

Capítol

8

Els mapes de densitat electrònica en contracció isomètrica

A partir de l'extracció de la fase (excepte la incertesa en π) i el mòdul dels diferents ordres dels caps de miosina realitzada en els capítols 5 i 7, respectivament, construïm la síntesi de Fourier que permet deduir els possibles mapes axials de densitat electrònica en contracció isomètrica. L'ajustament de les dades cristal·logràfiques del cap de miosina als mapes axials permet resoldre la incertesa en π de les fases i quantificar l'orientació dels dos caps de miosina que formen el

8.1. El mapa de densitat electrònica en contracció isomètrica

8.1.1. La resolució de la incertesa en la fase

El mapa axial de densitat electrònica dels caps de miosina, objectiu principal d'aquest treball, és obtingut mitjançant la construcció de la síntesi de Fourier (expressió 2.18),

$$\rho_z(z) = \sum_l F_l \cos 2\pi z \frac{l}{C} + \phi_l \quad (8.1)$$

Els tractaments teòrics elaborats als tres capítols precedents han permès extreure els mòduls F_l i les fases f_l axials dels parells de caps de miosina. Amb tot, a causa de la centrosimetria del sistema, responsable de la funció d'interferència especular (expressió 5.16), les fases f_l tenen una indeterminació en p que ha de ser resolta.

Aquesta indeterminació de la fase porta a que, per a cada ordre de difracció, hi hagi dues possibilitats. En una síntesi de Fourier amb n ordres, per tant, hi ha, en principi, 2^n possibilitats. No obstant això, donat que l'origen de les fases és arbitrari, podem fixar arbitràriament la fase d'un ordre de la síntesi, de manera que es resol la incertesa d'aquesta fase i el nombre total de combinacions es redueix a 2^{n-1} . En el cas del mapa de densitat electrònica en contracció isomètrica, l'origen de fases s'ha escollit de manera que la fase del factor d'estructura de la reflexió 3M, f_{3M} , sigui p al centre de la reflexió (vegeu la secció 5.3.1.1).

La decisió sobre quin dels possibles mapes axials de densitat electrònica és més realista es realitza a partir de tres criteris: el teorema de la longitud d'ona mínima, la presència de *ripples* (*solvent flattening method*) i la compatibilitat amb una orientació del parell de caps de miosina capaç d'ajustar-se al mapa axial de densitat.

8.1.1.1. El teorema de la longitud d'ona mínima

El nombre de possibles mapes electrònics es redueix amb l'ús de la teorema de la mínima longitud d'ona (*minimum wavelength theorem*) [Bragg i Perutz, 1952]. Aquest estableix que, en estructures centrosimètriques, les posicions dels màxims (fase 0) i els mínims (fase p) se succeeixen amb una certa distància mínima que depèn inversament de la dimensió típica d del motiu de repetició en la direcció corresponent,

La dimensió típica de la projecció axial dels parells de caps de miosina, extreta de la microscòpia electrònica en teixits musculars [Craig, 1977; Sjöström i Squire, 1977a, 1977b] és ca. 10 nm. Així, segons el teorema, la fase no pot canviar de signe en intervals menors de $DZ = \text{ca. } 0.1 \text{ nm}^{-1}$, és a dir, uns 4 ordres de difracció dels caps de miosina. En general, els canvis de fase solen ser significativament més espaiats encara.

8.1.1.2. La presència de *ripples*

Un segon criteri emprat en la determinació de la incertesa en p de les fases és l'anomenat *solvent flattening method*. Aquest es basa en què els extrems de la cel·la han de tenir una densitat nul·la o positiva i sense contrast, és a dir, plana, donat que la projecció axial dels caps de miosina no s'estén sobre tota la cel·la elemental.

Sabem que, en una síntesi de Fourier, hi haurà sempre unes certes ondulacions (*ripples*) que provenen de problemes de terminació determinats per l'ordre màxim en la síntesi de Fourier. De fet, per la mateixa raó, aquestes ondulacions no poden tenir cap component de freqüència més baixa que la donada per aquest ordre màxim. En conseqüència, el mapa axial de densitat electrònica que correspon a la situació real al múscul ha de ser positiu i pla als extrems de la cel·la unitat (*solvent flattening method*) i ha de minimitzar la presència de *ripples* de freqüències inferiors a la corresponent a l'ordre màxim de la síntesi.

8.1.1.3. La compatibilitat amb l'estructura cristal·logràfica

Finalment, el tercer criteri que permet escollir la combinació de fases correcta, que a la pràctica és el més determinant, és la compatibilitat entre el mapa de densitat electrònica i la projecció, en la direcció del mapa, d'una orientació plausible dels dos caps de miosina. La projecció dels caps s'obté orientant les estructures dels caps de miosina que s'obtenen per cristal·lografia de proteïnes.

L'ajustament de les estructures cristal·logràfiques s'aconsegueix variant lliurement els angles de rotació i la distància entre els dos parells de caps de miosina i calculant les posicions de tots els aminoàcids del parell de caps de miosina. Com veurem més endavant, només els mapes amb unes certes característiques podran ser reproduïts amb projeccions raonables.

8.1.2. Els possibles mapes de densitat electrònica

Les síntesis de Fourier són generades pels mòduls i fases extrets dels ordres 3M, 6M, 9M i 15M (taula 8.1). Com ha quedat clar al capítol 4, les altres reflexions (la 12M i les reflexions prohibides) són negligibles en l'estat de contracció isomètrica. Les fases que s'introduran a la síntesi de Fourier són les obtingudes mitjançant l'aproximació teòrica ideal (vegeu el capítol 5). Remarquem que, a la resolució amb què obtenim els mapes de densitat electrònica, totes les aproximacions teòriques retornen unes fases que produeixen essencialment els mateixos mapes. L'elecció d'aquestes fases, per tant, no modifica els resultats ni les conclusions posteriors.

La presència de 4 ordres en la síntesi de Fourier suposa 2^3 possibles combinacions de fases a causa de la seva indeterminació en p . El diagrama de fases (figura 8.1) mostra les diferents possibilitats per a cada ordre. Les 8 possibilitats es mostren a la figura 8.1, amb la combinació de fases a què corresponen.

Aplicant un desplaçament de l'origen igual a la meitat de la cel·la unitat, és directe demostrar que les combinacions de fases que tenen 0 en la 3M són equivalents a les que sumen p a les reflexions 3M, 9M i 15M. Així, per exemple, la combinació (0, p , p , 0) és equivalent a la (p , p , 0, p). D'aquesta manera es completen les 16 possibles combinacions a què dona peu la incertesa en p de la fase.

Els mapes de densitat electrònica no inclouen l'ordre zero a la síntesi de Fourier (expressió 8.1). Aquest ordre afegeix una constant a la densitat electrònica que

desplaça verticalment el mapa de densitat electrònica i determina l'anomenada *línia basal* que marca el mínim de la densitat electrònica. Perquè aquesta tingui sentit físic, cal que la línia basal sigui positiva (condició de *positivitat*). La línia basal no pot ser calculada en aquest estat i, per tant, l'assumirem zero per a tots els possibles mapes axials.

Taula 8.1. Mòduls i fases de les reflexions considerades en estat de contracció isomètrica, extrets de l'aproximació teòrica ideal (secció 5.3). La indeterminació en p de les fases provoca que, per a cada ordre, siguin possibles dues opcions, anomenades opció 0 (la més negativa entre -180° i 180°) i opció p , que resulten de l'addició de 180° a les anterior.

	F_l	f_l	
	[nm]	opció 0	opció p
3M	1	0	180
6M	0.477	-106	74
9M	0.196	-112.5	67.5
15M	0.158	-79	101

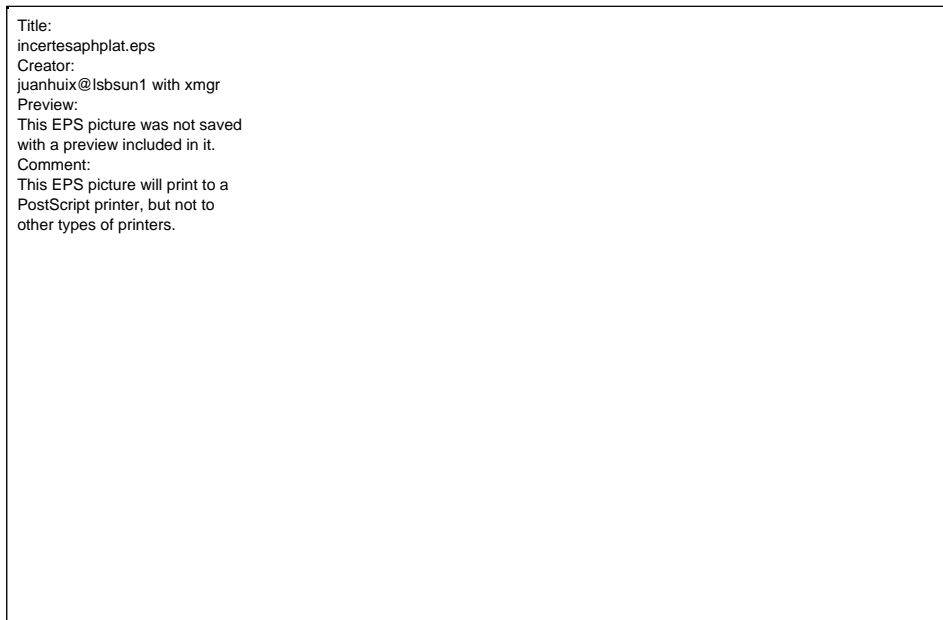


Figura 8.1. Possibles fases dels ordres permesos en l'estat contracció isomètrica. La combinació de fases que generen el mapa axial de densitat electrònica més probable estan unides per una línia contínua. La fase 0 de la reflexió 3M està descartada per l'elecció de l'origen de les fases.

A tall d'incís, cal dir que, havent normalitzat tots els ordres de tal manera que el mòdul de la reflexió 3M sigui la unitat, el valor de la constant que fa nul·la la línia basal de la combinació $(p, p, 0, 0)$ és 1.098. Aquest valor serà emprat al capítol següent

per calcular la positivitat dels possibles mapes de densitat electrònica en l'estat de descans (vegeu la secció 9.4.4.6).

Les combinacions de fases associades als mapes de densitat electrònica en contracció isomètrica que més probablement representen la situació real al múscul han de complir el teorema de la mínima longitud d'ona, així com mostrar la presència de *ripples* de freqüències inferiors a corresponent a la de la 15M (de període ca. 2.2 nm). La inspecció visual d'aquests mapes (figura 8.2) indica clarament que les dues combinacions de fases que compleixen aquests criteris són la $(p, p, 0, 0)$ i la $(p, 0, p, p)$. En aquestes dues combinacions, l'aplanament de la densitat axial als extrems de la cel·la és notable, i contrasta amb les valls profundes que tenen els altres mapes.

8.1.3. Conclusions

Fins aquest punt es pot establir, per criteris purament cristal·logràfics, que, de les 8 possibilitats que hi ha, dues són les més probables. De fet, més endavant, comprovem que solament una d'aquestes dues és compatible amb l'estructura cristal·logràfica del parell de caps de miosina.

Malgrat que en aquest moment de l'anàlisi no es pugui determinar amb certesa quin és, de les 8 possibilitats, el mapa axial correcte, podem extreure ja algunes conclusions importants.

8.1.3.1. La densitat axial és asimètrica

Els 8 possibles mapes axials de densitat de massa en contracció isomètrica tenen en comú dos lòbuls principals que se superposen, un d'ells més intens que l'altre. La asimetria dels lòbuls és la conseqüència de la diferència de fase (avançament o retard, segons el mapa) de la reflexió 6M respecte de la 3M, donat que els factors d'estructura d'aquestes dues reflexions són els dominants en els mapes de densitat. En conseqüència, la presència de dos lòbuls diferents és independent de les fases dels ordres superiors.

Aquest raonament queda palès a la figura 8.3, on es mostren els possibles mapes axials de densitat que inclouen solament les reflexions 3M i 6M. En les dues possibles combinacions de fases possibles, (p, p) i $(p, 0)$, s'observen clarament els dos lòbuls asimètrics (figura 8.3). Aquesta asimetria és la conseqüència inevitable de la gran diferència de fase, independent de l'aproximació teòrica emprada, entre les reflexions 3M i 6M.

Convé puntualitzar que els dos lòbuls solament podrien ser iguals quan les fases de les reflexions 3M i 6M fossin iguals o bé oposades 180°. Això, amb tota evidència, no es produeix, donat que implicaria que la reflexió 6M tindria un sol pic central (figura 4.12).

Title:
massprojplatall.eps
Creator:
juanhui@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 8.2. Els vuit possibles mapes electrònics que surten de la combinació de les fases dels ordres 3M, 6M, 9M i 15M en l'estat de contracció isomètrica (havent definit l'origen de fases amb $f_{3M} = p$). A tots els mapes es defineix una línia basal nul·la, és a dir, es defineix com a zero el punt amb una densitat electrònica més negativa. Dels 8 mapes, únicament els dos mapes electrònics superiors, $(p, p, 0, 0)$ i $(p, 0, p, p)$, presenten els *ripples* característics dels mapes de densitat electrònica d'estructures biològiques.

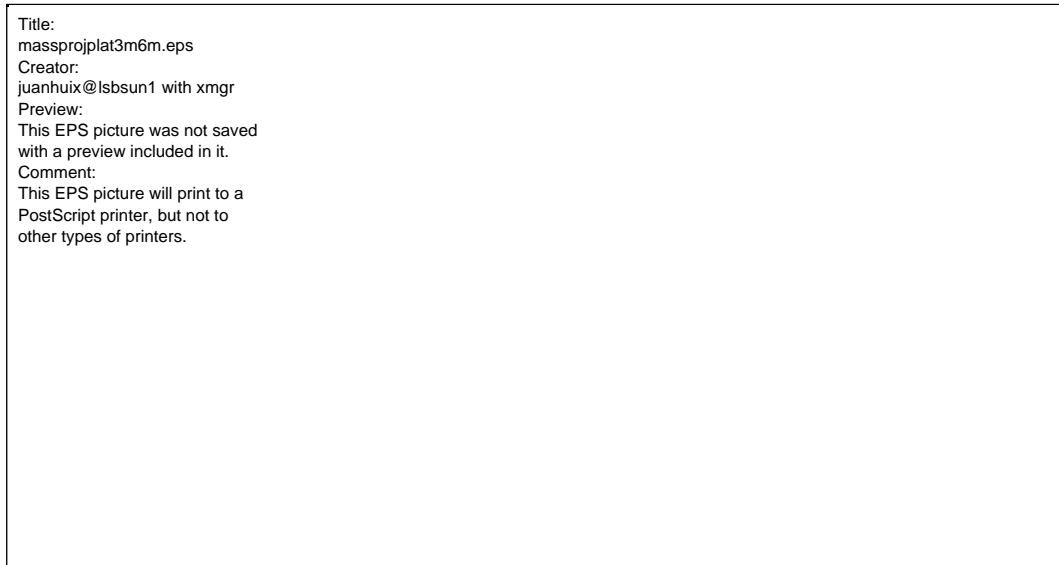


Figura 8.3. Densitats axials de massa de les dues combinacions possibles de fases que permet la síntesi de Fourier de les reflexions 3M i 6M en l'estat de contracció isomètrica. En les dues s'observen dos lòbuls asimètrics, producte de la relació de fases entre les dues reflexions.

8.1.3.2. Els dos caps d'un parell poden tenir orientacions idèntiques o diferents, però no perpendiculars

Respecte de l'orientació relativa dels caps, la presència certa de dos lòbuls asimètrics en la densitat axial de massa té lectures contraposades, depenent de si es considera que la contribució principal de cada lòbul prové d'un sol cap de miosina o bé d'un mateix segment dels dos caps que formen el parell.

D'una banda, en cas que cada lòbul provingui principalment d'un dels dos caps, la asimetria dels lòbuls suggereix que les projeccions de massa de cada cap de miosina són diferents i, per tant, també ho són les orientacions que prenen. En aquest cas, a causa de la diferent orientació, els caps de miosina no podrien establir el mateix enllaç estereoespecífic amb el mateix filament d'actina, responsable de la contracció isomètrica (vegeu les seccions 1.3.2.2 i 1.4).

Alternativament, hi ha la possibilitat que els dos lòbuls estiguin originats per parts diferents del cap de miosina, que és altament asimètric. Així, el lòbul més intens seria originat pel domini motor del cap de miosina, el segment més massiu, mentre que el lòbul secundari estaria associat a la cua del cap i les cadenes lleugeres. En aquest cas, els dos caps de miosina estarien orientats en la mateixa direcció i cap a un extrem del filament. En aquest cas, l'orientació resulta ser molt aplanada i, per tant, poc probable. Més endavant comprovem que, efectivament, aquesta opció no és possible.

De tota manera, sigui quina sigui la interpretació correcta, la diferent intensitat dels dos lòbuls evidencia que no és possible una posició idèntica dels dos caps de miosina totalment perpendicular a l'eix del filament gruixut, sinó que han d'estar inclinats. Amb aquesta disposició, els caps de miosina no poden establir simultàniament de manera favorable l'enllaç estereoespecífic amb un mateix filament d'actina.

En resum, amb les dades presentades fins ara, si bé no es pot concloure l'orientació relativa dels dos caps de miosina, la asimetria de la densitat de massa suggereix que

els dos caps no poden estar enllaçats estereoespecíficament al mateix filament d'actina al mateix temps. Més endavant, amb la modelització de la densitat axial de massa mitjançant la projecció axial de les estructures cristal·logràfiques dels dos caps, aquestes conclusions es confirmaran i aprofundiran.

8.2. Estructura cristal·logràfica del cap de miosina

8.2.1. Estructura cristal·logràfica sense nucleòtid (2MYS)

Les dades experimentals presentades en aquest treball permeten d'obtenir la projecció axial del parell de caps de miosina en l'estat de contracció isomètrica i, com veurem més endavant, en l'estat de descans, del múscul viu. Com hem vist a l'anterior secció, aquesta projecció axial dóna una idea únicament qualitativa, encara que podem concloure alguns aspectes importants respecte de la disposició dels caps de miosina.

Es pot donar ara un pas més enllà en el nostre estudi sobre la conformació dels caps de miosina. La informació sobre la orientació dels caps pot ser refinada i quantificada mitjançant l'ajustament de l'orientació de l'estructura del cap de miosina obtingut per cristal·lografia de proteïnes [Rayment *et al.*, 1993a]. En principi, la configuració cristal·logràfica obtinguda per Rayment *et al.* ha de ser idèntica, o almenys propera, a la configuració esperada al múscul viu, en l'estat de contracció isomètrica, donat que el cap de miosina no conté ATP. En aquest cas, quan la configuració del cap de miosina en el cristall no és significativament diferent a la configuració que presenta en el múscul viu, la projecció axial de l'estructura cristal·logràfica amb l'orientació correcta d'un parell de caps ha d'aconseguir reproduir la densitat axial de massa obtinguda a partir dels experiments presentats aquí.

L'estructura del cap de miosina emprada per aconseguir la projecció axial és un refinament de l'estructura del subfragment S1 cristal·litzada i resolta per Rayment *et al.* (fitxer PDB-2MYS de la *Protein Data Bank* [RCSB, 2000]), que conté 1072 aminoàcids. El refinament que dóna lloc a l'estructura completa del subfragment S1, de 1157 aminoàcids, s'aconsegueix afegint la seqüència dels aminoàcids que resten [Maita *et al.*, 1987], mitjançant un programa de predicció de l'estructura secundària de proteïnes [Rost i Sander, 1993].

8.2.2. Definició de les direccions i angles del cap de miosina

A fi de manipular l'estructura cristal·logràfica del cap de miosina, cal definir arbitràriament una posició inicial d'aquest en els eixos de referència, així com els angles que en caracteritzen l'orientació.

La figura 8.4 mostra l'orientació inicial arbitrària del cap de miosina. L'eix del múscul i, per tant, l'eix del filament gruixut, es situa sobre l'eix z. D'altra banda, l'eix major del cap de miosina, definit com la línia en què els aminoàcids del cap tenen un menor moment de segon ordre, es situa sobre l'eix x. Finalment, l'eix y es defineix de tal manera que el bucle que formen els aminoàcids GLY203-GLY216 apareix en la direcció z negativa. D'aquesta manera, inicialment, el cap de miosina queda

unívocament orientat al llarg de l'eix x , i perpendicular a l'esquelet del filament gruixut.

L'origen dels eixos és la intersecció entre l'eix x i el pla perpendicular a aquest que passa pel a-C de l'aminoàcid situat a la coordenada x més positiva, que resulta ser ASP884. Finalment, donat que la densitat axial no és sensible al pla de simetria xz , és a dir, al canvi $y \rightarrow -y$, definim arbitràriament el sentit dels eixos de manera que formin un tríedre definit positiu.

Sobre aquesta definició dels eixos, i prenent l'origen de coordenades com a centre de rotació, qualsevol orientació del cap de miosina queda definida per dos angles. D'una banda, l'angle de rotació intrínseca y , o angle de *spin*, especifica la rotació del cap sobre el seu eix major (l'eix x). D'altra banda, l'angle polar q defineix la inclinació del cap respecte de la perpendicular del filament gruixut (l'eix z). Qualsevol moviment de cap es realitzarà aplicant, primerament, una rotació sobre l'eix x (rotació sobre y) i, posteriorment, una rotació sobre l'eix z (rotació sobre q).

Els angles polar i de rotació intrínseca són equivalents als angles d'Euler q i y , respectivament, tenint en compte que la projecció axial que tractem d'ajustar amb l'orientació de l'estructura cristal·logràfica no és sensible a l'angle azimutal f [Goldstein, 1988].

Cal remarcar que, a causa de la definició de l'origen dels eixos, una rotació sobre l'angle y no provoca un canvi en la posició del centre de masses del cap. Per contra, sí canvia la posició de l'extrem de la cua i, per tant, canvia el punt d'unió amb l'esquelet del filament gruixut (figura 8.4, a baix). La rotació sobre l'angle polar q té un efecte contrari a aquest: desplaça el centre de masses en la direcció de la rotació, però, en canvi, manté constant el punt d'unió amb l'esquelet del filament gruixut.

En principi, els dos caps de miosina que formen un parell poden, respectant les restriccions geomètriques, moure's amb independència entre ells. Per tant, el parell de caps serà definit mitjançant 4 angles, dos polars i dos de *spin*. A aquests paràmetres s'ha d'afegir la distància d entre els orígens de coordenades dels dos caps. Per tant, un total de 5 paràmetres permeten definir la configuració d'un parell de caps de miosina.

Convé puntualitzar que, per la forma en què ha estat definit el paràmetre d , aquest no expressa directament la distància entre els últims aminoàcids de les dues cadenes pesades (MHC) del cap de miosina (LYS843), ja que depèn dels angles de rotació intrínseca. La posició d'aquest aminoàcid de la cadena pesada és rellevant, donat que determina el punt d'unió del cap de miosina a l'esquelet del filament gruixut.

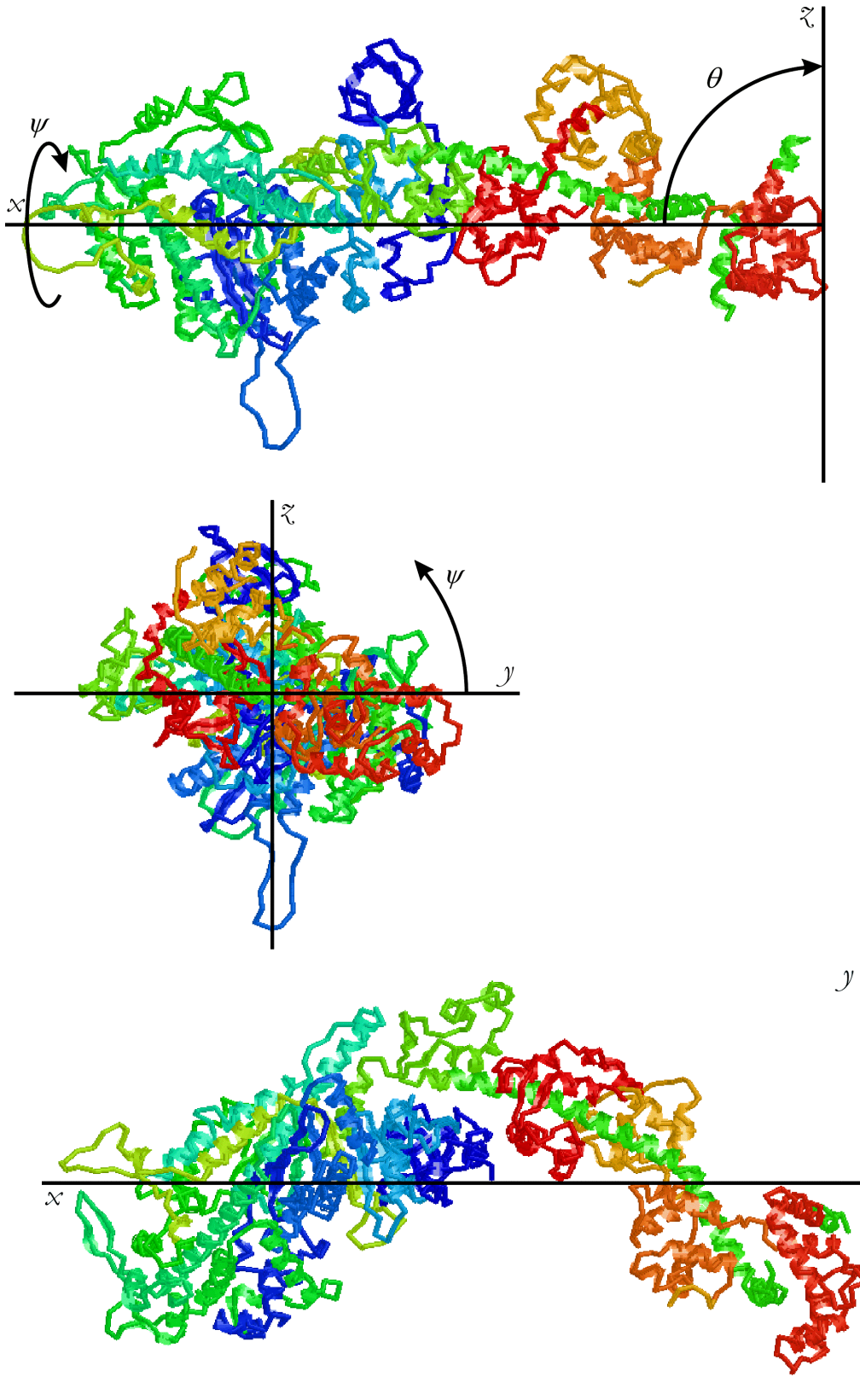


Figura 8.4. Definició de la orientació inicial del cap de miosina i dels angles polar q i de rotació intrínseca o de *spin* y . (*A dalt*) visió lateral del cap de miosina, (*al mig*) visió frontal, (*a baix*) visió zenital. La figura està preparada amb el programa de gràfics molecular Rasmol [Sayle i Milner-White, 1995; Martz i Finlayson, 2000].

8.3. Determinació de l'orientació del parell de caps de miosina

La projecció axial de l'estructura definida amb els 5 paràmetres geomètrics caracteritzats en la secció anterior ha de reproduir la densitat axial de massa aconseguida en la síntesi de Fourier (expressió 8.1). A tal efecte, cal variar independentment els quatre paràmetres angulars i la distància entre orígens dels caps de miosina.

8.3.1. Restriccions a la variació dels paràmetres que orienten el cap de miosina

Les possibles restriccions a què se sotmeten aquests paràmetres en l'ajustament poden ser degudes a experiments realitzats amb altres tècniques, sigui de microscòpia electrònica o encara altres tècniques, o per raons estèriques.

De fet, la literatura no aporta cap dada concloent en músculs vius dels paràmetres amb què caracteritzem l'orientació dels caps de miosina. En aquest sentit, únicament es poden destacar un intent teòric per explicar, a partir de càlculs de dinàmica molecular, la disposició dels caps quan s'enllacen amb el filament prim [Díaz-Baños *et al.*, 1996]. En aquest estudi es presenten 2 estats d'enllaç estereoespecífic actina-miosina susceptibles de ser responsables de la contracció isomètrica, en els quals el cap de miosina té una orientació aproximadament perpendicular al filament. Això no obstant, aquests tipus d'estudis donen una imatge aproximada dels possibles enllaços entre actina i miosina, per formar el complex actomiosina, però no poden precisar l'orientació que adopta el cap de miosina. En conseqüència, aquestes dades ha de ser preses únicament com una orientació per aquest estudi.

D'altra banda, la microscòpia electrònica no aporta dades rellevants, atès que totes les imatges aconseguides fins ara s'han realitzat amb filaments d'actina decorats amb caps de miosina sense nucleòtid, és a dir, en l'estat de rigor i sense el lligam fisiològic amb el filament gruixut. A més, la resolució està limitada a ca. 3 nm, massa baixa per als nostres objectius [Milligan i Flicker, 1987; Milligan *et al.*, 1990]. Per aquesta raó, els resultats obtinguts en microscòpia electrònica solament també han de ser considerats, en el millor dels casos, com a orientatius. El resultat més rellevant és la modelització del filament prim amb els caps de miosina en l'estat de rigor utilitzant l'estructura cristal·logràfica de Rayment *et al.* (1993b).

Així doncs, fins ara, els resultats experimentals previs no han donat cap informació concloent sobre aquest tema, que restava totalment obert fins a la consecució dels resultats experimentals inclosos en aquesta tesi.

La segona causa de la restricció dels paràmetres de l'orientació dels caps (els angles polars, els de *spin* i la distància entre cues) són les raons estèriques. En concret, en l'ajustament s'han tingut en compte que:

- El cap de miosina no ha de penetrar a l'esquelet del filament gruixut (*backbone*), és a dir, cap aminoàcid situat en x negatives.
- Els dos caps d'un parell no poden col·lisionar.

- El parell de caps de miosina ha d'estar inscrit dins d'una periodicitat o , dit de manera equivalent, tota la densitat axial de massa d'una repetició ha de provenir d'un sol parell de caps. Amb les dimensions del cap de miosina i de la cel·la, aquesta condició imposa un límit de ca. $\pm 75^\circ$ pels angles polars i de ca. 7 nm per la distància d .

Si bé la forma oblonga del cap de miosina afavoreix la restricció dels paràmetres, els límits imposats són molt amples i, a la pràctica, no suposen cap limitació a l'ajustament. D'altra banda, convé remarcar que aquestes limitacions permeten una variació lliure dels angles de rotació intrínseca y .

8.3.2. Ajustament als possibles mapes axials

Ateses les consideracions fetes en la secció anterior, en l'ajustament dels possibles mapes axials es permet la variació pràcticament lliure dels 5 paràmetres que defineixen la projecció axial del parell de caps de miosina en l'ajustament d'aquesta a les 8 possibles projeccions axials obtingudes mitjançant la síntesi de Fourier.

D'aquestes 8 possibles projeccions, només el mapa que té la combinació de fases $(p, p, 0, 0)$ pot ser reproduït mitjançant el procediment descrit anteriorment. El resultat de l'ajustament es mostra a la figura 8.5, juntament amb la projecció bidimensional dels caps de miosina. Els paràmetres que porten a la minimització es llisten a la taula 8.2. Un factor favorable a aquesta combinació de fases és la presència de *ripples* al mapa de densitat axial que genera.

A més de la considerada, d'entre les possibles combinacions de fases, també ha estat possible trobar un ajustament aproximat amb la combinació $(p, 0, p, p)$, aplicant una rotació de 180° en l'angle de *spin* en els dos caps i donant una inclinació polar lleugerament inferior al segon cap. No obstant això, l'ajustament és menys aproximat i ha estat descartat. En cap dels altres possibles mapes de densitat electrònica originats per les restants combinacions de fases (figura 8.3) ha estat possible trobar un ajustament raonable.

Amb tot, cal remarcar que en qualsevol ajustament possible és necessari orientar els dos caps de miosina amb angles polars diferents, amb un primer cap aproximadament perpendicular i el segon inclinat respecte de la perpendicular de l'eix del filament.

Taula 8.2. Paràmetres de la densitat axial de massa modelada que optimitzen l'ajustament de les dades experimentals. L'origen dels angles es defineix a la figura 8.4.

	q	y
	[deg]	[deg]
cap de miosina 1	3	108.4
cap de miosina 2	29.5	181.3
d	-0.27 nm	



Figura 8.5. (*Esquerra*) Projectió de massa bidimensional d'un parell de caps de miosina que, després d'una segona projectió sobre l'eix z , genera la projectió de massa mostrada en línia contínua en el requadre de la dreta. Els valors dels paràmetres d'aquesta projectió estan llistats a la taula 8.2. Es mostren únicament les cadenes polipèptides dels dos parells de caps amb les dues cadenes lleugeres ELC i RLC. El cap més inclinat és definit com cap 1, i el més inclinat és el cap 2. (*Dreta*) En cercles, mapa de densitat electrònica construït amb la combinació de fases $(p, p, 0, 0)$ (figura 8.1). Aquest mapa és el mateix que el mostrat a la figura 8.2 (requadre superior esquerre), i és l'únic amb el qual es pot aconseguir un ajustament satisfactori de la projectió de masses de dos caps de miosina (línia contínua).

8.4. Conclusions

Aquestes conclusions resumeixen el treball realitzat en contracció isomètrica. Puntualitzem que tant l'anàlisi, descrita detalladament als capítols precedents, com les conclusions assolides en aquest estat muscular, es troben a Juanhuix *et al.* (2001).

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

Els resultats experimentals mostrats al capítol 4 indiquen que, sigui quina sigui la disposició axial dels caps de miosina d'un parell, aquesta ha de ser bastant rígida. Únicament en aquest cas es poden explicar els diferents pics que presenta la reflexió 15M, i fins i tot la 18M, no emprada en l'anàlisi, en termes d'interferència entre els caps de miosina dels dos extrems del filament gruixut. La presència de moviments asíncrons dels caps de recorregut superior a la meitat del límit de resolució, ca. 1.4 nm, produiria una cancel·lació de la relació de fase entre unitats de difracció. A més, la intensitat de la funció d'interferència (expressió 5.25), que en el cas ideal és la funció de Laue (expressió 5.26), es reduiria de manera important.

Aquesta conclusió és reforçada per anteriors resultats que estableixen que els moviments asíncrons dels caps, en cas d'existir, han d'estar realitzats per una petita

fracció dels caps i/o de la massa total del cap [Martín-Fernández *et al.*, 1994]. De fet, donat que la dispersió de les periodicitats dels caps de miosina, segons el model de dispersió de periodicitats que ajusta les dades experimentals (vegeu la secció 5.7), és només ca. 0.036 nm, aquesta fracció ha de ser molt petita o, fins i tot, nul·la.

8.4.2. La fase del factor d'estructura és independent de l'aproximació teòrica del filament gruixut

Per a l'extracció de la fase del factor d'estructura de les reflexions meridionals és necessària una aproximació teòrica a la disposició dels caps de miosina al filament gruixut. Al capítol 5 s'han adoptat tres aproximacions: l'ideal, amb desordre de segona espècie i amb dispersió de periodicitats.

L'aproximació teòrica ideal descriu molt correctament el perfil axial de les reflexions meridionals, però dona uns valors no físics de nombre de caps en un extrem del filament gruixut i la longitud d'interferència entre els caps dels dos extrems del filament (vegeu la secció 5.3). El valor d'aquests dos paràmetres, aparentment, disminueix en augmentar l'ordre, fet que pot indicar una progressiva pèrdua de coherència dels caps de miosina a mesura que s'allunyen del centre del filament. Els valors varien de la mateixa manera amb la introducció de desordres de segona espècie (vegeu la secció 5.5).

La introducció d'una dispersió de periodicitats, finalment, aconsegueix ajustar les dades experimentals amb uns valors físics de tots els paràmetres. El petit valor de la dispersió introduïda, $DC = \text{ca. } 0.036 \text{ nm}$, i la manca de contrastació amb d'altres tècniques experimentals fan que la presència real de les dues periodicitats no pugui ser establerta inequívocament.

De tota manera, el fet més destacable és que totes les aproximacions teòriques extreuen uns valors de les fases del factor d'estructura molt similars en tots els ordres considerats, amb variacions de l'ordre de pocs graus. El mapa de densitat electrònica, realitzat a partir d'aquestes fases, és, per tant, independent del model utilitzat. Això és així donat que la fase és determinada per la relació d'intensitats entre els diferents pics de la mateixa reflexió, mentre que els models afecten principalment l'amplada dels pics i la separació entre ells.

8.4.3. Els dos caps de miosina d'un parell tenen diferents projeccions axials de massa

Els vuit possibles mapes de densitat electrònica, resultat de la síntesi de Fourier (expressió 2.18) realitzada sobre les reflexions 3M, 6M, 9M i 15M del meridià, tenen en comú que presenten dos lòbuls, dels quals un és significativament més pronunciat que l'altre (vegeu la secció 8.1). La asimetria dels dos lòbuls és el resultat de la diferència de fase entre la reflexió 3M i la 6M. Una diferència de fase de 0° o 180° genera un sol lòbul pronunciat, mentre que una diferència de fase de 90° o 270° origina dos lòbuls simètrics. La diferència de ca. 75° (o -105° , depenent del mapa considerat) porta inevitablement a la asimetria dels lòbuls.

Aquesta asimetria suggereix que les projeccions axials dels dos caps d'un parell de són diferents, fet que és reforçat per l'ajustament a la projecció axial de les estructures cristal·logràfiques dels caps (vegeu tot seguit).

Finalment, cal remarcar que els ordres superiors inclosos a la síntesi de Fourier no influeixen en la presència dels dos lòbuls asimètrics, ja que l'amplitud del factor d'estructura és sensiblement menor. Aquesta conclusió, per tant, es pot extreure solament de l'anàlisi de les reflexions 3M i 6M.

8.4.4. *L'ajustament de l'orientació dels caps a la projecció axial sembla donar una única solució*

A priori, solament amb les dades experimentals proporcionades per la difracció de raigs X a baixos angles descrites en aquest treball, no es pot determinar quina de les 8 possibles projeccions axials dels caps de miosina és la real. Les indicacions al respecte (e.g. teorema de la mínima longitud d'ona, presència de *ripples*, vegeu la secció 8.1.1) no són, ni de lluny, concloents.

De tota manera, l'anàlisi pot progressar amb l'ajustament a les projeccions axials de l'estructura cristal·logràfica del cap de miosina (Rayment *et al.*, 1993a). Amb l'ús d'aquesta estructura cristal·logràfica es demostra que únicament un mapa axial (la combinació $(p, p, 0, 0)$ de la figura 8.2) sembla tenir una orientació dels dos caps de miosina capaç de donar un ajustament correcte.

El resultat de l'ajustament revela un comportament clarament asimètric del parell de caps de miosina, com ja s'indica a la conclusió anterior, que no té en compte la projecció de l'estructura cristal·logràfica. Respecte de l'angle polar q , un dels caps (definit com *cap de miosina 1*) és orientat de manera quasi perpendicular a l'eix del filament, mentre que l'altre (*cap de miosina 2*) és inclinat ca. 30° . A causa de la forma asimètrica del cap de miosina i de la suficient resolució de les dades, la projecció axial també és sensible a l'angle de *spin* y . Respecte del cap de miosina perpendicular, l'angle de *spin* relatiu del segon és ca. 73° , que fa que els possibles enllaços del cap de miosina al filament d'actina tinguin una distribució diferent. En la projecció bidimensional (figura 8.5 esquerra), aquest fet dóna al segon cap una aparença recta, mentre que el primer cap apareix doblegat un angle ca. 110° . De tota manera, cal recalcar que l'estructura dels dos caps és la mateixa.

Els caps tenen els respectius orígens de rotació separats ca. -0.27 nm, que equival, amb els angles de la taula 8.2, a una distància entre els aminoàcids LYS843 (els extrems de la MHC del cap de miosina) de ca. 3.7 nm. El signe negatiu de la distància entre orígens implica que l'origen del cap més inclinat és més proper a l'origen de coordenades que l'altre cap de miosina.

L'ajustament dóna un residu, calculat mitjançant l'expressió 3.4, de 6.48%. Aquest és particularment sensible a la distància d entre les cues dels caps i als angles polars q . Una diferència d'únicament 0.4 nm en la distància o 3° dels angles polars augmenta en més d'un 50% el residu, un valor clarament no satisfactori. Convé remarcar que, malgrat que hi ha altres possibles ajustaments de l'estructura cristal·logràfica a les altres possibles projeccions axials (figura 8.2), els ajustaments tenen uns residus significativament superiors. A més, en qualsevol cas, totes les solucions tenen en comú una orientació polar dels dos caps que difereix en ca. 30° i un angle de rotació intrínseca significativament diferent.

En definitiva, els caps de miosina d'un parell tenen una orientació polar i de *spin* clarament diferent, ca. 30° i 70°, respectivament. Aquestes conclusions verifiquen amplament i quantifiquen les conclusions de la secció 8.1.3.2, obtinguda d'una forma més intuïtiva.

8.4.5. *Només un dels caps a cada parell està enllaçat estereoespecíficament amb l'actina*

La disposició dels caps de miosina que resulta de l'ajustament de l'estructura cristal·logràfica a la projecció axial (figura 8.4) és tal que si un cap està situat, respecte del filament d'actina, de tal manera que s'hi enllaça estereoespecíficament, l'altre cap no pot situar-se en la mateixa posició, a causa de les restriccions de la simetria helicoidal. Aquesta observació és vàlida independentment del nombre i de la posició dels contactes que formen l'enllaç estereoespecífic actina-miosina. Per tant, quan un cap forma un complex actina-miosina, l'altre no el pot formar.

En contracció isomètrica, la primera línia de difracció dels caps de miosina, a ca. 43 nm, se superposa amb la primera línia de difracció basada en l'actina, a ca. 37 nm. Mitjançant les intensitats relatives d'aquestes dues línies de difracció, en treballs anteriors s'ha demostrat que, aproximadament el 50% dels caps de miosina poden estar formant un enllaç actina-miosina estereoespecífic en contracció isomètrica [Bordas *et al.*, 1993]. Aquest resultat previ, juntament amb el resultat exposat anteriorment, suggereix que aquell 50% dels caps que formen un complex actina-miosina provenen d'un dels dos caps de miosina de cada parell. Així, un cap del parell és responsable de la forta línia de difracció amb periodicitat de l'actina, ca. 37 nm, mentre que l'altre origina la línia de difracció amb periodicitat de la miosina en l'estat de descans, ca. 43 nm.

Per tant, en un mateix parell de caps de miosina, hi ha un cap de miosina enllaçat estereoespecíficament i un altre cap desenllaçat o no enllaçat estereoespecíficament (cal notar que, tant si el cap no està enllaçat o no ho està estereoespecíficament, aquest no ha de seguir la simetria del filament prim). Això explica perquè les línies de difracció de l'actina 5A i 6A, a ca. 5.9 nm i 5.1 nm respectivament, no es desplacen en contracció isomètrica tant cap a la línia del meridià com ho fan en l'estat de rigor [Bordas *et al.*, 1999a]. Probablement, en l'estat de rigor els dos caps de miosina estan formant un complex actina-miosina, mentre que en contracció isomètrica només una el pot realitzar.

Aquesta conclusió és important, donat que molt sovint en la literatura s'ha identificat l'estat de rigor amb el pas del cicle d'ATP en què es forma el complex actina-miosina en contracció isomètrica [Whittaker *et al.*, 1995; Holmes, 1997].

8.4.6. *Possiblement, el cap perpendicular d'un parell forma l'enllaç estereoespecífic*

Mitjançant estudis de dinàmica molecular s'ha calculat que l'estat de menor energia lliure, és a dir, quan hi ha una interacció plena i estereoespecífica entre les dues proteïnes per formar un complex actina-miosina, té una configuració en la que el cap de miosina és molt aproximadament perpendicular a l'eix dels filaments [Díaz-Baños *et*

al., 1996]. Per tant, suggerim que el cap que està enllaçant més perpendicularment a l'eix dels filaments (definit com a cap de miosina 1 a la secció 8.2.2) és el que s'enllaça estereoespecíficament al filament d'actina. Aquest cap seria igualment responsable de del desdobleament (*untwist*) del filament gruixut en l'estat de contracció isomètrica [HE Huxley *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1994; Bordas *et al.*, 1999].

Cal notar que, després d'un escurçament (*release*) de ca. 4.0 nm per mig sarcòmer, el segon cap pot col·locar-se en una posició tal que pot enllaçar-se amb els enllaços dels següents monòmers d'actina. És interessant especular que el cap inclinat, que no pot enllaçar-se estereoespecíficament quan l'altre, més perpendicular, ho està, pot substituir aquest darrer quan el múscul experimenta un escurçament de curta durada. Aquesta possibilitat ja ha estat proposada per HE Huxley i Tideswell (1996) com una manera de reconciliar el comportament mecànic de les fibres musculars subjectes a escurçaments sobtats amb el fet que el filament prim es dona (té una certa *compliance*) [HE Huxley *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1994; Bordas *et al.*, 1999].

A més, reforçant la cooperació entre caps de miosina, la situació estructural que hem obtingut (figura 8.4) implica que, probablement, el cap que forma el complex actina-miosina obstrueix l'enllaç estereoespecífic de l'altre cap amb el filament d'actina, de manera que els dos no puguin tenir el mateix enllaç estereoespecífic. HE Huxley i Tideswell (1997) han desenvolupat aquesta hipòtesi per explicar el fenomen de *re-priming* [Lombardi *et al.*, 1992].

8.4.7. *No hi ha certesa de quin dels dos caps del parell forma el complex actina-miosina*

Les raons acabades d'exposar, juntament amb dades de difracció de raigs X amb resolució temporal (en què se segueix l'espaiat de la reflexió 3M en un escurçament sobtat del múscul [Bordas, 1999b]) afavoreixen la hipòtesi que el cap més perpendicular a l'eix del filament forma el complex actina-miosina, mentre que l'altre està preparat per fer-ho quan sigui necessari. No obstant això, a aquest punt de les investigacions, no és possible de concloure de manera inequívoca quin dels dos caps de miosina d'un parell és l'enllaçat estereoespecíficament amb l'actina.

En cas que la situació fos la inversa, de manera que el cap enllaçat fos el cap menys perpendicular (és a dir, el cap 2 a la figura 8.4), aquest és molt semblant a l'observat en l'estat de rigor [Whittaker *et al.*, 1995]. L'altre cap, ara desenllaçat de l'actina, mostra en la projecció axial una configuració on el domini motor i la cua del cap de miosina formen un angle de 120°, característica de la configuració sense nucleòtid (ATP, ADP, o estats intermitjos). De tota manera, és concebible que es pugui obtenir un bon ajustament mitjançant el desplaçament de la cua del cap de miosina mitjançant la rotació respecte d'un eix, tal com ha estat proposat a partir de l'estructura cristal·logràfica del cap de miosina amb analogs d'ATP [Holmes, 1997; Houdusse, 1999]. Amb tot, cal assenyalar que, en aquest cas, el desplaçament de la cua del cap de miosina, segons la figura 8.4, seria ca. 10 nm, molt més gran que el desplaçament de ca. 3.5 nm deduït per microscòpia electrònica [Whittaker *et al.*, 1995].

Sigui quina sigui la situació real del múscul, en l'estadi actual de les investigacions, és possible afirmar que cal considerar la diferent orientació axial dels dos caps de miosina d'un parell en la interpretació del diagrama de difracció en l'estat de contracció isomètrica.