caps de miosina, ca. 43 nm [Rome *et al.*, 1972a]. Les contribucions de les dues proteïnes queden així solapades, fet que complica l'extracció de la fase de la miosina en quasi totes les línies de difracció.

Troponina

A més de la periodicitat del filament gruixut, al meridià hi són presents les reflexions que provenen de les periodicitats del filament prim i, en particular, de la troponina. Aquesta té una periodicitat de ca. 38.5 nm, sensiblement diferent a la dels caps de miosina, de manera que, en augmentar l'ordre i allunyar-nos de l'origen, el solapament d'aquestes contribucions amb les reflexions dels caps de miosina és menor i, per tant, l'efecte és menys important. Això és així fins que un ordre d'una contribució comença a solapar-se amb l'ordre següent de l'altra, com és el cas, per exemple, de la 9M amb la 8T. La influència d'ordres consecutius, però, ocorre en poques ocasions i té, en general, importàcia relativa, donat que la contribució de la troponina sol ser molt més intensa que la de la miosina.

Actina

L'actina, present igualment al filament prim amb una periodicitat de ca. 36 nm, també contribueix de forma significativa en els pics del meridià. En cas que l'actina tingués una simetria hecoïdal de 13/6 perfecta, la teoria estableix que en el meridià només originaria les reflexions d'ordre múltiple de 13, de les quals únicament és visible en el nostre diagrama de difracció la 13A, situada a ca. 2.7 nm (vegeu la secció 2.4.1). No obstant això, les imperfeccions en la simetria del filament prim fan que també s'observin en el meridià traces d'altres reflexions, a priori prohibides, d'ordre l no múltiple de 13, a l'espaiat corresponent de ca. $36/l$ nm.

Col·lagen

També cal mencionar la contribució al diagrama de difracció del col·lagen que es localitza entre fibres musculars i que relliga el múscul. A causa de la orientació aleatòria del col·lagen al múscul, les reflexions que origina, amb una periodicitat de ca. 63.5 nm, són cercles que travessen el meridià i poden influir en les reflexions meridionals (figura 4.2).

Altres periodicitats

Entre les reflexions dels caps de miosina, i a voltes solapades a elles, són presents una multitud de pics que no poden ser identificats amb cap periodicitat coneguda del sarcòmer (figures 4.1 i 4.2). Aquests pics poden tenir diversos orígens. Així, aquests pics poden provenir d'una superrepetició de les estructures més conegudes abans mencionades. Igualment, poden ser pics secundaris de la funció de Laue de reflexions principals amb poques repeticions, de tal manera que poden ser relativament importants (vegeu el capítol 5).

Alternativament, aquestes reflexions poden provenir d'altres proteïnes presents al múscul no considerades fins ara. Com hem dit anteriorment, el múscul conté un bon nombre de proteïnes de molt diversa funció, amb una disposició no coneguda encara, algunes de les quals, en especial les proteïnes estructurals i dels filaments intermitjos (vegeu secció 1.2.4), poden generar pics de difracció en el meridià a causa de la disposició regular en la direcció axial. Algunes d'aquestes periodicitats, malgrat l'origen incert que tenen, s'introduiran al capítol 6 per aconseguir la modelització del perfils meridionals de les reflexions en l'estat de descans.

Finalment, a part de totes les reflexions causades per la disposició regular de les proteïnes, cal mencionar les reflexions que provenen de la successió regular del sarcòmer al llarg de la miofibril·la (vegeu la secció 1.1.2). El sarcòmer té aproximadament una periodicitat de 2.3 μ m, una longitud evidentment molt més gran que la repetició de les proteïnes que formen els filaments i, per tant, les reflexions que genera es veuen a molt baixos angles (figura 4.2). De fet, el càlcul de l'espaiat d'aquestes reflexions dóna un càlcul relativament acurat de la longitud del sarcòmer.

La manera més exacta de tractar la presència de les diverses periodicitats mencionades suara és incloure-les en els diferents models. Això no obstant, en fer-ho, el nombre de paràmetres augmenta molt, cosa que complica la minimització i pot provocar multiplicitat de solucions. Per evitar aquests efectes, als capítols 5 i 6 i al capítol 7, en l'extracció de la fase i del mòdul del factor d'estructura, respectivament, es fan simplificacions a l'estructura del sarcòmer.

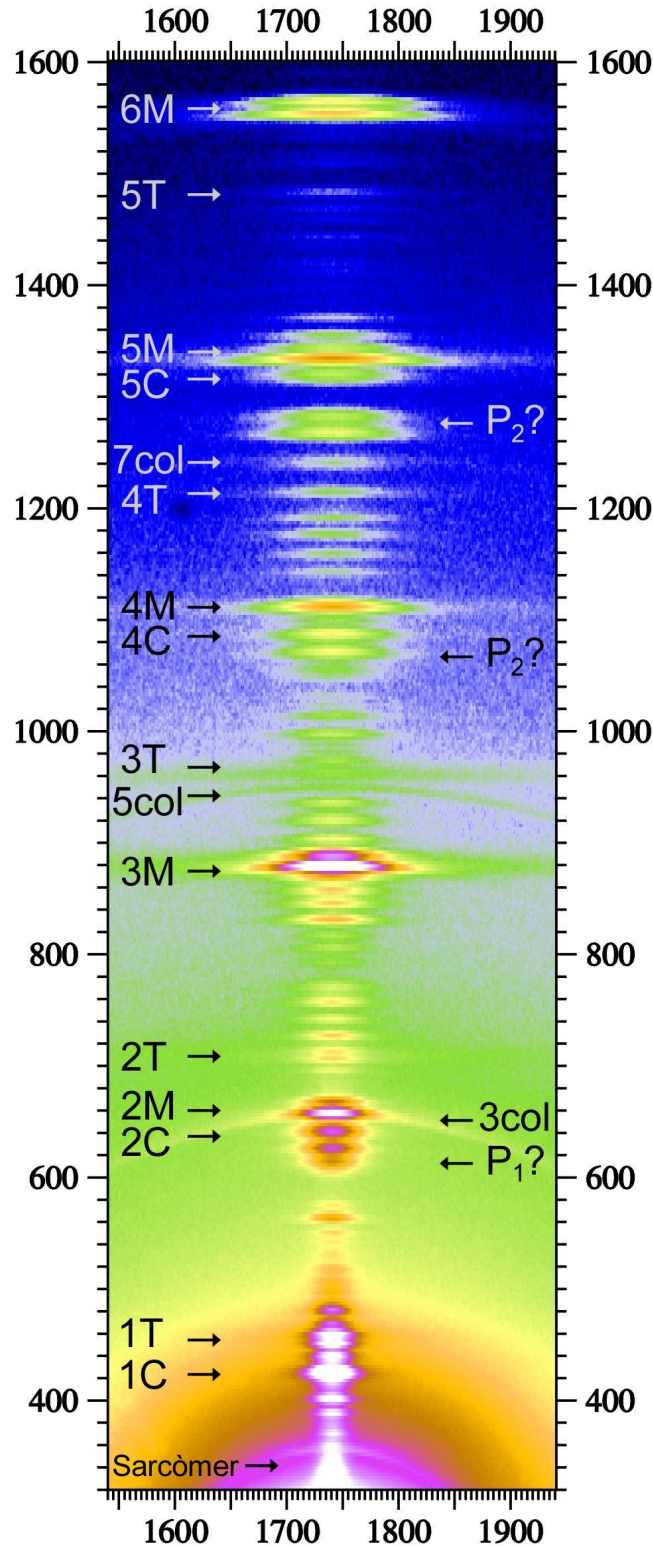


Figura 4.2. Regió del diagrama de difracció propera al meridià en l'estat de descans fins a la reflexió 6M. La intensitat d'aquesta figura i de les següents es mostra en una escala cromàtica que va del negre (poc intens) fins al blanc (molt intens). S'observa clarament la complexitat del meridià que presenta, entre d'altres, les contribucions de la miosina (*M*), la proteïna C (*C*), la troponina (*T*) i els ordres senars del col·lagen (*col*), així com les reflexions generades per tot el sarcòmer a molt baixos angles. L'origen de moltes altres de les reflexions situades entre les reflexions de la miosina és desconegut. Les reflexions marcades amb un interrogant han estat modelades en aquest treball assumint la presència de dues proteïnes, P_1 i P_2 (vegeu la secció 6.3).

4.2.1.2. La bipolaritat dels filaments

Un segon factor que contribueix a la complexitat de les reflexions és la bipolaritat dels filaments primis i dels filaments gruixuts, és a dir, la simetria especular dels filaments respecte de les línies Z i M, respectivament (vegeu la secció 1.2). La bipolaritat del filament origina un fenomen d'interferència entre els caps de miosina d'una i altra banda del centre de simetria. Aquest fenomen es va observar per primera vegada en músculs vius en l'estat de descans [Haselgrove, 1970]. Posteriorment, alguns aspectes parcials s'han interpretat com deguts a interferència entre unitats de proteïna C [Rome *et al.*, 1973a; Squire, 1981], de la troponina [Rome *et al.*, 1973b; Squire, 1981], a més de la interferència entre caps de miosina. En el múscul en contracció isomètrica, aquests fenòmens no havien estat observats fins recentment [Bordas *et al.*, 1995]

La interferència dels caps de miosina situats a diferents costats de la línia M té l'efecte de mostrejar els pics relativament amples dels caps de miosina en els valors en què la interferència és constructiva (efecte de *sampling*), i d'anul·lar el pic quan l'interferència és destructiva. En absència d'altres factors que concorren a la forma de la reflexió, aquest queda així separat per diferents pics equiespaiats una distància L ,

$$L = \frac{1}{Z_2 - Z_1}, \quad (4.2)$$

on Z_1 i Z_2 són les posicions en el meridià dels dos pics consecutius. Aquestes posicions en el meridià tenen un espaiat equivalent en l'espai real $1/d_1$ i $1/d_2$, respectivament (taula 4.1). La distància L no és altra que la longitud d'interferència entre els dos extrems del filament. De tota manera, convé puntualitzar que, a causa dels altres factors i periodicitats de què depèn la forma del pic, la diferència de màxims en el perfil meridional no porta a una determinació precisa de L , sinó a una estimació experimental, que notem L_{exp} .

De les dades dels ordres 3M i 6M (taula 4.1, figura 4.3) es desprèn que la longitud d'interferència L_{exp} és ca. 900 nm, un valor aproximadament igual a la meitat de la longitud del filament gruixut, de ca. 1600 nm [Squire, 1981]. Aquesta distància és l'esperada en cas que els pics siguin originats per la interferència de la major part de caps de miosina.

Un resultat nou, i important en la modelització dels perfils meridionals de les reflexions, és que s'observa una disminució progressiva de la distància entre pics en augmentar l'ordre (figura 4.3). Això és significatiu especialment en els ordres prohibits, donat que en aquests, la contribució d'altres periodicitats és menor (vegeu el capítol 6). Així, mentre en la reflexió 3M el valor de L_{exp} obtingut supera amb escreix els 900 nm, en les reflexions 9M, 12M i 15M el valor es situa al voltant de 700 nm. Si bé aquesta disminució podria ser inclosa en les barres d'error i, per tant, ser aparent i no real, creiem que no és així per la manera en què s'han calculat els errors.

Efectivament, els errors dels dos pics consecutius situats a Z_1 i Z_2 , obtinguts de la taula 4.1 en l'estat de descans (i de la taula 4.2 en contracció isomètrica, vegeu la secció 4.2.2) són considerats independents en el càlcul de l'error de la longitud d'interferència L a partir de l'expressió 4.2. Això clarament no és així, donat que els errors sistemàtics (p. ex. un error en la determinació de l'origen del diagrama de difracció) afecten als valors absoluts Z_1 i Z_2 , però no afecten la seva diferència, que és la que finalment s'utilitza per calcular la distància entre pics (equació 4.2). Davant la

impossibilitat de determinar els errors sistemàtics, s'inclou el màxim error possible, si bé cal tenir en compte que l'error pot ser sobredimensionat significativament.

En conclusió, si bé no es pot determinar exactament l'abast de la variació de la longitud d'interferència L_{exp} , es considera que aquesta variació és real. Aquest punt serà confirmat en les modelitzacions del meridià en descans i contracció isomètrica dels capítols següents.

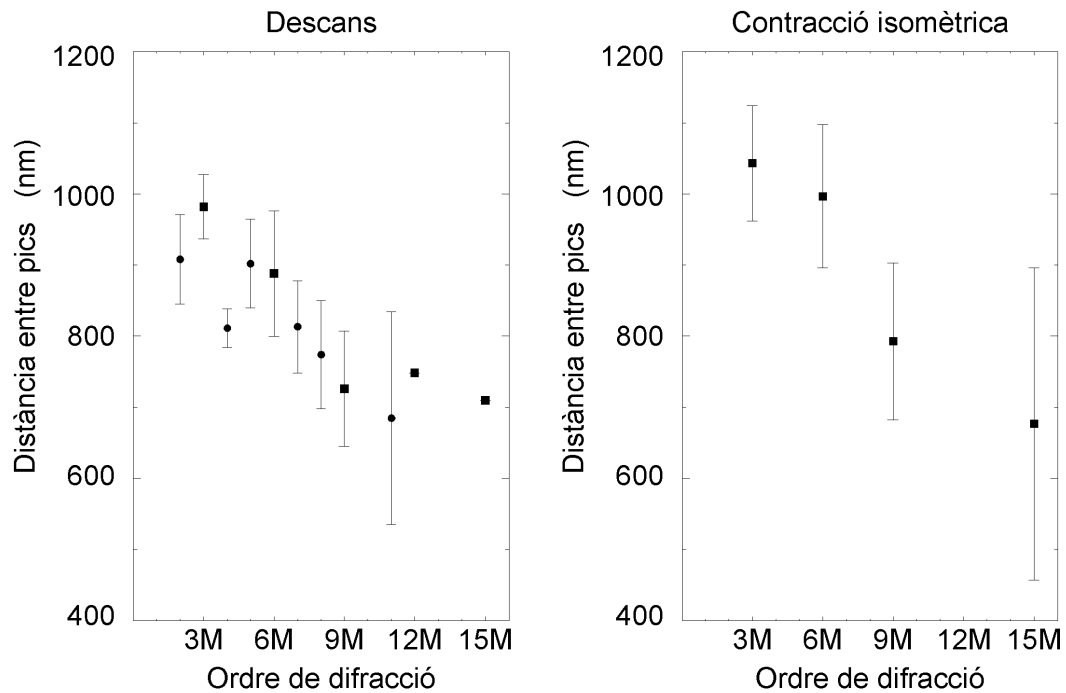


Figura 4.3. Variació de la distància L equivalent en l'espai real entre els pics més intensos dels ordres de difracció dels caps de miosina, en els estats descans i contracció isomètrica. Els ordres permesos per la simetria helicoidal (múltiples de 3) es mostren en quadrats, mentre que els prohibits es mostren en cercles. La distància mitjana entre pics se situa al voltant de 800 nm, el valor esperat en cas que els pics provinquin de la interferència entre elements situats a extrems oposats de la línia M. S'observa un lleugera reducció de la distància entre pics en augmentar l'ordre. L'error ha estat calculat amb els valors de les taules 4.1 (en descans) i 4.2 (en contracció isomètrica), assumint que l'error en l'espaiat entre els dos pics consecutius és independent, fet que, probablement, el sobredimensiona.

Finalment, cal puntualitzar que l'efecte d'interferència que origina diferents pics dins el mateix ordre de difracció no és una complicació addicional a l'estudi de les reflexions de la miosina. Al contrari, aquest efecte és un punt fonamental que permet la determinació de les fases, com es veu al capítol 5.

Mostrem tot seguit tots els pics de difracció dels caps de miosina en el meridià mesurats, fins al 18M. Les unitats arbitràries de la intensitat són les mateixes per a tots els pics en l'estat de descans.

4.2.2. El perfil meridional de les reflexions permeses

Les reflexions que provenen dels caps de miosina amb ordres múltiples de 3, les anomenades reflexions *permeses* (3M, 6M, etc.), són les úniques que, en una simetria helicoidal d'ordre 3 ideal, s'han de localitzar en el meridià. La més intensa és la 3M, seguida per la 6M (figura 4.4). A causa de la bipolaritat dels filaments gruixuts, aquests dos ordres presenten, en lloc d'un sol pic, dos pics asimètrics perfectament definits, amb altres pics menors més allunyats.



Figura 4.4. Perfils meridionals de les reflexions 3M i 6M en descans. A sobre dels pics principals es mostra l'espaiat aproximadament en nm. En aquesta i en les successives figures del perfil meridional, les dades s'han obtingut amb la suma de 6 músculs, amb un temps d'exposició total de ca. 3 s. El quocient entre el pic situat a ca. 7.12 nm i la vall entre els dos pics principals de la reflexió 3M ha estat la figura de mèrit utilitzada per valorar la qualitat dels diagrames de difracció en descans (vegeu la secció 3.6).

La mitjana dels espaiats dels diferents pics que formen la reflexió 3M (la primera reflexió permesa), ponderada per les intensitats respectives, dona el valor de la periodicitat axial dels caps de miosina. Aquest valor serà utilitzat més endavant en la modelització dels perfils de les línies de difracció. El valor de la periodicitat axial és

$$C_{3M, \text{descans}} = 14.317 \text{ nm} .$$

Els ordres superiors, fins al darrer mesurat (18M), són més dèbils, especialment l'ordre 12M (figura 4.5), i tenen un soroll de fons relativament important. Malgrat el soroll, la presència certa de diversos pics en la mateixa reflexió, alguns d'ells provinents de l'efecte d'interferència mencionat anteriorment es manté en tots els ordres, com és palès, en les reflexions 15M i 18M en els diagrames de difracció en 2D ampliat (figura 4.6).

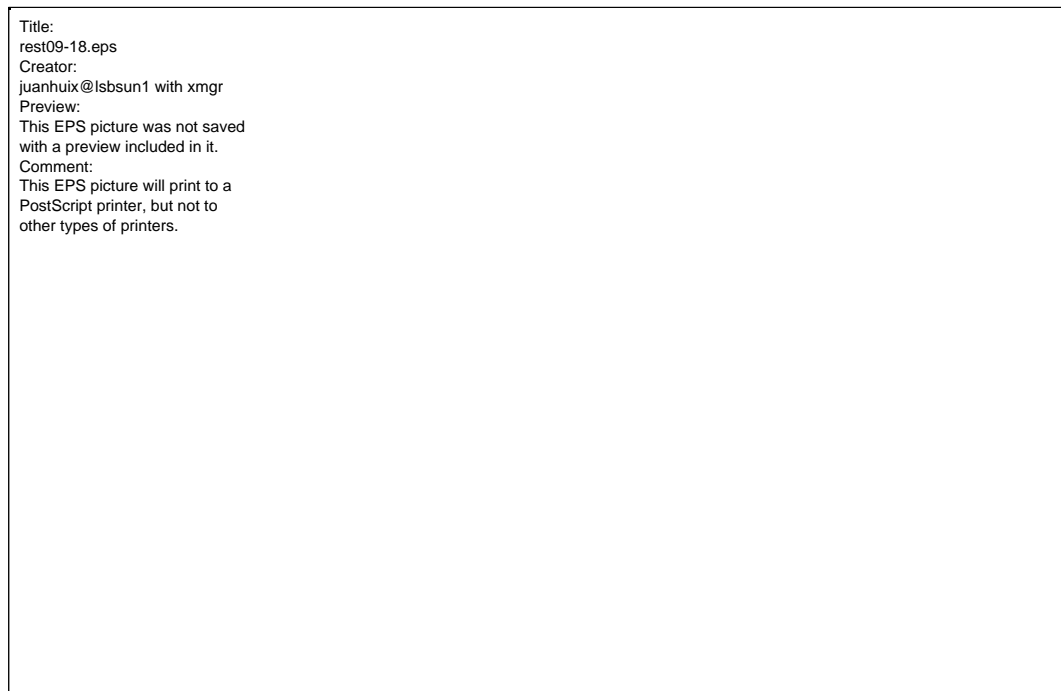


Figura 4.5. Perfils meridionals de les reflexions 9M, 12M, 15M i 18M en l'estat de descans. Les unitats de les intensitats són les mateixes que les unitats de la figura 4.4. A sobre dels pics principals es mostra l'espaiat aproximat en nm. El nombre de pics en cada reflexió depèn de la quantitat de contribucions diferents i de la interferència de cadascuna d'elles a causa de la bipolaritat del filament.

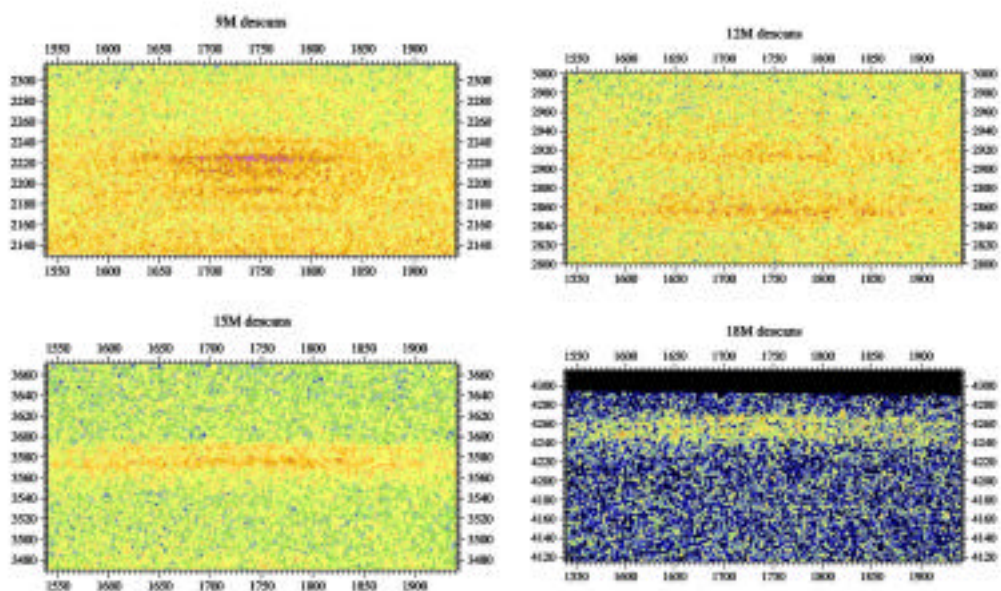


Figura 4.6. Diagrama de difracció en 2D dels ordres permesos. Malgrat l'important soroll de fons, en totes les reflexions es pot observar clarament l'estructura en diferents pics. A la reflexió 18M s'observa el límit de la placa de raigs X.

La darrera reflexió, la 18M, no és tinguda en compte pels càlculs que seguiran, a causa del gran soroll de fons i per la impossibilitat de substreure amb seguretat la dispersió de fons, donat que la reflexió se situa molt al marge del diagrama de difracció. (figura 4.6).

La presència de pics secundaris d'altres periodicitats es dona especialment a l'extrem dels espaiats alts (costat esquerre de les reflexions, figura 4.5). Cal destacar, en la reflexió més dèbil, la 12M, 3 pics entre els espaiats ca. 3.66 nm i ca. 3.62 nm, més intensos que els pics que provenen de la miosina, que podrien ser deguts a la periodicitat del filament prim (probablement la reflexió 10A).

Es pot comprovar en els diagrames de difracció 2D (figura 4.6) també l'efecte, dèbil però clar, de l'arquejament dels pics a causa del desordre angular. Per la mateixa causa s'observa igualment un progressiu eixamplament en la direcció meridional dels ordres de difracció, si bé l'important soroll de fons en els ordres superiors en fa dubtosa la quantificació. Aquest efecte s'observa també, i de manera més clara, en els ordres prohibits.

4.2.3. *El perfil meridional de la regió de la reflexió 1M*

En la regió entre ca. 55 nm i 34 nm, el meridià presenta un complex conjunt de pics (figura 4.7). El pic principal del conjunt, situat a ca. 44.3 nm, i el secundari situat a ca. 41.6 nm provenen en la seva major part de la proteïna C [Rome *et al.*, 1973a]. D'altra banda, el doblet de pics situats a ca. 39.6 nm i ca. 38.2 nm provenen de la periodicitat de la troponina (1T) [Huxley i Brown, 1967, Rome *et al.*, 1973b].

En principi, segons la simetria helicoidal, la primera línia de difracció de l'actina (1A) i la primera de la miosina (1M), situades a ca. 36 nm i ca. 43 nm respectivament, no són reflexions meridionals i, per tant, no haurien de ser visibles a la figura 4.7. Amb tot, a causa del desordre dels filaments i les alteracions de la simetria helicoidal, aquestes reflexions hi poden ser presents. Per aquest fet, la reflexió 1A és l'origen probable dels pics situats a ca. 37 nm i a ca. 35.3 nm. En canvi, la possible traça dels pics meridionals de la 1M, que caldria esperar en l'espaiat de ca. 43 nm, en cas d'existir es troben emmascarats per la 1C.

S'ha observat que la major part dels pics de la regió de la reflexió 1M varia de forma notable entre diferents músculs i, en el mateix múscul, segons el nombre d'excitacions i exposicions a la llum de sincrotró. En particular, els dos pics del doblet de la 1T tenen una variació de la intensitat relativa significativa (a ca. 39.5 nm i ca. 38.2 nm) [Campmany, 2000]. Convé destacar, però, que aquesta situació és restringida a la regió 1M, i no s'ha observat en ordres superiors.

Un altre problema important és la substracció de la dispersió de fons, atès que, en aquesta regió del diagrama, la dispersió varia molt ràpidament (figura 4.1). A més, la gran quantitat de pics fa que no es pugui definir de forma clara un ajustament experimental del fons.

En resum, la poca reproductibilitat del perfil meridional i la gran variació de la dispersió de fons fa que no s'analitzi aquest pic per trobar el mòdul i la fase dels pics corresponents a la miosina. Malgrat tot, aquests podran ser extrets mitjançant una estimació basada en primers principis i un coneixement bàsic de l'estructura dels caps (vegeu el capítol 8).

4.2.4. El perfil meridional de les reflexions prohibides

Els ordres no múltiples de 3 no són permesos en el meridià en el cas d'una simetria hecoïdal d'ordre 3, raó per la qual s'anomenen ordres *prohibits* [Huxley i Brown, 1967]. En contra del dictat de la simetria, però, en l'estat de descans, molts d'aquests ordres presenten una intensitat important en el meridià, i han de ser tinguts en compte per interpretar de manera completa la disposició axial dels caps de miosina.

La línia de difracció 2M, situada a un espaiat de ca. 21.5 nm, mostra un pic principal acompanyat a baixos angles per un seguit de pics (figura 4.7). Aquests pics, situats a espaiats de ca. 23 nm, no poden ser explicats per la periodicitat dels caps de miosina. Per tant, cal concloure que, en aquesta reflexió, hi ha altres contribucions basades en una periodicitat lleugerament superior. La proteïna C és una explicació possible, però no es poden descartar altres periodicitats. De fet, la gran intensitat d'aquesta reflexió pot ser indicativa de la importància de la proteïna C i d'aquestes altres contribucions a la intensitat final.

En les reflexions 4M i 5M, l'estructura és igualment complexa, i hi ha multitud de pics amb periodicitats lleugerament més grans que la dels caps de miosina (figura 4.8). Malgrat l'important soroll de fons, la presència de diversos pics en les diferents línies de difracció és clara, com es pot comprovar al diagrama de difracció 2D dels diferents ordres (figura 4.2). Cal destacar a la 5M un doblet de pics situats a ca. 9 nm i separats apreciablement del pic principal de la reflexió, actualment d'origen poc clar, i atribuïts més endavant a una periodicitat P_2 (vegeu la secció 6.3).



Figura 4.7. Perfils meridionals de les reflexions 1M i 2M en l'estat de descans. Les unitats de les intensitats són les mateixes que les unitats de la figura 4.4. A sobre dels pics principals es mostra l'espaiat aproximat en nm.

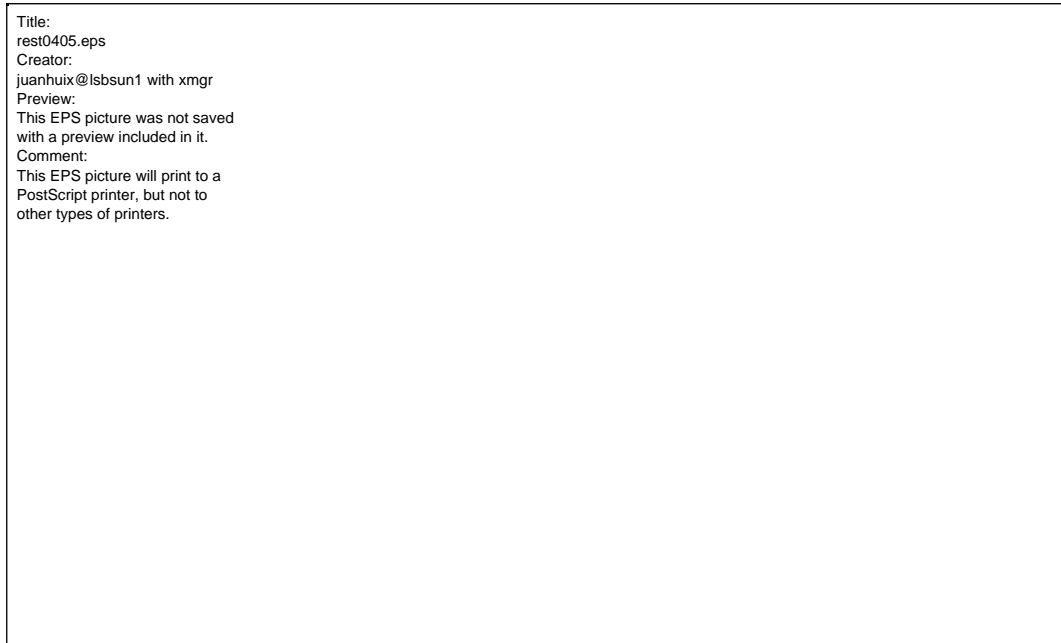


Figura 4.8. Perfils meridionals de les reflexions 4M i 5M en l'estat de descans. Les unitats de les intensitats són les mateixes que les unitats de la figura 4.4. A sobre dels pics principals es mostra l'espaiat aproximadament en nm.

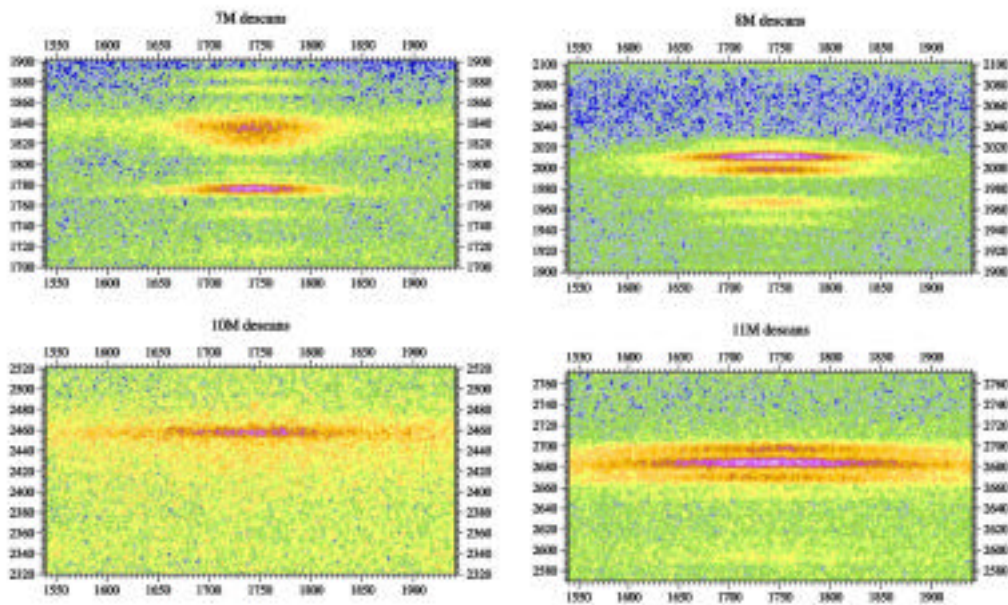


Figura 4.9. Diagrames de difracció 2D dels ordres prohibits 7M, 8M, 10M i 11M en descans.

Els ordres prohibits més enllà de la 6M tenen una intensitat sensiblement més baixa. D'entre ells destaquen, per ordre d'intensitat, les reflexions 8M, 11M, 7M i 10M (figura 4.9, figura 4.10). Malgrat ser febles, la intensitat d'aquests ordres prohibits és més gran que els ordres permesos 9M i 12M. Finalment, enllà de la

reflexió 12M, i fins la 18M, els ordres prohibits són pràcticament inapreciables dins del soroll de fons.

Cal remarcar que, en aquestes reflexions, els pics que origina la proteïna C, d'espaiat lleugerament més gran que la dels caps de miosina, apareixen més separats, cosa que facilita l'anàlisi posterior. Això és palès especialment en les reflexions 8M i 11M, on la contribució de la proteïna C apareix clarament a espaiats superiors, a ca. 5.5 nm i ca. 4.0 nm, respectivament. La periodicitat de la proteïna C, així com la de les altres periodicitats, es trobarà en la modelització del perfil meridional en l'estat de descans (vegeu el capítol 6).

Per contra, alguns ordres de la troponina s'encavalquen amb els pics que provenen de la miosina. Això és especialment notable en la reflexió 10M, on la reflexió 9T hi té una contribució que pot no ser negligible, atesa la poca definició dels pics laterals. En la reflexió 11M aquest efecte també pot ser present, si bé la contribució de la 10T no sembla tant important a causa de la intensitat dels pics que provenen d'altres contribucions i del relatiu poc solapament entre aquestes dues reflexions. L'origen de la reflexió 11M no és clar, a causa de la gran intensitat que presenta, i que contrasta amb la reduïda intensitat dels ordres més propers. Aquesta reflexió serà estudiada més endavant (vegeu les seccions 6.3.2.8 i 9.4.6).

Finalment, un altre efecte notable, que ja havíem observat en els ordres permesos, és el progressiu eixamplament dels ordres de difracció. Qualitativament l'efecte es pot observar clarament amb el nombre de pics visibles en cada reflexió. Mentre que a baixos ordres (p.ex. 2M i 6M) hi ha 2 pics atribuïbles a la periodicitat dels caps de miosina, en les reflexions 8M i 11M s'observen clarament 3 pics. Aquest efecte serà discutit extensament al capítol següent.

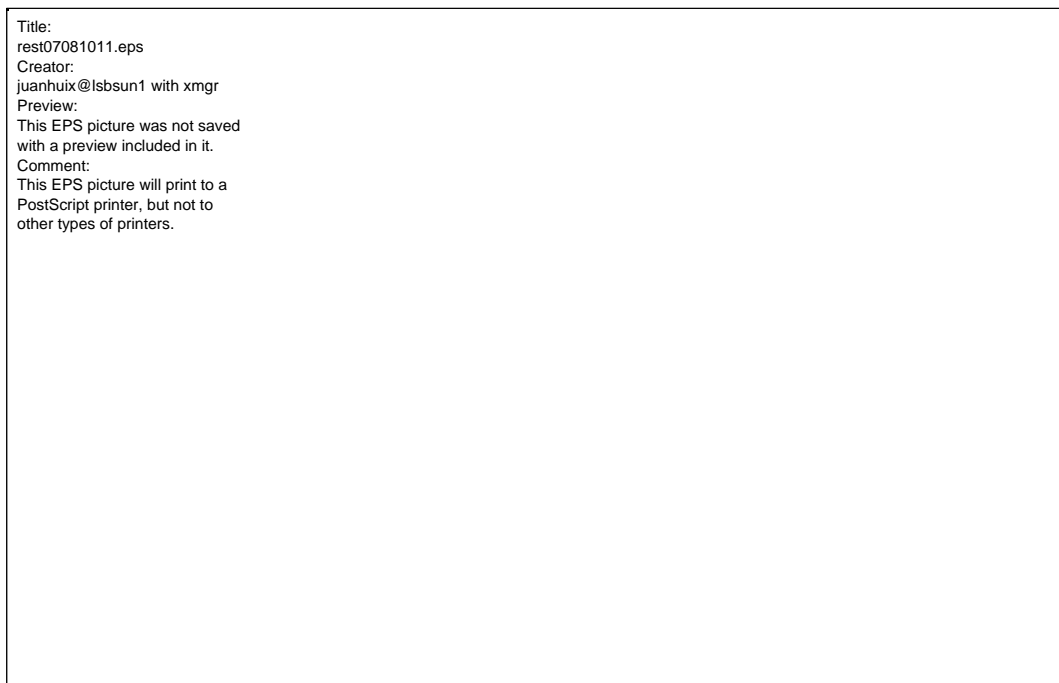


Figura 4.10. Perfils meridionals de les reflexions 7M, 8M, 10M i 11M en l'estat de descans. Les unitats de les intensitats són les mateixes que les unitats de la figura 4.2. A sobre dels pics principals es mostra l'espaiat aproximadament en nm.

4.3. El meridià en l'estat de contracció isomètrica

L'aspecte general del diagrama de difracció del múscul en contracció isomètrica presenta canvis importants respecte de l'estat de descans. Els pics de difracció en aquest estat són menys nombrosos (figura 4.2, figura 4.11). De fet, els pics principals al diagrama de difracció corresponen als ordres permesos dels caps de miosina. A la taula 4.2 hi ha un llistat dels pics més prominents. El meridià en aquest estat és més simple i, per tant, suggereix un major ordre o simetria, sense la complexa estructura que té en l'estat de descans. No apareix cap nova reflexió de manera notòria, i els ja existents canvien en major o menor grau d'intensitat. Aquests canvis indiquen un canvi notable en, almenys, moltes de les estructures presents en el sarcòmer que provoquen difracció, incloent-hi els caps de miosina.

L'efecte d'interferència causat per la bipolaritat dels filaments és també clarament visible en els perfils meridionals de les reflexions permeses. De la mateixa manera que en l'estat de descans, els ordres de difracció no presenten un sol pic, sinó que estan formats per un conjunt de pics, si bé els pesos relatius dels pics en un mateix ordre varien. La importància d'aquesta observació serà a bastament estudiada en el proper capítol.

La intensitat de les reflexions prohibides disminueix notablement respecte de l'estat de descans. Les reflexions permeses, en canvi, continuen essent predominants al meridià. De fet, dues de les línies de difracció permeses (9M i 15M), augmenten significativament d'intensitat. De manera general, podem dir que la intensitat es redistribueix dels ordres prohibits als ordres permesos, en passar de l'estat de descans al de contracció isomètrica.

Les reflexions prohibides en el meridià apareixen relativament molt més dèbils que les reflexions permeses. Així, en contracció isomètrica, les intensitats dels ordres permesos són ca. 92% de la intensitat integrada de tots els ordres atribuïbles a les periodicitats dels caps de miosina, mentre que, en descans, aquesta proporció és ca. 68%, netament inferior. En contracció isomètrica, per tant, els caps de miosina adopten una simetria més helicoidal.

L'espaiat de les reflexions basades en els caps de miosina en contracció isomètrica augmenten en relació amb l'estat de descans. En la reflexió 3M, l'espaiat mitjà de tota la reflexió augmenta ca. 1.60%, i passa de ca. 14.31 nm a ca. 14.55 nm. En el cas de la reflexió 6M, l'augment és de ca. 1.8%. La raó d'aquesta lleugera discrepància és el diferent mostratge que origina la bipolaritat del filament a la reflexió dels caps de miosina (vegeu el capítol següent). Amb tot, aquests valors concorden plenament amb experiments anteriors, que també donen un valor de ca. 1.6% [Bordas *et al.*, 1993; Huxley *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1994, Bordas *et al.*, 1999]. Aquesta variació és independent de la longitud del múscul, tal com estableix el model de filaments entrecreuats (vegeu la secció 1.2.4).

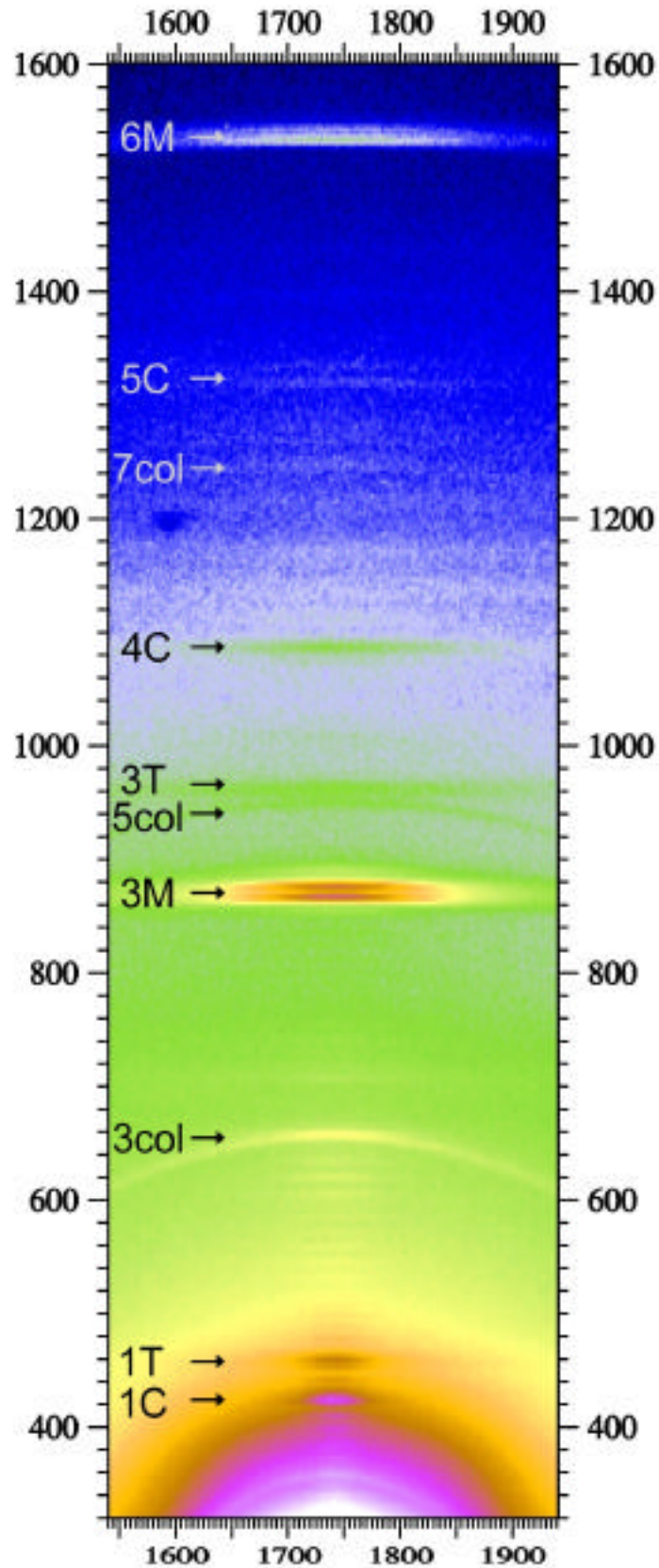


Figura 4.11. Regió del diagrama de difracció propera al meridià en l'estat de contracció isomètrica fins a la reflexió 6M. El meridià és clarament menys complex que en descans. Les reflexions més notables són els ordres permesos de la miosina (3M i 6M), alguns ordres de la proteïna C (1C), de la troponina (1T) i els ordres senars del col·lagen (1col).

Taula 4.2. Espaiats presents en el meridià en l'estat de contracció isomètrica. L'error correspon a la desviació típica dels 6 meridians. L'origen de les reflexions mostrat en aquesta taula és una primera atribució basada en la literatura, i pot ser matisat més endavant. Els pics marcats en negreta són els més intensos de la reflexió; els pics en cursiva tenen una interpretació dubtosa.

Espaiat [nm]	Intensitat [u.a.]	Possible origen	Espaiat [nm]	Intensitat [u.a.]	Possible origen
64.533 ± 0.363	198		11.158 ± 0.020	96	
58.554 ± 0.161	28		11.002 ± 0.008	442	4C
54.240 ± 0.264	37		10.696	94	
50.569 ± 0.034	233		10.377 ± 0.018	155	4A
47.707 ± 0.037	241		9.298 ± 0.008	43	4A
44.747 ± 0.065	1073	1C	9.115	34	4A
43.194 ± 0.115	296	1C	9.012	41	4A
41.260 ± 0.030	139	1C	8.698	153	5M
39.381 ± 0.027	514	1T	8.583	119	5M
38.326 ± 0.083	903	1T	7.307 ± 0.003	740	6M
35.815 ± 0.0313	68	1A	7.254 ± 0.003	360	6M
34.462 ± 0.088	31		7.202 ± 0.014	71	
25.703 ± 0.032	20		5.921 ± 0.007	1112	6A
24.373 ± 0.049	48		5.111	460	7A
23.495 ± 0.035	63		4.873	46	9M
22.699 ± 0.095	60		4.843 ± 0.001	193	9M
21.554 ± 0.006	440	2M	4.382 ± 0.002	105	10M
19.382 ± 0.017	206	2T	4.353 ± 0.002	63	10M
14.917 ± 0.013	357	3M	3.982 ± 0.002	227	11M
14.652 ± 0.007	5348	3M	3.964 ± 0.004	86	11M
14.449 ± 0.010	4897	3M	2.924	26	15M
14.153 ± 0.015	465	3M	2.910 ± 0.002	146	15M
13.017 ± 0.010	231	3T	2.899	34	15M
12.806 ± 0.003	470		2.752 ± 0.002	107	13A
12.078	75	3A	2.742 ± 0.004	43	13A

Les periodicitats sense error han estat obtingudes amb la mitjana de tots els meridians considerats a causa de la debilitat que tenen i, per tant, no disposen d'estadística.

4.3.1. El perfil meridional de les reflexions permeses

Les reflexions permeses són, pràcticament, les úniques reflexions atribuïbles als caps de miosina que resten en el perfil meridional en contracció isomètrica (figura 4.1). Aquesta fet indica que els caps de miosina no presenten les distorsions de la simetria helicoidal pròpies en l'estat de descans, i es comporten de manera molt més regular.

La reflexió 3M presenta dos pics principals situats a ca. 14.65 nm i ca. 14.44 nm, amb una intensitat, relativa a tota la reflexió, del 50% i del 45%, respectivament (figura 4.12). Aquesta estructura de la 3M en contracció isomètrica és diferent a la situació en l'estat de descans, en què hi havia un sol pic principal. Les periodicitats del meridià en contracció isomètrica s'han obtingut com han estat descrit anteriorment (vegeu la secció 4.2.1). És a dir, la referència en aquest estat és

$$C_{3M, \text{Contracció Isomètrica}} = 14.550 \text{ nm} .$$

Respecte de la intensitat, en la reflexió 3M disminueix aproximadament a la meitat, si bé passa a tenir més importància relativa que en descans. Mentre que, en descans, aquesta reflexió té una intensitat de ca. 63% relativa al total atribuïble als caps de miosina, en contracció isomètrica té el ca. 86% del total.

La reflexió 6M, per la seva banda, té una estructura relativament semblant a la que tenia en descans, amb un pic principal i un pic secundari, a ca. 7.307 nm i ca. 7.254 nm, respectivament. En aquesta reflexió s'observa (figura 4.12), en la zona de baixes periodicitats, un lleuger punt d'inflexió a 7.19 nm, seguit d'un gep que sobresurt a la dispersió de fons aproximadament exponencial present al llarg del meridià. Aquest efecte pot ser degut, entre d'altres factors, a una periodicitat del col·lagen i, especialment, a la presència de caps en estat de descans que no han pogut enllaçar-se amb els filaments primers perquè no estaven solapats amb aquests.

Les reflexions 9M i 15M també mantenen clarament el fenomen d'interferència, amb un pic principal i un pic secundari a alts espaiats (figura 4.13). Les reflexions 9M i 15M, contràriament a les reflexions 3M i 6M, augmenta d'intensitat aproximadament d'un factor 2 i 1.5, respectivament, respecte de la intensitat en descans. D'altra banda, la 12M, molt dèbil ja en l'estat de descans, pràcticament desapareix, i igualment és negligible també la intensitat de la 18M. Aquests darrers dos ordres, per bé que dèbils, són clarament observables en el diagrama de difracció bidimensional (figura 4.14).



Figura 4.12. Perfils meridionals de les reflexions 3M i 6M en contracció isomètrica. Les unitats arbitràries de les intensitats són les mateixes que les unitats de les anteriors figures dels perfils meridionals. A sobre dels pics principals es mostra l'espaiat aproximat en nm. El quocient entre el pic situat a ca. 14.45 nm i la vall entre els dos pics principals de la reflexió 3M ha estat la figura de mèrit utilitzada per valorar la qualitat dels diagrames de difracció en contracció isomètrica (vegeu la secció 3.6)

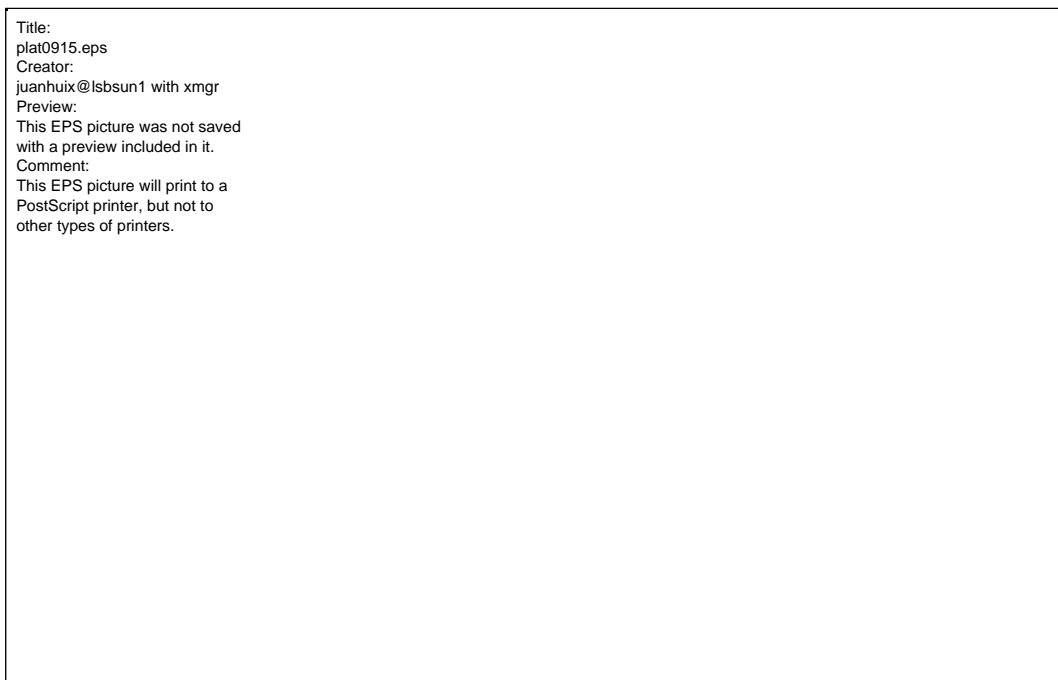


Figura 4.13. Perfils meridionals de les reflexions 9M i 15M en l'estat de contracció isomètrica. Les unitats arbitràries de les intensitats són les mateixes que les unitats de les anteriors figures dels perfils meridionals. A sobre dels pics principals es mostra l'espaiat aproximat en nm.

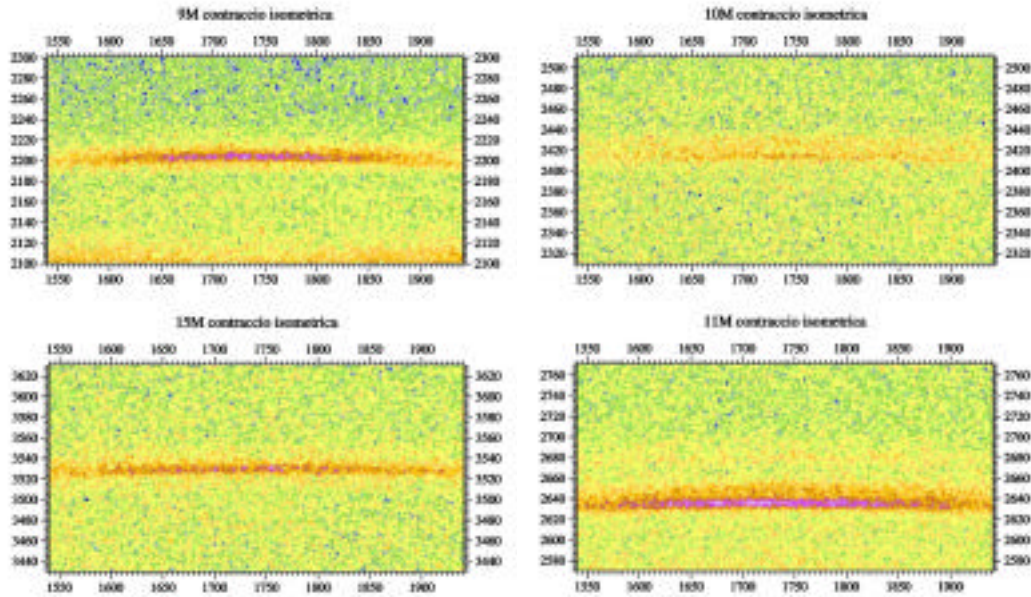


Figura 4.14. Diagrames de difracció de les reflexions més notables en contracció isomètrica més enllà de la 6M.

4.3.2. El perfil meridional de les reflexions prohibides

En contracció isomètrica, les reflexions prohibides baixen molt la seva intensitat, fins al punt que moltes deixen de ser observades. D'aquestes reflexions, únicament en la regió de la 1M, on els pics són de difícil extracció a causa de la dispersió de fons, la 2M i la 4M conserven certa prominència (figura 4.15). Les traces de les reflexions 5M i ordres superiors, per bé que molt dèbils, són encara visibles.

De fet, donat l'espaiat d'aquestes reflexions, i com s'explica més endavant, el seu origen, amb molt probabilitat, no és la periodicitat dels caps de miosina, sinó d'altres proteïnes presents al sarcòmer. Per això, i a més per la baixa intensitat que tenen, negligirem les reflexions prohibides pels futurs càlculs en l'estat de contracció isomètrica. Així, per exemple, la reflexió 4M, situada a una periodicitat de ca. 11 nm, no té el valor esperat en cas que l'origen fos la periodicitat dels caps de miosina (és a dir, ca. 10.8 nm), sinó que correspon a l'espaiat de la reflexió 4C, també visibles en l'estat de descans.

D'altra banda, la contribució de la proteïna C es veu poc alterada respecte a la situació en descans, amb una disminució moderada de la intensitat, però amb el mateix espaiat. Cal ressaltar la situació en la reflexió 15M on, a causa de l'alt ordre, les contribucions de la proteïna C i dels caps de miosina estan clarament separades i, a més, les altres contribucions d'origen incert són negligibles. Aquesta reflexió dona, per tant, el valor més exacte de l'espaiat de la proteïna C, ca. 43.87 nm. Aquest valor, com veurem al capítol 6, és el mateix que el deduït mitjançant l'ajustament de les reflexions a diverses aproximacions teòriques.

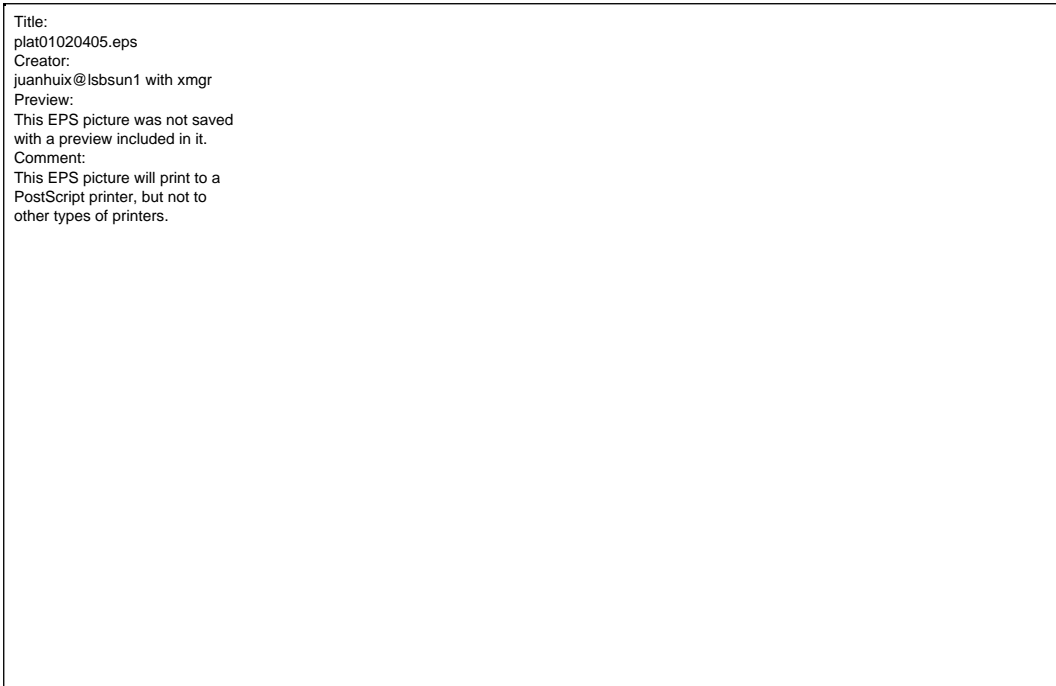


Figura 4.15. Perfils meridionals de les reflexions prohibides més notables en l'estat de contracció isomètrica. Les unitats arbitràries de les intensitats són les mateixes que les unitats de les anteriors figures dels perfils meridionals. A sobre dels pics principals es mostra l'espaiat aproximant en nm.

La regió de la 11M suposa un cas especial, per la relativa gran intensitat que té tant en l'estat de descans com en contracció isomètrica. La disminució d'intensitat en contracció isomètrica, prop d'un factor 3, és menor que en tots els altres ordres prohibits. D'altra banda, l'augment de l'espaiat entre aquest darrer estat i en descans és d'un 2%, lleugerament superior al valor en les reflexions 3M i 6M.

La causa de la gran intensitat de la reflexió 11M, ara com ara, no és clara. De tota manera, és més que probable, com veurem més endavant, que la contribució principal, o fins i tot total, a aquesta provingui de la titina. Aquesta proteïna de gran massa, que forma part dels filaments intermedis, és composta de subdominis de longitud ca. 4 nm [Trinick, 1996], que és justament l'espaiat de la reflexió 11M. La influència relativa de les contribucions de la miosina i la titina és discutida més endavant (vegeu les seccions 6.3.2.8 i 9.4.6).

4.4. El perfil radial de les línies de difracció

En aquesta secció s'extreuen els perfils radials de les línies de difracció basades en la periodicitat dels caps de miosina en descans i contracció isomètrica. Aquests perfils són més adequats que els perfils meridionals, extrets a la secció anterior, per trobar la intensitat total de les diferents reflexions, donat que tenen una forma més simple.

Els perfils radials de les línies de difracció s'obtenen integrant el diagrama de difracció bidimensional (vegeu la secció 4.1.1) en la direcció meridional, en tot l'interval de la reflexió. S'ha considerat un interval, igual per a tots els ordres, de 0.0093 nm^{-1} (90 píxels).

En aquest interval s'inclouen, inevitablement, altres periodicitats que contribueixen a la intensitat final. L'error comès, però, queda corregit per l'extracció de les amplituds relatives de les diferents contribucions en la modelització dels perfils meridionals de les reflexions (vegeu el capítol 6). A més, la diferent distància radial mitjana de les proteïnes respecte de l'eix del filament, que hauria de generar una distribució radial diferent de la intensitat, no resulta important (vegeu el capítol 7).

Un cop es té el perfil radial, es subtreu la dispersió de fons segons el procediment descrit al capítol 3.

4.4.1. *El perfil radial de les línies de difracció en descans*

El resultat de les operacions anteriors són els perfils radials de les línies de difracció més prominents en l'estat de descans (figura 4.16). La intensitat de les línies de difracció va disminuint, com és norma general, en augmentar l'ordre, si bé els dos pics més intensos corresponen a les reflexions 3M i 2M (taula 4.1). Els perfils radials mostren clarament un augment constant de l'amplada del pic del meridià (taula 4.3).

La forma del pic també varia. A ordres alts, la forma és la d'una funció de Bessel d'ordre 0, mentre que a baixos ordres és la d'una funció de Debye [Abramowitz i Stegun, 1965]. Aquest canvi en la forma dels pics de la línia de difracció amb l'ordre és influenciat per tres factors.



Figura 4.16. Perfils radials de les línies de difracció basades en els caps de miosina més prominents en l'estat de descans.

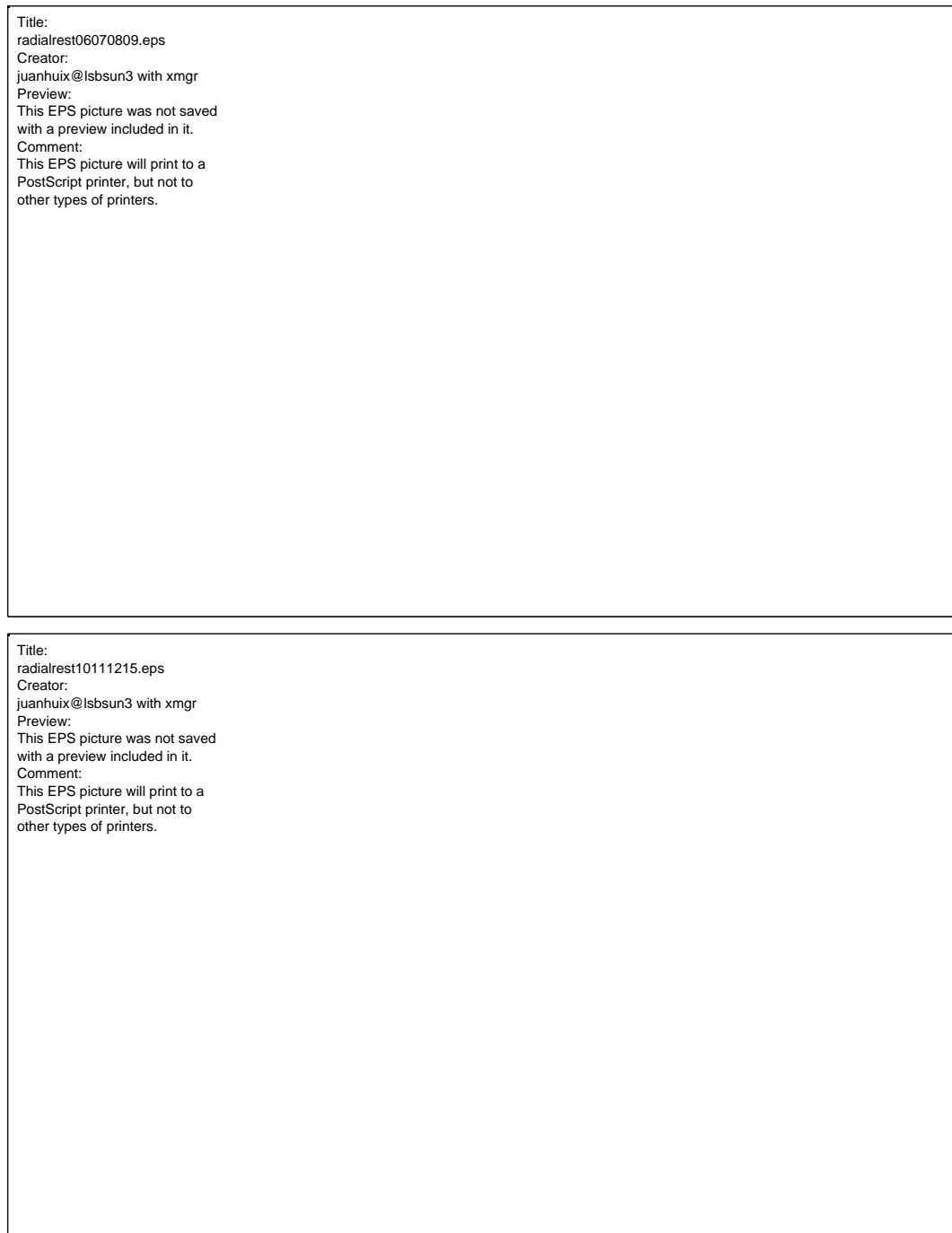


Figura 4.16 (cont.). Perfils radials de les línies de difracció basades en els caps de miosina més prominents en l'estat de descans.

La simetria helicoidal

En primer terme, les línies de difracció que provenen d'una estructura amb simetria helicoidal tenen un perfil radial F_r que ve descrit per una combinació de funcions de Bessel (expressió 2.32). D'elles, únicament la funció de Bessel d'ordre 0 té un màxim al meridià, mentre que les altres s'anul·len.

Taula 4.3. Amplades a mitja altura (*Full Width at Half Maximum*) radials dels pics meridionals de la periodicitat dels filaments de miosina, en els estats de descans i contracció isomètrica. Cal tenir en compte que, a més d'aquesta periodicitat, en els pics hi intervenen altres periodicitats que poden perturbar el valor que s'obtingria únicament amb les periodicitats dels caps de miosina. Les amplades augmenten amb l'ordre, especialment en descans, fruit de la pèrdua de cristal·linitat.

Reflexió	FWHM descans [10^{-3} nm^{-1}]	FWHM contracció isom. [10^{-3} nm^{-1}]	Reflexió	FWHM descans [10^{-3} nm^{-1}]	FWHM contracció isom. [10 ⁻³ nm ⁻¹]
2M	1.8		8M	7.4	
3M	2.5	6.4	9M	12.1	18.3
4M	3.3		10M	16.7	
5M	4.0		11M	17.4	
6M	5.2	14.8	12M	12.3	
7M	5.3		15M	23.0	19.1

El fet que els ordres prohibits en el meridià siguin aliens a la simetria helicoidal no impedeix que també segueixin el perfil descrit per funcions de Bessel. Això és així ja que els ordres prohibits poden ser explicats en considerar la simetria dels caps de miosina com a cilíndrica en lloc de helicoidal [Kensler i Stewart, 1986]. En el cas de simetria cilíndrica, la contribució de la funció de Bessel d'ordre 0 a l'amplitud de difracció F_j es manté i, per tant, la discussió que segueix els és igualment vàlida [Klug *et al.*, 1958; Kensler i Stewart, 1986].

En particular, en les reflexions prohibides 4M, 5M, 7M, 8M i 11M, a més del pic central (meridional), en principi prohibit per la simetria helicoidal, s'observen pics laterals importants a una distància de ca. 0.05 nm^{-1} , que segons la regla de selecció 2.37 corresponen a funcions de Bessel d'ordre 3.

El mostratge de la xarxa hexagonal

Un segon factor que influeix en l'amplada radial de les reflexions dels caps de miosina en el meridià és l'efecte de mostratge (*sampling*) que genera l'estructura hexagonal en la direcció transversal, que té de mitjana N_r filaments paral·lels. El pic causat pel mostratge ve determinat, en el cas ideal sense desordres, per una funció de Laue de N_r repeticions, que té una amplada $2/N_r$ (vegeu el capítol 7). Com veurem més endavant, aquest és el factor més rellevant en l'amplada radial del pic quan, a la resolució de la reflexió considerada, el múscul és ordenat en la direcció radial.

Convé afegir que l'amplada radial causada pel nombre finit de repeticions és influenciada pel desordre de l'estructura. Aquest desordre té l'efecte d'eixamplar radialment els pics a mesura que augmenta l'ordre de difracció, contràriament al cas ideal, en què l'amplada del pic a causa del mostratge és constant. Com veurem al capítol 7, l'efecte del mostratge és, de fet, el factor dominant al perfil radial de les línies de difracció a baixos ordres.

Als ordres més baixos, on el mostratge és més marcat, s'observa que els pics que mostregen la línia de difracció fora del meridià tenen espais diferents segons si la reflexió és prohibida o permesa. Aquest efecte és producte de la presència d'una superxarxa, amb un efecte anàleg a un desplaçament axial relatiu dels filaments que formen l'estructura hexagonal (vegeu el capítol 2). Aquest fet no és rellevant per a l'extracció de la projecció de masses axial i, per tant, no serà analitzat.

La desviació angular

Finalment, el tercer factor que pot influir el perfil radial de les línies de difracció és la desviació angular de les diferents fibres del múscul, la influència de la qual és lineal amb l'ordre. Aquest factor no influeix en l'àrea total del pic, sinó en l'altura, és a dir, la intensitat de pic a $R = 0$.

La influència d'aquests tres factors està descrita al capítol 7, on es fa un estudi quantitatiu del perfil radial de les línies de difracció en l'estat de descans que valora la importància relativa dels tres factors en tots els ordres de difracció. Aquesta importància variarà segons l'ordre de difracció, donat que la forma del pic principal (meridional) no és la mateixa per tots els ordres.

4.4.2. *El perfil radial de les línies de difracció en contracció isomètrica*

Els perfils radials de les línies de difracció dels caps de miosina en l'estat de contracció isomètrica s'obtenen d'igual manera que en l'estat de descans (vegeu secció anterior). El resultat del procediment són els perfils radials en l'estat de descans (figura 4.17), que mostra el perfil de les línies de difracció més prominents.

En l'estat de contracció isomètrica s'analitzen únicament les reflexions 3M, 6M, 9M i 15M. Per les raons donades anteriorment, les altres reflexions permeses (12M i 18M) i els ordres prohibits no són considerats.

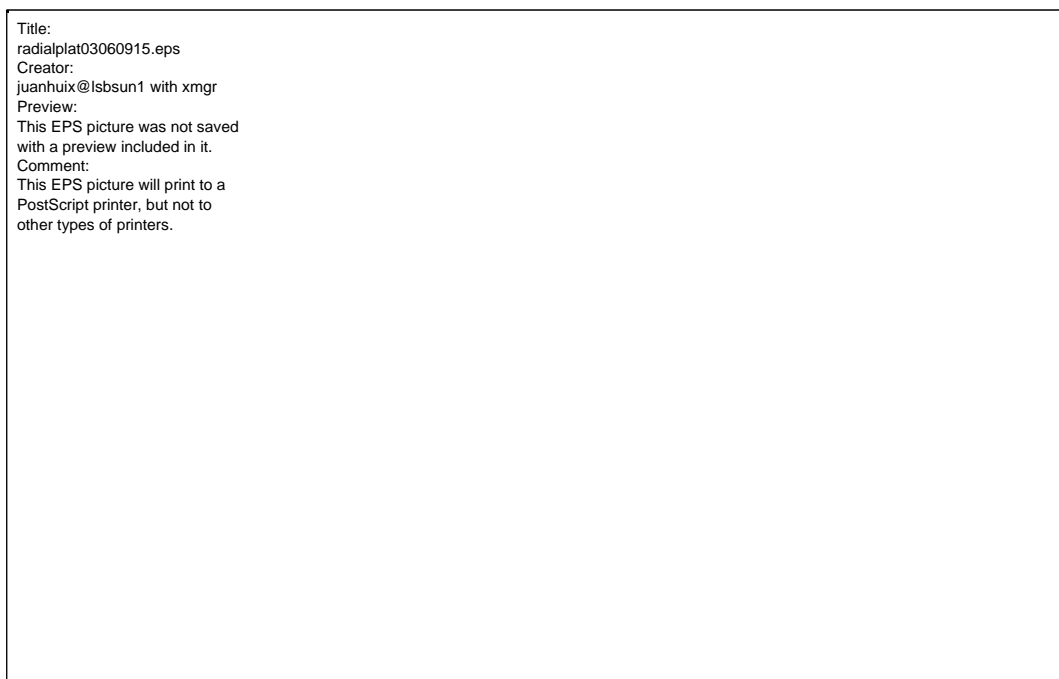


Figura 4.17. Perfils radials de les línies de difracció basades en els caps de miosina més prominents en l'estat de contracció isomètrica.

Els perfils radials mostren clarament un augment constant de l'amplada del pic del meridiana. La intensitat va disminuint, com a norma general, i la forma del pic varia, en

augmentar l'ordre. No obstant això, la variació de la forma aparent del pic no és tant important com en l'estat de descans. Així, en contracció isomètrica, l'amplada augmenta de manera molt important amb l'ordre, si bé no tant a com ho fa en descans (taula 4.3). Per a un ordre donat, l'amplada del perfil radial en contracció isomètrica és més gran que la que s'observa en l'estat de descans.

El perfil radial de les reflexions en l'estat de contracció isomètrica sembla determinat quasi totalment per les funcions de Bessel que descriuen la simetria helicoidal. Els altres dos factors que contribueixen, en principi, al perfil radial de les reflexions, el mostratge de la xarxa hexagonal i la desviació angular, perden importància. D'una banda el mostratge de les línia de difracció ha desaparegut almenys quasi totalment, com ho demostra el fet que ja no s'observen pics laterals. D'altra banda, no s'observa una curvatura important de les línies de difracció, malgrat que tenen una amplada més gran que en l'estat de descans i, per tant, la desviació angular ha de ser menor.

4.5. Conclusions

Els diagrames de difracció del múscul, en els dos estats musculars de descans i contracció isomètrica, que s'han obtingut en els experiments, han estat processats per minimitzar l'efecte de la dispersió de fons. De les dades s'han extret (a) els perfils meridionals mitjançant la integració sobre un estret rang de R , i (b) els perfils radials de les línies de difracció més prominents que inclouen una contribució dels caps de miosina.

Cal destacar que, fins on el nostre coneixement arriba, hem aconseguit els diagrames de difracció de millor resolució fins ara assolits. Aquesta gran resolució és especialment important per a l'estudi del diagrama de difracció en l'estat de descans per la complexitat que presenta.

El diagrama de difracció en l'estat de descans revela multitud de línies de difracció generades per diverses proteïnes amb una disposició regular. Les línies més remarcables identificades fins al moment són les dels caps de miosina (equiespaiades ca. 43 nm), proteïna C (equiespaiada 43.87 nm) i troponina (equiespaiada ca. 38.5 nm).

En la línia ja indicada per altres autors per a la troponina, la proteïna C i els caps de miosina, en l'estat de descans s'ha observat que les línies de difracció dels caps de miosina no presenten un sol pic, sinó que tenen una estructura complexa. L'origen d'aquesta estructura en diversos pics es relaciona amb la interferència entre les unitats de proteïna a cada meitat de sarcòmer, i es produeix tant en repeticions dels caps de miosina com en la proteïna C i troponina. La interferència es manté fins i tot als ordres més alts (15M i 18M), fet que denota que l'estructura té un alt grau d'ordre axial, almenys, fins al límit de la nostra resolució (ca. 2.4 nm).

Les diferències entre el meridià en l'estat de descans i en contracció isomètrica són remarcables. Les línies de difracció en contracció isomètrica són menys abundants que en descans, i pràcticament desapareixen les reflexions generades per la proteïna C i la troponina, així com els ordres prohibits dels caps de miosina. No obstant això, les periodicitats d'aquestes proteïnes en aquest estat s'han pogut mesurar (taula 4.2). Les reflexions causades pels caps de miosina en contracció isomètrica també estan mostrejades, anàlogament a l'estat de descans. L'origen d'aquest mostratge en

contracció isomètrica és, per tant, també un fenomen d'interferència entre meitats de sarcòmer.