

**Capítol**

**5**

# **L'extracció de les fases en l'estat de contracció isomètrica**

En aquest capítol es proposen diferents aproximacions teòriques per interpretar el perfil meridional de les línies de difracció 3M, 6M, 9M i 15M que originen els caps de miosina, en l'estat muscular de contracció isomètrica. Es dona una interpretació física de les aproximacions i, posteriorment, s'ajusten a les dades experimentals. L'objectiu final dels ajustaments és l'extracció de la fase del factor d'estructura dels ordres considerats.



## 5.1. Objectiu de la modelització del meridià

Una vegada obtinguts els perfils axials i radials dels pics meridionals de la manera mostrada al capítol anterior, en aquest capítol s'inicia l'estudi teòric d'aquest treball. Per cobrir aquest objectiu, es desenvolupen tres aproximacions teòriques que modelen el perfil axial de les línies de difracció en el meridià. L'interès d'aquesta modelització és el fet que en aquestes expressions hi intervé, de forma explícita, la fase del factor d'estructura dels caps de miosina. Com ja s'ha remarcat en anteriors capítols, amb aquesta fase i el mòdul del factor d'estructura es determina la projecció de masses axial dels caps de miosina del filament gruixut en el múscul viu (expressió 2.18).

Així, la modelització dels pics meridionals porta a l'extracció de la fase del factor d'estructura i, en últim terme, a la determinació de la projecció axial dels caps de miosina. De moment, aquest enfocament del problema de les fases està limitat al meridià, però, en principi, es pot estendre a tot el diagrama de difracció en cas d'aconseguir músculs o fibres musculars molt més ordenats. Aquesta és una de les possibles extensions d'aquest treball que es discuteix al capítol 10.

De tota manera, el fet d'estar limitats en aquest treball al meridià possibilita un tractament unidimensional sense pèrdua de precisió. Això permet que, en aquest capítol, les expressions generals de la difracció de raigs X trobades anteriorment (vegeu el capítol 2) es puguin reduir a la coordenada axial, que defineix el meridià.

### 5.1.1. L'amplitud de difracció d'una unitat de repetició

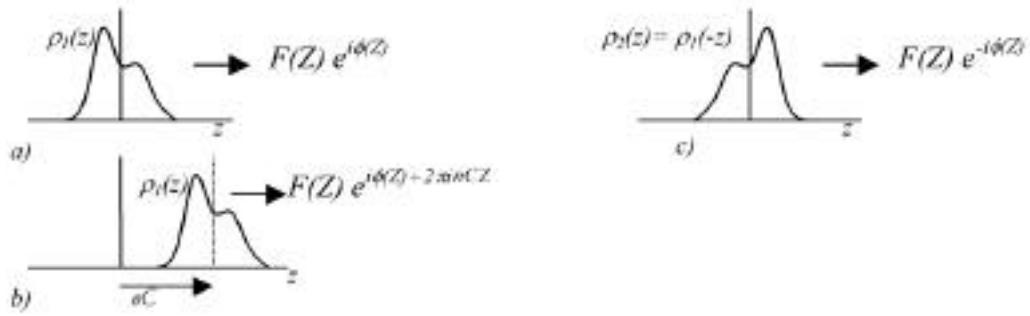
Com a primer pas per trobar l'amplitud de difracció dels caps de miosina, estudiem primerament la difracció produïda per un sol parell de caps. El parell, que és la unitat de difracció de l'estructura, sobresurt de l'esquelet del filament gruixut amb una inclinació i orientació respecte l'eix  $z$  que defineixen la densitat electrònica axial  $\rho_z(z)$ . Aquesta densitat electrònica pot tenir, a priori, una forma arbitrària sense cap restricció i caracteritza el *motiu de repetició* en la direcció  $Z$  del diagrama de difracció.

L'amplitud de difracció  $F_1(Z)$  que produeix un sol parell de caps de miosina, anomenada també factor d'estructura (vegeu la secció 2.1.3), aplicant l'expressió 2.3 al cas continu i unidimensional, és

$$F_1(Z) = \int_{-}^{+} \rho_z(z) e^{2\pi izZ} dz. \quad (5.1)$$

D'aquesta expressió es desprèn que, en general, el factor d'estructura  $F_1(Z)$  serà un nombre complex, caracteritzat en cada punt  $Z$  del meridià per un mòdul  $F(Z)$  i una fase  $\phi(Z)$  (figura 5.1a),

$$F_1(Z) = F(Z) e^{i\phi(Z)}. \quad (5.2)$$



**Figura 5.1.** Exemple de densitat axial de massa  $\rho_1(z)$  d'una estructura arbitrària a) Amb l'origen de l'eix  $z$  situat al centre de masses, l'amplitud de difracció que genera és  $F^d$ . b) L'efecte d'un desplaçament  $nC$  en l'eix  $z$  és la introducció d'un factor  $2\pi i n C Z$  en la fase. c) Densitat electrònica de l'estructura simètrica a l'altre extrem del sarcòmer. La fase de l'amplitud de difracció canvia de signe.

### 5.1.2. El mòdul i la fase dels ordres de difracció

En principi, donat que el factor d'estructura  $F_1(Z)$  (expressió 5.2) es defineix a tot el meridià, cal trobar-ne el mòdul i la fase en cada punt del meridià, mitjançant una síntesi de Fourier contínua, anàloga a l'expressió 2.6 per a una sola dimensió. Sortosament, però, la situació és més senzilla. La contribució dels caps de miosina en l'amplitud de difracció en tot el meridià  $F_{mer}(Z)$  no és contínua, sinó que presenta línies de difracció als valors  $Z = l/C$ , on  $C$  és ca. 14.317 nm en descans, i ca. 14.45 nm en contracció isomètrica.

Aquestes línies indiquen que la projecció axial de massa és periòdica, amb un espaiat de  $C$ . Com s'ha trobat a la secció 2.1.3, la repetició dels caps de miosina permet que la densitat axial de massa  $r_z(z)$  pugui ser expressada per una sèrie de Fourier, en lloc de síntesi de Fourier integral. Així, la densitat axial es pot expressar com (expressió 2.18),

$$\rho_z(z) = \sum_l F_l \cos 2\pi z \frac{l}{C} + \phi_l \quad , \quad (5.3)$$

on  $F_l$  i  $\phi_l$  són el mòdul i la fase del factor d'estructura de la línia de difracció  $l$  en el meridià, és a dir,

$$F_l = \left| F \frac{l}{C} \right| \quad \text{i} \quad \phi_l = \phi \frac{l}{C} \quad . \quad (5.4)$$

Una suposició feta per construir la sèrie de Fourier ha estat que tant el mòdul com la fase del factor d'estructura  $F_1(Z)$ , que en principi varien contínuament en  $Z$ , són constants en tot l'ample meridional d'una línia de difracció  $DZ_l$ . Aquesta suposició és

certa a causa del teorema de la longitud d'ona mínima (*minimum wavelength theorem*), que estableix que el factor d'estructura varia de manera inversament proporcional a les dimensions de la molècula en la direcció corresponent [Bragg i Perutz, 1952]. Els caps de miosina i, en general, totes les proteïnes amb disposició periòdica del sarcòmer tenen unes grans dimensions que fan que, juntament amb la poca amplada de les línies de difracció, el mòdul i la fase del factor d'estructura puguin ser considerats constants. L'expressió 5.3, per tant, és una molt bona aproximació a la integral de Fourier (expressió 5.2).

La gran dificultat per a l'aplicació de l'expressió 5.3 prové del problema de les fases (vegeu la secció 2.1.2). Una de les aportacions originals d'aquest treball és, justament, la resolució d'aquest problema, és a dir, la determinació de la fase del factor d'estructura de les reflexions meridionals. Tot seguit es desenvolupen diverses aproximacions teòriques que permeten descriure analíticament el perfil axial de les línies de difracció al meridià, amb la presència explícita de la fase  $\phi_l$ , fet que permet extreure-la.

Ajustant els valors d'aquestes amplituds i fases, entre altres paràmetres, les aproximacions teòriques següents van orientades a explicar el perfil que adopten les línies de difracció dels caps de miosina al meridià. Un cop determinades les amplituds i les fases en les línies, la determinació de la densitat axial de massa és immediata amb l'ús de l'expressió 5.3.

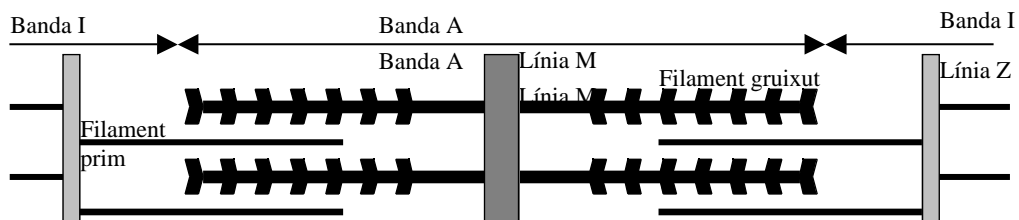
## 5.2. L'aproximació teòrica dels caps de miosina ideal

S'introdueixen tot seguit les expressions que caracteritzen la difracció dels caps de miosina d'un filament gruixut suposant que la disposició d'aquests és *ideal*, és a dir, regular i sense desordre. Sota aquestes condicions, els caps de miosina formen una xarxa unidimensional perfecta. Aquesta aproximació teòrica és una extensió de la teoria clàssica de fenòmens d'interferència de difracció, que inclou, com a punt clau, la polaritat dels filaments [O'Brien *et al.*, 1971; Rome *et al.*, 1972].

L'esquema de la disposició ideal dels caps de miosina als filaments gruixuts es mostra a la figura 5.2. El filament gruixut es compon per un esquelet (*backbone*) del qual sobresurten periòdicament els parells de caps de les miosina (vegeu la secció 1.2.2). Els filaments gruixuts, ancorats a la línia M, travessen la meitat de la banda A del sarcòmer. Per cobrir tota la banda A, els filaments se situen amb una simetria bipolar, és a dir, el filament simètric s'aconsegueix rotant 180° el filament original. Els paràmetres del filament compleixen la relació

$$L = 2b + C(N - 1) \quad , \quad (5.5)$$

on  $N$  i  $C$  són el nombre i la periodicitat dels caps de miosina,  $L$  és la longitud d'interferència entre les dues meitats de sarcòmer, i  $2b$  és la longitud del fragment de filament gruixut desproveït de caps de miosina, també anomenada *zona nua* (*bare zone*).



**Figura 5.2.** Representació esquemàtica del sarcòmer, que mostra la definició de la longitud d'interferència  $L$ , de la *zona nua b* (*bare zone*), i del nombre i periodicitat  $N$  i  $C$  dels caps de miosina. L'orientació, nombre i forma dels parells de caps de miosina que es mostra és arbitrària.

Cal remarcar que, si bé particularitzem la imatge als caps de miosina, les expressions són igualment vàlides per a qualsevol estructura periòdica present en el sarcòmer i que compleixi les mateixes condicions que les de l'estructura dels caps de miosina. De fet, al capítol següent, s'aprofitarà el mateix desenvolupament per a l'estructura que formen altres proteïnes del sarcòmer.

A fi d'establir l'expressió que reproduïx el perfil axial de la intensitat de la difracció de tot el filament gruixut, es dedueixen primerament les expressions de la difracció d'un filament gruixut i, posteriorment, de tot el sarcòmer, amb la simetria especular. Les aproximacions teòriques posteriors consideren el fet que l'estructura periòdica no és ideal, i hi aporten altres factors que afecten el perfil meridional.

### 5.2.1. L'amplitud de difracció d'una fila d'unitats

Considerem l'ordenació ideal periòdica de  $N$  parells de caps de miosina d'un dels filaments gruixuts que s'estén a una meitat del sarcòmer, amb una separació  $C$  entre dues unitats de miosina consecutives. El centre del  $n$ -èsim parell de caps (amb  $n = 0$  pel primer) se situa a una distància  $nC$  de l'origen i, segons l'expressió 5.2, genera una amplitud de difracció

$$F_n(Z) = F(Z) e^{2\pi i n C Z + i\phi(Z)}, \quad (5.5)$$

en què la nova fase  $2\pi i n C Z$  apareix a causa del desplaçament de l'origen de  $z$  (figura 5.1b). L'amplitud de difracció  $F_N$  dels caps d'una meitat del sarcòmer és la suma de les amplituds de difracció dels diferents parells de caps,

$$F_N(Z) = F(Z) e^{2\pi i\phi(Z)} \sum_{m=0}^{N-1} e^{imCZ} = F(Z) e^{i\phi(Z)} \frac{1 - e^{2\pi i N C Z}}{1 - e^{2\pi i C Z}} \quad (5.6)$$

on, per la darrera igualtat, hem utilitzat l'expressió de la suma d'una sèrie geomètrica de raó  $e^{2\pi i CZ}$ . Si multipliquem i dividim el darrer membre per  $e^{\pi i CNZ}$  i per  $e^{\pi i CZ}$ , s'obté

$$F_N(Z) = F(Z) e^{i\phi(Z)} \frac{\sin \pi NCZ}{\sin \pi CZ} e^{\pi i(N-1)CZ} . \tag{5.7}$$

Comparant aquesta expressió amb l'expressió 5.2, s'observa que l'estructura del motiu de repetició hi ha introduït un factor extra  $B(Z)$ ,

$$B(Z) = \frac{\sin \pi NCZ}{\sin \pi CZ} e^{\pi i(N-1)CZ} . \tag{5.8}$$

Aquest nou factor és, de fet, l'amplitud de la funció de disposició que ja havíem trobat al capítol 2, i depèn de l'estructura cristal·logràfica i no del motiu de repetició (vegeu la secció 2.1.3.1). En el cas d'una xarxa ideal, la funció  $B(Z)$  és una *funció de Laue*, el quadrat de la qual dóna la intensitat de difracció a causa de la xarxa (figura 5.3). Més endavant es detallen les seves propietats.



**Figura 5.3.** Diagrama de difracció d'una estructura lineal ideal amb  $N = 20$  unitats puntuals. Matemàticament, el diagrama és descrit pel quadrat de la funció de disposició, que és una funció de Laue.

### 5.2.2. L'efecte d'interferència entre dos filaments gruixuts simètrics

En l'expressió 5.7,  $F_N(Z)$  és l'amplitud de difracció d'un filament gruixut, amb  $N$  parells de caps de miosina disposats regularment a una distància  $C$ . En un sarcòmer ideal, els filaments gruixuts d'un sarcòmer se situen amb una simetria bipolar amb respecte a la línia  $M$ . La banda  $A$  del sarcòmer queda així formada per dues fileres idèntiques de  $N$  caps de miosina amb una periodicitat  $C$ , i separades per una distància  $L$  (figura 5.2).

Donat que, en aquest treball, solament es considera la simetria en la direcció meridional, en una sola dimensió, la simetria bipolar és equivalent a la simetria especular i, per tant, els tractarem indistintament. El tractament matemàtic que segueix a continuació es basa en les propietats de la simetria especular i, per tant, únicament serà vàlid en la direcció meridional.

#### 5.2.2.1. Relació del mòdul i la fase de dues estructures especulars

L'amplitud de difracció dels filaments gruixuts d'un sarcòmer és la suma de cadascun dels filaments amb polaritat. Cal trobar, per tant, la relació de mòdul i fase entre dues estructures amb aquest tipus de simetria. Per una banda, suposem una estructura arbitrària localitzada en un filament gruixut i que, segons l'expressió 5.2, té l'amplitud de difracció

$$F_1(Z) = |F_1(Z)| e^{i\phi_1(Z)}.$$

D'altra banda, l'estructura simètrica localitzada en el filament simètric, tindrà una amplitud de difracció

$$F_2(Z) = \int_{-}^{+} \rho_2(z) e^{2\pi iz Z} dz = |F_2(Z)| e^{2\pi i\phi_2} \quad (5.9)$$

Atès que la orientació de la segona estructura presenta simetria especular respecte la primera, les densitats electròniques de les dues compliran la relació  $\rho_2(z) = \rho_1(-z)$  (figura 5.2c). Fent el canvi de variable  $z' = -z$ , i manipulant l'equació 5.9, s'obté

$$F_2(Z) = \int_{+}^{-} \rho_2(-z) e^{-2\pi iz Z} (-dz) = \int_{-}^{+} \rho_1(z) e^{-2\pi iz Z} dz = |F_1(Z)| e^{-i\phi_1}.$$

Per tant, les dues amplituds de difracció  $F_1$  i  $F_2$  de les dues estructures amb simetria especular compleixen les relacions

$$|F_1(Z)| = |F_2(Z)| = F(Z) \quad \text{i} \quad \phi_1(Z) = -\phi_2(Z) = \phi(Z). \quad (5.10)$$



Així doncs, si  $F_N(Z)$  és l'amplitud de difracció del conjunt dels parells de caps de miosina d'un filament gruixut, per la relació de fase i mòdul entre dues estructures especulars (expressió 5.10), l'amplitud de difracció del filament simètric  $F_{-N}(Z)$  és

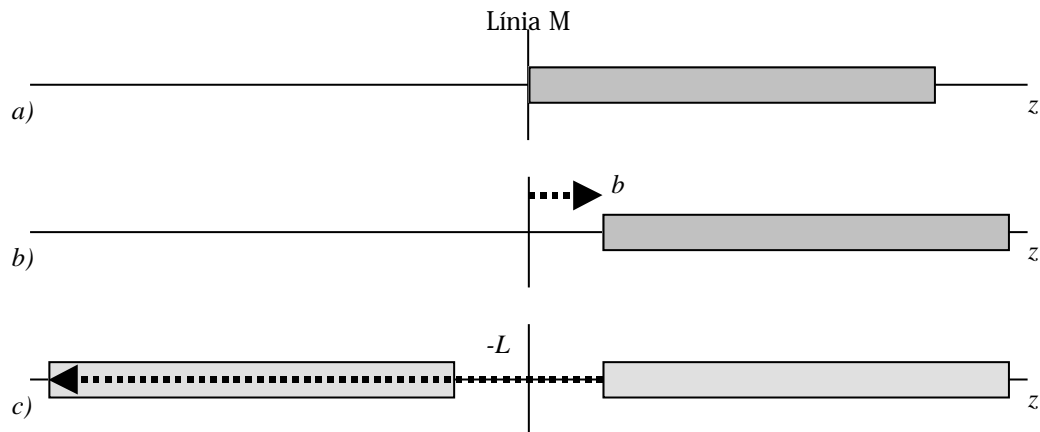
$$F_{-N}(Z) = F(Z)e^{-2\pi i\phi(Z)} \frac{\sin\pi NCZ}{\sin\pi CZ} e^{\pi i(N-1)CZ}, \quad (5.11)$$

que és idèntica a l'amplitud de difracció del primer filament (expressió 5.7), excepte la fase del motiu de repetició  $\phi(Z)$ , que canvia de signe. L'amplitud de difracció  $B(Z)$  de la funció de disposició (expressió 5.8) és la mateixa pels dos filaments.

### 5.2.2.2. L'amplitud de difracció del filament ideal

Per trobar l'amplitud conjunta dels dos filaments gruixuts simètrics, cal primerament situar les dues amplituds de difracció en el mateix origen. Les expressions 5.7 i 5.11 suposen l'origen de l'eix  $z$  en el centre de masses de la primera repetició (figura 5.4a). És necessari, per tant, desplaçar l'origen dels dos extrems de tal manera que els centres de massa estiguin separats una distància  $b$  del centre i a una distància  $L$  entre centres de massa (figura 5.2).

Per aconseguir aquesta disposició, les dues estructures es desplacen una distància  $b$ , cosa que introdueix una fase  $e^{2\pi i b Z}$  en l'amplitud de difracció en cadascuna d'elles (figura 5.4b). Tot seguit, una de les estructures es desplaça una distància  $-L$  i, per tant, la nova fase d'aquesta passa a ser  $e^{2\pi i (b-L)Z}$  (figura 5.4c). Així, tenint en compte aquests desplaçaments, l'amplitud de difracció  $F_M(Z)$  dels parells de caps de miosina dels dos filaments gruixuts simètrics dels dos costats de la línia M és



**figura 5.4.** Desplaçaments dels dos filaments gruixuts simètrics per aconseguir que l'origen sigui la línia M. a) Origen de les dues estructures segons les expressions 5.6 i 5.9. b) Desplaçament en  $b$  de les dues estructures; s'hi introdueix una fase  $e^{2\pi i b Z}$  en cada estructura. c) Desplaçament en  $-L$  d'una d'elles; s'introdueix una fase  $e^{2\pi i (b-L)Z}$  en una de les estructures, mentre que l'altra resta constant.

$$F_M(Z) = F_{+N}(Z)e^{2\pi ibZ} + F_{-N}(Z)e^{2\pi i(b-L)Z} .$$

Quan fem la substitució  $F_{+N}(Z)$  per l'expressió 5.7, i  $F_{-N}(Z)$  per l'expressió 5.11, trobem

$$F_M(Z) = F(Z) \frac{\sin \pi NCZ}{\sin \pi CZ} \left[ e^{i\phi(Z)} + e^{-i\phi(Z) + 2\pi i LZ} \right] e^{\pi i (N-1) CZ} e^{2\pi ibZ} .$$

Finalment, si multipliquem i dividim la darrera expressió per  $e^{\pi i LZ}$ , i apliquem la igualtat trigonomètrica  $2 \cos \alpha = e^{i\alpha} + e^{-i\alpha}$ , obtenim l'expressió final

$$F_M(Z) = F(Z) \frac{\sin \pi NCZ}{\sin \pi CZ} \cos[\pi LZ + \phi(Z)], \quad (5.12)$$

on hem aplicat la relació geomètrica entre paràmetres (expressió 5.5).  $F_M(Z)$  és l'amplitud de difracció generada per l'estructura dels parells de caps de miosina que es troben dins d'un sarcòmer, prenent com a origen la línia M. Notem que l'amplitud de difracció, segons l'expressió 5.12, és real, tal com correspon a la condició de centrosimetria de l'estructura des d'aquest origen.

Comparant les expressions 5.7 i 5.12, observem que, a banda de la fase, la influència de la simetria del sarcòmer sobre l'amplitud de difracció  $F_M(Z)$  ha estat l'addició d'un nou factor  $\cos[\pi LZ + \phi(Z)]$ . Aquest nou factor és, de fet, una funció de Laue amb  $N = 2$  i no és altra que l'amplitud de difracció de la funció de disposició d'una estructura de 2 unitats, el motiu de repetició de la qual són, llavors, les  $N$  repeticions d'un filament.

Atès que no s'ha suposat cap condició en la forma de la densitat electrònica, l'expressió 5.12 és aplicable a qualsevol estructura del sarcòmer que presenti simetria especular entre les dues meitats del sarcòmer. En concret, serà aplicable a altres proteïnes que compleixen també la condició de simetria, bé amb el pla especular situat a la línia M (proteïna C) com a la línia Z (troponina) (vegeu la secció 1.3), entre d'altres. Per aquestes altres estructures, l'expressió 5.12 també és vàlida, amb diferents paràmetres  $L_i$ ,  $C_i$ ,  $b_i$ ,  $N_i$  i  $\phi_i$ . L'amplitud total de difracció serà la suma de les contribucions que es considerin,

$$F_{TOT}(Z) = \sum_i F_i(Z) = \sum_i |F_i(Z)| \frac{\sin \pi N_i C_i Z}{\sin \pi C_i Z} \cos[\pi L_i Z + \phi_i(Z)]. \quad (5.13)$$

### 5.2.3. La intensitat de difracció del filament ideal

L'expressió 5.12 descriu l'amplitud de difracció dels parells de caps de miosina presents al sarcòmer, suposant una ordenació ideal perfectament regular, al meridià. Si considerem que solament els caps de miosina contribueixen a la intensitat de difracció del meridià, aquesta serà el quadrat de l'amplitud de difracció dels caps de miosina,  $I_M(Z)$ , és a dir,

$$I_M(Z) = F^2(Z) \frac{\sin \pi NCZ}{\sin \pi CZ}^2 \cos^2 [\pi LZ + \phi(Z)]. \quad (5.14)$$

La importància d'aquesta darrera fórmula, fonamental per a aquest treball, rau en què la diferència d'intensitats entre els diferents pics d'un conjunt originat per la mateixa estructura depèn de la fase  $f(Z)$  del motiu de repetició. Aquesta fase, que en condicions habituals no apareix en l'expressió de la intensitat, a la línia del meridià apareix a causa de la interferència entre els conjunts especulars de caps de miosina a cada filament gruixut. Es resol així, per aquesta regió concreta, el problema de les fases.

En cas que es considerés més d'una estructura, la intensitat seria simplement el quadrat de la suma d'amplituds de difracció (expressió 5.13), si les diferents estructures tenen una relació de fases fixa i se sumen coherentment. Si, en canvi, les estructures no tenen una relació de fases fixa, la suma és incoherent i, per tant, és la suma d'intensitats (i no d'amplituds) que dona la intensitat total. El problema de les fases, en qualsevol cas, es resol igualment. De fet, una combinació d'aquestes dues possibilitats és utilitzada en la modelització de tots els perfils meridionals de les reflexions en l'estat de descans (vegeu la secció 6.3).

#### 5.2.3.1. Factors de la intensitat de difracció

És convenient, de cara a l'estudi posterior, analitzar quina és la influència que té cada paràmetre en el perfil de la intensitat en el meridià segons aquesta expressió.

*La funció de Laue*

El primer factor de la intensitat de difracció (expressió 5.14) és el quadrat de la funció de Laue, que prové de les  $N$  repeticions d'un filament gruixut.

$$\frac{\sin \pi NCZ}{\sin \pi CZ}^2, \quad (5.15)$$

que té pics pronunciats d'amplada  $2/NC$  i centrats a  $Z = l/C$ , en què la funció pren el valor  $N^2$  (figura 5.5a). El valor de la funció de Laue entre aquests pics tendeix a zero quan  $N$  augmenta.

*La funció d'interferència especular*

El segon factor de l'expressió 5.14 és l'anomenada *funció d'interferència especular* entre els dos extrems amb simetria especular del filament gruixut,

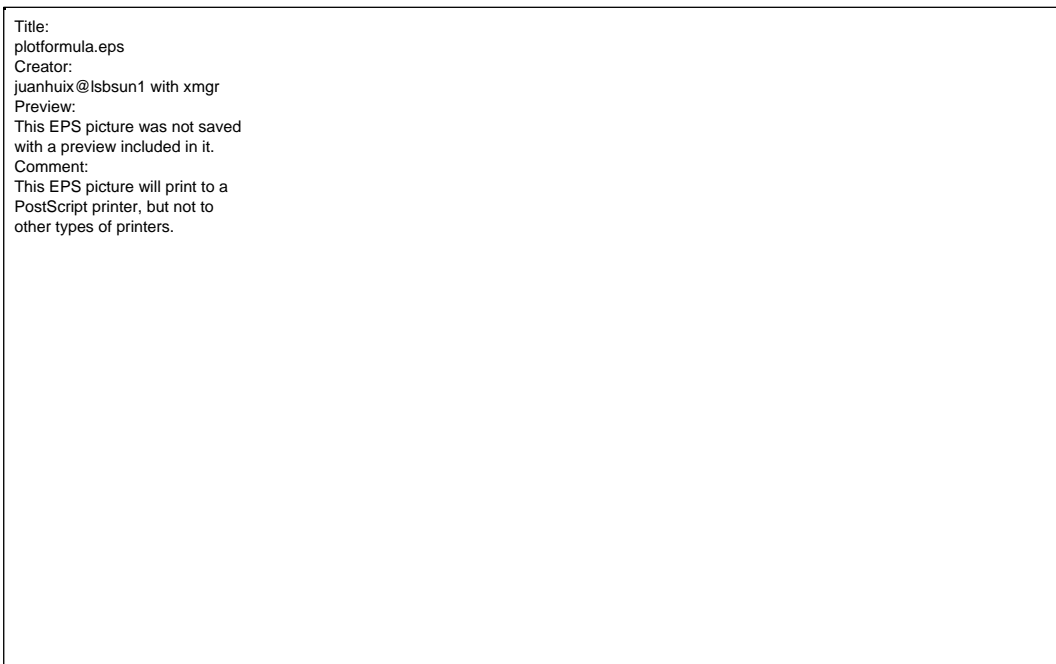
$$\cos^2 [\pi LZ + \phi(Z)], \quad (5.16)$$

que, de fet, no és altra que una funció d'interferència amb  $N = 2$ , i a on s'ha introduït una fase a causa de la relació d'especularitat entre les dues estructures.

La fase  $f(Z)$  del factor d'estructura és aproximadament constant dintre l'amplada dels pics de Laue ( $2/NC$ ), tal com queda garantit pel teorema de la mínima longitud d'ona i, per tant, els màxims de la funció d'interferència especular depenen únicament de la longitud d'interferència  $L$ . Així, els màxims queden espaiats una distància aproximada  $DZ = 1/L$  (figura 5.5a).

#### *El mòdul del factor d'estructura*

Finalment, respecte de l'últim factor de la intensitat de difracció (expressió 5.14), el mòdul del factor d'estructura,  $F(Z)$ , és un factor d'escala que és el mateix a tots els pics d'una mateixa reflexió, de manera que no té influència en les intensitats relatives dels diferents pics. Aquest paràmetre, important donat que apareix a la síntesi de Fourier de la densitat electrònica axial (expressió 2.18), és ajustat per mètodes més precisos explicats al capítol 7. Per tant, en aquest capítol la intensitat simplement es normalitza a la unitat.



**Figura 5.5.** Construcció de la intensitat dels pics meridionals basats en la periodicitat dels caps de miosina (expressió 5.14). *a)* La funció de Laue, que prové de la difracció d'un filament gruixut amb  $N$  unitats de repetició, i la funció d'interferència especular, resultat de la interferència entre dos filaments. *b)* El producte d'aquests dona el perfil de la intensitat dels pics al meridià. *c)* Un major nombre de pics d'interferència entren dins d'un pic de Laue quan  $N$  disminueix. *d)* Una lleugera variació de la longitud d'interferència genera un desplaçament dels pics, que canvien d'intensitat.

### 5.2.3.2. Formació dels diferents pics en una mateixa reflexió

Donat que el valor de la longitud d'interferència  $L$  és més gran que la longitud de coherència  $NC$  dels caps de miosina en un filament gruixut, els pics de la funció de Laue són clarament més amples que els de la funció d'interferència especular. El producte d'aquestes dues funcions, per tant, genera un mostratge de la funció de Laue en diversos pics definits pels màxims de la funció d'interferència especular (figura 5.5b). El nombre de pics que cauen sota el pic principal de Laue depèn de l'amplada d'aquest, que és inversament proporcional al nombre  $N$  de caps de miosina d'un filament gruixut. Així, en disminuir  $N$ , l'amplada augmenta i, com a conseqüència, sota l'envolupant de cada pic apareix una quantitat més gran de pics de la funció d'interferència especular (figura 5.5c).

Per altra banda, un canvi petit en  $L$  té com a conseqüència un desplaçament dels pics de la funció d'interferència especular, de manera que la intensitat d'aquests pics canvia perquè se centren sobre un punt diferent de la funció de Laue (figura 5.5d). Un canvi en la longitud de la zona nua o en la fase  $f(Z)$  del motiu de repetició produeix el mateix efecte.

En canvi, un canvi en la longitud d'interferència  $L$  igual a un múltiple de  $C$  no fa variar les intensitats dels pics inclosos en la funció de Laue, donat que un altre màxim de la funció d'interferència especular cau al mateix punt. En lloc de variar les intensitats relatives, un augment o disminució de  $L$  d'aquesta magnitud aproxima o allunya, respectivament, els pics de la funció d'interferència especular.

### 5.2.3.3. Incertesa en $p$ de la fase

Malgrat que en l'expressió de la intensitat de difracció (expressió 5.14) apareix la fase  $f(Z)$  del factor d'estructura, aquesta no pot quedar unívocament determinada mitjançant un ajustament de l'aproximació teòrica al perfil meridional experimental. Això és així a causa del quadrat de la funció d'interferència especular (expressió 5.15), que fa que el cosinus quedi indeterminat en el signe i, per tant, l'argument del cosinus pugui ser  $(pLZ + f(Z))$  o  $(pLZ + f(Z) + p)$ . Això porta a que, per a cada ordre de difracció, hi hagi dues possibles fases del factor d'estructura no discriminables mitjançant l'ajustament del perfil meridional.

Aquesta incertesa en  $p$  de la fase del factor d'estructura, que, de fet, és pròpia de totes les estructures centrosimètriques, és més crítica com més gran és el nombre d'ordres considerats en la determinació de la densitat axial electrònica. L'incertesa ha de ser resolta mitjançant diversos mètodes i amb cert coneixement previ de la forma de la densitat axial electrònica (vegeu la secció 8.1.1).

## 5.3. Ajustament de l'aproximació ideal als perfils meridionals

La fórmula 5.14 constitueix una aproximació teòrica senzilla per explicar els pics de difracció originats per l'estructura dels caps de miosina. Ajustant els paràmetres que hi intervenen, aquesta fórmula es pot aplicar a cada ordre per ajustar els perfils meridionals a les dades experimentals obtingudes al capítol 4. L'objectiu de l'ajustament és la determinació de la fase del factor d'estructura.

En l'ajustament es permet una variació lliure de tots els paràmetres, tot mantenint les restriccions imposades per la geometria del filament gruixut (expressió 5.5). Donat que, físicament, els paràmetres geomètrics  $N$  i  $L$  han de ser iguals per a tots els ordres, la variació d'aquests independent a cada ordre pot portar a valors no realistes. Per tant, en els ajustaments aquests paràmetres seran referits com el nombre aparent d'unitats  $N_{ap}$  i la longitud aparent d'interferència  $L_{ap}$ . La constància d'aquests dos paràmetres en tots els ordres suposa un test significatiu de la validesa de l'aproximació teòrica.

Es comprovarà que aquesta aproximació teòrica pot descriure amb molta exactitud el perfil d'aquestes reflexions, si bé haurà de ser revisat a causa de la variació amb l'ordre del nombre d'unitats  $N$  i la longitud d'interferència  $L$  entre les dues meitats del sarcòmer. El sentit físic d'aquests paràmetres (és a dir, paràmetres geomètrics del filament gruixut) comporta que haurien de romandre constants en tots els ordres.

### 5.3.1. Ajustament dels ordres permesos

#### 5.3.1.1. Elecció de l'origen de fases

L'aplicació de l'expressió de la intensitat (expressió 5.14) als ordres permesos 3M, 6M, 9M i 15M en l'estat de contracció isomètrica porta una incertesa entre els paràmetres que hi actuen ( $N$ ,  $L$  i  $f$ ). Això és degut a que l'argument del factor cosinus de la fórmula 5.14 en l'ordre  $l$ ,

$$\cos \pi L \frac{l}{C} + \phi_l \quad (5.17)$$

no té una solució única per a un valor donat del cosinus. El factor pren el mateix valor per qualsevol  $L = L + kC$ , on  $k$  és un nombre enter. Donat que els paràmetres lineals estan lligats per la relació geomètrica 5.5, una elecció arbitrària de la longitud d'interferència afecta també els altres paràmetres.

Per fixar aquesta indeterminació prenem com a criteri la longitud  $2b$  de la zona nua (*bare zone*) al voltant de la línia M, que és constant. Diferents estudis per microscòpia electrònica han demostrat que la zona nua té una longitud d'entre ca. 150 nm i ca. 160 nm [Sjöström *et al.*, 1977; Craig, 1977; Squire, 1981] i, per tant, limitem la longitud permesa de la zona nua en aquest rang. Si, a més, definim arbitràriament que la fase de la reflexió 3M en contracció isomètrica sigui cèntrica, és a dir, que sigui  $f_{3Mcim} = 0 \text{ deg}$  o  $f_{3Mcim} = 180 \text{ deg}$ , trobem finalment un valor de referència que imposem per a tots els altres ordres. Aquest valor és

$$2b = 152.25 \text{ nm} \quad (\text{amb } f_{3Mcim} = 0/180 \text{ deg}). \quad (5.18)$$

Convé assenyalar que aquesta definició arbitrària de la fase de la reflexió 3M no comporta cap limitació mentre es mantingui el mateix origen de fases en tots els ordres. La definició de la fase amb un altre valor, o en un altre ordre, solament suposa un desplaçament de l'origen de fases, que té com a conseqüència un desplaçament de la de la densitat axial de massa que resulta de l'aplicació de la fase a la síntesi de Fourier

(expressió 5.3). El desplaçament de la densitat no té cap significació física i, per tant, pot ser triat a voluntat. La forma de la densitat axial de massa, que és la figura amb significació física, per tant, és independent de la definició inicial.

Remarquem que el valor escollit de la zona nua no és una mesura d'aquesta, sinó una elecció de l'origen de fases. Qualsevol altre valor, dins dels límits permesos per altres experiments (entre ca. 150 nm i ca. 160 nm), pot ser igualment vàlid, sempre i quan es mantingui aquest valor a tots els ordres.

### 5.3.1.2. Resultat de l'ajustament

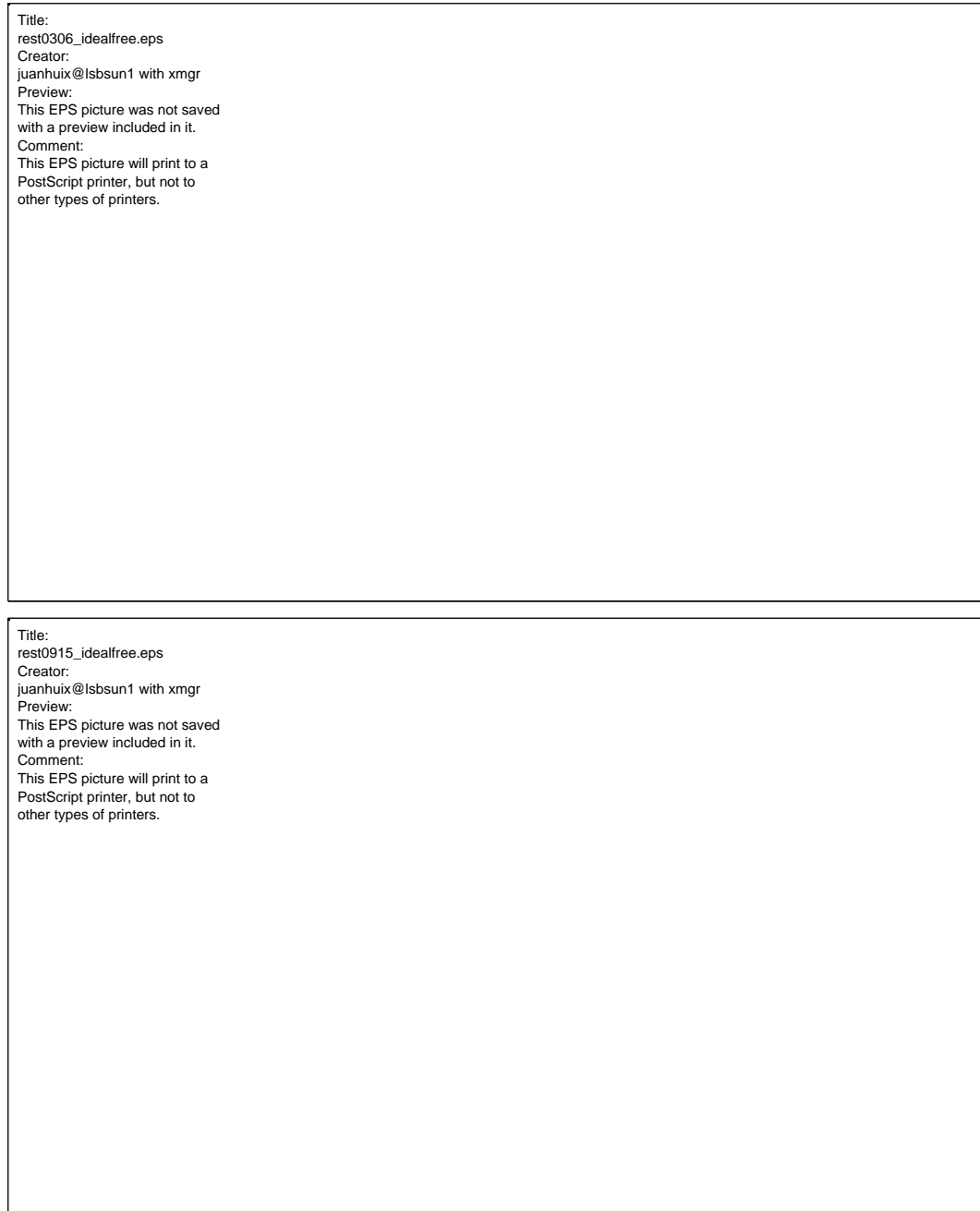
Amb la definició de l'origen de fases donada anteriorment, s'ajusten els valors *aparents* dels paràmetres de l'aproximació teòrica, permetent-ne la variació independent per a cada ordre, i tenint present el valor constant per a tots els ordres de la zona nua i la restricció de la relació 5.5. El valor escollit de la repetició és  $C = 14.55$  nm (vegeu la secció 4.2).

Per ajustar millor les dades experimentals a l'aproximació teòrica, aquest es convoluciona amb una funció de dispersió de punt (*point spread function*) que té en compte l'efecte de l'amplada finita del feix de llum de sincrotró, així com de la dispersió de l'energia de cada fotó absorbit en més d'un píxel. Aquesta funció de dispersió de punt es considera gaussiana, amb una desviació mitjana  $s$  de ca. 2.2 píxels.

Amb aquesta darrera correcció, s'ha observat que la major part dels errors són sistemàtics, causats majoritàriament per la no inclusió d'altres periodicitats. Amb aquest tipus d'errors, el criteri utilitzat per acceptar l'ajustament és que la distància entre els dos pics principals d'una mateixa reflexió calculada amb l'aproximació teòrica no han de discrepar en més de un píxel respecte de la mesurada amb les dades experimentals (vegeu la secció 3.6.3).

El resultat d'aquest ajustament per als ordres permesos en l'estat de contracció isomètrica es mostra a la figura 5.6. Els paràmetres que en resulten es llisten a la taula 5.1. Els ajustaments dels diferents ordres no porten a un únic valor de  $N$  i  $L$ . Això és degut, d'una banda, a que  $N_{ap}$  ha de ser un nombre enter, fet que afegeix una restricció addicional que impedeix una optimització contínua de tots els paràmetres. D'altra banda, la substracció de la dispersió de fons i les possibles contribucions d'altres periodicitats no incloses en aquest ajustament generen una incertesa en el resultat.

Així doncs, fet l'ajustament, s'observa clarament que els valors aparents per a cada ordre del nombre d'unitats i de la longitud d'interferència,  $N_{ap}$  i  $L_{ap}$ , disminueixen substancialment amb l'ordre (figura 5.7). Aquesta disminució és especialment remarcable als ordres superiors (9M i 15M), on els valors dels paràmetres estan lluny de les mesures experimentals realitzades mitjançant microscòpia electrònica. El valor generalment acceptat del nombre d'unitats  $N$  és 49 o 50 [Squire, 1981].



**Figura 5.6.** Minimització dels ordres permesos en l'estat de contracció isomètrica amb l'expressió 5.14 quan es permet una variació lliure dels paràmetres per a cada ordre, tenint en compte les restriccions convencionals (expressió 5.5). Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 5.1. En la figura es mostren les minimitzacions per  $N_{3M} = 50$ ,  $N_{6M} = 47$ ,  $N_{9M} = 40$  i  $N_{15M} = 31$ .

Els errors més destacables de l'ajustament respecte del perfil experimental es donen als ordres 9M i 15M, i poden tenir orígens diversos sistemàtics que l'aproximació teòrica ideal no pot incloure.

**Taula 5.1.** Paràmetres òptims de l'ajustament amb l'aproximació teòrica ideal (expressió 5.14) de les reflexions permeses en l'estat de contracció isomètrica. Es mostren les dues solucions més ajustades per a



cada ordre, donat que no és possible discernir l'òptima entre elles. Atès que es permet la variació lliure dels paràmetres geomètrics  $N$  i  $L$  per a cada ordre, els valors són aparents i, en conseqüència, són anomenats  $N_{ap}$  i  $L_{ap}$ . La fase té dues solucions a causa de la indeterminació en  $p$  provocada per la centrosimetria del filament gruixut. La fase de la reflexió 3M és fixada a 0, definició que fixa la longitud  $2b$  de la zona nua en 152.25 nm.

Contracció isomètrica	$N_{ap}$	$L_{ap}$	$f_i$	
Model ideal		[nm]	[deg]	
3M	50	865.2	0	(180)
	49	850.65	0	(180)
6M	48	836.1	73.5	(-106.5)
	47	821.55	74	(-106)
9M	41	734.25	67.5	(-112.5)
	40	719.7	67.5	(-112.5)
15M	31	588.75	101	(-79)
	30	574.2	102	(-78)



**Figura 5.7.** Variació dels paràmetres òptims (taula 5.1) de l'ajustament dels perfils meridionals de les reflexions permeses en l'estat de contracció isomètrica amb l'aproximació teòrica ideal. *Esquerra*, distàncies d'interferència aparents  $L_{ap}$  en funció de l'ordre de difracció. *Dreta*, distàncies d'interferència aparents en funció del nombre aparent de caps en mig sarcòmer  $N_{ap}$ . Si l'aproximació teòrica fos exacta,  $N_{ap}$  i  $L_{ap}$  serien constants amb l'ordre  $i$ , per tant, en el gràfic de la dreta, els punts dels diferents ordres caurien sobre una línia plana; en el gràfic de l'esquerra, els valors de tots els ordres se situarien al mateix punt.

En el primer cas, l'espaiat que correspon a l'ordre 9M (ca. 4.85 nm) és aproximadament el mateix al de l'ordre 8T (ca. 4.87 nm), que prové de troponina. Les intensitats relatives de totes les reflexions aïllades de la troponina (p. ex. 3T, figura 4.1) en contracció isomètrica són molt baixes. Això suggereix que la intensitat de

l'ordre 8T ha de ser igualment baixa, però encara prou intensa com per contribuir a la intensitat de la reflexió 9M de manera limitada. En aquest cas, la diferència entre l'ajustament teòric i els resultats experimentals de la 9M (part dreta de la reflexió 9M, figura 5.6) podria ser causada per la presència de la reflexió 8T que, en tot cas, no pot ser superior a un 10% de la intensitat total de la reflexió. Finalment, en el cas de la reflexió 15M, l'error pot ser atribuït a l'arquejament dels perfils de difracció (figura 4.14).

### 5.3.2. Valoració de l'aproximació ideal

La senzilla expressió 5.14, que té en compte solament una periodicitat, aconsegueix de reproduir de manera molt precisa els perfils de les reflexions permeses en contracció isomètrica. Fins i tot, els ordres permesos no considerats (12M i 18M) poden ser igualment ajustats amb aquesta aproximació teòrica, malgrat la poca intensitat i gran soroll que presenten.

De tota manera, l'aproximació teòrica ideal no pot ser considerada completa a causa de la disminució molt significativa del valor aparent del nombre d'unitats i de la longitud d'interferència amb l'ordre. La interpretació física d'aquests paràmetres requereix que el valor que prenen sigui el mateix en tots els ordres. Aquesta disminució pot tenir diverses causes, no excloents entre si.

Una primera explicació pot ser la progressiva pèrdua de coherència de les unitats de difracció a mesura que augmenta l'ordre. L'origen de la pèrdua de coherència pot estar en què, segons el teorema de Shannon, només difracten coherentment en l'ordre  $l$ -èsim els caps que tenen un desordre axial inferior a

$$Dz_l = C / 2l \quad . \quad (5.19)$$

Segons aquest teorema, la no-coherència progressiva pot aparèixer en cas que el desordre dels caps de miosina augmenti a mesura que aquests s'allunyen del centre del filament. En aquest cas, per a un ordre  $l$  determinat, els caps de miosina situats més enllà d'una certa distància de la línia M tenen un desordre massa gran com per poder difractar i així contribuir al pic de difracció. La longitud d'interferència aparent  $L_{ap}$  és llavors la distància mitjana entre els caps dels dos filaments gruixuts simètrics que interfereixen. D'aquesta manera, el nombre de caps de miosina efectiu que difracten es redueix al nombre de caps que queden dins d'aquesta distància. El nombre de caps i la distància d'interferència disminueixen a mesura que augmenta l'ordre de difracció, donat que la condició 5.19 és més exigent, i es dona l'efecte observat a la figura 5.7.

Una segona explicació, alternativa, a l'apparent disminució del nombre de caps i la longitud d'interferència és la inclusió de més d'una estructura, amb periodicitats lleugerament diferents. L'efecte d'aquesta modificació és un eixamplament progressiu dels pics de difracció, anàleg a l'efecte de la disminució del nombre d'unitats. Les dues explicacions de l'apparent disminució dels paràmetres  $N$  i  $L$  són estudiades en les dues aproximacions teòriques següents.

En resum, l'aproximació teòrica ideal explica bé el perfil meridional de les reflexions basades en la periodicitat de la miosina, però la variació aparent dels paràmetres fa que hagi de ser modificada. La modificació pot consistir tant en la inclusió de desordres en l'estructura que formen es caps de miosina, com de l'addició

de noves estructures. Aquestes dues modificacions, que donen peu a aproximacions teòriques més elaborades, són estudiades en les seccions següents.

## 5.4. L'aproximació dels caps de miosina amb desordre

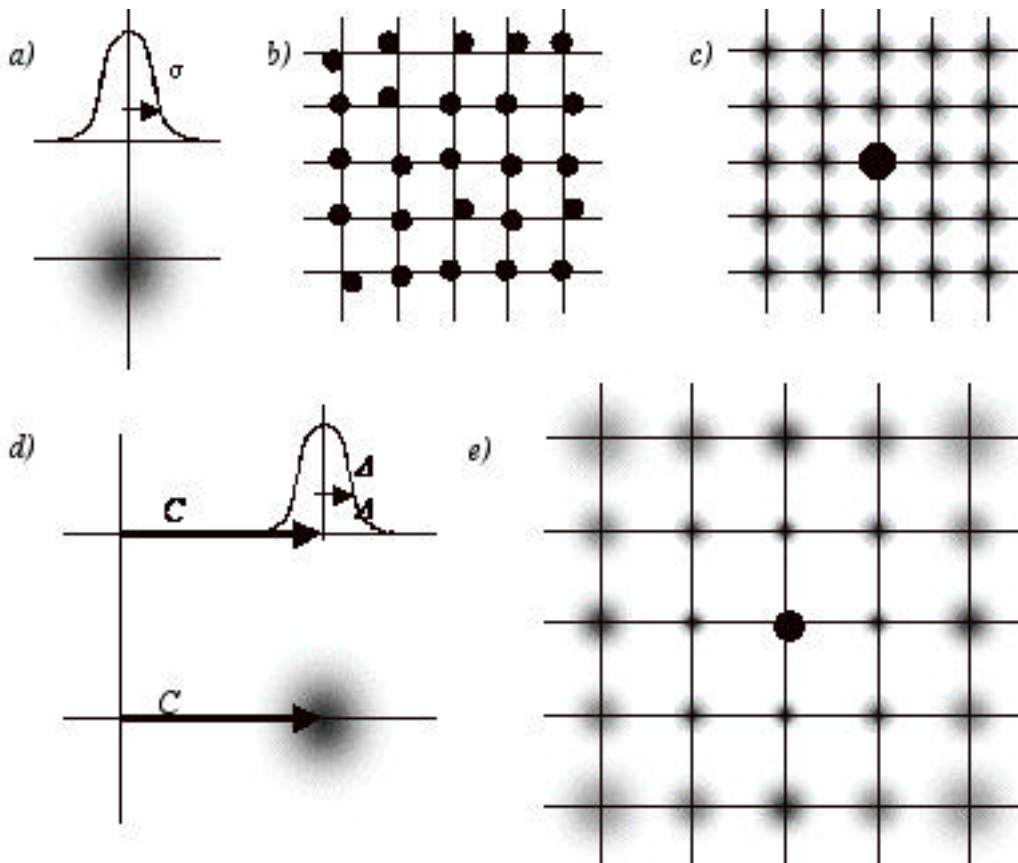
En l'anterior secció s'ha comprovat que el perfil meridional de la intensitat de difracció del filament gruixut ideal (expressió 5.14) ajusta molt bé els perfils experimentals, però els valors aparents de  $N$  i  $L$  que resulten de l'ajustament no poden tenir el significat físic que la teoria suposa. Cal introduir una modificació a l'aproximació teòrica ideal que resolgui la manca de sentit físic d'aquests valors aparents.

L'aproximació teòrica anterior suposava una ordenació ideal dels caps de miosina. De tota manera, això és una suposició arriscada en un teixit biològic on, per la seva pròpia natura, la cristal·linitat no pot ser perfecta. Cal no oblidar que una estructura cristal·logràficament perfecta assoleix un mínim de l'energia lliure i, per tant, no pot desenvolupar una funció biològica. Queda clar, per tant, que una plausible modificació a l'aproximació ideal anterior és la introducció de desordres en l'estructura, que es considera en aquesta secció.

### 5.4.1. Tipus de desordre

Els desordres en una estructura cristal·lina qualsevol poden ser de dues espècies segons la natura del seu abast [Vainshtein, 1966]. D'una banda, en el *desordre de primera espècie*, els punts de la xarxa cristal·lina són substituïts per una probabilitat centrada en el punt (figura 5.8a). Un exemple de desordre de primera espècie és el desordre tèrmic, que apareix degut a moviments vibracionals respecte a una posició d'equilibri.

Aquest tipus de desordre suposa que cada unitat de difracció té una posició i orientació ideals i idèntiques a tots els nodes, de la qual se separa amb una certa probabilitat de desplaçament o rotació de la unitat (figura 5.8b). Com que la mitjana de la distribució ve fixat per la xarxa regular, l'ordre a llarga distància es conserva i, per tant, és possible definir analíticament la funció de disposició, que defineix la probabilitat de localització de les unitats de difracció (figura 5.8c). La funció de disposició amb desordre de primera espècie no es difumina a mesura que ens allunyem de l'origen, i té la forma d'un sumatori de gaussianes centrades en els nodes de la xarxa.



**Figura 5.8.** Tipus de desordre d'una xarxa cristal·lina bidimensional: *a)* Desordre de primera espècie: a cada punt de la xarxa li correspon una distribució de probabilitat constant. *b)* Posició d'un conjunt de punts que formen una xarxa amb desordre de primera espècie i *c)* la seva funció d'interferència. *d)* Desordre de segona espècie, on es defineix únicament una distribució de distàncies als primers veïns *e)* La funció d'interferència, que es difumina a veïns llunyans.

La conseqüència de la introducció del desordre de primera espècie en el diagrama de difracció és el decreixement exponencial de la intensitat dels pics a mesura que s'incrementa l'ordre de difracció, a la vegada que va augmentant la intensitat dispersada pel desordre. La inclusió d'aquest desordre no afecta l'amplada del pic, sinó únicament la intensitat (figura 5.9b). Donat que els pics meridionals del diagrama de difracció varien d'amplada (capítol 4.2), cal descartar aquest tipus de desordre com a factor rellevant que, introduït a l'aproximació teòrica ideal, ha d'explicar el perfil dels pics en el meridià.

D'altra banda, molt més rellevants per al nostre estudi són els anomenats *desordres de segona espècie* o *paracristal·lins*. En una estructura amb aquest desordre, no hi ha definida una posició fixa de les unitats que componen l'estructura, de tal manera que no hi ha cap xarxa rígida de les posicions mitjanes d'equilibri de totes les unitats que formen el cristall, com ocorre en els desordre de primera espècie. Solament es pot definir una distribució de distàncies als veïns més propers (figura 5.8d), amb una distància mitjana  $C$  entre veïns.

```

Title:
fidis1ki.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 5.9.** Diagrama de difracció d'una estructura lineal amb  $N = 20$  unitats puntuals. Matemàticament, el diagrama és descrit pel quadrat de la funció de disposició. *a)* En el cas ideal, sense desordres, el quadrat de la funció de disposició és una funció de Laue. *b)* Cas d'estructura amb desordre de primera espècie ( $\sigma = 0.01C$ ). Els pics disminueixen d'amplitud, però l'amplada es manté constant.

El desordre de segona espècie té un efecte més dramàtic que el de primera espècie en el diagrama de difracció. A mesura que augmenta l'ordre, els pics de difracció, a més de disminuir en intensitat, es fan progressivament més amples. Alguns exemples típics de desordre de segona espècie són els líquids, on únicament els àtoms que formen la pròpia molècula poden tenir distàncies ben definides; les estructures en cadena i, en particular, les estructures helicoidals. Per tant, les estructures presents en el sarcòmer, de simetria helicoidal, són susceptibles de presentar desordre de segona espècie. A causa d'això es detallen tot seguit les expressions que regeixen aquest tipus de desordre, i posteriorment s'analitzen la possible influència que tenen aquestes sobre el perfil del meridià.

## 5.4.2. El desordre de segona espècie

### 5.4.2.1. La distribució de distàncies

El desordre de segona espècie es caracteritza en què no hi ha definida una posició d'equilibri de la unitat de difracció al voltant de la qual hi ha distorsions, com passa en el desordre de primera espècie, sinó que solament hi ha definida una distribució de distàncies  $H_1(z)$  pel primer veí o, com a màxim, pels primers veïns. En aquesta situació, el desordre de segona espècie conserva l'ordre als primers veïns, és a dir, a curtes distàncies, però difumina progressivament l'ordre a llargues distàncies. En el cas d'una cadena lineal, i assumint una distribució gaussiana de distàncies al veí més proper, la distribució de distàncies és

$$H_1(z + C) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma} e^{-\frac{z^2}{2\sigma^2}} \quad (5.20)$$

El paràmetre  $\Delta$  és la desviació mitjana respecte de la distància mitjana del veí més proper,  $C$ . L'amplitud de difracció d'aquesta distribució és la seva transformada de Fourier,  $F_1(Z)$ , que serà

$$F_1(Z) = e^{-2\pi^2 Z^2 / \Delta^2} e^{2\pi i CZ} . \quad (5.21)$$

#### 5.4.2.2. La funció d'interferència i la intensitat d'una sola estructura

Malauradament, en presència de desordres de segona espècie, l'amplitud de difracció  $F(Z)$  no pot ser calculada. Efectivament, en el capítol 2 s'ha mostrat que, en general, l'amplitud de difracció d'una estructura és el producte de dos factors,

$$F(Z) = F_1(Z) B(Z) , \quad (5.22)$$

on  $F_1(Z)$  és el factor d'estructura, és a dir, la TF del motiu de repetició (expressió 5.1), i  $B(Z)$  és l'amplitud de difracció (és a dir, la TF) de la funció de disposició en l'espai recíproc. Aquesta funció de disposició, que segons l'expressió 2.11 és la distribució de *posicions* dels punts de la xarxa, no pot ser calculada en estructures amb desordre de segona espècie, atès que només estan definides les *distàncies relatives* dels veïns. En conseqüència, tampoc l'amplitud de difracció total  $F(Z)$  podrà ser trobada analíticament.

De tota manera, contràriament a l'amplitud de difracció, la intensitat mesurada pel detector pot ser calculada analíticament. Aquesta és simplement el quadrat de l'expressió 5.22,

$$I_0(Z) = |F_1(Z)|^2 |B(Z)|^2 = |F_1(Z)|^2 G(Z) , \quad (5.23)$$

on  $G(Z)$  és la TF de la *funció de distribució*,  $G(Z) = |B(Z)|^2$ , també anomenada *funció d'interferència*. La funció de distribució representa la distribució de distàncies entre punts. La distribució de distàncies mútues és determinada per la distribució dels primers veïns (expressió 5.20).

La posició del  $n$ -èsim veí queda definida per la combinació recurrent de la distribució de distàncies  $H_1(z)$  al veí adjacent (expressió 5.20), que dóna la posició relativa del primer veí, del segon, i així successivament al  $n$ -èsim. Matemàticament, aquesta operació és la convolució  $n$  vegades de la funció  $H_1(z)$ , i dóna com a resultat una distribució gaussiana  $H_n(z)$  de desviació mitjana  $\Delta_n = \Delta\sqrt{n}$  i centrada a  $z = nC$ .

L'amplitud de difracció generada pel  $n$ -èsim veí és la TF de la distribució  $H_n(z)$  que, mitjançant el teorema de la convolució (relació 2.8), és la potenciació  $n$ -èsima de  $F_1(Z)$ , és a dir,

$$F_n(Z) = e^{-2\pi^2 Z^2 / \Delta_n^2} e^{2\pi i n CZ} , \quad (5.24)$$

on la fase apareix a causa del desplaçament mitjà  $nC$  entre la unitat de referència i el seu veí  $n$ -èsim. Amb aquestes consideracions, la suma de l'amplitud de difracció de totes les distàncies mútues d'una cadena lineal amb  $N$  unitats és [Vainshtein, 1966]

$$G(Z) = N + \sum_{n=1}^N (N - |n|) [F_n(Z) + F_n^*(Z)] \quad (5.25)$$

El primer terme de la funció d'interferència,  $N$ , és el relatiu a les distàncies entre les unitats amb elles mateixes, i el terme del sumatori amb  $n = 1$  és el referent a la distància entre veïns consecutius. El sumatori s'estén fins als extrems oposats ( $n = N - 1$ ).

*Cas ideal*

A la figura 5.10a es mostra la forma que adopta la funció d'interferència en el cas ideal i amb desordre de segona espècie. D'una banda, en el cas ideal, la funció d'interferència es redueix a la funció de Laue que ja havíem obtingut a la secció 5.2.1. En efecte, si la distribució de distàncies entre veïns és  $H_1(z) = \delta(z - C)$ , que té una transformada de Fourier  $F(Z) = e^{2\pi i CZ}$ , quan operem en l'expressió 5.25, trobem que la funció d'interferència d'una estructura ideal és

$$G(Z) = \frac{\sin^2 \pi NCZ}{\sin^2 \pi CZ} \quad (5.26)$$

que és el quadrat de la funció de Laue (expressió 5.8) (figura 5.10a).

*Cas amb desordre finit*

D'altra banda, quan el desordre de segona espècie és present, els diferents ordres de difracció van disminuint en intensitat i es van eixamplant a mesura que ens allunyem del centre (figura 5.10b). La semiamplada  $\Delta Z$  de l'ordre de difracció  $l$ -èsim de la funció d'interferència és llavors

$$\Delta Z = \frac{1}{C} \pi^2 l^2 \frac{1}{C} \quad (5.27)$$

on la desviació  $\Delta$  és definida per la distribució de distàncies entre veïns, expressió 5.18.

Finalment, la intensitat final s'obté substituint la funció de Laue ideal per la funció d'interferència  $G(Z)$  (expressió 5.25) a l'expressió 5.14. Així, podem formular la intensitat total que genera un filament gruixut amb desordre de segona espècie com

$$I_0(Z) = F^2(Z) G(Z) \cos^2 [\pi LZ + \phi(Z)] \quad (5.28)$$

En aquest cas, on hi ha una sola estructura que difracta, la funció  $B(Z)$  no apareix en l'expressió de la intensitat, només el seu quadrat i, per tant, l'aproximació teòrica de la intensitat de difracció amb desordre de segona espècie té solució analítica.

L'expressió 5.28 és l'equivalent a la important fórmula 5.14, que permetia trobar la fase del factor d'estructura dels pics de difracció en el meridià. En aquest cas, encara que és més complexa per la inclusió del desordre de segona espècie, la intensitat també té dependència en aquesta fase i pot ser utilitzada per extreure-la mitjançant l'ajustament a les dades experimentals.

```
Title:
figudist.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 5.10.** Funció d'interferència dels 5 primers ordres de difracció d'una estructura amb  $N = 20$  repeticions *a)* ideal sense distorsions, on apareix el quadrat de la funció de Laue (expressió 5.26), i *b)* amb desordres de segona espècie, amb una desviació típica de  $\Delta = 0.025C$ , on  $C$  és la repetició. Els pics perden intensitat exponencialment i augmenten la seva amplada proporcionalment amb el quadrat de l'ordre  $n$ .

### 5.4.2.3. Amplitud de difracció i funció d'interferència amb més d'una estructura

El fet que solament es pugui extreure analíticament  $G(Z)$  i no  $B(Z)$  té solament conseqüències quan es considera més d'una repetició en el sarcòmer. Efectivament, en el cas general en què diferents estructures es presenten en el sarcòmer, l'amplitud total de difracció és

$$F(Z) = \sum_j^N F_j(Z) B_j(Z) \quad , \quad (5.29)$$

on  $F_j(Z)$  és el factor d'estructura de cada motiu de repetició (e.g. una proteïna amb una distribució periòdica al sarcòmer) i  $B_j(Z)$  és l'amplitud de difracció de la seva funció de disposició. En la intensitat observada pel detector, que és el producte de l'amplitud total de difracció per la seva complexa conjugada, apareixen termes creuats  $F_i(Z) F_j^*(Z)$



$B_i(Z) B_j^*(Z)$  amb  $i \neq j$ , que fan impossible el càlcul analític davant la impossibilitat de conèixer els diferents  $B_j(Z)$ .

L'aproximació en considerar una o més estructures periòdiques en el sarcòmer és més o menys bona segons la precisió que es requereix, així com de la zona de l'espectre considerada. Així, dues estructures en el sarcòmer amb periodicitats de valor molt semblant generen pics de difracció molt propers entre ells i produeixen fenòmens d'interferència que fan no negligibles els termes creuats.

Només en el cas en què les periodicitats són suficientment diferents com perquè els efectes de la interferència siguin negligibles, es pot considerar que la intensitat total  $I(Z)$  és simplement la suma d'intensitats de les diferents estructures  $I_i(Z)$ ,

$$I_0(Z) = \sum_i |F_i(Z)|^2 |B_i(Z)|^2 = \sum_i |F_i(Z)|^2 G_i(Z). \quad (5.30)$$

## 5.5. Ajustament de l'aproximació amb desordre als perfils meridionals

Apliquem l'aproximació teòrica, desenvolupada a la secció anterior, que inclou el desordre de segona espècie en la disposició dels caps de miosina, a les reflexions permeses més intenses de l'estat de contracció isomètrica. Com el cas anterior, en què consideràvem el cas ideal, en l'ajustament es permet una variació lliure dels paràmetres, tot mantenint les restriccions imposades per la geometria del filament gruixut. El criteri de l'acceptació de l'ajustament és el mateix que en l'aproximació teòrica ideal (vegeu el capítol 3).

Com veurem, aquesta aproximació teòrica s'ajusta molt bé als perfils experimentals, però al preu d'una disminució aparent en el nombre d'unitats i en la longitud d'interferència, anàlogament a l'aproximació teòrica ideal. La permanència d'aquesta disminució a pesar d'haver introduït el desordre de segona espècie és valorada.

### 5.5.1. Ajustament dels ordres permesos

Apliquem l'expressió 5.28 per trobar el perfil dels pics meridionals dels caps de miosina. Per escollir l'origen de fases s'ha utilitzat, de manera independent, el mateix procediment que el cas ideal (vegeu la secció 5.3.1). El procediment ha donat els mateixos paràmetres: amb la fase de la reflexió 3M definida zero, la longitud de la zona nua  $2b$  és 152.25 nm.

La intensitat descrita pèe aquesta aproximació teòrica ha estat convolucionada per una funció de dispersió de punt  $s$  de ca. 2.1 píxels. El valor escollit de la mitjana de la distribució de distàncies  $C$  és 14.55 nm, mentre que el valor de la desviació d'aquesta és  $D = 0.06$  nm.

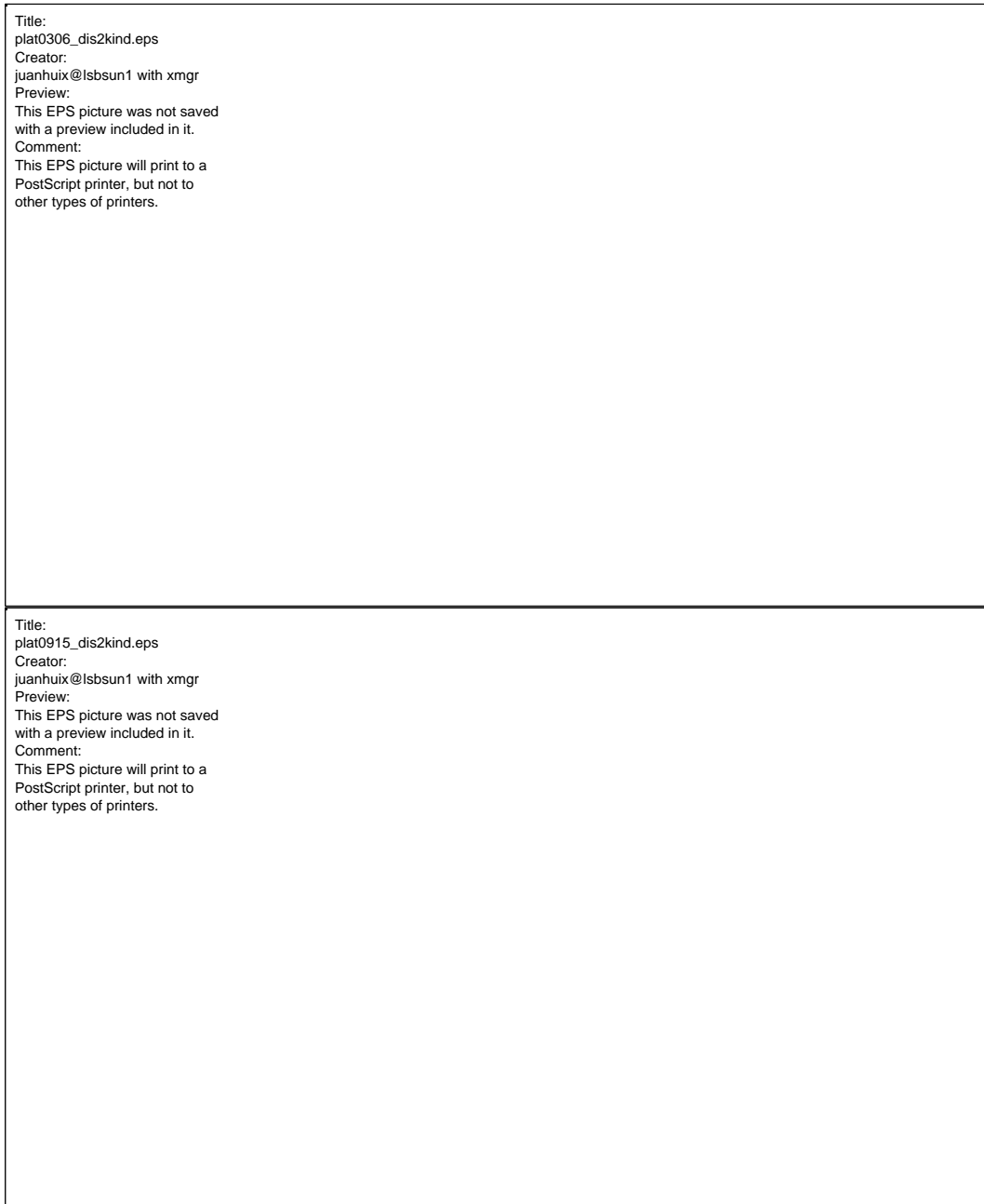
El resultat de l'ajustament dels ordres permesos en l'estat de contracció isomètrica es mostra a la figura 5.11. Els paràmetres que en resulten es llisten a la taula 5.2.

L'optimització de l'ajustament no porta a una única solució dels paràmetres per a cada ordre, a pesar de ser una aproximació teòrica més complet que l'ideal, sinó que hi ha diferents solucions per a cada ordre. D'igual manera que l'aproximació teòrica ideal, no és possible de discernir els paràmetres òptims a causa de la variació discreta del nombre de caps i de la possibilitat d'errors sistemàtics, com la presència d'altres periodicitats.

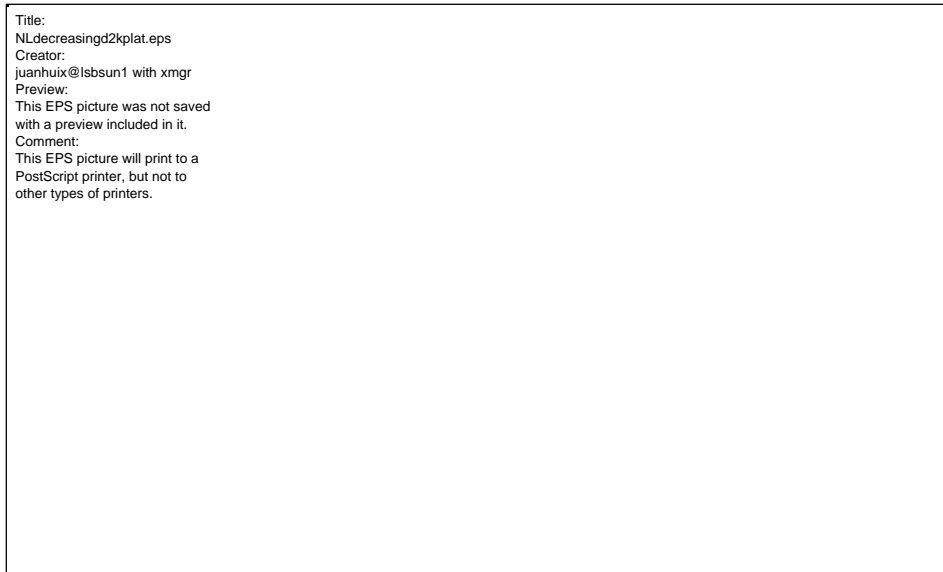
S'observa clarament que els resultats són quasi idèntics a l'aproximació teòrica ideal, de tal manera que el nombre d'unitats aparent i la longitud d'interferència aparent varien quasi de la mateixa manera en les dues aproximacions (figura 5.12). Els únics efectes aparents que hi introdueix el desordre de segona espècie és una lleugera disminució de la variació de  $N$  i  $L$ , i un millor ajustament de la reflexió 15M. En aquesta reflexió és justament, on el desordre ha de tenir més influència, donat el caràcter acumulatiu que té el tipus d'error considerat.

**Taula 5.2.** Paràmetres que resulten de la minimització de les reflexions permeses en l'estat de contracció isomètrica, considerant desordres de segona espècie. S'ha tingut en compte la restricció geomètrica 5.5, i s'ha imposat la condició de fase nul·la per a la reflexió 3M. La distribució de distàncies (expressió 5.20) té una amplada de  $D = 0.06$  nm. Hi ha una indeterminació en el nombre d'unitats, fet que provoca diferents solucions per a cada ordre, així com de la fase.

Contracció isomètrica Desordre de 2 <sup>a</sup> espècie	$N_{ap}$	$L_{ap}$ [nm]	$f$ [deg]
3M	50	865.20	0 (180)
	49	850.65	0 (180)
6M	49	850.65	73.5 (-106.5)
	48	836.10	73.5 (-106.5)
9M	44	777.90	67.5 (-112.5)
	43	763.35	67.5 (-112.5)
15M	33	617.85	109 (-71)
	32	603.30	109 (-71)



**Figura 5.11.** Ajustament dels ordres permesos en l'estat de contracció isomètrica amb l'expressió 5.28 quan es permet una variació lliure dels paràmetres per a cada ordre, tenint en compte les restriccions geomètriques (expressió 5.5). S'han estudiat únicament els ordres permesos que no inclouen contribucions importants d'altres periodicitats (especialment proteïna C). Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 5.3. En la figura es mostren les minimitzacions per  $N_{3M} = 50$ ,  $N_{6M} = 48$ ,  $N_{9M} = 41$  i  $N_{15M} = 33$ .



**Figura 5.12.** Variació dels paràmetres que resulten de l'ajustament dels perfils meridionals de les reflexions permeses en l'estat de contracció isomètrica amb l'expressió 5.28, que inclou desordre de segona espècie. *Esquerra*, distàncies d'interferència aparents en funció del nombre aparent de caps en mig sarcòmer  $N_{ap}$ . *Dreta*, distàncies d'interferència aparents  $L_{ap}$  en funció de l'ordre de difracció.

### 5.5.2. Valoració de l'aproximació amb desordre

La introducció dels desordres de segona espècie a l'aproximació teòrica ideal no aporta grans canvis en els valors de les fases del factor d'estructura  $f_l$ , que són l'objectiu de la modelització. En particular, la fase del factor d'estructura obtinguda amb aquesta nova aproximació teòrica s'assembla molt a la mateixa que l'obtinguda amb l'aproximació ideal en tots els ordres, especialment als ordres baixos. Fins i tot als ordres alts, la discrepància en la fase no supera els  $3^\circ$ , exceptuant la reflexió 15M en descans, que té una desviació de  $7^\circ$  o  $8^\circ$ . En tots els casos, com veurem al capítol 5, la influència d'aquests errors en la densitat axial de massa són mínims.

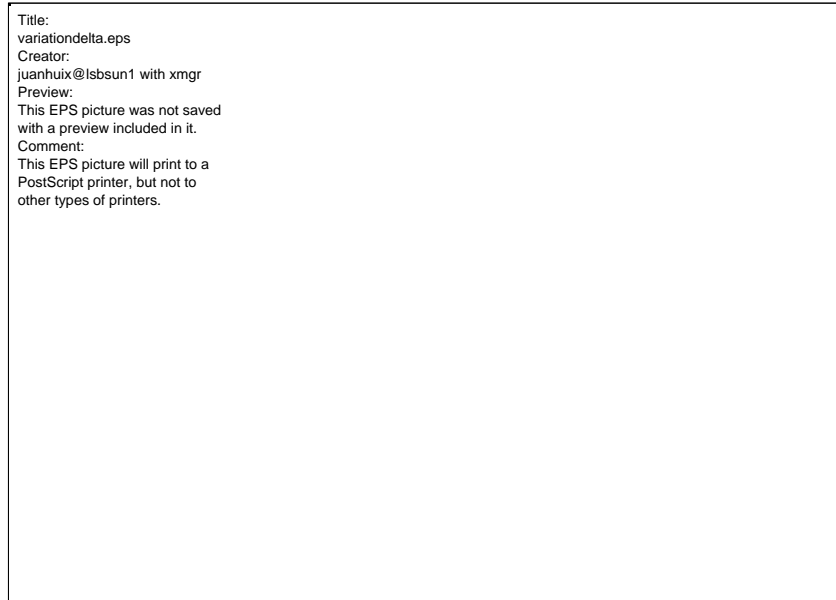
Amb tot, el desordre de segona espècie ha estat introduït per disminuir o, millor encara, anul·lar la variació dels paràmetres  $N_{ap}$  i  $L_{ap}$  en l'ajustament dels diferents ordres. Clarament aquest objectiu no s'aconsegueix només amb la introducció del desordre de segona espècies, perquè, si bé els paràmetres presenten una variació lleugerament menor, encara és molt significativa.

L'anàlisi de la funció d'interferència  $G(Z)$  que inclou els desordres de segona espècie pot explicar perquè els desordres no permeten mantenir constants els valors dels paràmetres. En aquesta funció, quan augmenta la desviació mitjana  $D$ , els pics s'eixamplen a ordres més alts, però la funció d'interferència especular manté els pics a una separació constant (figura 5.13). Per tant, el desordre de segona espècie té l'efecte de disminuir el nombre aparent d'unitats de difracció  $N$  (equivalent a eixamplar el pic de Laue, figura 5.5c) però, en canvi, manté constant la longitud d'interferència  $L$ , ja que la funció d'interferència especular no es veu afectada.

Aquesta, però, no és la situació observada en els perfils meridionals experimentals. Als perfils experimentals i en el model ideal, en canvi, s'observa que els pics se separen (equivalent a disminuir  $L$ ). L'aproximació teòrica no pot explicar la disminució aparent de  $L$  i, per tant, aquest paràmetre s'ha de variar forçant un valor diferent a cada ordre.

Com que físicament cal imposar un lligam entre  $N$  i  $L$  (expressió 5.5), també  $N$  acaba variant d'ordre a ordre, i l'objectiu de mantenir constants els paràmetres no s'assoleix.

Tot i aquests inconvenients, l'efecte del desordre de segona espècie sobre els valors aparents del nombre  $N$  de repeticions i la longitud  $L$  d'interferència serà d'importància en la discussió del tractament teòric complet d'extracció de les fases del factor d'estructura en l'estat de descans (vegeu la secció 6.3).



**Figura 5.13.** Intensitats de difracció experimental i simulades amb l'aproximació teòrica amb desordre de segona espècie de la reflexió 15M en contracció isomètrica per a diferents desviacions mitjanes de la distribució de distàncies  $D$  (expressió 5.20). En augmentar  $D$ , el conjunt de pics té una amplada més gran (equivalent a disminuir  $N$ ), però els pics no canvien de posició (equivalent a mantenir constant  $L$ ). El desordre de segona espècie, per tant, no pot explicar satisfactòriament la variació dels paràmetres observada.

## 5.6. L'aproximació dels caps de miosina amb dispersió de periodicitats

### 5.6.1. Motivació de la correcció

Hem vist en l'anterior capítol que la variació aparent del nombre de caps  $N$  d'un filament gruixut i de la longitud d'interferència  $L$  entre un filament i el seu simètric de l'altra meitat de sarcòmer no és correctament descrita per la inclusió de desordres de segona espècie ni, encara menys, de desordres de primera espècie. Cal, per tant, introduir un altre tipus de modificació a les fórmules 5.14 (aproximació teòrica ideal) o 5.28 (aproximació teòrica amb desordre) capaç d'explicar la disminució de  $N$  i  $L$  observada en aquestes dues aproximacions.

Una possibilitat per a la introducció de canvis, especialment vàlida en l'estat de contracció isomètrica, la motiva el fet que el cap de miosina pot seguir diferents

periodicitats a causa de l'enllaç entre l'actina i la miosina. Mentre la cua del cap de miosina roman lligada a l'esquelet del filament gruixut, el cap està enllaçat amb el filament prim. Donat que les periodicitats dels dos filaments no són múltiples, els dos extrems del cap de miosina poden seguir periodicitats lleugerament diferents.

En l'estat de descans o contracció isotònica, aquest fet pot no tenir tanta rellevància. De totes maneres, s'ha comprovat l'existència d'un enllaç feble, no específic, entre actina i miosina (vegeu el capítol 1) que pot portar igualment a la presència de diferents periodicitats.

Una segona possibilitat, no necessàriament exclouent de l'anterior, que dona peu a incloure modificacions al model és l'agrupació en parells dels caps de miosina. Els dos caps d'un parell poden estar, en un temps donat, en un estat diferent, donat que, per restriccions físiques poden tenir un entorn lleugerament diferent. És imaginable, per tant, que aquests caps no tinguin exactament la mateixa periodicitat.

Amb aquestes motivacions, és plausible modelar els pics de difracció meridionals dels caps de miosina suposant l'existència de dues o més periodicitats en l'estructura que formen els caps de miosina.

### 5.6.2. La intensitat de difracció en l'aproximació amb dispersió de periodicitats

Suposem, de forma general, l'existència de  $P$  periodicitats ideals en el cap de miosina, cadascuna de les quals contribueix a l'amplitud de difracció total amb un pes  $w_j$ . La periodicitat de la  $j$ -èsima contribució és  $(C + jDC)$ , i té una longitud d'interferència de  $L_j = 2b + (N-1)(C + jDC)$ , on  $2b$  és l'amplada de la zona nua (figura 5.2). Amb aquests nous paràmetres, i partint de l'expressió 5.12, l'amplitud de difracció de la  $j$ -èsima periodicitat és

$$F_{M,j}(Z) = F(Z)\omega_j \frac{\sin \pi N(C + j C)Z}{\sin \pi (C + j C)Z} \cos[\pi(2b + (N - 1)(C + j C))Z + \phi(Z)] \quad (5.31)$$

El mòdul  $F(Z)$  i la fase  $f(Z)$  tenen essencialment el mateix significat que en l'expressió en el cas ideal, i representen el mòdul i la fase mitjans del factor d'estructura del parell de caps de miosina. Finalment, la intensitat total que genera tota l'estructura de caps de miosina en el meridià és

$$I_M(Z) = F^2(Z) \sum_{j=-(P-1)/2}^{j=(P-1)/2} \omega_j \frac{\sin \pi N(C + j C)Z}{\sin \pi (C + j C)Z} \cos[\pi(2b + (N - 1)(C + j C))Z + \phi(Z)]^2 \quad (5.32)$$

Naturalment, quan es considera una sola repetició ( $P = 1$ ,  $DC = 0$ ) aquesta intensitat es redueix al cas ideal (expressions 5.12, 5.14). L'expressió 5.32 es pot expressar en forma contínua com

$$I_M(Z) = F^2(Z) \int_0^{\omega(C)} \frac{\sin \pi NCZ}{\sin \pi CZ} \cos [\pi (2b + (N-1)C)Z + \phi(Z)] dC \quad (5.33)$$

La funció  $w(C)$  s'interpreta físicament com la *funció de dispersió de periodicitats* dins de la mateixa estructura. El mòdul  $F$  i la fase  $f$  del factor d'estructura són els valors mitjans de l'estructura que inclou la funció de dispersió. Aquesta funció no es coneix a priori i, per tant, el model ha de ser simplificat.

Cal assenyalar que aquesta aproximació teòrica pot ser interpretada com un conjunt d'aproximacions ideals amb diferents estructures (vegeu la secció 5.2.3), en les quals s'imposa la condició que les periodicitats estiguin equiespaiades i tinguin la mateixa fase del factor d'estructura (la fase mitjana), nombre de repeticions i zona nua  $b$ .

Una primera conseqüència directa de la introducció de diverses periodicitats lleugerament diferents és l'eixamplament del pic total de difracció quan augmentem l'ordre, a causa de la progressiva separació dels pics de Laue de les diferents contribucions. Això és equivalent a una reducció aparent del nombre d'unitats de difracció  $N$ . La longitud d'interferència  $L$ , com veurem en la modelització, també es redueix aparentment, de tal manera que reproduïm els resultats experimentals.

## 5.7. Ajustament de l'aproximació amb dispersió de periodicitats als perfils meridionals

A diferència de l'aproximació teòrica que inclou el desordre de segona espècie, que afegia un sol paràmetre a l'ajustament dels perfils del meridià, l'aproximació teòrica dels caps de miosina amb dispersió de periodicitats suposa la introducció d'un conjunt de paràmetres  $w_j$  en el cas discret, o de la funció de dispersió, en el cas continu. Això suposa una dificultat important, ja que el conjunt de paràmetres o, equivalentment, la funció, no són coneguts, i formen part de les hipòtesis del model. A més, el nivell de soroll de les dades a ordres alts, que són els més sensibles a les possibles diferents periodicitats presents, no en permet la determinació exacta.

Per tot això, escollim el model més senzill possible, únicament amb dues periodicitats d'igual pes ( $P = 2$ ;  $w_{-1/2} = w_{1/2} = 0.5$ ). D'aquesta manera, s'introdueix només un sol paràmetre, la dispersió DC. Per a l'acceptació dels ajustaments s'utilitza el criteri descrit al capítol 3.

### 5.7.1. Ajustament dels ordres permesos

Aplicuem, per tant, l'expressió 5.32 per ajustar els perfils meridionals de les reflexions permeses en l'estat de contracció isomètrica. Com en els casos anteriors, hem aplicat el criteri d'anul·lar la fase de la reflexió 3M per trobar un valor de la zona nua (vegeu la secció 5.3.1.1). En aquest cas també, el valor obtingut de  $2b$  és 152.25 nm.

El resultat de l'ajustament es mostra a la figura 5.14. S'ha convolucionat la intensitat predita per l'aproximació teòrica (expressió 5.32) amb una funció gaussiana de desviació estàndard  $s = 2.3$  píxels, per donar compte de la dimensió vertical del feix de llum sincrotró i de la funció de dispersió de punt del detector. La dispersió de periodicitats obtinguda en l'ajustament és  $DC = 0.036$  nm.

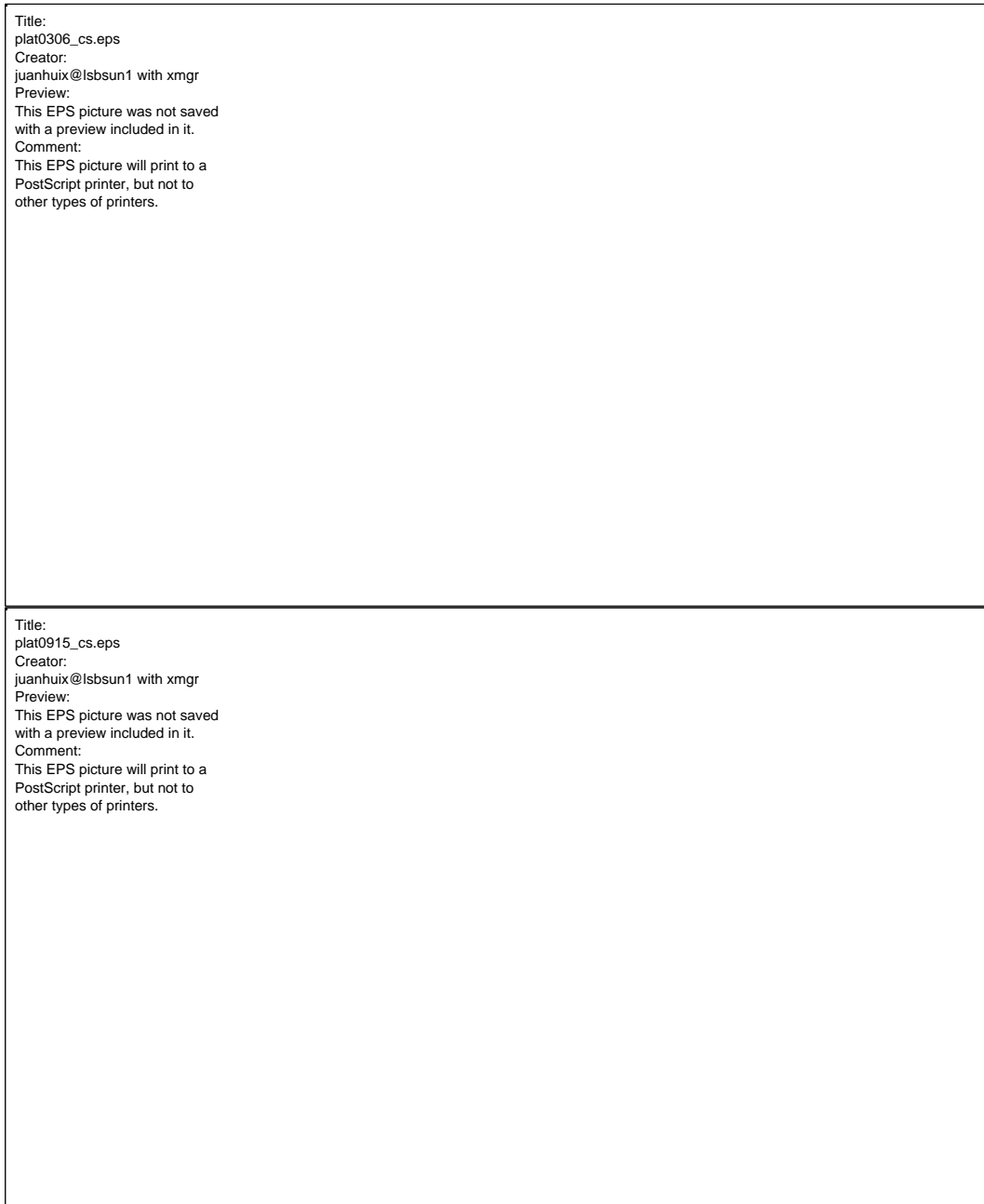
L'aproximació teòrica simple amb dispersió de periodicitats aconsegueix ajustar els perfils meridionals correctament, d'igual manera que les anteriors aproximacions teòriques. A diferència d'aquests, però, els ajusta considerant el mateix nombre d'unitats  $N$  i la mateixa longitud d'interferència  $L$  en tots els ordres (taula 5.3). El model aconsegueix simular l'aparent disminució dels valors de  $N$  i  $L$ , i els dona així un sentit físic coherent.

El rang dels paràmetres  $DC$ ,  $N$  i  $L$  que ajusten els perfils experimentals, segons el criteri estàndard (vegeu el capítol 3), és ample. Quan es permet variar lliurement la dispersió de periodicitats a cada ordre,  $N$  pot variar entre 47 i 50 i, per tant, segons la relació 5.5,  $L$  varia entre 821.55 nm i 865.20 nm. D'altra banda, la dispersió de periodicitats varia entre  $DC = 0.032$  nm i 0.042 nm. Això no obstant, en tots els casos sense excepció, la fase  $f$  en tots els ordres roman constant en un interval de  $2^\circ$ .

**Taula 5.3.** Paràmetres que resulten de la minimització de les reflexions permeses en l'estat de contracció isomètrica, quan es considera una dispersió de dues periodicitats d'igual pes, amb  $DC = 0.036$  nm. S'ha tingut en compte la restricció geomètrica 5.5, i s'ha imposat la condició de fase nul·la per a la reflexió 3M. Hi ha una indeterminació en el nombre d'unitats, fet que provoca diferents solucions per a cada ordre, així com de la fase.

Contracció isomètrica	$N_{ap}$	$L_{ap}$	$f$	
Dispersió de periodicitats		[nm]	[deg]	
3M	50	865.20	0	(180)
6M	50	865.20	76	(-104)
9M	50	865.20	59	(-121)
15M	50	865.20	98	(-82)





**Figura 5.14.** Ajustament dels ordres permesos en l'estat de contracció isomètrica mitjançant un model de dispersió de dues periodicitats d'igual pes (expressió 5.32). S'han estudiat únicament els ordres permesos que no inclouen contribucions importants d'altres periodicitats (especialment proteïna C). Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 5.5.

### 5.7.2. *Valoració de l'aproximació amb dispersió de periodicitats*

L'aproximació teòrica que introdueix una dispersió de periodicitats supera les dificultats que tenien les anteriors aproximacions, l'ideal i la que inclou desordre de segona espècie. L'ajustament de l'aproximació als perfils meridionals en contracció isomètrica és correcta a tots els ordres (figura 5.14), i entra dins del criteri de

l'ajustament (vegeu la secció 3.6.3). A més, manté constants els paràmetres  $N$  i  $L$  amb valors compatibles amb els experiments de microscòpia electrònica [Squire, 1981].

Cal remarcar que aquesta aproximació teòrica és la més simple possible que inclou dispersió de periodicitats, amb dues periodicitats d'igual pes i amb una dispersió de periodicitats de ca. 0.035 nm. Els valors obtinguts per  $N$ ,  $L$  i  $DC$  considerats són els mateixos en els dos estats musculars dintre l'error acceptat en l'ajustament. El possible significat físic d'aquesta dispersió de periodicitats és suggerit més endavant.

Una forma més complexa dels coeficients  $w_j$ , o de la funció  $w(C)$  en el cas continu, podria donar un ajustament encara millor, amb un marge de variació de  $N$ ,  $L$  i  $DC$  inferiors. Aquest refinament, però, topa amb diverses dificultats. En primer lloc, els possibles errors sistemàtics poden ser importants en tots els ordres, així com el soroll de fons a ordres alts.

En segon lloc, no és possible de modelar els coeficients en base a l'estructura, ja que és aquesta, justament, la que s'ha de trobar mitjançant el mòdul i la fase del factor d'estructura. Aquestes aproximacions teòriques més refinades introduirien, simplement, una multitud de paràmetres que emascararien l'ajustament amb justificació física.

En darrer lloc, es demostra que el diagrama de difracció d'un perfil de dispersió continu és dominat per les periodicitats més allunyades de la mitjana, especialment a ordres alts, més sensibles a la dispersió. Per tant, un perfil més complex, o fins i tot continu pot ser reduït amb una certa precisió a un més simple de dues periodicitats situades aproximadament als extrems del perfil original.

## 5.8. Conclusions

### 5.8.1. *Els diferents models extreuen les mateixes fases*

En aquest capítol s'han deduït les expressions que reproduïxen els perfils meridionals de les reflexions dels caps de miosina. A causa de la polaritat del filament gruixut, les expressions depenen de la fase del factor d'estructura, que pot ser utilitzada per la resolució de la densitat axial de massa. Les expressions s'han obtingut considerant tres aproximacions teòriques diferents a l'estructura del filament gruixut.

S'ha considerat primerament una aproximació teòrica ideal (expressió 5.14), amb una disposició ordenada i regular dels caps de miosina. L'ajustament d'aquesta aproximació, malgrat que reproduïx amb gran exactitud els perfils dels pics, dona lloc a variacions aparents del nombre d'unitats i de la longitud d'interferència. Posteriorment, s'ha demostrat que, quan l'aproximació teòrica inclou desordres en la disposició dels caps (expressió 5.28), les dificultats continuen.

Una descripció suficient es troba quan es considera que l'estructura dels caps de miosina inclou una dispersió de periodicitats ideals (expressió 5.32). Quan s'escull la dispersió més simple possible (dues periodicitats ideals d'igual pes), es troba una solució en què els valors dels paràmetres no varien i són compatibles amb d'altres experiments de microscòpia electrònica.

No obstant això, un fet remarcable és que les fases del factor d'estructura de cadascun dels ordres considerats són pràcticament independents de l'aproximació teòrica emprada (taula 5.4). Per tant, la definició exacta de l'aproximació que explica la posició dels caps de miosina no és necessària per a la determinació, fins a un cert nivell de resolució, de la projecció axial, donat que la fase és aproximadament constant. La fase del factor d'estructura d'un cap de miosina en tots els ordres de difracció considerats depèn quasi totalment de la relació d'intensitats entre els pics d'un mateix ordre, i no dels desordres, o de la dispersió de periodicitats dels caps del filament gruixut.

**Taula 5.4.** Taula comparativa de les fases del factor d'estructura dels ordres permesos en l'estat de contracció isomètrica extretes a partir de les 3 aproximacions teòriques considerades.

Contracció isomètrica Ordre de difracció	Fase en el model ideal		Fase en el model amb desordre de 2 <sup>a</sup> espècie		Fase en el model amb dispersió de periodicitats	
$M$	[deg]		[deg]		[deg]	
3M	0	(180)	0	(180)	0	(180)
6M	74	(-106)	73.5	(-106.5)	76	(-104)
9M	67.5	(-112.5)	67.5	(-112.5)	59	(-121)
15M	101	(-79)	109	(-71)	98	(-82)

### 5.8.2. *La presència de dues periodicitats sembla explicar correctament els perfils meridionals*

Com s'ha dit anteriorment, la introducció de dues periodicitats dels caps de miosina porta a una interpretació coherent dels paràmetres de l'aproximació teòrica. La significació física d'aquestes dues periodicitats, però, no és evident, i hi ha, d'entrada, dues possibilitats. Una possibilitat és que les dues periodicitats corresponguin als dos caps de miosina que conformen un parell, els quals podrien tenir un enllaç amb el subfragment S2 i l'esquelet del filament gruixut en posicions no simètriques. Una causa de la diferent posició dels dos caps en un parell pot ser l'empaquetament de les miosines per formar el filament gruixut. Una segona possibilitat, que no exclou l'anterior, és que els altres components del filament gruixut, especialment la proteïna C, tinguin una influència diferent en la situació dels dos caps. Aquestes possibilitats seran explorades més endavant, al capítol 9.

De tota manera, el refinament de la dispersió de periodicitats, malgrat que és possible, comporta grans dificultats: el soroll de fons i els possibles errors sistemàtics; la introducció de molts paràmetres lliures que emmascaren un model intuïtiu, i, finalment, la poca influència que tenen les periodicitats properes a la mitjana en comparació amb els extrems de la distribució de la dispersió.

Una altra raó de fons és que aquest refinament, de fet, no és necessari. L'objectiu de la modelització del meridià, recordem-ho, és l'extracció de les fases en els diferents ordres de difracció meridionals. Quan comparem les fases dels ordres en l'estat de

contracció isomètrica i en descans, extretes utilitzant les tres aproximacions teòriques, observem que són molt similars entre elles (taula 5.4).

### **5.8.3. *L'orientació axial dels caps de miosina ha de ser rígida***

Amb independència de l'aproximació teòrica emprada, una altra observació important és que la disposició dels caps ha de ser bastant rígida, donat que, a la resolució de la reflexió 15M, els efectes d'interferència són encara clarament visibles. Si els moviments asíncrons dels caps de miosina fossin més grans que aproximadament la meitat del límit de resolució, ca. 1.4 nm, la relació de fase entre les unitats de difracció es cancel·laria i la interferència desapareixeria.

Les dades mostren que la reflexió 15M mostra un efecte d'interferència pronunciat que és incompatible amb un moviment axial asíncron significatiu dels caps de miosina associat amb el cicle de ATP. Aquesta important conclusió ja ha estat igualment extreta en d'altres experiments [Martín-Fernández *et al.*, 1994]. De fet, donat que la variabilitat de la repetició axial dels caps de miosina necessària per ajustar els resultats experimentals és molt petita, ca. 0.036 nm, la possible fracció de caps de miosina i/o de massa que realitza aquests moviments asíncrons en contracció isomètrica ha de ser molt petita, o fins i tot nul·la.

## Capítol

# 6

## L'extracció de les fases en l'estat de descans

En aquest capítol s'apliquen les aproximacions teòriques del filament gruixut del capítol anterior per descriure i interpretar el perfil meridional de les línies de difracció dels caps de miosina. L'objectiu és l'extracció de la fase del factor d'estructura dels diferents ordres, que permetrà realitzar la síntesi de Fourier.



## 6.1. Introducció

**A**l capítol anterior s'han desenvolupat tres aproximacions teòriques del filament gruixut (amb caps de miosina ideals, amb desordre espècie i amb dispersió de periodicitats) que permetien descriure el perfil meridional de les línies de difracció en estat de contracció isomètrica. De les tres aproximacions considerades, la que incloïa una dispersió de periodicitats era la que donava uns resultats que tenien significació física, i concordaven amb els experiments.

A més, l'anàlisi del capítol anterior mostrava també que les fases extretes per a cada ordre considerat són molt semblants en totes les aproximacions teòriques, generalment amb diferències d'únicament ca.  $3^\circ$  (taula 5.7), i encara menors als ordres baixos. Aquestes diferències de fases no són determinants per a l'extracció de la densitat axial de massa, ja que la resolució a la que treballem admet un marge d'incertesa més ample. Efectivament, un error de  $3^\circ$  en la determinació de la fase d'un ordre  $l$  donat suposa un desplaçament de  $3^\circ/360^\circ \times C/l$ . Per la 3M, per exemple, el desplaçament és de ca. 1.2 nm, un error inferior al límit de la resolució, que és ca. 2.4 nm. Per a ordres superiors, l'error associat a la incertesa de la fase és encara menor. Per tant, cal concloure que totes les aproximacions teòriques extreuen una fase del factor d'estructura igual dins del límit d'error, fet que permet utilitzar d'ara en endavant l'aproximació ideal en lloc de l'aproximació amb dispersió de periodicitats sense que això suposi una pèrdua de precisió apreciable.

L'ús de l'aproximació teòrica ideal en comptes d'altres aproximacions més complexes, una substitució vàlida com hem vist en contracció isomètrica, és especialment rellevant quan s'aplica a l'estat de descans. El diagrama de difracció en aquest estat presenta un meridià molt més complex que el de contracció isomètrica, amb moltes més línies de difracció, tal com resulta notori, per exemple, en la comparació dels diagrames bidimensionals en els dos estats (figures 4.2 i 4.11). Així, mentre en contracció isomètrica únicament són importants les reflexions permeses, en l'estat de descans, a més, les reflexions *prohibides* (no múltiples de 3) són clarament presents i relativament intenses. Així mateix, a més de ser més nombroses, les línies de difracció en l'estat de descans presenten, en general, una estructura més complexa, amb multitud de pics que no poden provenir únicament de la periodicitat dels caps de miosina (vegeu el capítol 4).

L'objectiu d'aquest capítol és l'extracció de les fases del factor d'estructura de les reflexions meridionals dels caps de miosina en l'estat de descans, mitjançant els models desenvolupats al capítol anterior.

La complexitat del meridià en descans, però, fa que s'estudiï els pics de difracció meridionals en dos passos. D'entrada, s'estudien solament els ordres permesos més baixos, els ordres 3M i 6M, mitjançant el mètode utilitzat al capítol precedent. Aquests ordres s'ajusten a les tres aproximacions teòriques considerades anteriorment (ideal, amb desordre de segona espècie i amb dispersió de periodicitats) amb únicament la contribució dels caps de miosina, sense contribucions d'altres proteïnes. Es comprovarà que les conclusions a què s'ha arribat en l'estudi de l'estat de contracció isomètrica també són vàlides en l'estat de descans.

Posteriorment, en un segon pas, s'abordarà l'extracció de les fases de totes les reflexions, incloses les reflexions prohibides. Aquestes reflexions tenen una gran intensitat en l'estat de descans en comparació amb l'estat de contracció isomètrica, i han de ser inclosos en el model complet de la disposició axial dels caps de miosina. Es

comprovarà que cal introduir noves periodicitats per explicar la forma complexa de les reflexions.

## 6.2. Les fases de les reflexions 3M i 6M

El primer pas cap a la comprensió del meridià en l'estat de descans ha de ser l'anàlisi dels perfils axials dels ordres permesos més baixos, els ordres 3M i 6M. Com comprovarem tot seguit, la modelització d'aquestes reflexions és possible amb una aproximació teòrica que inclou únicament la periodicitat dels caps de miosina.

La modelització d'aquests ordres en l'estat de descans permet, també, la comparació d'aquests amb els resultats equivalents obtinguts en contracció isomètrica. La projecció de massa axial que s'obté amb aquests dos ordres, i obviant tots els intensos ordres prohibits, representa la mitjana de cada tres parells de caps de miosina del factor d'estructura. La projecció és, per tant, plenament comparable a la que s'obté en contracció isomètrica amb els mateixos ordres.

Les reflexions permeses d'ordres superiors, 9M i 12M, són dèbils en comparació amb les reflexions 3M i 6M. La reflexió 9M presenta, a més, diversos pics relativament importants generats per les repeticions de la proteïna C i de la troponina (vegeu el capítol 4). D'acord amb aquestes raons, descartem aquestes dues reflexions en un primer pas, i ens limitem, d'entrada, a les reflexions 3M i 6M.

Igualment, en aquest primer pas també negligim la reflexió 15M atès que, havent descartat les reflexions 9M i la 12M, no té sentit en la síntesi de Fourier. Malgrat tot, la reflexió 15M és analitzada igualment atesa la sensibilitat que té en alguns paràmetres de les aproximacions teòriques que considerem.

L'acotament dels paràmetres en l'estudi de les reflexions 3M, 6M, i la 15M segueix el mateix mètode emprat en el capítol anterior en el cas dels ordres permesos en l'estat de contracció isomètrica. D'entrada, l'aproximació teòrica ideal s'ajusta a les dades experimentals, i es comprova que hi ha una variació anòmala del nombre aparent d'unitats de difracció i de la longitud d'interferència entre extrems del sarcòmer. Posteriorment, s'analitza la possibilitat que aquesta variació sigui produïda per un desordre axial de segona espècie, o bé per una dispersió de periodicitats. Anàlogament al cas de contracció isomètrica, els resultats mostraran que, aparentment, aquesta darrera possibilitat dona uns valors dels paràmetres més ajustats a una interpretació física.

### 6.2.1. Aproximació teòrica ideal

Per a l'estat de contracció isomètrica, a la secció 5.2, s'ha elaborat una aproximació teòrica ideal dels caps de miosina que, amb la única suposició de la periodicitat i la simetria especular d'aquests, permet extreure la fase del factor d'estructura de les reflexions generen. Aquestes suposicions es compleixen plenament en l'estat de descans i, per tant, la mateixa aproximació teòrica és aplicable a les reflexions meridionals extretes amb aquest estat muscular. En el cas ideal, on es considera que hi ha una sola estructura sense desordres de cap tipus, aquesta expressió és (expressió 5.14),



$$I_M(Z) = F^2(Z) \frac{\sin \pi N C Z}{\sin \pi C Z}^2 \cos^2 [\pi L Z + \phi(Z)] , \quad (6.1)$$

on  $C$  i  $N$  són la periodicitat i el nombre de caps de miosina d'un filament gruixut.  $L$  és la longitud d'interferència entre els filaments gruixuts simètrics a ambdós costats de la línia  $M$ , i compleix la relació geomètrica 5.5, és a dir,

$$L = 2b + C(N - 1) , \quad (6.2)$$

on  $2b$  és la longitud de la *zona nua* (*bare zone*) (figura 5.1). Per la seva banda,  $F(Z)$  i  $f(Z)$  són el mòdul i la fase del factor d'estructura de l'ordre  $l$ , situat a una coordenada axial  $Z = l/C$ .

L'expressió 6.1 és aplicable a cada ordre per separat, tot mantenint la mateixa periodicitat  $C$  i la relació geomètrica 6.2, de tal manera que es pot extreure la fase a cada ordre analitzat. Aquestes fases es podran incloure a la síntesi de Fourier (expressió 5.4) sempre i quan s'esculli un mateix origen de fases per a tots els ordres. En aquest primer pas en l'estudi del meridià en descans, el procediment és el mateix que l'emprat en contracció isomètrica: tot mantenint nul·la la fase de la reflexió  $3M$ , es varia, entre ca. 150 i 160 nm, la longitud de la zona nua  $2b$  de tal manera que el model ajusti les dades experimentals (secció 5.3.2). Posteriorment, als ordres restants, aquesta longitud queda fixada, i l'ajustament es realitza variant la fase. Amb aquest procediment, la longitud de la zona nua que resulta de l'ajustament de la reflexió  $3M$  és

$$2b = 159.35 \text{ nm} . \quad (6.3)$$

Cal remarcar que aquesta no és una mesura precisa de la zona nua, sinó el valor que resulta del procediment de l'elecció de l'origen de fases. El valor real pot estar comprès en un interval entre  $2b - C$  i  $2b + C$ .

La influència dels diferents paràmetres que intervenen en l'expressió 6.1 és descrita al capítol anterior. En particular, convé recordar que hi ha una indeterminació en el signe de la funció d'interferència especular (el factor cosinus de l'expressió 6.1) que genera, al seu torn, una indeterminació en  $p$  en la fase  $f$  extreta (vegeu la secció 5.2.3.3). Així, el model no pot distingir entre les fases  $f$  i  $f + p$  i, per tant, la indeterminació ha de ser resolta altrament (vegeu el capítol 9).

Una altra indeterminació es dona en la longitud d'interferència  $L$ . Quan aquesta varia en un múltiple de la distància  $C$ , la funció d'interferència especular pràcticament no canvia i, per tant, l'ajustament es manté en el mínim. De tota manera, una longitud d'interferència  $L$  massa gran o massa petita provoca que la separació entre pics sigui massa petita o massa gran, respectivament. Així, aquests factors, la relació d'intensitats entre pics del mateix ordre i la separació entre ells, donen peu a què les dades experimentals s'ajustin a uns pocs valors diferents de  $L$  o, de manera equivalent per la relació 6.2, a uns pocs valors del nombre  $N$  d'unitats de difracció. La variació discreta del paràmetre  $N$  impedeix ajustar unívocament les dades experimentals i, per tant, aquests diferents valors de  $L$  i  $N$ , en general dos valors, són igualment vàlids a efectes de l'ajustament.

### 6.2.1.1. Resultat de l'ajustament

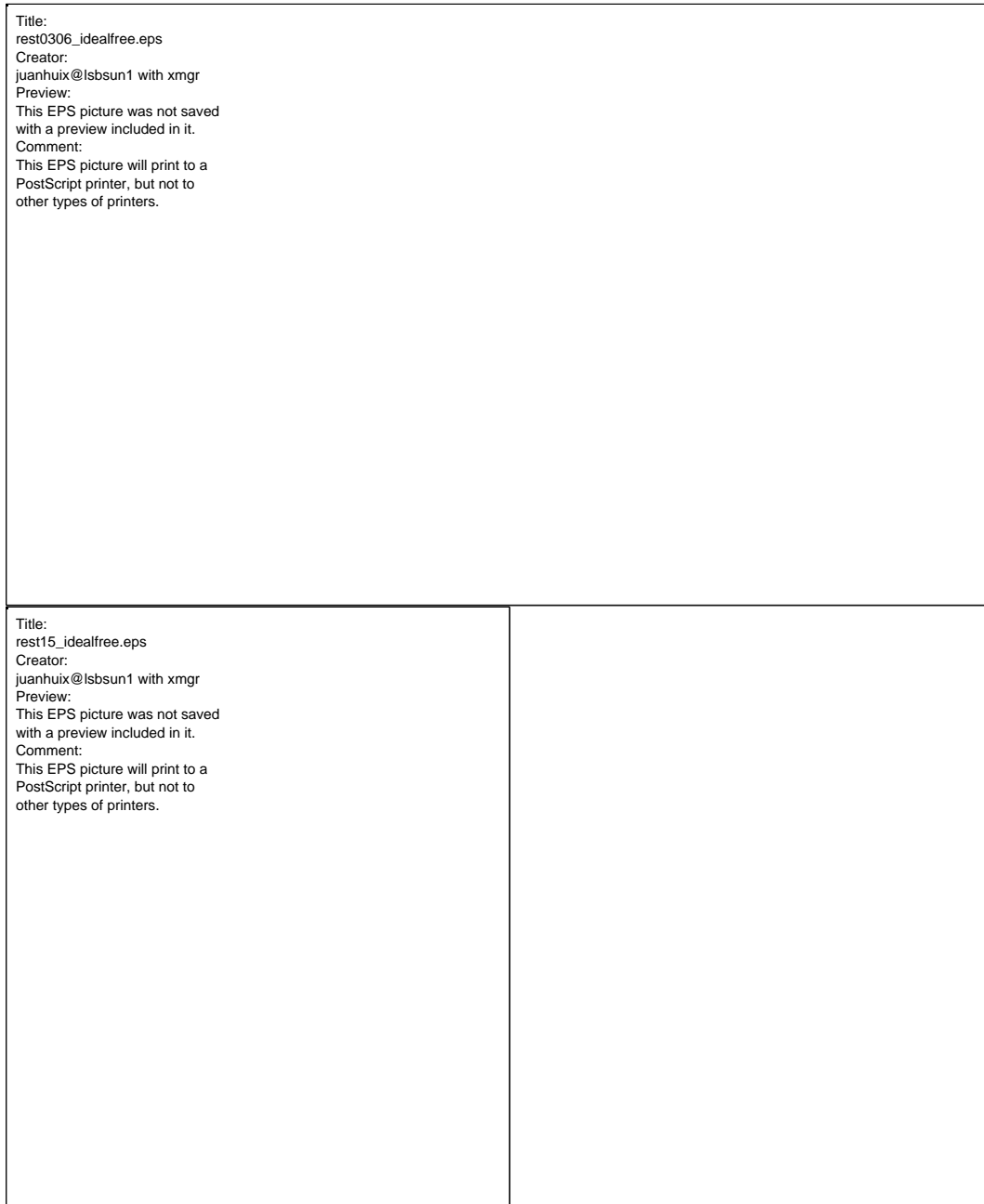
L'ajustament dels diferents ordres, després del procediment de definició de fases descrit, es realitza variant  $N$  i  $L$ ,  $f$  i el factor d'escala  $F$ , amb la restricció geomètrica que imposa la condició 6.1. La periodicitat  $C$  és fixada a 14.3173 nm (vegeu el capítol 4). Com que es permet la variació de  $N$  i  $L$  entre ordres, els valors d'aquests paràmetres que resulten de l'ajustament són els valors aparents,  $N_{ap}$  i  $L_{ap}$ . Amb aquestes condicions es realitza l'ajustament, el resultat del qual es mostra a la figura 6.1. Els paràmetres òptims de l'ajustament es llisten a la taula 6.1.

**Taula 6.1.** Paràmetres de les reflexions permeses en l'estat de descans que resulten de l'ajustament de les dades experimentals a l'aproximació teòrica ideal. Hi ha una indeterminació en el nombre d'unitats, fet que provoca diferents solucions de  $N_{ap}$ ,  $L_{ap}$  i  $f$  per a cada ordre. A més, la fase  $f$  del factor d'estructura té la indeterminació en  $p$  que genera dues opcions d'aquesta, 0 i  $p$  (la segona opció figura entre parèntesis). La longitud de la zona nua  $2b$  es manté al valor en descans i s'imposa la relació geomètrica dels paràmetres (expressió 6.2).

Estat de descans	$N_{ap}$	$L_{ap}$	$f$	
Aproximació ideal		[nm]	[deg]	
3M	48	832.313	0	(180)
	47	817.946	0	(180)
6M	44	775.044	25.2	(-156)
	43	760.677	25	(-156)
15M	37	674.773	137	(-43)
	36	660.455	137	(-43)
	35	646.138	137	(-43)

El resultat de l'ajustament, exceptuant el valor de la fase de la 6M, és similar al de l'estat de contracció isomètrica. Per a cada reflexió hi ha dos ajustaments òptims, donada la variació discreta de  $N_{ap}$  i el soroll de fons.

Els paràmetres  $N_{ap}$  i  $L_{ap}$ , a l'igual que en contracció isomètrica, tenen diferents valors en les dues reflexions, menors a ordres alts (figura 6.2). La diferència es pot considerar significativa, però, en canvi, no pot ser física, donat que, òbviament, tots els ordres han de tenir els mateixos valors del nombre de caps i la longitud d'interferència. Aquesta disminució aparent de  $N$  i  $L$  sembla ser causada bé per una progressiva pèrdua de coherència dels caps de miosina a mesura que s'allunyen del centre del filament, o bé per una dispersió en les periodicitats dels parells de caps de miosina. Seguint l'esquema argumentatiu del capítol anterior, per sortir de l'atzucac s'estudien a continuació dues aproximacions teòriques a la disposició dels caps de miosina que poden explicar aquest efecte.



**Figura 6.1.** Minimització dels ordres permesos en l'estat de descans dels ordres 3M, 6M i 15M amb l'aproximació teòrica ideal (expressió 6.1) quan es permet una variació lliure dels paràmetres per a cada ordre, tenint en compte la restricció geomètrica (expressió 6.2). S'han estudiat únicament els ordres permesos que no inclouen contribucions importants d'altres periodicitats (especialment proteïna C). Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 6.1. En la figura es mostren les minimitzacions per  $N_{3M} = 48$ ,  $N_{6M} = 44$  i  $N_{15M} = 38$ .



**Figura 6.2.** Variació dels paràmetres que resulten de l'ajustament, mitjançant les tres aproximacions teòriques considerades, dels perfils meridionals de les reflexions permeses en l'estat de descans. (*dreta*) Distàncies d'interferència aparents  $L_{ap}$  en funció de l'ordre de difracció. (*esquerra*) Distàncies d'interferència aparents en funció del nombre aparent de caps en mig sarcòmer  $N_{ap}$ . Únicament l'aproximació que considera una dispersió de periodicitats dels caps de miosina dona resultats coherents ( $N_{ap}$  i  $L_{ap}$  constants) en tots els ordres de difracció

### 6.2.2. *L'aproximació teòrica dels caps de miosina amb desordre*

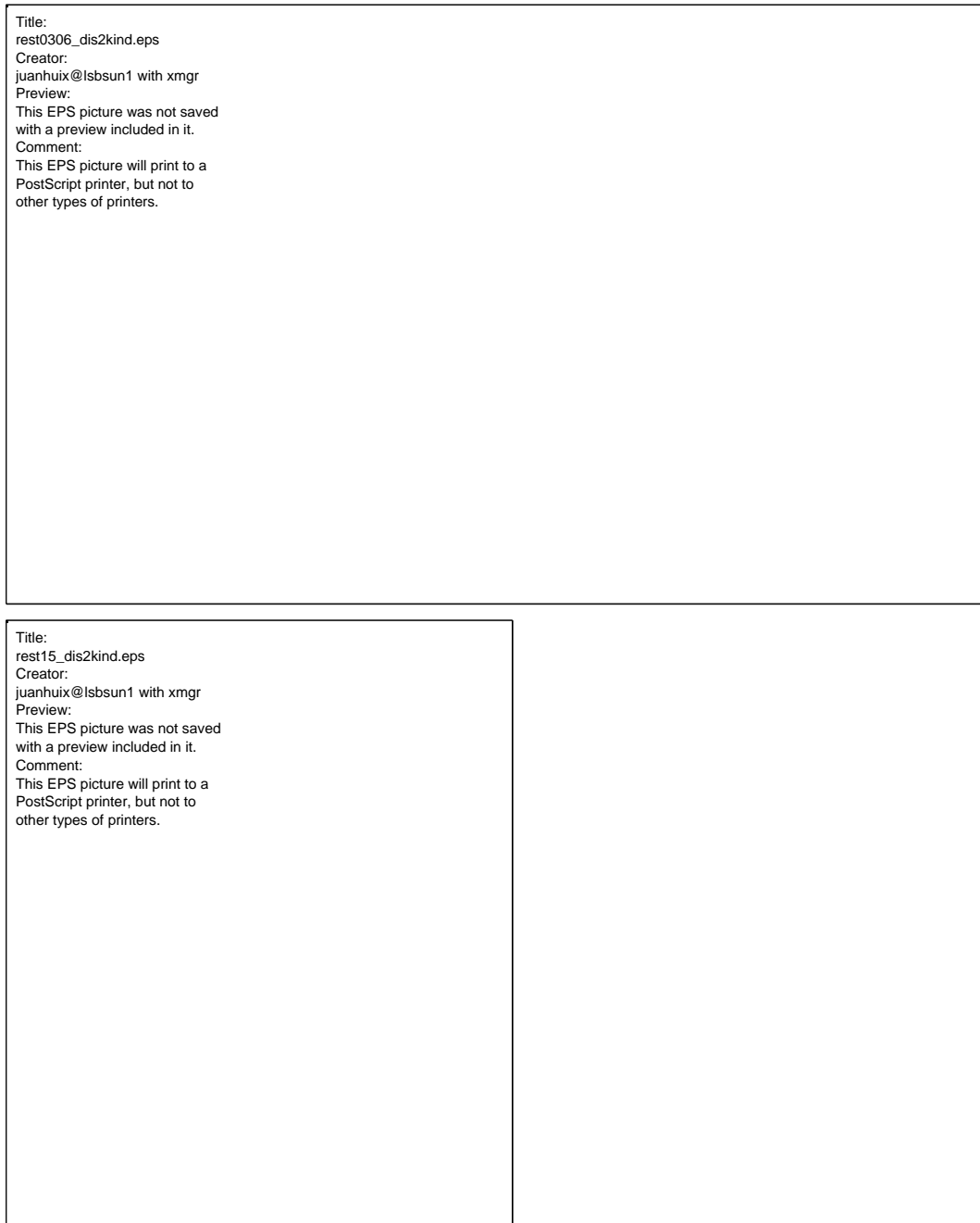
El desordre de segona espècie axial dóna peu a una extensió de l'aproximació teòrica ideal (expressió 5.28) que ha d'aconseguir reproduir els perfils meridionals tot mantenint constants el nombre d'unitats i la longitud d'interferència (vegeu la secció 5.4). Cal dir que aquesta aproximació teòrica ha resultat ineficaç en contracció isomètrica, però encara cal provar-ne la validesa en l'estat de descans.

A aquest efecte, s'ajusta l'expressió 5.28, que descriu el perfil axial de les línies de difracció en presència de desordres de segona espècie en la distribució dels caps de miosina, als perfils axials de les línies 3M, 6M i 15M. L'ordre 15M és necessari per trobar un valor realista de la desviació mitjana  $D$  de la distància al veí més proper. Aquest ordre té una gran sensibilitat a aquest paràmetre, mentre que els ordres 3M i 6M en tenen poca. L'ajustament dels ordres més baixos solament pot donar un valor òptim de la desviació que no és real i, per tant, cal realitzar igualment l'ajustament de la reflexió 15M.

D'altra banda, l'origen de fases dels diferents ordres es determina de la mateixa manera que en el model ideal, a partir de la fase nul·la de la reflexió 3M i la imposició que la longitud de la zona nua estigui compresa entre 150 nm i 160 nm (secció 5.3).

### 6.2.2.1. Resultat de l'ajustament

El procés de determinació de l'origen de fases pel mètode descrit anteriorment porta a una longitud de la zona nua  $2b$  de 159.35 nm, la mateixa que en el model ideal. Amb aquest valor, i aplicant l'expressió 5.28, s'ajusten els ordres permesos considerats, 3M, 6M i 15M, que es mostren a la figura 6.3. Els paràmetres que donen peu a aquest ajustament es llisten a la taula 6.2.



**Figura 6.3.** Minimització dels ordres permesos 3M, 6M i 15M en l'estat de descans amb l'aproximació teòrica que inclou desordres de segona espècie en la disposició dels caps de miosina (expressió 5.28) quan es permet una variació lliure dels paràmetres per a cada ordre. Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 6.2. En la figura es mostren les minimitzacions per  $N_{3M} = 47$ ,  $N_{6M} = 44$  i  $N_{15M} = 38$ .

Igualment al que succeïa en el cas ideal, i en tots els casos en contracció isomètrica, persisteix la indeterminació en  $p$  de la fase, així com els canvis en  $C$  de la longitud d'interferència  $L$ .

L'ajustament de l'ordre 15M en aquest model resulta del tot necessari donada la gran sensibilitat que té amb la desviació  $D$  de la distància entre veïns propers, a diferència dels ordres 3M i 6M. Aquest ordre imposa un valor màxim de la desviació de  $D < \text{ca. } 0.12 \text{ nm}$ , per sobre del qual en el model apareixen pics laterals no detectats en les dades experimentals.

**Taula 6.2.** Paràmetres de les reflexions permeses en l'estat de descans que resulten de l'ajustament de les dades experimentals a l'aproximació teòrica que inclou desordre de segona espècie (expressió 5.28). Hi ha una indeterminació en el nombre d'unitats, fet que provoca diferents solucions de  $N_{ap}$ ,  $L_{ap}$  i  $f$  per a cada ordre. A més, la fase  $f$  del factor d'estructura té la indeterminació en  $p$  que genera dues opcions d'aquesta, o i  $p$  (la segona opció entre parèntesis). Es manté la longitud de la zona nua  $2b$  al valor en descans i s'imposa la relació geomètrica dels paràmetres (expressió 6.2).

Estat de descans	$N_{ap}$	$L_{ap}$	$f$	
Aproximació amb desordre		[nm]	[deg]	
3M	48	832.26	0	(180)
	47	817.90	0	(180)
6M	44	774.99	24	(-156)
	43	760.68	24	(-156)
15M	39	703.40	131	(-49)
	38	689.09	131	(-49)
	37	674.77	131	(-49)

### 6.2.2.2. Valoració de l'aproximació teòrica

Els resultats de l'aproximació teòrica que inclou un desordre de segona espècie en l'estat de descans són anàlegs als obtinguts en contracció isomètrica, mostrats al capítol precedent. Malgrat que, amb la inclusió del desordre de segona espècie, els paràmetres  $N$  i  $L$  presenten menys variació entre ordres amb aquesta nova aproximació teòrica, la variació que tenen és encara molt significativa (figura 6.2). Per tant, donat que aquests paràmetres ha de ser constants, si bé el desordre de segona espècie podria explicar part de la variació aparent del nombre d'unitats i la longitud d'interferència, l'efecte observat ha de tenir un altre origen.

Igualment a l'estat de contracció isomètrica, el desordre de segona espècie té l'efecte d'eixamplar l'envolupant dels pics, però no de separar-los entre ells (vegeu la secció 5.5.2). Aquest efecte és equivalent a una disminució del nombre d'unitats  $N$  (paràmetre responsable de l'amplada de l'envolupant) i al manteniment de  $L$  (paràmetre responsable de la separació entre pics).

Amb tot, a les dades experimentals s'observa una progressiva separació dels pics que es reflexa en el model ideal en una disminució del valor de  $L$ . Atès que el desordre no pot explicar aquesta aparent disminució de la longitud d'interferència, aquest

paràmetre s'ha de variar forçant un valor diferent a cada ordre que, a causa de la restricció geomètrica 6.2, també fa variar el nombre d'unitats  $N$ . Com a resultat, el desordre de segona espècie no aconsegueix el propòsit de mantenir els dos paràmetres constants per a tots els ordres.

Malgrat tot, convé ressaltar que la presència de desordre de segona espècie no afecta significativament les fases del factor d'estructura, d'igual manera a l'estat de contracció isomètrica estudiat al capítol anterior. Per tant, a efectes de l'extracció de les fases dels diferents ordres permesos, que és l'objectiu de la modelització, el possible ordre de segona espècie es pot negligir.

Puntualitzem finalment que en els ordres permesos la situació és diferent, com veurem a la secció 6.3. En aquests es dona justament la situació descrita en el cas de desordre de segona espècie, en què la longitud d'interferència aparent es manté constant mentre que el nombre d'unitats sembla disminuir amb l'ordre

### 6.2.3. L'aproximació teòrica amb dispersió de periodicitats

Una altra aproximació teòrica diferent a l'estructura dels caps de miosina, no necessàriament exclouent amb el desordre de segona espècie estudiat en la secció anterior, és la dispersió de periodicitats dels caps de miosina (vegeu la secció 5.7). Aquesta tercera aproximació teòrica pot explicar la variació del nombre aparent d'unitats de difracció  $N_{ap}$  i de la longitud aparent d'interferència  $L_{ap}$ . En lloc d'una sola periodicitat, aquesta aproximació suposa una distribució de periodicitats lleugerament diferents que provocaria l'eixamplament dels pics a mesura que s'augmenta l'ordre. Suposant la distribució més senzilla possible, amb només dues periodicitats d'igual pes, el perfil axial de la intensitat de les línies de difracció és (expressió 5.32)

$$I_M(Z) = F^2(Z) \frac{1}{2} \frac{\sin \pi N(C + j - C)Z}{\sin \pi (C + j - C)Z} \cos[\pi (2b + (N - 1)(C + j - C)Z) + \phi(Z)]^2 \quad (6.4)$$

$j = -1/2, 1/2$

La determinació de l'origen de les fases es realitza de la mateixa manera que en tots els casos anteriors, a partir de fixar a zero la fase de la reflexió 3M, i variar la longitud de la zona nua  $2b$  fins que l'aproximació teòrica es pot ajustar a les dades experimentals.

Cal remarcar que, encara que s'introdueixin diferents periodicitats, per construcció de l'expressió 6.4, la fase extreta  $f(l/C)$  prové d'un únic factor d'estructura, que correspon a un parell de caps de miosina sencer. En la secció 6.3 s'estudiarà una aproximació teòrica més completa on les dues periodicitats són tractades independentment, permetent que el mòdul i la fase del factor d'estructura puguin ser diferents. De tota manera, la suposició d'una fase i un mòdul comuns no afecta l'objectiu d'aquesta modelització d'extracció d'un mapa axial de densitat electrònica simplificat per a l'estat de descans.

### 6.2.3.1. Resultat de l'ajustament

El resultat de l'ajustament dels ordres 3M, 6M i 15M després de situar l'origen de fases de la manera descrita als anteriors casos, i aplicant l'expressió 6.4, es mostra a la figura 6.4. Els paràmetres que resulten d'aquesta optimització estan llistats a la taula 6.3.

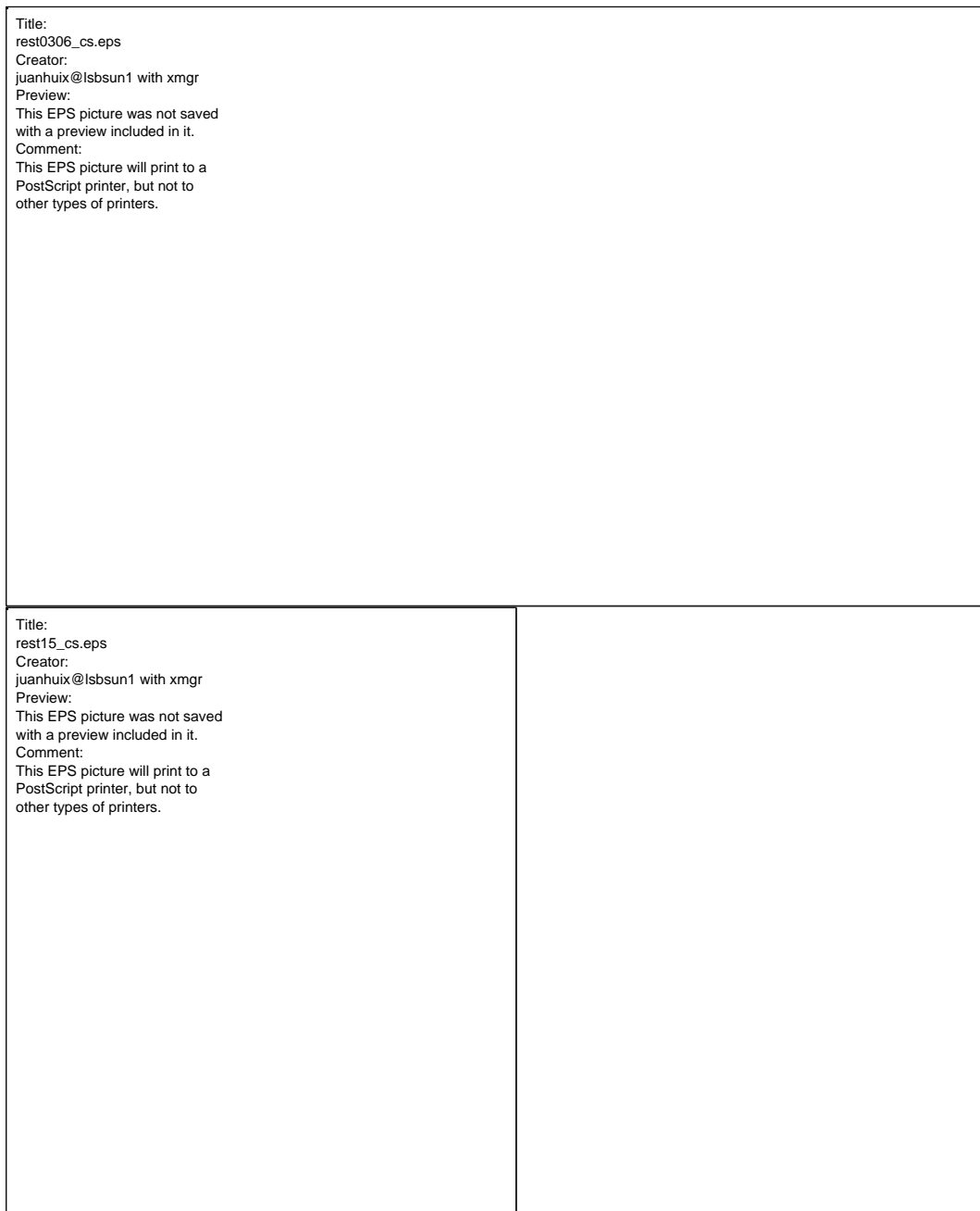
D'igual manera que el paràmetre  $D$  en l'aproximació teòrica anterior que inclou desordres de segona espècie, el paràmetre de la dispersió  $DC$  és acotat per la reflexió 15M, que imposa un valor màxim  $DC < \text{ca. } 0.04 \text{ nm}$  i un valor òptim de ca.  $0.034 \text{ nm}$ .

L'aspecte més destacat de l'ajustament és que els valors del nombre aparent d'unitats i de la longitud aparent d'interferència no disminueixen significativament amb l'ordre (figura 6.2), a pesar d'haver-ne permès la variació lliure a cada ordre. És remarcable que la reflexió 3M i 15M tenen un nombre òptim d'unitats de difracció de  $N = 47$ , mentre que la reflexió 6M el valor és lleugerament inferior, possiblement a causa de la influència de les reflexions que provenen d'altres components del sarcòmer, com ara l'ordre 9 del col·lagen muscular (figura 4.2).

**Taula 6.3.** Paràmetres que resulten de la minimització de les reflexions permeses en l'estat de descans, quan es considera una dispersió de dues periodicitats d'igual pes, amb  $DC = 0.034 \text{ nm}$ . Hi ha una indeterminació de  $180^\circ$  en la fase.

Estat de descans	$N_{ap}$	$L_{ap}$	$f$	
Dispersió de periodicitats		[nm]	[deg]	
3M	47	818.046	0	(180)
6M	45	789.411	23.8	(-157.2)
	44	775.094	23.6	(-157.4)
15M	47	818.046	134	(-46)





**Figura 6.4.** Ajustament dels ordres permesos 3M, 6M i 15M en l'estat de descans mitjançant l'aproximació teòrica que inclou una dispersió de dues periodicitats d'igual pes en la disposició dels caps de miosina (expressió 6.4). Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 6.3.

### 6.2.3.2. Valoració de l'aproximació teòrica

L'aproximació teòrica que inclou una dispersió de periodicitats dels caps de miosina sembla superar el problema de la variació del nombre aparent d'unitats de difracció i de la longitud aparent d'interferència que plantejava l'aproximació ideal, i que l'aproximació que introdueix desordre de segona espècie en la periodicitat dels caps de miosina no podia resoldre satisfactòriament. Amb una dispersió de periodicitats, els dos paràmetres es mantenen dins dels límits que fixen els experiments de microscòpia electrònica [Craig i Offer, 1976b; Squire, 1981].

La interpretació física d'aquesta dispersió de periodicitats no és clara. El fet que l'ajustament sigui possible amb només dues periodicitats fa pensar que cada periodicitat podria correspondre a un cap de miosina que forma un parell. També és possible la interpretació que una periodicitat correspon a la cua dels caps de miosina, mentre que l'altra correspon al domini motor del cap, més allunyat de l'esquelet del filament gruixut, si bé aquesta interpretació és veu desafavorida pels valors similars de la dispersió de periodicitats en descans i en contracció isomètrica, ca. 0.036 nm i ca. 0.034 nm, respectivament.

De tota manera, si bé la diferència entre aquests dos valors de les dispersions no és molt significativa, és remarcable que les dispersions en l'estat de descans siguin sistemàticament inferiors a les de contracció isomètrica. Això podria indicar que la dispersió té l'origen en l'estructura del filament gruixut, més que en les interaccions entre els caps de miosina i el filament prim, que, evidentment, tenen grans canvis entre els dos estats musculars. La semblança dels valors, per tant, podria indicar que les dues periodicitats corresponen als dos caps de miosina que conformen un parell, els quals podrien tenir un enllaç amb el subfragment S2 i l'esquelet del filament gruixut en posicions no simètriques. Una causa de la diferent posició dels dos caps en un parell pot ser l'empaquetament de les molècules de miosina per formar el filament gruixut. Una altra explicació, no excloent de l'anterior, és que els altres components del filament gruixut, especialment la proteïna C, tinguin una influència diferent en la situació dels dos caps.

Amb tot, cal mantenir la reserva sobre l'existència real d'aquesta dispersió de periodicitats dels caps de miosina al filament gruixut. D'una banda, el petit valor que pren la dispersió pot no ser significatiu, o ser una mitjana de diferents alteracions que poden presentar els caps de miosina en un filament gruixut [Yagi *et al.*, 1981; Squire *et al.*, 1982; Malinchik *et al.*, 1992]. D'altra banda, en la literatura no hi ha, fins a data d'avui, registre d'aquesta lleugera dispersió sistemàtica de les periodicitats dels caps de miosina.

#### 6.2.4. Conclusions

Les conclusions de la modelització dels ordres permesos en l'estat de descans són molt similars a les de la modelització dels ordres 3M, 6M, 9M i 15M en l'estat de contracció isomètrica. Això fa més fàcil la comparació dels dos estats musculars, si bé cal tenir present que, havent negligit fins ara els ordres prohibits, en l'estat de descans la densitat axial de massa que s'extreu representa únicament una mitjana de tres parells de caps de miosina.

Una primera conclusió remarcable de l'estudi en l'estat de descans és el fet que en les tres reflexions estudiades, la 3M, 6M i 15M, totes les aproximacions teòriques ajusten correctament les dades experimentals amb tan sols una sola periodicitat  $C$  de 14.3173 nm, que correspon a la dels parells de caps de miosina. Aquesta situació afavoreix, altra vegada, la comparació dels dos estats, i contrasta amb la situació als ordres prohibits que s'exposarà més endavant.

L'ajustament de les dades experimentals amb l'aproximació ideal, la més senzilla i amb menys paràmetres, és força acurat, però inclou una disminució no esperada dels valors del nombre aparent  $N_{ap}$  d'unitats de difracció i de la longitud aparent  $L_{ap}$  d'interferència. S'han considerat les dues explicacions no necessàriament excloents, exposades ja al capítol anterior per l'estat de contracció isomètrica, d'aquesta disminució dels paràmetres. D'una banda, s'ha proposat una aproximació teòrica

consistent en què la periodicitat dels caps de miosina inclou un desordre axial de segona espècie. Malgrat tot, l'efecte de la disminució de  $N_{ap}$  i  $L_{ap}$  persisteix a pesar de la introducció del desordre.

D'altra banda, una segona aproximació teòrica pretén explicar la disminució del valor dels paràmetres a partir d'una dispersió de periodicitats. Suposant solament dues periodicitats d'igual pes i separades ca. 0.034 nm s'aconsegueix reproduir acuradament les dades experimentals sense recórrer a la disminució dels paràmetres amb l'ordre. Amb tot, la interpretació física d'aquesta dispersió de periodicitats és dubtosa i, per tant, cal més evidència experimental per concloure la presència efectiva d'aquesta en la periodicitat dels parells de caps de miosina

Malgrat aquesta prudència necessària, una segona conclusió important que s'extreu dels diferents ajustaments dels ordres permesos en l'estat de descans és que la fase dels diferents ordres és pràcticament insensible a l'aproximació teòrica considerada, anàlogament a la situació vista en l'anterior capítol en el cas de l'estat de contracció isomètrica (taula 6.4). L'extracció de la fase del factor d'estructura és, de fet, l'objectiu d'aquesta modelització i, per tant, a efectes de la síntesi de Fourier que ha de donar la projecció axial de massa, l'elecció de l'aproximació no és determinant. Aquesta conclusió té rellevància en la modelització, que segueix a continuació, dels ordres prohibits en l'estat de descans, ja que aquests inclouen altres periodicitats que, pel seu espaiat diferent, no poden provenir dels caps de miosina. Per simplificar el càlcul en aquest estat, per tant, podrem utilitzar l'aproximació teòrica ideal.

**Taula 6.4.** Taula comparativa de les fases dels ordres permesos en els estats de contracció isomètrica i descans extretes a partir de les 3 aproximacions teòriques considerades. Les fases en l'estat de contracció isomètrica són les de les taules 5.1, 5.2 i 5.3.

Ordre de difracció	Fase amb l'aproximació ideal		Fase amb l'aproximació que inclou desordre de 2ª espècie		Fase amb l'aproximació que inclou dispersió de periodicitats	
	$M$	[deg]	$M$	[deg]	$M$	[deg]
<b>Contracció isomètrica</b>						
3M	0	(180)	0	(180)	0	(180)
6M	74	(-106)	73.5	(-106.5)	76	(-104)
9M	67.5	(-112.5)	67.5	(-112.5)	59	(-121)
15M	101	(-79)	109	(-71)	98	(-82)
<b>Descans</b>						
3M	0	(180)	0	(180)	0	(180)
6M	25	(-155)	24	(-156)	23.5	(-156.5)
15M	137	(-43)	131	(-49)	134	(-46)

Finalment, cal destacar que la diferència de fases entre la reflexió 6M i la 3M és distinta en els dos estats musculars. Mentre que en contracció isomètrica la diferència de fase voreja els 75°, en descans la diferència és ca. 24°. Aquests ca. 50° de diferència entre els dos estats comportarà canvis significatius en la projecció axial de massa (vegeu el capítol 9).

## 6.3. Modelització de tots els perfils meridionals en descans

### 6.3.1. L'aproximació ideal és adequada per a la modelització

Tal com s'ha remarcat al capítol 4, el perfil meridional de les línies de difracció, tant permeses com prohibides, en l'estat de descans és molt complex, amb una gran quantitat de pics de difracció, fet que dificulta la seva modelització i l'extracció de la fase del factor d'estructura.

Els perfils meridionals presenten una multitud de pics que, per l'espaiat, no poden correspondre a la periodicitat dels caps de miosina. A més dels caps, hi contribueixen altres proteïnes, en particular la proteïna C i la troponina, amb una estructura prou regular com per originar difracció (vegeu el capítol 4). Com es veu en aquesta secció, totes aquestes repeticions hauran de ser tingudes en compte en la modelització del meridià  $i$ , a més, caldrà modelar dues noves periodicitats per explicar correctament els perfils meridionals d'algunes reflexions prohibides, en especial, les d'ordre més baix.

La presència de diverses periodicitats que contribueixen a la intensitat total dels perfils meridionals porta a que no sigui possible la inclusió de desordres de segona espècie, ni tampoc una dispersió de periodicitats per a cada contribució. En el primer cas, la inclusió de desordre, hi ha un impediment fonamental, donat que no és possible calcular la funció de disposició  $B_i(Z)$  per a cada contribució (vegeu la secció 5.4.2.3). En el segon cas, la dispersió de periodicitats, el nombre de periodicitats augmenta molt, mentre que la seva significació física no és clara, fet que impedeix arribar a un resultat inequívoc. Per tant, per evitar l'atzucac a què ens aboquen aquestes aproximacions, cal emprar en la modelització l'aproximació ideal, desenvolupada a la secció 5.2.

Ultra els impediments de les altres aproximacions, la senzillesa de l'aproximació ideal no impedeix l'extracció precisa de les fases del factor d'estructura. L'aproximació teòrica ideal assumeix la presència en el sarcòmer, de diverses estructures periòdiques i sense desordre, amb un centre de simetria especular. Com s'ha demostrat per les reflexions permeses en contracció isomètrica (vegeu la secció 5.8.1) i en descans (vegeu la secció 6.2.4), els valors d'aquestes no varien significativament entre els models considerats. De fet, en considerar diverses periodicitats, la dispersió de periodicitats pot ser inclosa en l'aproximació ideal, tal com es comprovarà tot seguit.

L'aproximació ideal permet trobar una amplitud de difracció per a cada periodicitat  $i$  i per a cada ordre  $l$  (expressió 5.12) que depèn de la repetició  $C_i$ , el nombre de repeticions en un extrem del filament  $N_i$ , la longitud d'interferència entre els dos extrems  $L_i$  i, finalment, el mòdul i la fase del factor d'estructura,  $|F_{i,l}|$  i  $\phi_{i,l}$ , respectivament,

$$F_{i,l}(Z) = |F_{i,l}| \frac{\sin \pi N_i C_i Z}{\sin \pi C_i Z} \cos [\pi L_i Z + \phi_{i,l}] \quad (6.5)$$

Les contribucions de les diverses proteïnes se sumen de manera diferent segons la localització que tinguin en el sarcòmer. És raonable considerar que les proteïnes

situades al mateix filament, sigui el filament prim o el gruixut, tenen una posició relativa fixada i, per tant, se sumen les seves *amplituds* de difracció. En canvi, les proteïnes situades en diferents filaments no tenen una posició relativa fixada i, per tant, se sumen les seves *intensitats* de difracció. Tenint en compte que, a la pràctica, del filament prim, únicament la troponina (Tn) se superposa a algunes línies de difracció dels caps de miosina, la intensitat total d'un ordre  $l$  és

$$I_l(Z) = \underset{\text{Fil. gruixut}}{F_{i,l}(Z)}^2 + F_{Tn,l}^2(Z) \quad (6.6)$$

La modelització consistirà en l'ajustament al perfil meridional experimental de la intensitat donada per l'expressió 6.6 mitjançant l'optimització dels paràmetres de cada periodicitat, explicitats a l'expressió 6.5. Com en les anteriors modelitzacions (vegeu seccions anteriors i capítol 5), per a cada estructura  $i$  s'imposa una relació geomètrica entre el nombre d'unitats  $N_i$ , la zona nua  $b_i$  i la longitud d'interferència  $L_i$  (equació 5.5). L'objectiu d'aquesta modelització és l'extracció del valor de la fase del factor d'estructura per a tots els ordres de la contribució dels caps de miosina.

Aquesta modelització permet l'extracció de la fase del factor d'estructura però no l'extracció del mòdul, donat que hi ha diversos factors no inclosos en el model (particularment el desordre de la xarxa hexagonal dels filaments gruixuts, vegeu el capítol 7) que afecten de manera molt important l'extracció d'aquest. Per tant, els perfils radials es normalitzen a 1, i el mòdul  $|F_{i,l}|$  de l'expressió 6.5 passa a ser un pes relatiu  $w_{i,l}$  que valora l'amplitud relativa de les diferents contribucions. Amb aquesta consideració, l'expressió 6.6 és

$$I_l(Z) = \underset{\text{Fil. gruixut}}{w_{i,l} \frac{\sin \pi N_i C_i Z}{\sin \pi C_i Z} \cos [\pi L_i Z + \phi_{i,l}]}^2 + w_{Tn,l} \frac{\sin \pi N_{Tn} C_{Tn} Z}{\sin \pi C_{Tn} Z} \cos [\pi L_{Tn} Z + \phi_{Tn,l}]^2 \quad (6.7)$$

El fet que se sumin les amplituds i no les intensitats de les contribucions presents al filament gruixut porta a que la regió d'influència d'una periodicitat s'estengui més i pugui afectar a la intensitat aparent dels caps de miosina a pesar d'una periodicitat diferent sensiblement diferent a la d'aquests. Per tant, cal analitzar la totalitat de les diferents reflexions, malgrat que alguns pics d'aquestes se situïn lluny de l'espaiat dels caps de miosina.

### 6.3.2. Ajustament de les línies de difracció

Mitjançant l'aproximació teòrica ideal amb múltiples periodicitats (expressió 6.7), s'han ajustat els perfils meridionals de les reflexions 2M-9M, 11M i 15M. De totes les reflexions detectades, únicament la 1M, 10M i 12M no han estat considerades en l'extracció de la densitat axial electrònica.

En primer lloc, la regió 1M ha estat negligida perquè les úniques contribucions significatives clarament provenen de la proteïna C i la troponina, fins al punt que, en cas d'haver-hi alguna contribució dels caps de miosina, queda emmascarada. No obstant això, per primers principis es podrà donar uns valors del mòdul i la fase del factor d'estructura aproximats.

En segon lloc, la reflexió 10M tampoc s'ha inclòs ja que no presenta un mostratge de la funció de Laue clarament definit per la funció d'interferència especular (figura 4.10). Així, aquesta reflexió té un pic clarament definit a l'espaiat de ca. 4.29 nm, però els pics laterals estan difuminats, fet que impedeix l'extracció de la fase. Finalment, la reflexió 12M tampoc ha estat considerada, donada la poca intensitat i el gran soroll de fons relatiu que presenta (figura 4.5).

Cal assenyalar que, per completitud de l'estudi, s'han ajustat les reflexions 11M i 15M, malgrat que aquestes dues reflexions no s'utilitzen per a la resolució de la densitat electrònica axial dels caps de miosina per raons descrites més endavant (vegeu la secció 9.4).

### 6.3.2.1. L'origen de les fases del factor d'estructura

L'origen de les fases del factor d'estructura ha estat establert de manera diferent al model simplificat anterior en l'estat de descans (vegeu la secció 6.2), en què era definit de tal manera que la reflexió 3M tingués fase cèntrica, és a dir, 0 o  $p$  (vegeu la secció 5.3.1.1). En aquest cas, en canvi, s'ha considerat que la longitud d'interferència dels caps de miosina (de fet, la mitjana entre les dues periodicitats atribuïdes a aquests, vegeu la secció següent) és la mateixa que en l'estat de contracció isomètrica, és a dir,  $L = 865.2$  nm. La raó és explicada tot seguit.

Amb aquesta convenció, en què  $L$  és fixada, la funció d'interferència especular (relació 5.16) depèn únicament de la fase  $f$  del factor d'estructura, que es determina amb l'ajustament del perfil meridional de cada ordre de difracció, excepte la indeterminació en  $p$  esmentada anteriorment. Evidentment, amb aquesta nova convenció, la fase de la reflexió 3M, utilitzada de referència en l'estat de contracció isomètrica, no ha de ser necessàriament 0 o  $p$ .

L'avantatge d'igualar les longituds d'interferència és que imposa el mateix origen de les fases del factor d'estructura i, per tant, els desplaçaments relatius de la projecció de massa en descans i en contracció isomètrica són reals. Això possibilita la comparació de les cel·les elementals en els dos estats considerats.

Amb les consideracions anteriors, en els ordres considerats i per a cada periodicitat  $i$ , s'han variat lliurement els paràmetres  $C_i$ ,  $N_i$ ,  $L_i$  (tot mantenint la relació geomètrica 6.2),  $f_i$  i  $w_i$ . S'ha variat igualment el nombre de periodicitats considerades per a cada ordre, intentant mantenir un nombre mínim. Els paràmetres que han resultat de l'optimització de tots els ordres es mostren a les taules 6.5 i 6.6, i els ajustaments a què corresponen es llisten a les figures 6.5 i 6.6. El model que resulta, que anomenarem *model de 3+3 periodicitats*, conté una gran quantitat d'aspectes nous que tot seguit passem a descriure.

### 6.3.2.2. El model de 3+3 periodicitats

El resultat de l'ajustament dels perfils meridionals de les 10 reflexions considerades (2M-9M, 11M i 15M) ha estat, essencialment, un model, que anomenem de 3+3 periodicitats (taules 6.5 i 6.6). Aquest model consta de 3 periodicitats principals que permeten ajustar la major part de les reflexions:

- 2 periodicitats dels caps de miosina, de 43.05 nm i 42.83 nm. La presència de dues periodicitats no implica que cadascuna correspongui a un dels caps del parell.
- La periodicitat de la proteïna C, de 43.87 nm.

Aquestes 3 periodicitats són presents a tots els ordres modelitzats, i permeten l'ajustament de la majoria d'ordres de difracció. De tota manera, en alguns ordres, ha calgut introduir 3 periodicitats més:

- La periodicitat de la troponina, de 38.53 nm, a les reflexions 9M i 11M.
- Una periodicitat no identificada, que anomenem  $P_1$ , de 47.3 nm, a la reflexió 2M.
- Una segona periodicitat no identificada, que anomenem  $P_2$ , de 45.3 nm, a les reflexions 4M i 5M.

**Taula 6.5.** Resultat de l'ajustament de totes les reflexions en l'estat de descans excepte la 10M i la 12M. No totes les periodicitats s'utilitzen en totes les reflexions. Vegeu la taula 6.6 per saber quines periodicitats són aplicables a un ordre donat.

Proteïna	Periodicitat	Nombre de repeticions	Longitud d'interferència
	$C_i$	$N_i$	$L_i$
	[nm]		[nm]
Miosina 1	43.05	16*	866.75
Miosina 2	42.83	16*	863.45
Proteïna C	43.87	7	621.4
Troponina	38.53	26	1060.0
Proteïna $P_1$	47.3	9	699.3
Proteïna $P_2$	45.3	9	608.7

(\*) Nombre de repeticions de les dues periodicitats dels caps de miosina en els ordres permesos. Per als ordres prohibits, vegeu taula 6.6 i secció 6.3.2.3.

**Taula 6.6.** Nombre de repeticions  $N_{i,l}$ , pes relatiu  $w_{i,l}$  i fase (en graus) del factor d'estructura  $f_{i,l}$  de cada periodicitat  $i$  en un ordre  $l$ , de la modelització de les reflexions en l'estat de descans. A diferència del nombre de repeticions, la longitud d'interferència i la periodicitat es mantenen constants en tots els ordres i en totes les repeticions, i es llisten a la taula 6.5. El ordres permesos es marquen en negreta.

Reflexió	Miosina 1	Miosina 2	Proteïna C	Troponina	Proteïna $P_1$	Proteïna $P_2$
	$N_{Mio1}$	$N_{Mio2}$	$N_C$	$N_{Tn}$	$N_{P1}$	$N_{P2}$
	$w_{Mio1,l}$	$w_{Mio2,l}$	$w_{C,l}$	$w_{Tn,l}$	$w_{P1,l}$	$w_{P2,l}$
	$f_{Mio1,l}$	$f_{Mio2,l}$	$f_{C,l}$	$f_{Tn,l}$	$f_{P1,l}$	$f_{P2,l}$
<b>M</b>	15	15	7	9	9	
<b>2M</b>	0.060	0.105	0.581		0.254	
	-135	-30	-163		42	
<b>3M</b>	16	16				
	0.488	0.512				
	-57	-54				

4M	14	14	7	7
	0.244	0.382	0.276	0.098
	-129	161	73	110
5M	14	14	7	7
	0.121	0.357	0.214	0.308
	-105	-144	95	44
6M	16	16		
	0.548	0.452		
	-95	-69		
7M	14	14	7	
	0.537	0.182	0.280	
	-150	-125	100	
8M	11	11	7	
	0.314	0.373	0.314	
	-117	-119	-30	
9M	16	16	7	26
	0.242	0.203	0.369	0.186
	161	167	15	83
11M	9	9		26
	0.394	0.571		0.034
	11	40		-30
15M	16	16		
	0.493	0.507		
	90	-110		

Aquestes 3 periodicitats addicionals s'introdueixen en diferents ordres de difracció, de manera que en cap ordre la modelització requereix més de 4 periodicitats. Tot seguit es discuteixen les característiques del model per a cada periodicitat considerada, especialment, les periodicitats dels caps de miosina i de les dues periodicitats d'origen fisiològic no identificat.

### 6.3.2.3. Possibles fonts d'error en l'ajustament

En l'ajustament hi ha diverses fonts d'error sistemàtiques que han de ser reconegudes, si bé tenen un efecte molt reduït sobre els valors finals de la fase del factor d'estructura.

Una primera font d'error, ja comentada al capítol 4, és la substracció del fons de dispersió. Aquesta substracció és especialment delicada en les reflexions 1M i 2M, i en les reflexions menys intenses, la 7M, 9M i 15M. De tota manera, l'efecte d'aquesta sobre les fases és limitat, donat que la intensitat relativa entre els pics d'una mateixa reflexió no varia significativament.

Una segona font d'error sistemàtic rau en la suposició que la fase del factor d'estructura es manté constant en un ordre de difracció (vegeu la secció 5.1.2). La fase, però, no es manté constant, sinó que té una variació lenta, aproximadament lineal, que té un efecte sobre el pic considerat més important com més allunyat estigui aquest del pic on s'ha pres el valor de referència de la fase. Aquesta pot ser la causa del lleuger desplaçament dels pics secundaris de la reflexió 3M, 4M i 5M, entre altres (figura 6.5).

L'efecte de la diferència de fase per aquest concepte presumiblement no és important, donat que afecta solament els pics més allunyats i menys intensos, poc rellevants per a la determinació de la fase. L'efecte es pot suprimir, en principi, assumint una dependència lineal de la fase amb  $Z$ , però aquesta modificació complica el model introduint un nou paràmetre poc rellevant i, per tant, no és considerada.



Finalment, cal remarcar que aquest model no explica tots els pics del meridià en l'estat de descans, sinó únicament els pics de les reflexions  $M$ . Entre aquestes reflexions, com s'ha comprovat al capítol 4, hi ha altres pics, que probablement provenen d'altres estructures no considerades en el model. Aquestes estructures poden tenir alguna contribució en les reflexions  $M$  emmascarada per les periodicitats dels caps de miosina, la proteïna C o les altres periodicitats considerades. No obstant això, aquestes contribucions no han de tenir un efecte apreciable sobre els valors extrems de la fase del factor d'estructura.

### 6.3.3. Resultats de l'ajustament

#### 6.3.3.1. Els caps de miosina ha de ser modelats amb dues periodicitats

La modelització dels perfils meridionals de les reflexions permeses realitzades fins ara en contracció isomètrica i en descans ha conclòs que cal una dispersió de periodicitats per explicar la progressiva separació dels pics que formen una reflexió (vegeu les seccions 5.8.2 i 6.2.4, respectivament). De manera coherent a aquestes anteriors modelitzacions, la modelització de la totalitat dels pics en descans conclou igualment la necessitat de, com a mínim, dues periodicitats dels caps de miosina.

Aquestes dues periodicitats tenen uns valors de 43.05 nm i 42.83 nm (taula 6.5), i són presents a tots els ordres de difracció. De fet, excepte la reflexió 2M, aquestes dues periodicitats conformen la contribució més important a la intensitat total de les línies de difracció.

La diferència de periodicitats és de 0.22 nm, que malgrat ser petita és molt superior a la trobada amb l'anterior aproximació teòrica amb dispersió de periodicitats pels ordres permesos, ca. 0.034 nm per a la cel·la de dimensió  $C = 14.3173$  nm (vegeu la secció 6.2.3). Aquesta darrera passa a ser de ca. 0.102 nm si es multiplica la dispersió per 3 per tal de referir les diferències de periodicitats a la mateixa dimensió de cel·la.

L'aparent discrepància que encara existeix entre les diferències de periodicitats (0.22 nm per al model de 3+3 periodicitats, i 0.102 nm per l'aproximació teòrica amb dispersió de periodicitats dels ordres permesos) s'explica perquè en el primer cas permetem una variació lliure de tots els paràmetres de l'ajustament i, en particular, de la fase i el mòdul del factor d'estructura. En el segon cas, en canvi, la fase i el mòdul són les mateixes per a les dues periodicitats dels caps de miosina. Les condicions en els arguments del factor d'estructura són diferents en els dos casos i, per tant, l'espaiat assignat també és diferent.

#### 6.3.3.2. Les dues periodicitats dels caps de miosina presenten desordre de segona espècie als ordres prohibits

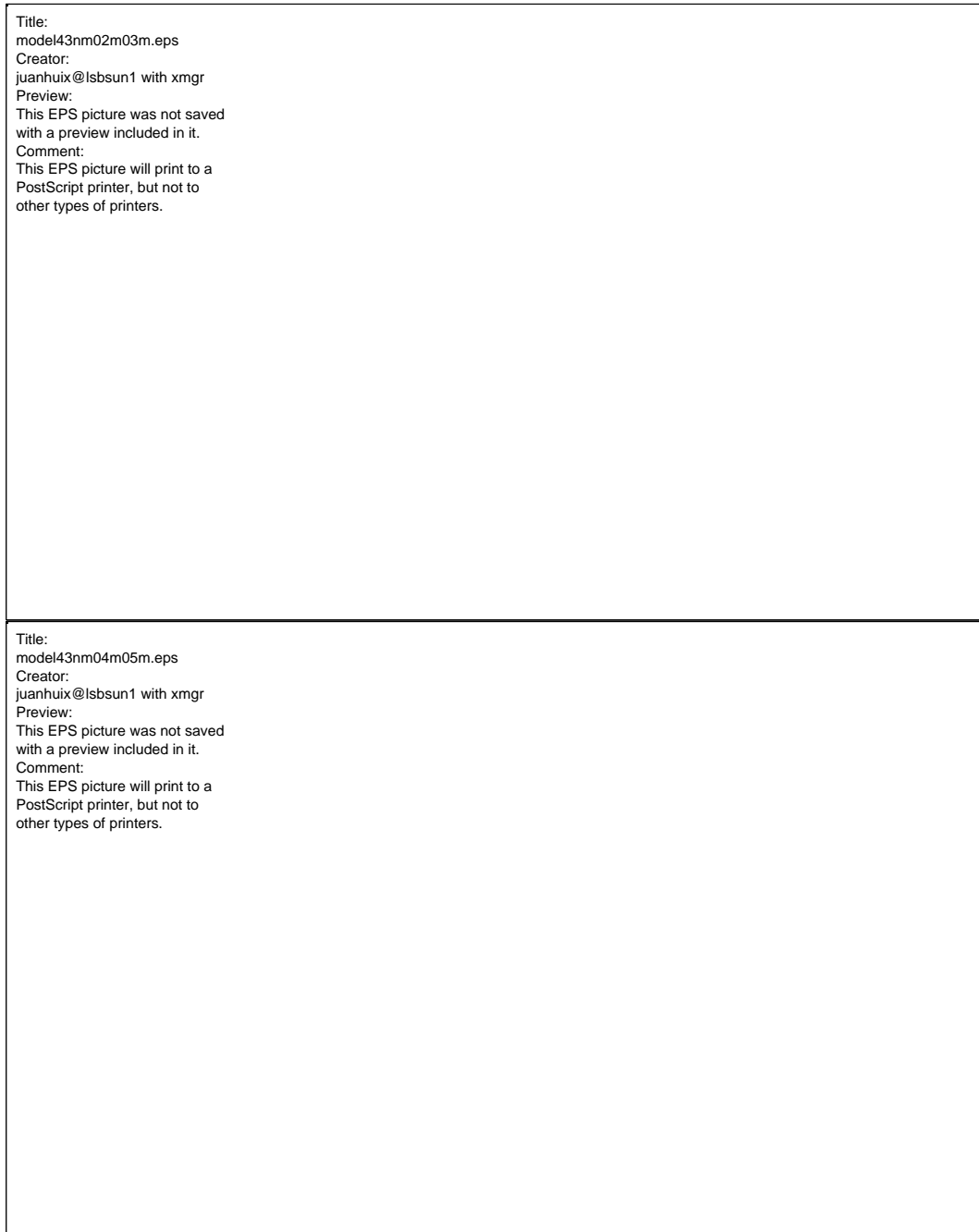
La característica més sorprenent de l'ajustament, pel que fa a les dues periodicitats dels caps de miosina, és el comportament del nombre aparent  $N_{Mio1}$  i  $N_{Mio2}$  de repeticions. Mentre que, als ordres permesos, el nombre de repeticions aparent és 16, que és el valor donat per microscòpia electrònica, als ordres prohibits s'observa una disminució progressiva del nombre amb l'ordre de difracció. Així, mentre la reflexió 2M ajusta amb 15 repeticions, amb una incertesa de 2 repeticions, la reflexió 11M necessita únicament 9 repeticions, també amb una incertesa de 2 repeticions (taula

6.6). La disminució aparent del nombre de repeticions, per tant, no pot ser atribuïda a l'error estadístic, sinó ha de tenir una causa sistemàtica.

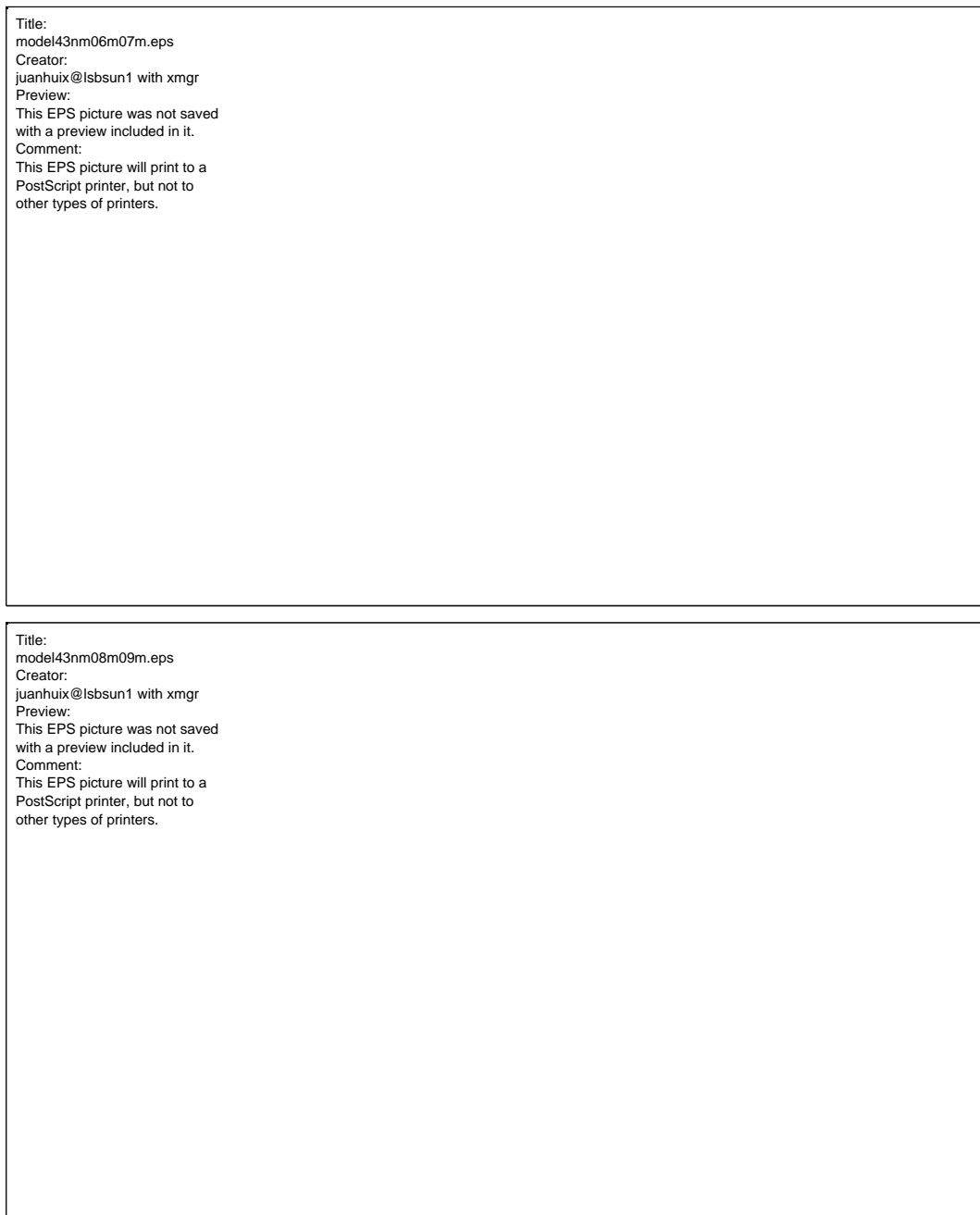
D'altra banda, malgrat la disminució del nombre aparent de repeticions amb l'ordre de difracció de les reflexions prohibides, la longitud d'interferència de les dues repeticions,  $L_{\text{Mio1}}$  i  $L_{\text{Mio2}}$ , es manté. Aquest comportament dels paràmetres, en què  $L$  es manté mentre  $N$  disminueix, és característic de les estructures amb desordre de segona espècie, tal com ja ha quedat de manifest a la secció 5.5.2.

Així doncs, en resum, les dues periodicitats ideals considerades dels caps de miosina poden explicar de manera coherent el perfil meridional de les reflexions permeses. En les reflexions prohibides, en canvi, cal assumir un cert desordre de segona espècie en aquestes dues repeticions. Aquest comportament és coherent amb un desordre relativament petit dels caps de miosina que porta a que no sigui perceptible entre dues corones consecutives (que és la repetició que genera els ordres permesos), però sí en una cel·la elemental, que inclou tres corones i genera els ordres prohibits.

El tractament rigorós de les reflexions prohibides, que hauria d'incloure diverses periodicitats i un desordre de segona espècie per a les dues repeticions dels caps de miosina, no és possible analíticament (vegeu la secció 5.4.2.3). Malgrat tot, això no és inconvenient per al nostre objectiu d'extreure les fases del factor d'estructura, donat que les fases que s'obtenen amb el model rigorós (amb desordre) i l'ideal, assumint una variació lliure dels paràmetres, són molt similars, tal com s'ha comprovat per als ordres permesos en contracció isomètrica i descans (vegeu les seccions 5.8.1 i 6.2.4, respectivament).



**Figura 6.5.** Ajustament dels ordres 2M-5M en l'estat de descans mitjançant un model ideal que inclou diverses periodicitats (expressió 6.6). Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 6.5 i 6.6. *2M*: El dos pics de l'esquerra són deguts principalment a la *proteïna*  $P_1$  (vegeu el text), mentre que els altres pics tenen una contribució majoritària de la proteïna C, una contribució menor de la periodicitat de 42.83 nm, i pràcticament nul·la de la de 43.05 nm. D'altra banda, al pic situat més a la dreta conté el tercer ordre del col·lagen, que no és vist pel model. *3M*: Pics originats solament per les dues periodicitats dels caps de miosina. *4M*: Els dos pics de l'esquerra estan contribuïts per la proteïna C i la *proteïna*  $P_2$ , el pic central per la proteïna C i el pic més intens i el de la dreta, per les dues periodicitats dels caps de miosina. *5M*: El doblet de l'esquerra és essencialment generat per la proteïna  $P_2$ , mentre que el pic principal i els laterals a banda i banda d'aquest són originats pels caps de miosina i la proteïna C.



**Figura 6.6.** Ajustament dels ordres 6M-9M en l'estat de descans mitjançant un model ideal que inclou diverses periodicitats (expressió 6.6). Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 6.5 i 6.6. *6M*: Els dos pics provenen de les dues reflexions de la miosina. *7M*: A la dreta, s'observa la intensa reflexió 6A, a ca. 5.9 nm, mentre a l'esquerra apareix ja clarament distanciat el pic que prové de la proteïna C. *8M*: Els dos pics de l'esquerra provenen de la proteïna C i, possiblement, de la troponina, mentre que el cúmul principal de tres pics provenen exclusivament dels caps de miosina. *9M*: Contràriament a les altres reflexions permeses, la 9M presenta una contribució apreciable de la proteïna C (dos pics de l'esquerra), la troponina (doblet de pics central) i dels caps de miosina (el pic més intens i el de la dreta).

### 6.3.3.3. La periodicitat de ca. 47.3 nm de la reflexió 2M

Els pics situats a ca. 23.76 nm i ca. 23.07 nm en la reflexió 2M (figura 4.7) no corresponen les periodicitats conegudes dels caps de miosina, troponina o proteïna C. A fi d'aconseguir la modelització de tota la reflexió ha calgut introduir una nova

periodicitat múltiple de ca. 23.65 nm. Donat que la reflexió 1M presenta pics no identificats propers a l'espaiat de 47.3 nm que podrien ser interpretats com el primer ordre dels dos pics de la reflexió 2M i, igualment, per claredat de comparació amb les altres estructures, assumirem que aquests pics de la reflexió 2M són el segon ordre d'una periodicitat amb un espaiat de 47.3 nm. De tota manera, cal remarcar que el valor de la fase del factor d'estructura de les periodicitats dels caps de miosina no és sensible a aquesta elecció.

S'ha assumit que aquesta nova periodicitat es localitza al filament gruixut i, per tant, la seva amplitud de difracció, i no la intensitat, se suma a la dels caps de miosina i la proteïna C. Per funcionalitat en la notació, la hipotètica proteïna o grup de proteïnes disposades a aquesta periodicitat és notada com a *proteïna* P<sub>1</sub>, si bé cal tenir present que no hi ha cap prova clara de la seva presència real, donat que en la literatura no hi ha cap referència explícita d'aquesta.

L'ajustament indica que aquesta periodicitat hauria de tenir 11 repeticions i provocar un fenomen d'interferència, amb una longitud d'interferència *L* de 699.3 nm, similar a la de la proteïna C. Amb tot, els valors obtinguts d'aquesta periodicitat admeten una certa variació en l'ajustament. Aquests són comparables si es postula un nombre de repeticions entre 7 i 12. Per la seva banda, la longitud d'interferència pot variar 100 nm del valor donat prèviament, amb salts de 47.3 nm, sense afectar significativament l'ajustament.

Aquestes dades afavoreixen la hipòtesi que, en cas d'existir, aquesta *proteïna* es localitzaria al filament gruixut, donat que aquest presenta fenòmens d'interferència més acusats, i el nombre de repeticions i la longitud d'interferència són comparables als de la proteïna C.

#### 6.3.3.4. La periodicitat de ca. 45.3 nm de les reflexions 4M i 5M

Anàlogament a la reflexió 2M, les reflexions prohibides 4M i 5M presenten diversos pics que no poden ser causats per les periodicitats dels caps de miosina, la troponina o la proteïna C. En particular, el pic situat a ca. 11.37 nm, en la reflexió 4M, i el doblet de pics situats a ca. 9.11 nm i ca. 8.99 nm, a prop de la 5M, no poden ser explicats per aquestes 3 periodicitats conegudes, ni tampoc per la periodicitat de ca. 47.3 nm abans postulada en la reflexió 2M.

Els pics mencionats de les reflexions 4M i 5M poden ser modelitzats mitjançant una repetició de ca. 11.32 nm i ca. 9.06 nm, respectivament, situada al filament gruixut i que, per tant, suma la seva amplitud de difracció a la de la resta de repeticions del mateix filament. La modelització és igualment vàlida amb l'ús d'un múltiple d'aquestes dues repeticions. En particular, les periodicitats de ca. 11.32 nm i ca. 9.06 nm es poden modelitzar utilitzant el seu mínim comú múltiple, que és ca. 45.3 nm, de manera que es poden interpretar com a ordres d'una mateixa repetició. La periodicitat de ca. 45.3 nm no pot ser atribuïda als caps de miosina ni a la proteïna C, per bé que l'espaiat és relativament proper al d'aquestes. Amb les mateixes precaucions que en el cas de la *proteïna* P<sub>1</sub>, la hipotètica proteïna o estructura de la qual prové aquesta nova repetició serà notada com a *proteïna* P<sub>2</sub>.

Aquesta nova periodicitat postulada podria presentar igualment un fenomen d'interferència entre els dos extrems del filament, com ho palesa amb claredat el doblet de pics a què dona lloc a la reflexió 5M. La clara interferència, juntament amb el valor de l'espaiat, afavoreix la hipòtesi que aquesta periodicitat P<sub>2</sub> està localitzada al filament gruixut, anàlogament a la periodicitat P<sub>1</sub>.

### 6.3.3.5. La presència de la proteïna C

La proteïna C és present en tots els ordres modelats i interfereix amb la contribució dels caps de miosina si bé, a causa del diferent espaiat, els pics de difracció de les reflexions d'ordres elevats apareixen progressivament separats.

La proteïna C té una contribució remarcable, sobretot, als ordres prohibits i, molt especialment, a la reflexió 2M. En aquesta reflexió, la proteïna C suposa la contribució més important, donat que forma la major part de la intensitat dels pics situats a ca. 22.28 nm i 21.48 nm, els dos més intensos de la reflexió. Aquesta importància, desconeguda fins ara, de la proteïna C en la reflexió 2M no ha de sorprendre si es té en compte la intensitat del pic d'aquesta proteïna a la reflexió 1M.

D'altra banda, la periodicitat de la proteïna C trobada, 43.87 nm, és significativament diferent de les dues periodicitats atribuïdes als caps de miosina. Aquest resultat contradiu alguns experiments previs de difracció òptica de músculs marcats amb anticossos [Offer, 1972; Pepe *et al.*, 1975; Craig, 1977], però recolza els estudis més recents que apunten que els caps de miosina i la proteïna C tenen periodicitats significativament diferents [Squire *et al.*, 1981; Bennet *et al.*, 1986].

Un punt remarcable dels paràmetres de la proteïna C és el fet que els valors de  $N_C$ ,  $C_C$  i  $L_C$  donen un valor, a partir de la relació 5.5, de la zona nua  $b_C$  de la proteïna C de ca. 179 nm, amb un error de aproximadament una repetició, ca. 43 nm. Aquesta longitud, que és la distància entre el centre del filament gruixut (la línia M) i la primera unitat de la periodicitat de la proteïna C, és lleugerament inferior a la calculada per microscòpia electrònica de músculs marcats amb anticossos, ca. 250 nm [Craig i Offer, 1976b]. Això no obstant, aquesta discrepància pot ser explicada tenint en compte que diferents marcatges d'anticossos donen 7, 9 o, fins i tot, 11 repeticions, que poden fer variar la distància d'interferència [Squire, 1981]. L'origen de la incertesa rau en què l'especificitat de l'anticòs no està assegurada, donat que hi ha diverses proteïnes al filament gruixut homòlogues a la proteïna C. En concret, sembla probable l'existència de proteïnes (les anomenades proteïnes X i H) amb periodicitats semblants o iguals a la de la proteïna C [Sjöstrom i Squire, 1977b; Bennett *et al.*, 1986] que poden modificar el valor extret de la zona nua de la proteïna C.

A més, cal remarcar que la mesura de la longitud d'interferència  $L_C$  i, per tant, de la zona nua  $b_C$  en estudis de difracció com el que aquí es presenta es basa en les repeticions amb homologia estructural. En canvi, la mesura d'aquests dos paràmetres per microscòpia electrònica a partir del marcatge d'anticossos es basa en les repeticions amb homologia seqüencial, i en part també estructural, de la proteïna que té funció d'antigen i a la qual s'enllaça l'anticòs. Per tant, les longituds d'interferència calculades per aquestes dues tècniques no necessàriament han de coincidir.

### 6.3.3.6. L'origen de la reflexió 11M

Les reflexions 11M i 15M no seran utilitzades en l'elaboració del mapa de densitat electrònica (vegeu el capítol 9), per diferents motius, malgrat que han pogut ser modelitzades correctament amb el model de 3+3 periodicitats (figura 6.7).



**Figura 6.7.** Ajustament dels ordres 11M i 15M en l'estat de descans mitjançant un model ideal que inclou diverses periodicitats (expressió 6.6). Els paràmetres de la minimització es llisten a la taula 6.5 i 6.6. *11M*: Els dos pics de l'esquerra provenen de la proteïna C, mentre que el triplet intens es modela amb les dues periodicitats dels caps de miosina, si bé l'origen no n'és clar (vegeu el text). La contribució de la troponina és reduïda, i intervé en els petits pics a la dreta del triplet. *15M*: La reflexió és modelada per les dues periodicitats de la miosina, si bé a l'esquerra apareix un lòbul d'origen no conegut.

D'entrada, a causa del confús perfil radial de la reflexió 10M (figura 4.10) la fase del factor d'estructura no pot ser estreta. Aquesta reflexió, per tant, no pot ser inclosa a la síntesi de Fourier que permet trobar el mapa de densitat electrònica i, en conseqüència, deixa de tenir sentit la inclusió d'ordres superiors, com són les reflexions 11M i 15M.

La singular intensitat de la reflexió 11M mereix un comentari separat de la resta de reflexions. Aquesta, a més de ser intensa en l'estat de descans, ho és també en l'estat de contracció isomètrica, fet que contrasta amb el comportament de totes les altres reflexions prohibides, que pràcticament desapareixen en aquest darrer (vegeu la secció 4.3.2). La proteïna C no pot ser responsable d'aquesta intensitat, donat que, en descans, l'espaiat no coincideix i, a més, en contracció isomètrica, suposaria un increment molt important de la intensitat (un factor 6), singular per aquest ordre, mentre que, en la resta d'ordres, la intensitat disminueix de manera remarcable. Una explicació més plausible de l'origen de la reflexió 11M, en els dos estats, és que provingui dels caps de miosina. L'ajustament en descans és correcte amb els espaiats que els corresponen, mentre que en contracció isomètrica s'aprecia un increment de l'espaiat d'un 2% (ca. 3.900 nm en descans per ca. 3.977 nm en contracció isomètrica), comparable al ca 1.6% observat a la 3M i al ca. 1.8% observat a la 6M (vegeu la secció 4.3).

Malgrat tot, diversos autors assenyalen que aquesta reflexió pot provenir en gran mesura de la titina, que forma un filament intermitjà que travessa mig sarcòmer (vegeu la secció 1.2.4) [Trinick, 1996; Squire, 2000]. La part principal de la titina està formada per dominis homòlegs a la fibronectina tipus III (*fibronectin type III*, FN3) i a la immunoglobulina (Ig), d'una longitud aproximada de 4 nm [Labeit i Kolmerer, 1995b; Trinick, 1996], que pot originar un primer ordre que coincideixi amb la reflexió 11M. El gran nombre d'aquestes unitats en una sola molècula de titina, i la

gran quantitat d'aquestes presents al sarcòmer pot explicar la gran intensitat d'aquesta reflexió.

Un argument a favor de la influència de la titina en la reflexió 11M és el fet que, quan aquesta s'introdueix en el mapa axial de densitat electrònica calculat fins a la reflexió 9M, l'afecta de tal manera que no és possible reconèixer els dos caps de cada parell. L'efecte és la superposició d'una estructura (probablement els dominis de la titina) a una altra (la dels parells de caps de miosina) (vegeu la secció 9.4.6).

El model, però, permet encaixar el perfil meridional de la reflexió amb les dues periodicitats dels caps de miosina utilitzades en tots els altres ordres. Això pot indicar que, en cas que aquesta reflexió fos originada per la titina, aquesta hauria de tenir un espaiat commensurable al de la miosina, i tenir el mateix canvi d'espaiat en passar de l'estat de descans al de contracció isomètrica. Això únicament seria possible si les dues proteïnes (la titina i els caps de miosina) estiguessin enllaçades.

Davant del dubte raonable sobre l'origen d'aquesta reflexió, i tenint en compte que no ha estat possible introduir la reflexió 10M, es negligirà la reflexió 11M en el càlcul de la densitat axial electrònica. Per tant, limitarem la reconstrucció dels mapes axials de densitat electrònica (vegeu el capítol 9) a una resolució de ca. 4.5 nm.

D'altra banda, la reflexió 15M és una reflexió permesa que queda modelada amb l'ús de les dues periodicitats dels caps de miosina (figura 6.7). No obstant això, aquesta no pot ser inclosa en el càlcul de la densitat axial electrònica, atès que hi ha reflexions d'ordre més baix (10M i 11M) que n'han hagut de ser excloses.

## 6.4. Conclusions

En aquest capítol, s'ha extret la fase del factor d'estructura dels ordres de difracció dels caps de miosina en l'estat de descans a partir del perfil meridional del diagrama de difracció. La complexitat d'aquest ha fet necessària una extracció en dos passos.

### 6.4.1. *Les diferents aproximacions extreuen les mateixes fases dels ordres permesos*

En el primer pas, s'han considerat únicament els perfils meridionals de les reflexions permeses 3M, 6M i 15M, que s'han analitzat de la mateixa manera que els ordres permesos en contracció isomètrica, al capítol anterior. S'ha considerat primerament el model ideal, que suposa una sola periodicitat regular de caps de miosina. L'ajustament als perfils meridionals és correcte, si bé apareix una variació aparent dels paràmetres geomètrics del filament gruixut, la longitud i el nombre de caps de miosina en un extrem, en funció de l'ordre de difracció.

Un segon model, amb desordre de segona espècie, ajusta igualment bé els perfils meridionals, però no aconsegueix explicar aquesta variació dels paràmetres geomètrics. Finalment, un tercer model, que suposa una dispersió de periodicitats, aconsegueix ajustar correctament els perfils meridionals, alhora que manté constants els paràmetres geomètrics per a tots els ordres.



De tota manera, el punt més remarcable és que els diferents models extreuen pràcticament les mateixes fases del factor d'estructura, independentment de l'inclusió de desordres de segona espècie o diverses periodicitats. Aquesta situació, que és idèntica a la trobada en contracció isomètrica (vegeu el capítol anterior), fa que per trobar el mapa de densitat electrònica no sigui necessari determinar exactament el model que explica la disposició dels caps de miosina al filament gruixut.

Aquesta conclusió, comprovada a les reflexions en contracció isomètrica i als ordres permesos en descans, és generalitzada als ordres prohibits d'aquest darrer estat. Per tant, l'estudi complet dels perfils meridionals en descans es realitzarà amb el model més senzill, el model ideal. Aquesta simplificació és molt rellevant, ja que el major nombre de reflexions i les diverses contribucions que tenen fan necessària la simplificació.

#### **6.4.2. *Són necessàries almenys dues periodicitats dels caps de miosina***

Prenent com a base la conclusió anterior que estableix que, a efectes de l'extracció de la fase del factor d'estructura, les diverses periodicitats poden ser tractades com a ideals, s'elabora un model que reproduïx els perfils meridionals de les reflexions considerades (2M-9M, 11M i 15M). El model finalment adoptat, anomenat model de 3+3 periodicitats, inclou necessàriament dues periodicitats atribuïbles als caps de miosina (de 43.05 nm i 42.83 nm) i una periodicitat atribuïble a la proteïna C (de 43.87 nm).

La presència física efectiva de dues periodicitats en la disposició dels caps de miosina en un filament gruixut no és definida. Un model amb més de dues periodicitats, o amb restriccions com les imposades en el model de dispersió de periodicitats en els ordres permesos, també aconseguiria ajustar correctament els perfils meridionals. Convé, per tant, considerar aquestes dues periodicitats com instrumentals per extreure el mapa axial de densitat electrònica, i no com dues periodicitats que segueixen els caps de miosina.

Això no obstant, l'estudi conclou de manera categòrica que una sola periodicitat, sigui ideal o amb desordre de segona espècie, no ajusta correctament els perfils meridionals. En la disposició dels caps de miosina en un filament gruixut hi intervenen, per tant, dues periodicitats.

#### **6.4.3. *La presència de la proteïna C i altres proteïnes***

La tercera contribució present en totes les reflexions considerades del meridià és la proteïna C. El model de 3+3 periodicitats ha conclòs que l'espaiat és significativament diferent dels de les diferents periodicitats dels caps de miosina. Això contradiu algunes observacions en difracció òptica, que assenyalaven que la miosina i la proteïna C tenien la mateixa periodicitat, i reforça les tesis d'altres autors més recents que apuntaven a una diferent periodicitat.

Adicionalment a les dues periodicitats dels caps de miosina i de la proteïna C, ha calgut introduir tres periodicitats més que influeixen en l'ajustament d'algunes de les reflexions considerades. Així, per reproduir les reflexions 9M i 11M, aquesta darrera en

menor mesura, s'ha introduït la periodicitat de la troponina, de 38.53 nm. Finalment, s'han suposat dues periodicitats més, de 47.3 nm i 45.3 nm, que permeten ajustar més correctament les reflexions 2M, i 4M i 4M, respectivament.

La presència d'aquestes dues darreres periodicitats sembla no coincidir amb cap de les estructures fins ara reconegudes del sarcòmer. Per tant, cal considerar-les merament especulatives i auxiliars per trobar les fases del factor d'estructura dels caps de miosina.

Finalment, la intensitat de la reflexió 11M i el mapa axial de densitat electrònica que resulta de la inclusió d'aquesta indiquen que l'origen d'aquesta reflexió és la titina, i no els caps de miosina. Això implica que aquestes dues proteïnes tenen una periodicitat commensurable.

# Capítol

# 7

## L'extracció dels mòduls

En aquest capítol es proposa un model que inclou els diferents factors que expliquen el perfil radial de la intensitat de les línies de difracció dels caps de miosina. L'objectiu d'aquestes modelitzacions és l'extracció del mòdul del factor d'estructura dels diferents ordres en descans i contracció isomètrica, per realitzar la síntesi de Fourier



## 7.1. Factors en la intensitat de les línies de difracció

### 7.1.1. Introducció

**E**ls capítols precedents han estat dedicats a extreure les fases  $f_l$  del factor d'estructura de totes les línies de difracció i en diferents estats musculars mitjançant aproximacions teòriques coherents del filament gruixut. Aquestes fases són necessàries per resoldre la densitat axial de massa dels caps de miosina mitjançant la síntesi de Fourier (expressió 2.18),

$$\rho_z(z) = \sum_l F_l \cos 2\pi z \frac{l}{C} + \phi_l \quad (7.1)$$

A la síntesi de Fourier, però, a més de la fase hi intervé el mòdul  $F_l$  del factor d'estructura en el meridià de les línies de difracció. En principi, el mòdul del factor d'estructura és simplement l'arrel quadrada de la intensitat de pic de les dades experimentals, és a dir, l'altura dels pics de difracció en el meridià, que es mostren en el capítol 4,

$$F_l = \sqrt{I_{l,\text{exp}}(R=0)} \quad (7.2)$$

Aquesta extracció tan directa, però, no és exacta, donat que en la intensitat hi intervenen altres contribucions alienes al factor d'estructura. Aquestes contribucions, com veurem, no es poden avaluar a partir de la intensitat de pic, sinó que cal ajustar el perfil radial de les línies de difracció. En aquest capítol es descriu, justament, un tractament teòric, que creiem original, que permet ajustar els perfils radials de les línies de difracció i extreure els mòduls  $F_l$  del factor d'estructura de cada ordre.

Les contribucions addicionals a la intensitat que es tindran en compte són: el perfil de difracció que origina la simetria helicoidal, el desordre radial de segona espècie de la miofibril·la, i el desordre angular de les fibres. D'aquestes tres contribucions, la simetria helicoidal ja ha estat exposada prèviament en el capítol 2, així com el desordre radial de segona espècie, exposat en el cas axial i amb una sola dimensió en el capítol 5. En aquest capítol aquests aspectes són repesos i ampliat per incloure'ls al tractament de les dades.

L'ajustament del perfil radial de la línia de difracció té l'avantatge que, a diferència del perfil meridional, no presenta la multiplicitat de pics causada per la funció d'interferència especular, que prové de la bipolaritat del sarcòmer (vegeu la secció 5.2.3.1, expressió 5.16). D'aquesta manera, la integració axial, amb la qual s'obté el perfil radial, permet eliminar la dependència en la fase del factor d'estructura i, per tant, simplificar el model.

Finalment convé puntualitzar, respecte de la notació emprada en aquest capítol, que, per simplicitat, utilitzem el símbol  $F_l$  a la vegada per a l'amplitud de difracció i per al mòdul del factor d'estructura. Per no confondre, en la primera accepció, el

símbol és acompanyat per un parèntesi que assenyalava les dependències (p. ex. en la següent expressió 7.3), mentre que el mòdul és una constant en cada ordre  $l$ .

### 7.1.2. El perfil radial que genera la simetria helicoidal

Tal com s'ha exposat al capítol 2, l'amplitud de les línies de difracció generades pels caps de miosina segueixen un perfil radial regit per funcions de Bessel d'ordre  $n$  (expressió 2.33),

$$\left\{ \begin{array}{l} F_l(R, \frac{l}{C}) = 2\pi r_0 J_{kN}(2\pi r_0 R) e^{ikN \frac{\pi}{2}} \\ l = pm + q \frac{n}{N} \end{array} \right. \quad (7.3)$$

A partir d'aquesta expressió, que és el cas general vàlid en tot el diagrama de difracció, farem simplificacions aplicables en la regió propera al meridià.

En primer lloc, únicament s'inclouran al tractament les funcions de Bessel d'ordre  $n = 0$  ( $J_0$ ), que és l'única funció de Bessel amb un màxim al meridià. Les altres funcions de Bessel d'ordre superior tenen, per raons de simetria ordre  $3n$  i, per tant, la seva contribució a la regió meridional ha de ser negligible (figura 2.5).

Aquesta situació és vàlida igualment pels ordres *prohibits*, no múltiples de 3, en què també apareixen pics centrats a  $R = 0$ , malgrat que la simetria helicoidal teòrica dels caps de miosina prohibeix la contribució de  $J_0$  en aquests ordres. El fet que apareguin s'explica per la pèrdua parcial de simetria helicoidal dels caps de miosina, que passen a tenir una certa simetria cilíndrica [Kensler i Stewart, 1986]. De fet, la contribució de les funcions  $J_0$  al diagrama de difracció de la simetria purament helicoidal en representa la component cilíndrica. Per tant, les dues simetries tenen la mateixa expressió en el meridià, que s'obté en reduir l'expressió 7.3 als termes que depenen de  $J_0$ , i podem així tractar d'igual manera els ordres permesos i els prohibits.

En segon lloc, integrem l'expressió 7.3 sobre la coordenada azimutal, ja que el diagrama de difracció és el resultat de la integració cilíndrica de tots els filaments. Aquesta integració elimina la dependència d'aquesta coordenada, atès que, en l'expressió 7.3, només apareix en la fase de l'amplitud de difracció.

Així doncs, a partir d'aquesta expressió, i amb aquestes dues aproximacions prèvies, l'amplitud de la  $l$ -èsima línia de difracció dels caps de miosina a prop del meridià és

$$F_l(R, \frac{l}{C}) = \sum_j 2\pi r_j f_j J_0(2\pi r_j R) \quad , \quad (7.4)$$

on el sumatori sobre  $j$  s'estén sobre tots els elements de massa, caracteritzats per un radi  $r_j$  i un factor d'estructura  $f_j$ , que contribueixen a la intensitat de la línia  $l$ . En general, aquests elements són fragments de les unitats de difracció que afecten la intensitat de la línia, no solament dels caps de miosina, sinó també de altres proteïnes.

Podem encara simplificar l'expressió 7.4 reduint el sumatori a una mitjana de tots els fragments caracteritzada per un radi mitjà  $r_l$  i un factor d'estructura  $F_l$ . Aquesta mitjana ha de satisfer la relació

$$2\pi r_l F_l J_0(2\pi r_l R) = \sum_j 2\pi r_j f_j J_0(2\pi r_j R) \quad (7.5)$$

Val a dir que, en general, aquesta condició no s'ha de complir necessàriament en tota l'amplada radial dels pics dels diferents ordres. En aquest cas, definim el radi mitjà com aquell que compleixi millor experimentalment aquesta darrera condició. Donat que  $f_j$  depèn de l'ordre, el radi mitjà  $r_l$  vist per la difracció dependrà igualment de l'ordre, i no ha de ser necessàriament igual al radi mitjà  $\langle r_j \rangle$  obtingut amb la mitjana ponderada dels elements de massa.

L'aproximació 7.5 es pot considerar bastant ajustada, a causa del gran radi mitjà  $\langle r_j \rangle$  del cap de miosina, i la forma aproximadament globular que té, excepte la cua del cap, de menor massa. L'excel·lent ajustament del model a les dades experimentals que s'obtéindrà corrobora aquestes apreciacions.

Així doncs, a partir de l'expressió 7.4, i introduint la mitjana dels elements de massa, l'amplitud de la  $l$ -èsima línia de difracció dels caps de miosina, sigui o no permès per la simetria helicoidal, a prop del meridià és

$$F_l R, \frac{l}{C} = 2\pi r_l F_l J_0(2\pi r_l R) \quad (7.6)$$

El perfil radial descrit per l'expressió 7.6 correspon a l'amplitud de difracció que genera els caps de miosina d'un filament gruixut aïllat a prop del meridià. Com a comentari, afegim que si, en lloc de tot el filament gruixut es considera un sol parell de caps de miosina, l'amplitud de difracció de l'expressió 7.6 es redueix al terme  $l = 0$ .

Sobre aquesta expressió del perfil radial de l'amplitud de difracció, la xarxa que formen els filaments actua modificant el valor de pic  $i$ , per tant, l'amplitud de difracció aparent de la unitat de difracció. Tot seguit s'avalua l'efecte d'aquesta xarxa, així com els desordres que porta associada.

### 7.1.3. L'efecte dels desordres de la xarxa

Dins de cada miofibril·la, els filaments gruixuts i els filaments primers estan empaquetats formant una xarxa hexagonal en el pla transversal, mentre que en la direcció axial els parells de caps d'un mateix filament es repeteixen amb una certa periodicitat  $C_z$  (vegeu el capítol 2). Aquesta xarxa i els desordres que porta associats han de ser inclosos en el perfil radial de les línies de difracció. Aquesta secció descriu la

contribució del desordre de la simetria al perfil de les línies de difracció a prop del meridià, complementant el capítol 2, que tracta dels pics de difracció que genera la xarxa en tot el diagrama de difracció en el cas ideal.

Hi ha diverses observacions que poden indicar la presència de desordre de segona espècie en la direcció radial: tant en descans com en contracció isomètrica, els pics de l'equador s'eixamplen en augmentar l'ordre de difracció, i, en descans, el mostratge de les línies de difracció només apareix clarament a baixos ordres. Aquest desordre, tal com s'ha analitzat al capítol 5, prové físicament d'una ordenació de curt abast, on només hi ha definides la distribució de distàncies dels primers veïns.

El desordre de segona espècie serà utilitzat per reproduir el perfil radial del pic meridional de les línies de difracció. Aquest perfil és sensible a aquests desordres a causa, d'una banda, del propi valor dels desordres rellevants en aquesta direcció i, d'altra banda, per l'absència dels fenòmens d'interferència que caracteritzen el perfil meridional i que dificulten l'avaluació dels desordres. A tal fi, és necessari expandir la teoria dels desordres de segona espècie al cas 3D.

### 7.1.3.1. El desordre de segona espècie en més d'una dimensió

En presència de desordre de segona espècie, la intensitat total d'una miofibril·la és el producte del quadrat del factor d'estructura de la unitat de difracció  $F_1(R, Z)$  amb la funció d'interferència  $G(R, Z)$ , que conté tota la influència de la xarxa cristal·lina (expressió 5.23),

$$I_0(R, Z) = |F_1(R, Z)|^2 G(R, Z). \quad (7.7)$$

En aquest cas, el factor d'estructura  $F_1(R, Z)$  és l'amplitud de difracció d'un sol filament gruixut (expressió 7.6). Per tant, en el model que explica el perfil radial de les línies de difracció, cal deduir abans el perfil radial en les línies de difracció d'aquesta funció d'interferència.

Suposem, en conseqüència, la presència de desordre de segona espècie en les tres direccions que marquen els vectors  $\mathbf{a}$  i  $\mathbf{b}$  de la xarxa hexagonal, i la direcció axial  $\hat{z}$  (vegeu la secció 2.5). En una estructura en l'espai, el desordre és definit mitjançant una matriu de rang  $3 \times 3$ , en què cada terme  $D_{ij}$  caracteritza el desordre en la direcció  $j$  que presenta la unitat de difracció veïna en la direcció  $i$  [Vainshtein, 1966]. La matriu és equivalent a la desviació  $D$  que defineix el desordre en una dimensió (expressió 5.20).

De tota manera, aquesta matriu se simplifica en el cas del múscul a causa de la integració azimuthal, que és possible perquè els filaments tenen una relació de les fases azimuthals no regular. Així, les unitats de difracció poden ser descrites en el diagrama tan sols per una coordenada radial  $R$  i una coordenada axial  $Z$  i la matriu es redueix, amb les coordenades radial i axial, a una matriu  $2 \times 2$ ,

$$\begin{matrix} rr & rz \\ zr & zz \end{matrix}.$$

El terme  $D_{ij}$  representa la desviació mitjana en la direcció  $j$  que té el veí situat en direcció  $i$ . Amb la reducció de les dimensions efectives dels desordres, de tres a dues, la



funció d'interferència de l'estructura és, finalment, el producte de les dues funcions d'interferència  $G_r$  i  $G_z$  en les direccions radial i axial, respectivament,

$$G(R, Z) = G_r(R, Z)G_z(R, Z) . \quad (7.8)$$

El perfil radial de la funció d'interferència total  $G_l(Z)$  en la  $l$ -èsima línia de difracció serà simplement la integració sobre de l'ample  $Z_l$  de la línia,

$$G_l(R) = \int_{Z_l} G_r(R, Z)G_z(R, Z) dZ . \quad (7.9)$$

Tot seguit analitzem separatament les funcions d'interferència de la xarxa en les direccions radial i axial per trobar la dependència que tenen amb els diferents desordres, i així poder simplificar les expressions.

### 7.1.3.2. La funció d'interferència radial

La funció d'interferència radial  $G_r$  té un tractament anàleg al cas unidimensional de la secció 2.4.2, i queda definida per una distribució de distàncies sobre el veí més proper en la direcció radial. Si assumim una distribució de forma gaussiana, *mutatis mutandis* l'expressió 5.20, la distribució de distàncies serà,

$$H_r(\hat{r} + C_r \hat{r}) = \frac{1}{2\pi} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{r^2}{r_r} + \frac{z^2}{r_z} \right)} , \quad (7.10)$$

on  $\hat{r}$  és el vector unitari i  $C_r$  la periodicitat en la direcció radial. Cal puntualitzar que, en haver fet una integració azimuthal sobre la simetria hexagonal, la periodicitat  $C_r$  no és pròpiament una periodicitat, sinó el conjunt de distàncies radials de les unitats d'aquesta simetria hexagonal, que vénen donades per l'expressió 2.39. De tota manera, donat que en aquest anàlisi només interessa el pic del meridià, aquestes distàncies no intervenen en el desenvolupament matemàtic que ve a continuació.

D'altra banda, la transformada de Fourier (TF) de la distribució radial de distàncies 7.10 és

$$F_r(R, Z) = e^{-2\pi^2 \left( \frac{R^2}{r_r} + \frac{Z^2}{r_z} \right)} e^{2\pi i C_r R} .$$

Similarment al desordre de segona espècie unidimensional, la funció d'interferència que genera l'estructura en la direcció radial és la suma de totes les TF de les distàncies mútues en aquesta direcció [Vainshtein, 1966],

$$G_r(\xi) = N_r + \sum_{n=1}^{N_r} (N_r - n) \left[ F_r^n(\xi) + F_r^{*n}(\xi) \right], \quad (7.11)$$

on  $N_r$  és el nombre d'unitats de difracció en la direcció radial. Aquesta funció d'interferència radial és equivalent a l'expressió 5.25 en el cas unidimensional. La funció  $F_r^n$  és l'amplitud de difracció que genera el  $n$ -èsim veí, i és el resultat de la convolució  $n$  vegades de la distribució de distàncies, és a dir, pel teorema de convolució (expressió 2.8), la potència  $n$ -èsima de  $F_r(R, Z)$ . La funció d'interferència radial  $G_r(S)$  només depèn de  $F_r$ , que al seu torn depèn solament dels desordres  $D_{rr}$  i  $D_{rz}$ . Substituint la forma de  $F_r$  en la funció d'interferència, obtenim

$$G_r(R, Z) = N_r + 2 \sum_{n=1}^{N_r} (N_r - n) e^{-2\pi^2 n \left( \frac{1}{2} D_{rr} R^2 + \frac{1}{2} D_{rz} Z^2 \right)} \cos(2\pi n C_r R) \quad (7.12)$$

A la figura 7.1 es mostra el comportament de  $G_r$  en el diagrama de difracció. En la direcció radial, la funció  $G_r(S)$  es comporta com la funció d'interferència  $G(Z)$  en el cas unidimensional, mostrada en la figura 5.10b. A mesura que augmenta l'ordre de difracció, en aquesta direcció, els pics perden altura i s'eixamplen segons la relació 5.27, a causa del caràcter acumulatiu del desordre. L'eixamplament depèn del desordre radial en la direcció radial,  $D_{rr}$ , i augmenta amb l'ordre de difracció al quadrat. En el cas límit, quan  $D_{rr} \gg 1/R$ , la funció d'interferència arriba al valor constant  $N_r$  i la interferència i la cristal·linitat desapareixen totalment. En aquest cas, la intensitat total és  $N_r$  vegades la intensitat  $|F_r(R, Z)|^2$  d'un sol filament.

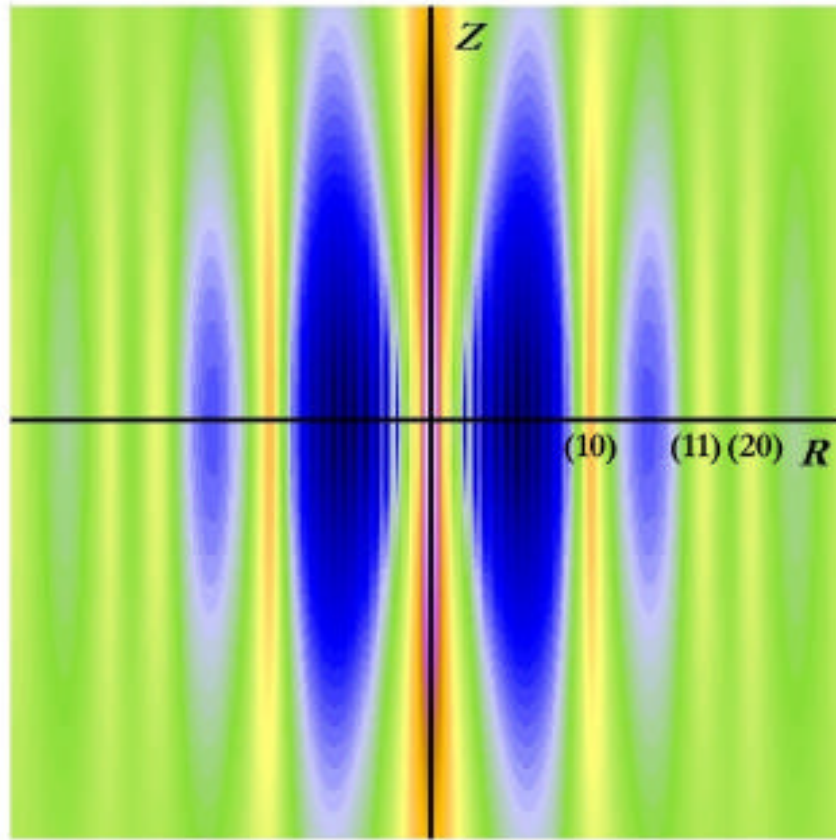
En canvi, en l'altre límit, quan el desordre  $D_{rr}$  o la distància radial  $R$  tendeixen a zero, apareixen els pics de la funció de Laue característics d'un filament ideal (expressió 5.15). Llavors, la funció d'interferència  $G_r$  pren el valor  $N_r^2$ , i es recupera l'efecte de la paracristal·linitat de la mostra. L'efecte del desordre  $D_{rr}$  augmenta amb  $R$  i, per tant, en el pic meridional s'espera que no sigui rellevant pel model. Segons l'expressió 7.12, aquest desordre pot ser negligit quan

$$DR_l \gg \frac{1}{\sqrt{N_r} R_l}, \quad (7.13)$$

on  $DR_l$  és l'amplada radial del pic meridional de la  $l$ -èsima línia de difracció. La condició 7.13 es compleix a bastament, donat que  $N_r$  és, per microscòpia electrònica, de l'ordre d'unes poques desenes de filaments com a molt, i l'ample radial del pic és, típicament,  $0.02 \text{ nm}^{-1}$ . Amb aquests valors, la condició per negligir aquest efecte és

$7 \text{ nm}$ . Per comparació, recordem que el paràmetre de xarxa en aquesta direcció és  $a = \text{ca. } 41 \text{ nm}$ . La condició es compleix folgadamente, com ho demostren les fotografies de seccions musculars de microscòpia electrònica, i, en conseqüència, el desordre  $D_{rr}$  serà negligit.

D'altra banda, seguint la direcció axial, la funció decau als pics de forma monòtona i asimptòtica al valor  $N_r$ , mentre que a les valls la funció augmenta fins a aquest mateix valor, de manera tant més ràpida com més alts siguin els valors de  $D_{rz}$ . El desordre  $D_{rz}$  representa la desviació axial en la direcció radial, és a dir, el desplaçament axial relatiu dels filaments contigus. Com veiem seguidament, aquest és el desordre rellevant que determina en major grau el perfil radial dels pics a prop del meridiana.



**Figura 7.1.** Comportament de la funció d'interferència radial  $G_r(R, Z)$  en el diagrama de difracció (expressió 7.12) d'una estructura de  $N_r = 15$  i desordres  $D_r$  i  $D_z$  iguals. Aquesta estructura origina els pics en l'equador, que progressivament es difuminen a causa del desordre. A prop de la línia central, s'observa una successió de línies menys intenses, però estretes i ben definides, que corresponen als màxims secundaris d'una funció de Laue. En els pics més allunyats del meridià, el desordre radial  $D_r$  té un efecte més gran que fa que els pics s'eixamplin i els pics secundaris de la funció de Laue desapareguin. En la direcció axial, en canvi, a mesura que s'augmenta  $Z$ , les línies disminueixen d'intensitat i s'eixamplen en funció de  $D_z$ .

### 7.1.3.3. La funció d'interferència axial

El tractament de la funció d'interferència axial  $G_z(R, Z)$  és anàleg a la funció radial (expressió 7.12), amb l'intercanvi de  $r$  per  $z$ ,

$$G_z(R, Z) = N_z + 2 \sum_{n=1}^{N_z} (N_z - n) e^{-2\pi^2 n (\frac{1}{2} R^2 + \frac{1}{2} Z^2)} \cos(2\pi n C_z R) \quad (7.14)$$

Així, la funció depèn únicament dels desordres  $D_r$  i  $D_z$ . La situació del múscul, i la limitació de la regió d'interès a la regió del meridià permet simplificar la funció d'interferència axial.

En primer lloc, el terme  $D_{zz}$  avalua el desordre axial en la direcció axial, que no és altre que el desordre de segona espècie unidimensional considerat als capítols 5 i 6 per als estats de contracció isomètrica i descans, respectivament. La conclusió ha estat que en cap dels dos estats no hi ha una contribució apreciable d'aquest desordre en els perfils axials del meridià, sinó una dispersió de periodicitats, fins i tot a ordres de difracció molt elevats (15M). Per tant, podem negligir aquest desordre i considerar que la periodicitat axial dels caps de miosina és ideal, de tal manera que la funció d'interferència és una funció de Laue.

En segon lloc, el desordre  $D_{zr}$ , que és la desviació radial de les unitats de difracció situades en la direcció axial, representa la distorsió que provoca la curvatura del filament gruixut o, també, la incertesa radial dels caps de miosina. Aquest pot ser negligit quan es compleix la condició

$$\frac{1}{\sqrt{N_z} R_l} \ll \lambda \quad (7.15)$$

Tant en descans com en contracció isomètrica, el valor típic de  $N_z$  és ca. 50, i de  $R_l$  és ca.  $0.02 \text{ nm}^{-1}$  (vegeu la secció 4.4) i, en conseqüència, la condició és similar a la del desordre  $D_{zr}$ , és a dir,  $\lambda \ll 7 \text{ nm}$ . El desordre  $D_{zr}$ , a la pràctica, ha de ser molt més petit, com queda demostrat, entre altres experiments, per la microscòpia electrònica [Craig, 1977] i, per tant, serà també negligit.

Un argument addicional per negligir el desordre  $D_{zr}$  és que aquest introdueix un efecte sobre les línies de difracció que depèn de  $R$  i no de  $Z$  i, per tant, és el mateix per a totes les línies. A mesura que s'allunya radialment del meridià, aquest desordre fa decaure el valor de la funció d'interferència. Així, encara que el desordre hagués estat important, aquest no afectaria a la relació d'intensitats de pic dels diferents ordres.

En resum, considerant els arguments anteriors, en el rang que comprèn el perfil radial del pic meridional de les línies de difracció, els desordres  $D_{zr}$  i  $D_{zz}$  poden ser negligits. En aquest cas, l'expressió 7.14 de la funció d'interferència  $G_z(\mathcal{S})$  pot ser reduïda al cas ideal sense desordre, que té la forma d'una funció de Laue (expressió 5.15),

$$G_z(R, Z) = \frac{\sin^2 \pi N_z C_z Z}{\sin^2 \pi C_z Z} \quad (7.16)$$

Aquest factor marca la localització meridional de les línies de difracció en els punts on té els màxims pronunciats, a  $Z = l/C$ , que, de fet, ja han aparegut en considerar l'amplitud de difracció de tot el filament gruixut, en la secció anterior.

La funció d'interferència axial (expressió 7.16) no depèn de la coordenada radial  $R$ , de manera que el perfil radial d'aquesta, obtingut en integrar sobre la coordenada  $Z$ , només és un factor numèric constant per a tots els ordres. Per a grans  $N_z$ , el resultat de la integració és, essencialment, l'àrea del pic principal de la funció de Laue i, per tant, la funció d'interferència en la regió del diagrama de difracció propera al meridià és

$$G_{z,l}(R) = \int_{Z_l} G_z(R, Z) N_z^2 \cdot \quad (7.17)$$

### 7.1.3.4. La funció d'interferència total

El producte de les dues funcions d'interferència radial  $G_r$  i axial  $G_z$ , expressions 7.12 i 7.16 respectivament, dona com a resultat la funció d'interferència de tota l'estructura  $G$ . Quan s'apliquen les simplificacions de les seccions anteriors, resulta una funció d'interferència total

$$G(R, Z) = \frac{\sin^2 \pi N_z C_z Z}{\sin^2 \pi C_z Z} N_r + 2 \sum_{n=1}^{N_r} (N_r - n) e^{-2\pi^2 n \left( \frac{r}{r_c} R^2 + \frac{z}{z_c} Z^2 \right)} \cos(2\pi n C_r R) \quad (7.18)$$

Cal recordar que aquesta expressió és vàlida en el rang en què les condicions 7.13 i 7.15 són vàlides, és a dir, el rang que abasta el pic meridional de les línies de difracció. Naturalment, en cas que es tractés d'ajustar el perfil radial de tota la línia de difracció, i no només el pic meridional, aquesta expressió s'hauria d'estendre i incloure els termes negligits.

Amb aquesta darrera equació és possible, finalment, trobar una expressió per a la intensitat de difracció, donat que la intensitat final d'una miofibril·la és el producte de  $G(R, Z)$  pel quadrat del factor d'estructura (expressió 7.6). En aquest cas, el factor d'estructura és l'amplitud de difracció de tota una estructura helicoidal, determinada per la funció de Bessel (expressió 7.5). Per tant, el perfil radial de la  $l$ -èsima línia de difracció d'una miofibril·la és

$$I_{0,l}(R) = 4\pi^2 F_l^2 r_l^2 J_0^2(2\pi r_l R) \int_{Z_l} \frac{\sin^2 \pi N_z C_z Z}{\sin^2 \pi C_z Z} N_r + 2 \sum_{n=1}^{N_r} (N_r - n) e^{-2\pi^2 n \left( \frac{r}{r_c} R^2 + \frac{z}{z_c} Z^2 \right)} \cos(2\pi n C_r R) dZ \quad (7.19)$$

on la integració es realitza a tota l'amplada axial  $Z_l$  de la línia de difracció. Sobre aquesta expressió, si suposem que dins d'aquest ample axial de la línia de difracció el desordre axial en la direcció radial compleix la condició

$$\frac{1}{\sqrt{N_r} Z_l} \quad (7.20)$$

podem treure de la integral de l'expressió 7.19 la funció d'interferència radial. Aquesta condició es compleix amb escreix, ja que l'ample axial  $DZ_l$  de les línies de difracció val típicament ca.  $0.006 \text{ nm}^{-1}$  (vegeu el capítol 4), i  $N_r$  és d'unes poques desenes de unitats. Amb aquests valors, la condició que ha de complir aquest desordre és  $D_{rz}$  ca. 20 nm, distància superior fins i tot a la teòrica repetició axial de  $C_z = \text{ca. } 14 \text{ nm}$ . La integració axial es realitza únicament amb la funció de Laue, que pren un valor  $N_z^2$  (expressió 7.17) Així, sota aquesta simplificació, l'expressió general anterior té la forma

$$I_{0,l}(R) = 4\pi^2 F_l^2 r_l^2 J_0^2(2\pi r_l R) N_z^2 N_r + 2 \sum_{n=1}^{N_r} (N_r - n) e^{-2\pi^2 n^2 \frac{l^2}{c_z^2}} \cos(2\pi n C_r R) \quad (7.22)$$

on se substitueix la coordenada axial  $Z$  pel seu valor  $l/C_z$  a la línia  $l$  considerada. El factor  $N_z$  només aporta un valor numèric constant a tots els ordres  $i$ , per tant, no intervé en l'ajustament.

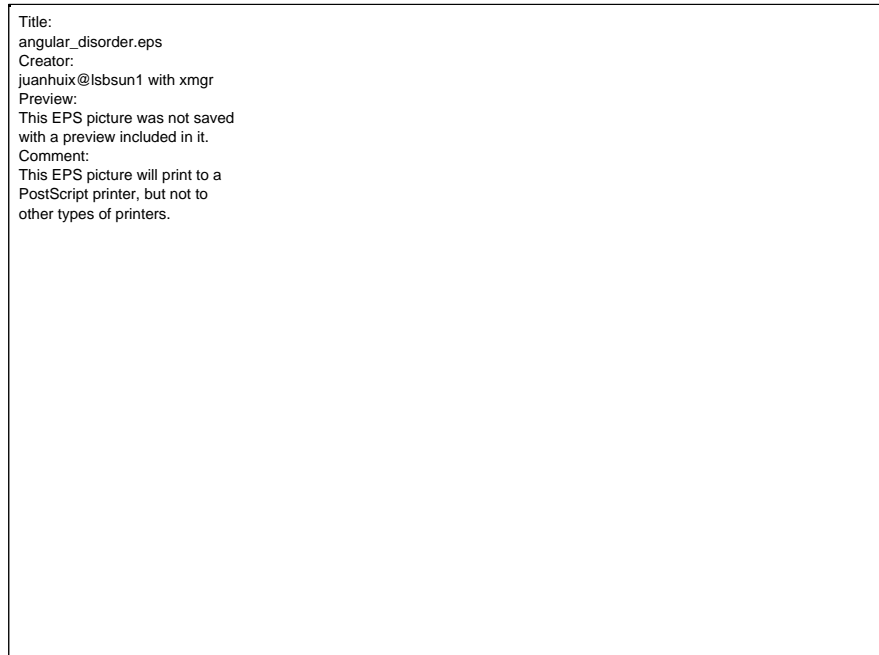
En treballs basats amb fibres musculars, el perfil radial de la intensitat (expressió 7.19), o la seva simplificació (expressió 7.22), són expressions finals les que han d'ajustar les dades experimentals. En el nostre cas, però, es treballa amb músculs vius, fet que pot afegir un nou tipus de desordre que és estudiat a continuació.

#### 7.1.4. La desviació angular de les fibres

El darrer factor que intervé en l'amplitud de la línia de difracció és la desviació angular de les fibres musculars. Aquesta desviació es dona, essencialment, a causa de la forma de fus del múscul, de tal manera que les fibres perden lleugerament el paral·lelisme. Cal no confondre aquesta desviació de l'anterior desordre intern producte de la xarxa hexagonal de l'interior d'una miofibril·la. L'origen de la desviació és molt diferent i, per tant, ha de tenir un tractament matemàtic diferenciat.

La presència d'aquesta desviació pot ser indicada en les ampliacions bidimensionals de les línies de difracció de la miosina del capítol 4 (figures 4.2, 4.6, 4.11 i 4.14). Els pics en el meridià de les línies de difracció meridionals semblen tenir una curvatura significativa, característica d'aquest tipus de desviació. A més, la desviació angular podria contribuir a eixamplar l'amplada dels pics dels ordres més alts és més gran. En l'anàlisi es comprovarà quin és l'abast real d'aquesta desviació.

L'efecte de la desviació angular és esquematitzada en la figura 7.2. L'altura del pic a  $R = 0$ , que és el valor utilitzat en el càlcul de la densitat axial de massa segons l'expressió 7.1, és sensiblement menor al real en presència de desordre angular ja que, al punt  $R = 0$ , les fibres desviades donen un valor lateral al pic en lloc del valor màxim central. Aquest efecte es va agreujant a mesura que augmenta l'ordre.



**Figura 7.2.** Perfil radial d'una línia de difracció que mostra l'efecte del desordre angular. La intensitat de pic esperada de la suma de les funcions de Bessel és 30 ( $3 \times 10$ ), però el valor absolut és a penes 27. Amb tot, si bé la intensitat de pic (altura) disminueix, l'àrea del pic amb desordre és la mateixa que la que tindria sense desordre.

Suposant una distribució estadística gaussiana de les fibres, la desviació angular queda caracteritzada per la desviació angular mitjana que tenen respecte l'eix vertical. En el diagrama de difracció, l'efecte és un augment de la desviació mitjana lineal de les fibres les línies de difracció proporcional a l'ordre  $l$ ,

$$s_l = l s \quad , \quad (7.23)$$

on  $s$  és la desviació lineal mitjana del primer ordre de difracció. La conseqüència d'aquest desordre és una convolució del perfil radial de la intensitat de la fibra vertical amb la distribució gaussiana de la desviació,

$$I_l(R) = I_{0,l}(R) g(l\sigma) \quad (7.24)$$

en què  $I_{0,l}$  ve donada per l'expressió 7.19, o la seva simplificació (expressió 7.22), i la distribució de desviacions del  $l$ -èsim ordre de difracció és

$$g(l\sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} l\sigma} e^{-\frac{R^2}{2l^2\sigma^2}} \quad . \quad (7.25)$$

Cal destacar que l'àrea total del pic no és afectat per aquesta convolució però, en canvi, sí que ho és el perfil radial i la intensitat de pic, és a dir, l'altura. Així doncs, la desviació angular de les fibres és un factor que afecta l'extracció directa del mòdul de l'amplitud de difracció (expressió 7.2), i que solament pot ser tingut en compte pel model que estem elaborant.

### 7.1.5. El perfil radial de les línies de difracció

Fent explícita l'expressió 7.24, i reunint tots els termes constants per a tots els ordres en la constant  $K$ , el perfil radial de la  $l$ -èsima línia de difracció, vàlida a prop del meridiana, és

$$I_l(R) = K F_l^2 \left[ r_l^2 J_0^2(2\pi r_l R) \prod_{n=1}^{N_r} (N_r - n) e^{-2\pi^2 n^2 \frac{l^2}{r_l^2 C_z^2}} \cos(2\pi n C_r R) \right] \frac{1}{l\sigma} e^{-\frac{R^2}{2l^2\sigma^2}} \quad (7.26)$$

Aquesta funció ha de ser ajustada a les dades experimentals dels perfils radials, mitjançant els paràmetres rellevants que hi intervenen: el radi mitjà  $r_l$  del parell de caps de miosina vist en l'ordre  $l$ ; el nombre de filaments en la direcció radial  $N_r$ ; la desviació axial mitjana  $D_{rz}$  del filament veí en la direcció radial, i el desordre angular de les fibres musculars  $s$ . Suposarem coneguts els paràmetres de la xarxa del múscul:  $C_r = a = \text{ca. } 41 \text{ nm}$ , i  $C_z = 14.3173 \text{ nm}$  en l'estat de descans, i  $C_z = 14.45 \text{ nm}$  en contracció isomètrica.

El perfil radial de la intensitat és proporcional al quadrat de l'amplitud de difracció  $F_l^2$ . Per tant, si el perfil es pot modelar correctament, el factor d'escala entre el model i les dades experimentals és proporcional a  $F_l^2$ . El factor numèric  $K$  és igual per a tots els ordres, ja que depèn solament del nombre de caps en un filament gruixut,  $N_z$ , i de les característiques del detector i, per tant, no intervé en l'ajustament.

Qualitativament, avaluem l'efecte dels diferents paràmetres. D'entrada, la desviació angular de les fibres aporta una convolució amb la resta de factors del perfil radial. La desviació típica augmenta linealment amb l'ordre, però l'efecte queda tapat per l'augment de l'amplada del pic amb l'ordre de difracció que causa el desordre de segona espècie, de manera que l'efecte d'aquest factor pot ser negligit en primera aproximació.

En segon lloc, el nombre d'unitats en la direcció radial,  $N_r$ , té l'efecte d'eixamplar per igual tots els ordres de difracció, anàlogament a l'efecte que té en la funció de Laue (secció 5.2.3). La semiampçada del pic de Laue és

$$R_{N_r} = \frac{1}{N_r a} \quad , \quad (7.27)$$



on  $a$  és el paràmetre de la xarxa hexagonal (vegeu la secció 2.5). Aquest valor és exacte en absència de tot tipus de desordre en el múscul  $i$ , per tant, imposa un límit inferior constant a l'amplada dels pics de difracció.

Aquesta amplada, però, només és rellevant quan l'efecte del desordre de segona espècie  $D_{iz}$  és baix. A mesura que s'augmenta l'ordre de difracció, l'amplada del pic de difracció augmenta, emmascarant l'efecte de l'eixamplament que provoca en nombre finit d'unitats. La importància relativa dels dos paràmetres depèn de l'estat muscular.

Aquests dos paràmetres, però, perden importància a ordres molt alts, quan el desordre és tal que la funció d'interferència és pràcticament constant  $i$ , per tant, els pics de difracció estan difuminats. En aquesta situació, l'efecte més rellevant el té el radi característic de la funció de Bessel. El pic de la funció de Bessel de l'ordre  $l$ -èsim té una semiamplicitud [Abramowitz i Stegun, 1965]

$$R_{l,Bess} = \frac{2.4}{2\pi r_l} \quad (7.28)$$

En aquesta distància radial, la funció de Bessel s'anul·la i és, per tant, el factor rellevant. Quan el radi és gran, el zero de la funció queda emmascarat pels pics de difracció de la xarxa hexagonal, en cas d'haver-hi. Es produeix llavors el fenomen de mostratge, que ja ha estat exposat al capítol 2. Si el radi decreix, el pic meridional de l'estructura hexagonal es veu ja influenciat per la funció de Bessel.

## 7.2. Els perfils radials en descans

El tractament desenvolupat en l'apartat anterior (expressió 7.26) és aplicat tot seguit als perfils radials experimentals de les línies de difracció en l'estat de descans, mostrats al capítol 4. Demostrem a continuació que el tractament reproduïx correctament la intensitat experimental del pic meridional de totes les línies de difracció.

La integració axial dels diferents ordres, a partir de la qual s'obté el perfil radial, abasta tot l'ample axial de les línies (90 píxels). En aquest ample, però, les línies en l'estat de descans contenen contribucions molt significatives d'altres periodicitats apart de la dels caps de miosina que poden afectar els paràmetres del model. Per minimitzar aquest efecte, el mòdul  $F_l$  del factor d'estructura obtingut en aquesta modelització es multiplicarà per un pes relatiu d'entre totes les contribucions d'una mateixa reflexió (vegeu les seccions 6.3.1 i 9.4.1).

De tota manera, l'excel·lent ajustament dels perfils radials indica que la presència de diverses contribucions en una mateixa línia de difracció no és crítica, i que les diverses aproximacions realitzades són correctes. En particular, la suposició que els diferents elements de massa que difracten es poden resumir en un radi mitjà (vegeu la secció 7.1.2) continua essent vàlida, malgrat les pluralitat de contribucions.

En aquest sentit, remarquem que, en l'ordre 2M, a més de la substracció de la dispersió de fons, s'ha fet una segona substracció per eliminar la contribució del tercer ordre de la periodicitat del col·lagen que s'hi superposa. El cercle de difracció del

col·lagen a prop d'aquesta reflexió de la miosina és evident a partir de la figura 4.2, i l'efecte que té sobre el perfil radial és palès a la figura 4.16.

Els ordres de difracció dels caps de miosina ajustats pel model són 2M-12M i 15M, és a dir, tots els enregistrats. Això no obstant, alguns d'ells són molt dèbils i, per tant, cal el seu ajustament és solament orientatiu. Igualment, no tots els ordres seran utilitzats posteriorment per determinar els mapes axials de densitat electrònica.

Sobre aquests ordres, es realitza l'ajustament de l'expressió 7.26 als perfils radials experimentals. En l'ajustament, tres dels paràmetres ( $N_r$ ,  $D_{rz}$ , i  $s$ ) són constants en tots els ordres, i només el restant,  $r_l$ , es deixa lliure a cada ordre. L'ajustament, mostrat a les figures 7.3 i 7.4, és notable, i aconsegueix reproduir correctament tant les amplades com la forma dels pics de difracció meridionals, que poden tenir des d'una forma de campana als primers ordres, fins ser pràcticament triangulars en l'ordre 11M. Els valors dels intensitats extrems, així com dels paràmetres òptims, estan llistats a la taula 7.1.

En l'ajustament es comprova que, a ordres baixos, fins aproximadament la reflexió 7M, el factor dominant és el desordre  $D_{rz}$ , que provoca un eixamplament lineal de les amplades dels pics (figura 7.5). En la reflexió 2M i, en menys mesura, la 3M també hi intervé el nombre de unitats de difracció  $N_r$ , si bé l'optimització demostra que aquest paràmetre no és crític. Fins la reflexió 6M, l'ajustament no és sensible al valor del radi de la funció de Bessel, donat que l'amplada del pic de Bessel és més gran que l'amplada que provoca el desordre. Com a hipòtesi, s'ha utilitzat el valor obtingut en la reflexió 7M, el primer ordre sensible a aquest paràmetre, tot i que no afecta a l'ajustament.

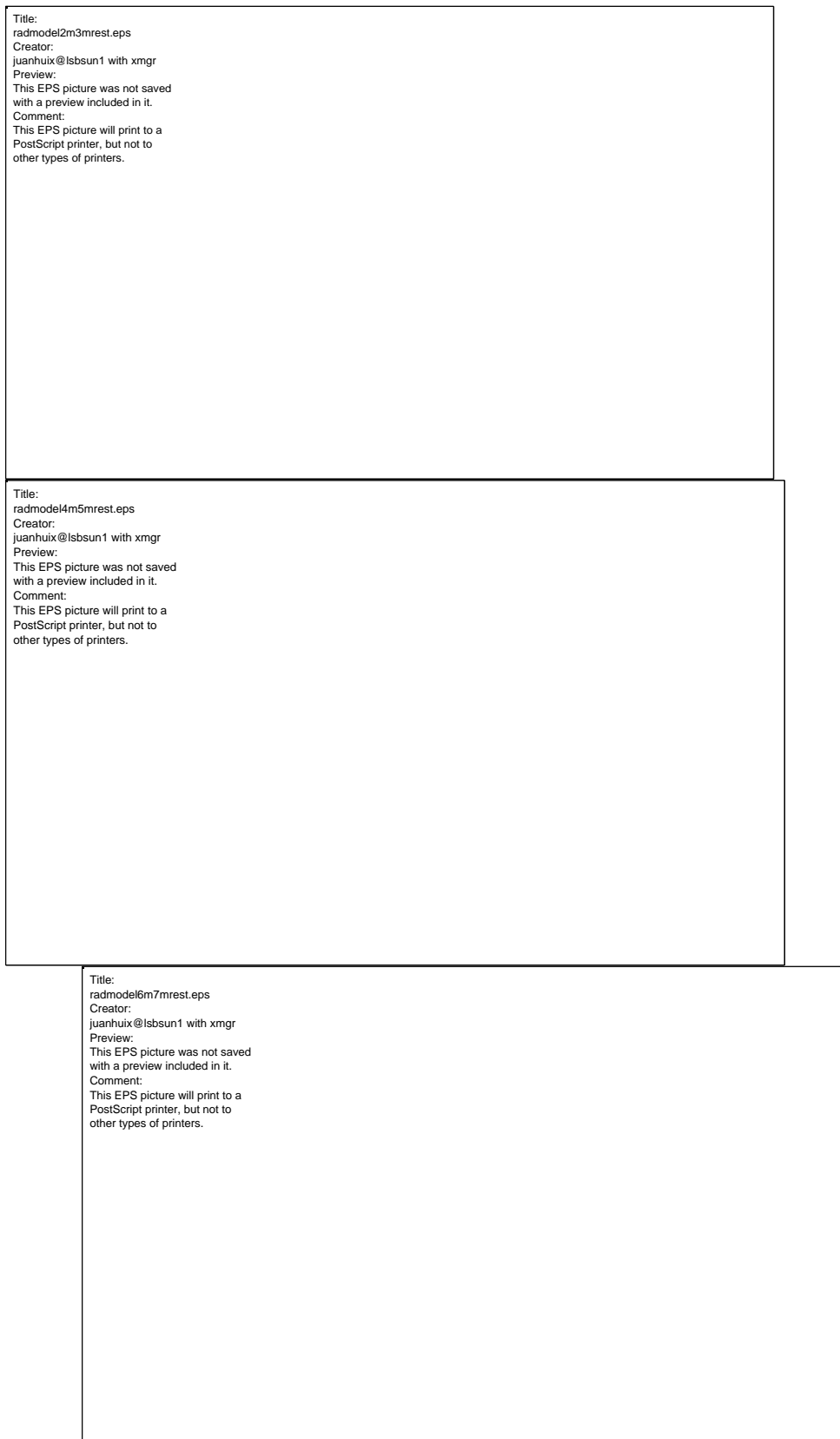
A partir de la reflexió 7M, el factor determinant és, cada cop més, la funció de Bessel, amb un radi  $r_l$  que decreix progressivament amb l'ordre. Aquest efecte és justificable, donat que els fragments del parell de caps de miosina més propers a l'esquelet i, per tant, amb un radi menor, molt probablement tindran una contribució més gran al filament gruixut. Finalment, ja a la reflexió 15M, únicament contribueix la funció de Bessel. A alts ordres, els fragments més llunyans de l'esquelet del filament han perdut la coherència, de tal manera que el radi aparent en el diagrama de difracció decreix.

D'altra banda, el valor de la desviació angular de les fibres és ca.  $5.7 \cdot 10^4 \text{ nm}^{-1}$ , un valor petit comparat amb la semiamplada típica dels pics, ca.  $0.02 \text{ nm}^{-1}$ . Aquest valor de la desviació mitjana de les fibres correspon a una desviació de  $1.4^\circ$ , un valor lleugerament més petit que l'angle mitjà de ca.  $4^\circ$  que descriu la forma de fus del múscul. Això és així, amb tota seguretat, a causa de la reduïda dimensió del feix de llum sincrotró, que fa que només irradii una petita part de l'amplada del múscul. Així, la desviació observada en el diagrama de difracció ha de correspondre a aquesta amplada, en lloc de la total.

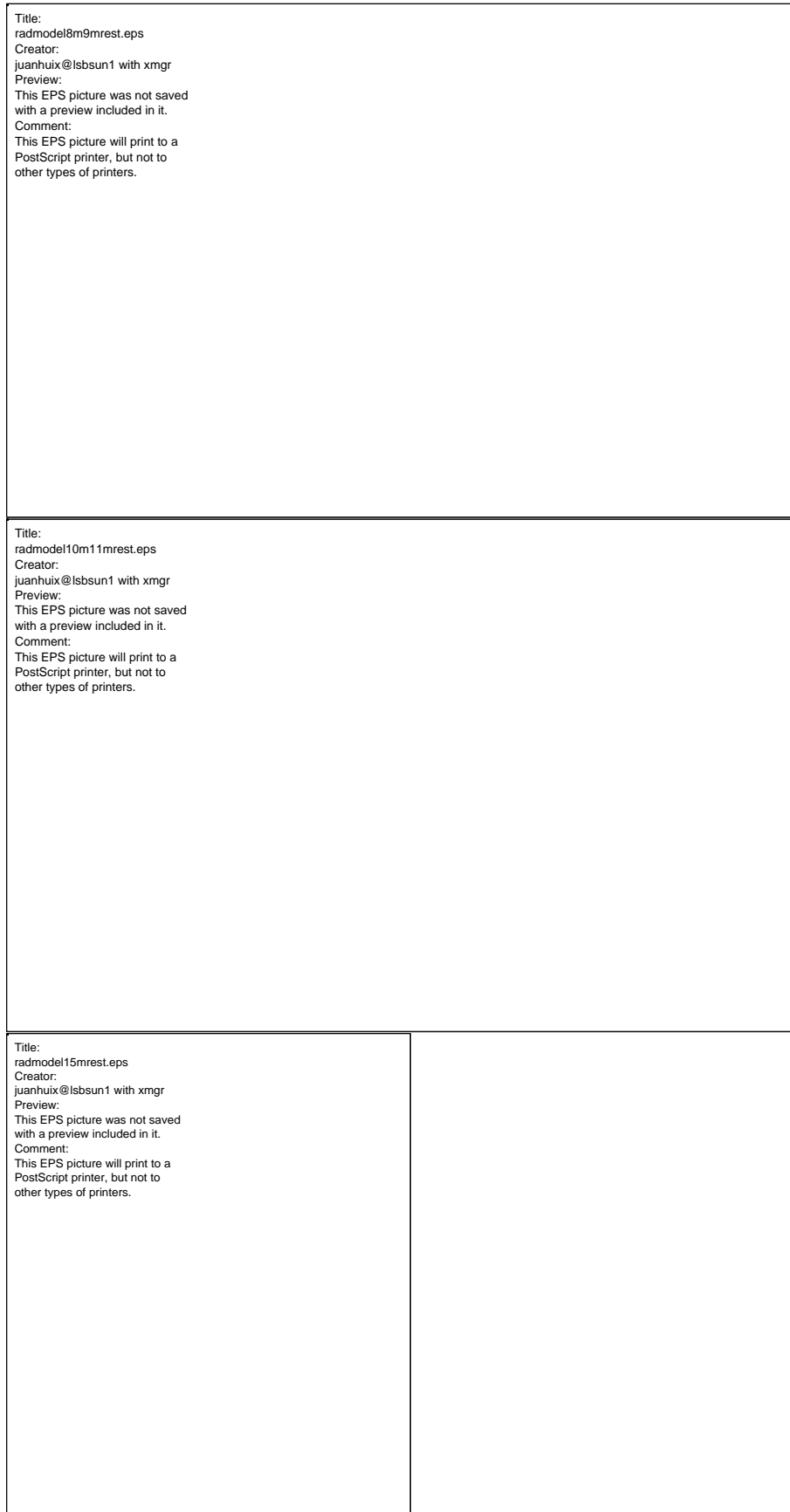
De tota manera, l'ajustament és poc sensible a aquest paràmetre, a causa del baix valor que té en comparació amb la semiamplada total del pic de difracció. Aquest valor ha de ser pres, més aviat, com una indicació que aquesta desviació no és un factor important en la forma final del perfil radial de les línies de difracció.

**Taula 7.1.** Valors de l'amplitud de difracció dels ordres en l'estat de descans respecte de l'amplitud de la reflexió 3M. A la columna  $F_l$  hi figuren els valors extrems ajustant les dades experimentals al model teòric (expressió 7.26). A la columna  $\sqrt{I_{exp}}$  hi ha llistats els valors experimentals de l'amplitud de difracció extrems de manera directa (expressió 7.2). Es mostren també el valor del radi mitjà utilitzat en cada ordre. Els valors marcats amb asterisc no són rellevants per a l'ajustament (vegeu el text).

$N_r = 9$ $D_{rz} = 1.42 \text{ nm}$ $s = 5.2 \cdot 10^{-4} \text{ nm}^{-1}$	$r_l$ [nm]	$F_l$	$\sqrt{I_{exp}(R=0)}$
2M	15 *	0.666	0.916
3M	15 *	1	1
4M	15 *	0.465	0.347
5M	15 *	0.565	0.320
6M	15 *	0.565	0.247
7M	15	0.195	0.071
8M	14.4	0.384	0.111
9M	10.3	0.264	0.047
10M	7.4	0.465	0.052
11M	8.5	0.963	0.120
12M	-	-	0.020
15M	7.9	0.293	0.032



**Figura 7.3.** Ajustament dels perfils radials de les reflexions 2M, 3M, 4M, 5M i 6M de l'estat de descans al model (expressió 7.26). En les dades experimentals de la 2M s'ha substatret la contribució del tercer ordre de col·lagen, visible clarament a la figura 4.2.



**Figura 7.4.** Ajustament dels perfils radials de les reflexions 8M, 9M, 10M, 11M i 15M de l'estat de descans al model (expressió 7.26).

### 7.3. Els perfils radials en contracció isomètrica

En l'estat de contracció isomètrica, els perfils radials de les línies de difracció dels caps de miosina permeses poden, a priori, ser reproduïts amb més precisió encara que els perfils en l'estat de descans, ja que, en aquestes reflexions, les contribucions de la proteïna C, la troponina, i altres estructures pràcticament desapareixen (vegeu la secció 4.3). La reflexió 12M té una intensitat negligible i, per tant, no serà considerada d'ara en endavant.

Igualment, en contracció isomètrica, les reflexions prohibides pràcticament desapareixen i, a més, la poca intensitat que en resta és atribuïble a altres periodicitats del múscul. En conclusió, les úniques reflexions que cal considerar en contracció isomètrica són la 3M, 6M, 9M i 15M.

El rang d'integració axial és més reduït que en descans, 50 píxels, donat que en les reflexions considerades únicament hi intervenen els caps de miosina i, per tant, hi ha menys dispersió de periodicitats. En contracció isomètrica, igual que en l'anterior estat muscular, es mantenen constants a tots els ordres els paràmetres  $N_r$ ,  $D_{zz}$  i  $s$ , i es deixa lliure a cada ordre de difracció el radi de la funció de Bessel  $r_l$ . El resultat dels ajustaments es mostra a la figura 7.5. Els paràmetres òptims es llisten a la taula 7.2.

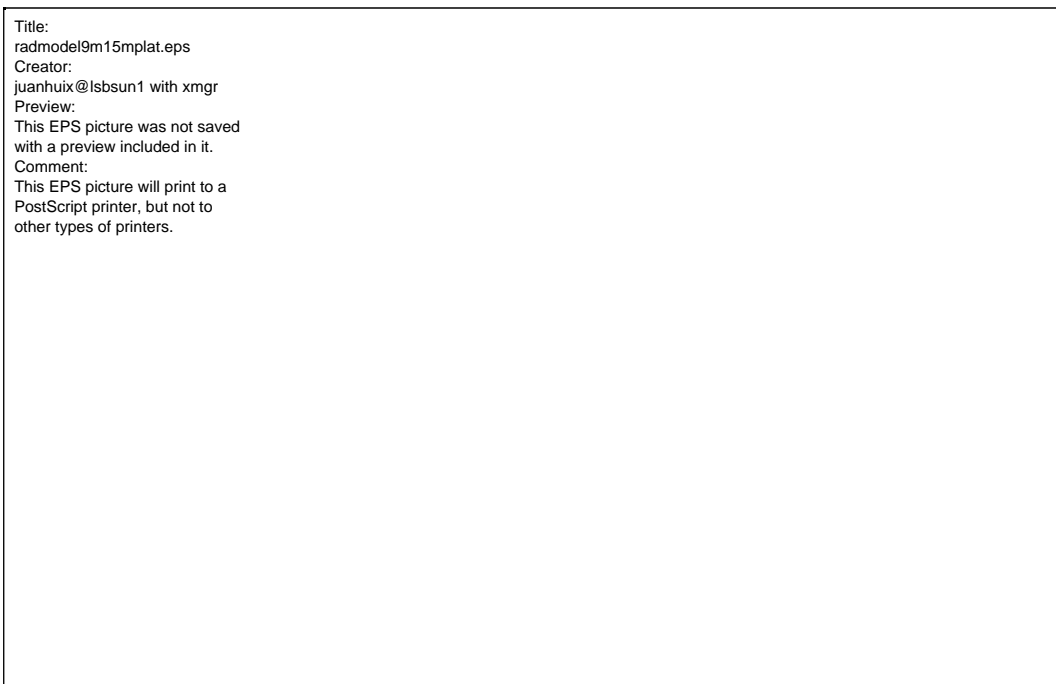
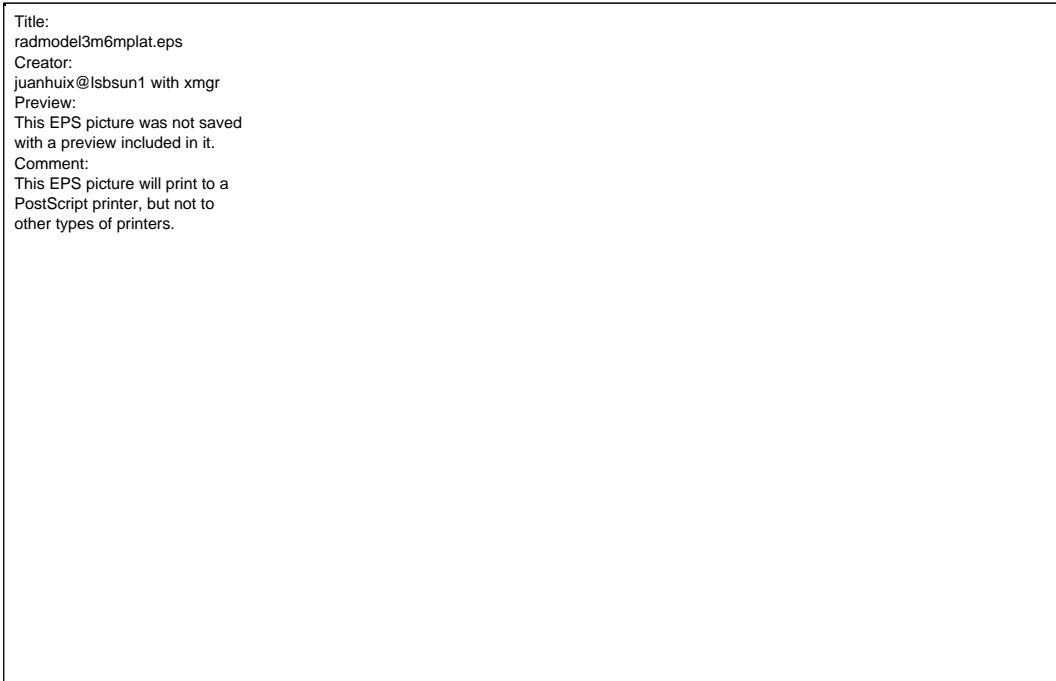
Una de les característiques més importants del diagrama de difracció en l'estat de contracció isomètrica és la pràctica absència de l'efecte de mostratge de la xarxa hexagonal. Això fa pensar que el desordre radial és molt gran, i la funció d'interferència  $G(R, Z)$  tendeix ràpidament al valor constant  $N_r N_z$ . En aquest cas, el perfil radial de la línia de difracció ve determinat a la pràctica pel radi de la funció de Bessel.

**Taula 7.2.** Valors de l'amplitud de difracció dels ordres en l'estat de contracció isomètrica respecte de l'amplitud de la reflexió 3M. A la columna  $F_l$  hi figuren els valors extrets ajustant les dades experimentals al model teòric (expressió 7.26). A la columna  $\sqrt{I_{exp}}$  hi ha tabulats els valors de l'amplitud de difracció. Es mostren també el valor del radi mitjà utilitzat en cada ordre.

$N_r = 10$ $D_{zz} = 3.5 \text{ nm}$ $s = 4.1 \cdot 10^{-4} \text{ nm}^{-1}$	$r_l$ [nm]	$F_l$	$\sqrt{I_{exp}}(R = 0)$
3M	10.9	1	1
6M	10.9	0.477	0.496
9M	9.9	0.196	0.199
15M	9.4	0.146	0.158

D'altra banda, en contracció isomètrica la desviació angular de les fibres  $s$  és ca.  $4 \cdot 10^{-4} \text{ nm}^{-1}$ , que correspon a un valor de l'angle de desviació típica de  $1^\circ$ . Aquest valor, més petit encara que en descans, és plausible donat que la contracció tensa el teixit muscular i, per tant, ha d'afavorir el paral·lelisme entre fibres. A més, els pics meridionals de les línies de difracció en aquest estat són més amples que en l'estat de descans i, per tant, l'efecte del paràmetre és encara menys important. Així,

l'ajustament és molt poc sensible a aquest paràmetre i, per tant, el seu valor només ha de ser pres de forma orientativa, i indicativa que l'efecte de la desviació de les fibres és molt reduït o, fins i tot, negligible.



**Figura 7.5.** Ajustament dels perfils radials de les reflexions 3M, 6M, 9M i 15M de l'estat de contracció isomètrica al model (expressió 7.26).

## 7.4. Discussió

En aquest capítol s'ha aconseguit elaborar un tractament teòric, que creiem original, que ajusta correctament el perfil radial dels pics meridionals de les línies de difracció que generen els caps de miosina, únicament amb la intervenció de tan sols 4 paràmetres lliures. El tractament teòric té en compte les següents contribucions al perfil radial: la component cilíndrica dels filaments gruixuts (via el radi  $r_l$  de la component  $J_0$  de les línies de difracció que apareixen a causa de la simetria helicoïdal); els desordres en la xarxa hexagonal (via el nombre de filaments  $N_r$  i el desordre de segona espècie axial dels filaments paral·lels  $D_{rz}$ ), i el desordre angular  $s$  de les fibres musculars. D'aquests quatre paràmetres, tan sols en el primer, el radi de la funció de Bessel, es permet la variació a cada ordre, mentre que els altres tres tenen el mateix valor en tots els ordres.

D'entrada, en tots dos estats i, especialment, en contracció isomètrica, l'efecte del desordre angular és molt petit. Efectivament, la desviació típica dels filaments en els dos estats és  $s_l = \text{ca. } l \times 5 \cdot 10^{-4}$  nm. A la reflexió 15M, on la desviació angular ha de ser més acusada, la desviació típica és  $0.008 \text{ nm}^{-1}$ , lluny de l'ample del pic de difracció  $DR_l = 0.04 \text{ nm}^{-1}$ . Aquest efecte, per tant, és molt petit i pot ser ignorat.

L'expressió 7.26 origina dos tipus de comportament del pic: el comportament cristal·lí i el no cristal·lí, que ara passem a descriure. En tota aquesta discussió negligim l'efecte de la desviació angular de les fibres, donada la poca rellevància que té en el nostre cas.

### 7.4.1. Comportament cristal·lí de la mostra

El cas cristal·lí es presenta quan les desviacions de la posició ideal dels filaments són petites en relació a la resolució de l'ordre de difracció que considerem, és a dir, quan el desordre  $D_{rz}$  tendeix a zero. En aquest cas, la funció d'interferència té la forma d'una funció de Laue, d'amplada molt més curta que l'amplada de la funció de Bessel  $DR_l$ . Així, la funció de Bessel pot ser considerada constant, de valor  $J_0(0) = 1$ , i l'expressió 7.26 es redueix a

$$I_{l,crist}(R) = K F_l^2 r_l^2 \frac{\sin^2 \pi N_r C_r R}{\sin^2 \pi C_r R} \quad (7.28)$$

Experimentalment hem trobat que el radi de la funció de Bessel  $r_l$  és constant a ordres baixos i, per tant, no afecta a les intensitats relatives dels ordres de difracció. La intensitat de difracció és, per tant, proporcional al quadrat de la funció de Laue, que depèn del nombre de filaments  $N_r$ . Convé recordar que, encara que físicament el nombre de filaments és, evidentment, el mateix per a totes les reflexions, la presència de desordre de segona espècie té l'efecte de disminuir el nombre aparent.

La millor mesura d'aquest nombre aparent, que és diferent a cada ordre, la dona l'amplada radial  $DR_l$ . Efectivament, el valor de pic de la funció de Laue és proporcional al quadrat del nombre aparent de filaments, mentre que l'amplada de la funció de Laue  $DR_l$  és inversament proporcional a  $N_r$  (expressió 7.27). Reunint aquestes dues



dependències, tenim que la intensitat al meridià ( $R = 0$ ) ha de ser corregida per un factor  $DR_l^2$ , és a dir,

$$I_{l,crist} = I_{l,exp} R_l^2, \quad (7.29)$$

Equivalentment, la intensitat corregida també es pot expressar, utilitzant l'expressió 7.28, com

$$I_{l,corr}(R=0) = K F_l^2 r_l^2 N_r^2. \quad (7.30)$$

### 7.4.2. Comportament no cristal·lí de la mostra

El cas oposat a l'anterior es dona quan el desordre és molt gran, de manera que es perd la interferència entre filaments, la funció d'interferència pren el valor constant  $N_r$  i el perfil radial de la intensitat és

$$I_{l,no\ crist}(R) = K F_l^2 N_r r_l^2 J_0^2(2\pi r_l R). \quad (7.31)$$

En el cas no cristal·lí, per tant, l'amplada radial del pic depèn de la funció de Bessel i no del nombre aparent de filaments. L'amplada de la funció de Bessel és inversament proporcional al radi aparent  $r_b$ , de manera que, en disminuir aquesta mesura que augmenta l'ordre, les reflexions es van eixamplant. Aquest efecte és observat clarament als ordres més elevats en l'estat de descans.

Exactament al meridià ( $R = 0$ ), l'expressió 7.31 es pot expressar com

$$I_{l,no\ crist}(R=0) = K F_l^2 r_l^2 N_r. \quad (7.32)$$

### 7.4.3. La correcció augmenta la intensitat dels ordres alts

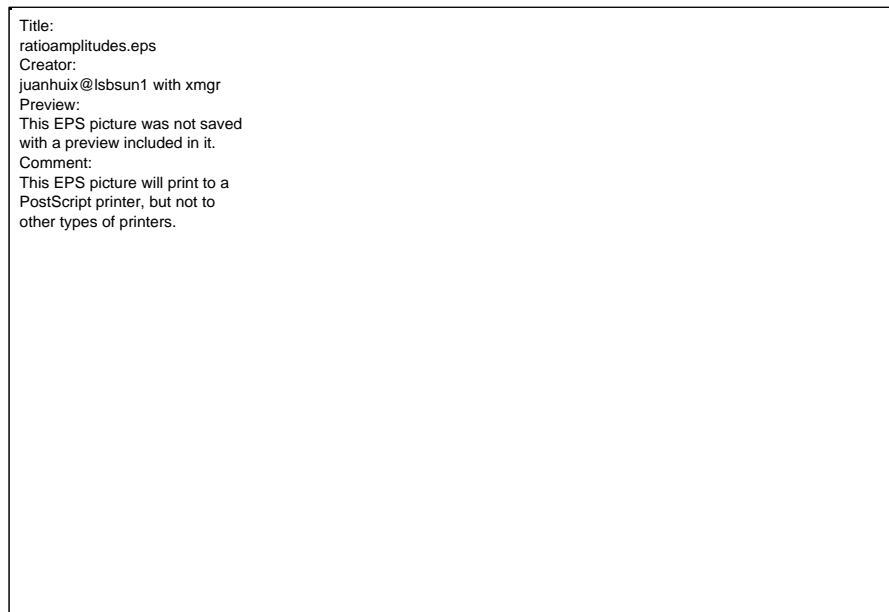
Si comparem les expressions 7.30 i 7.32, veiem que en la situació cristal·lina del múscul, la altura del pic depèn de  $N_r^2$ , mentre que, en la situació no cristal·lina, la dependència és lineal amb  $N_r$ . Per tant, la pèrdua de cristal·linitat provoca una disminució de la intensitat dels pics meridionals dels ordres més elevats.

Això queda reflectit en la figura 7.6. En l'estat de descans, l'amplitud de difracció obtinguda mitjançant el tractament teòric és diverses vegades superior a l'amplitud extreta simplement amb l'arrel quadrada de la intensitat del pic (expressió 7.2), fins a l'extrem que, en la reflexió 15M, l'amplitud modelada és aproximadament 10 vegades

l'amplitud extreta directament de la intensitat aparent. Als ordres més baixos, la discrepància entre els dos valors augmenta linealment, i proporcionalment al desordre  $D_{rz}$ . A partir de la reflexió 9M, la corba perd la linealitat amb l'ordre, i el perfil radial és avaluat segons l'expressió 7.31, que depèn essencialment del radi  $r_l$ .

Així, en l'estat de descans, l'ajustament és molt sensible al valor del desordre  $D_{rz}$  a baixos ordres de difracció, mentre que, a partir de l'ordre 8M, el radi de la funció de Bessel comença a tenir més importància. L'efecte del nombre de filaments  $N_r$  queda limitat a la reflexió 2M i, en menor mesura, la reflexió 3M. Això palesa el fet que la cristal·linitat de la mostra és el factor més important en la forma del pic a baixos ordres, però disminueix la seva influència fins al punt que, a partir de la reflexió 8M, el pic ve determinat principalment per la forma d'un sol parell de caps.

Respecte de contracció isomètrica, del diagrama de difracció resulta aparent que el desordre és molt més important, i així es reflexa en el model, on el valor òptim passa de  $D_{rz} = 1.5$  nm, en l'estat de descans, a  $D_{rz} = 3.5$  nm, en contracció isomètrica. No hi ha discrepància entre els valors de l'amplitud de difracció extrets a partir del model i directament, fet que indica que, ja a la reflexió 3M el règim és principalment no cristal·lí i, en tot el diagrama de difracció, els filaments no presenten pràcticament coherència radial.



**Figura 7.6.** Estimació de les amplituds de difracció obtingudes mitjançant el tractament teòric ( $F_{model}$ ) respecte el mètode directe ( $F_{exp}$ ). En contracció isomètrica, l'efecte de les diferents contribucions considerades al model es pràcticament nul ( $F_{model}/F_{exp} = 1$ ). En l'estat de descans, hi ha un augment lineal de la sobreestimació amb l'ordre, característic de la pèrdua de cristal·linitat. A ordres superiors, finalment, es produeix una saturació, ja que la cristal·linitat ja s'ha perdut totalment, i l'amplitud depèn ja només de la funció de Bessel.