

Capítol

10

Difracció del múscul en contracció no isomètrica

En aquest capítol s'exposen breument els últims resultats no inclosos en tot l'anàlisi anterior, especialment els referents als estats musculars no isomètrics (escurçament i estirament). S'extreuen diverses conclusions a partir del breu anàlisi de les reflexions 3M i 6M. Finalment, s'indiquen les possibles línies futures de treball.

10.1. El múscul actiu en condicions no isomètriques

En un punt donat, cal recapitular les dades i els resultats que formen un cos de coneixement homogeni, i presentar el treball de tesi. Les investigacions, però, continuen el seu curs i, des que la tesi ha començat a escriure's, s'han realitzat nous experiments que aporten noves dades i resultats que complementen i estenen els anteriors. Malgrat que l'anàlisi de les noves dades, evidentment, és encara parcial, per completesa creiem convenient exposar-ne les conclusions més rellevants.

Fins aquest punt, aquest treball ha estudiat el múscul en condicions isomètriques, és a dir, sense canvi de longitud, tant amb estimulació (estat de contracció isomètrica) com sense (estat de descans). No obstant això, la contracció muscular en aquestes condicions no és la més habitual en un sistema viu. De fet, la majoria de les situacions reals impliquen tant un canvi de longitud del múscul com un desenvolupament d'una tensió diferent a la tensió isomètrica.

Per tot això, convé estudiar el múscul en més condicions que les isomètriques, que han constituït el cos d'aquest treball. En particular, en el transcurs de les noves investigacions s'han estudiat dos altres estats musculars que impliquen una condició de contracció isotònica, és a dir, estats en què la tensió muscular es manté constant, però, en canvi, el múscul experimenta un canvi de longitud.

Estat d'escurçament actiu

El primer d'aquests dos estats de contracció isotònica és l'anomenat *estat d'escurçament actiu* amb tensió nul·la o, equivalentment, contra càrrega nul·la (*release*) (vegeu la secció 3.5.3). Aquest estat s'aconsegueix quan un múscul, d'entrada en l'estat de contracció isomètrica, s'escurça a una velocitat comparable a la velocitat isotònica V_0 , és a dir, ca. 0.1 m/s (vegeu la secció 1.3.1), de manera que la tensió que desenvolupa passa a ser nul·la. Un símil d'aquest estat es dona quan, en el joc d'estirar la corda, un dels extrems la deixa anar de sobte: l'altre extrem desenvolupa una força no compensada per la tensió de la corda (que ara és nul·la) de manera que genera un moviment (l'escurçament).

Experimentalment, l'estat d'escurçament o *release* és generat mitjançant el control de la longitud del múscul per part del solenoide de l'equip experimental (vegeu la secció 3.4). El solenoide és programat per provocar una petita disminució brusca de la longitud del múscul seguida d'un escurçament constant, de velocitat variable segons el múscul.

Estat d'estirament actiu

El segon dels estats de contracció isotònica considerats és l'anomenat *estat d'estirament actiu* (*stretch*). Aquest estat es produeix quan el múscul, inicialment en contracció isomètrica, experimenta un estirament en lloc d'un escurçament, com era el cas anterior. En aquest estat, la tensió augmenta de la tensió isomètrica inicial P_0 a una tensió molt més elevada que depèn de la velocitat d'estirament. La tensió màxima que pot desenvolupar el múscul és aproximadament $2 P_0$, a partir de la qual la tensió no creix malgrat que augmenti la velocitat d'estirament, de manera que s'arriba a l'anomenada condició de *cessió* (*give*). Aquesta situació és equivalent a tractar de mantenir un pes immòbil superior a la força màxima que el múscul pot desenvolupar.

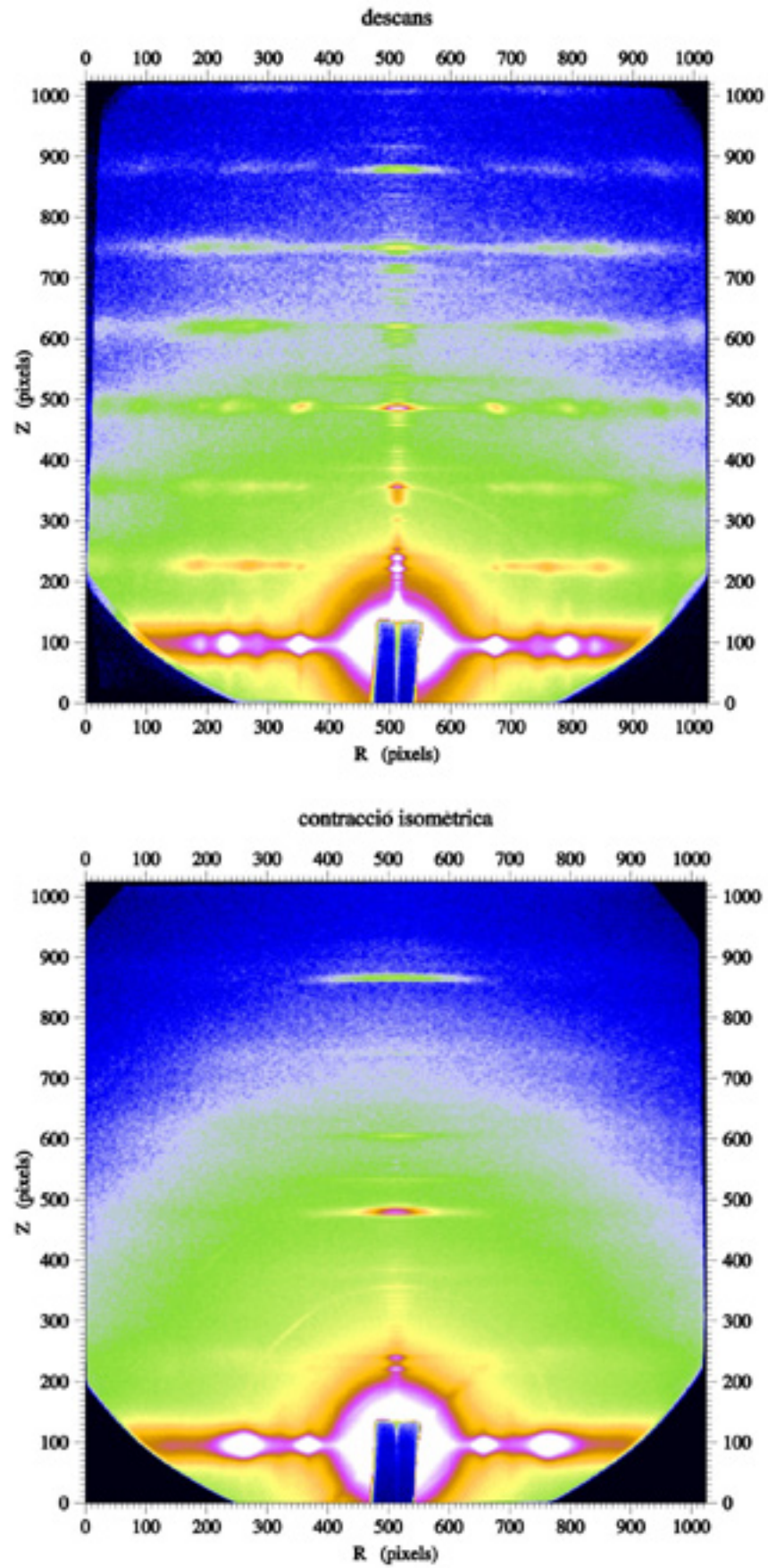


Figura 10.1. Diagrames de difracció bidimensionals del múscul en els estats de descans i contracció isomètrica.

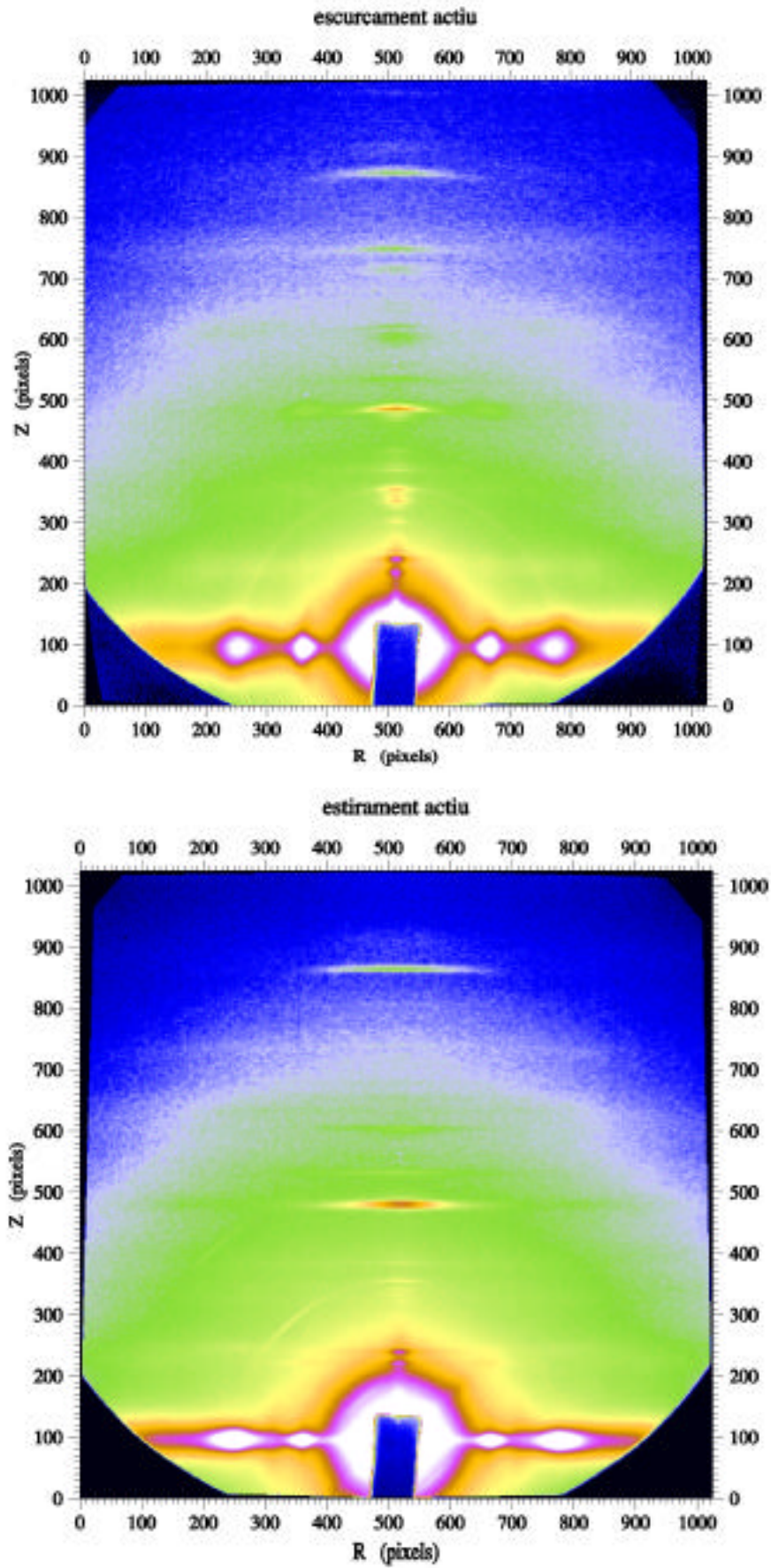


Figura 10.2. Diagrames de difracció bidimensionals del múscul en els estats d'escurçament actiu (*release*) i estirament actiu (*stretch*).

El muntatge experimental necessari per reproduir aquest estat és el mateix que l'emprat en l'estat d'escurçament, és a dir, un dispositiu que permeti una variació ràpida i contínua de la longitud del múscul, que en el nostre cas és el solenoide. Les condicions experimentals que hem obtingut per aquest estat han permès l'enregistrament en una condició de càrrega zero i tensió aproximadament $1.8 P_0$.

10.2. Comportament de les reflexions meridionals 3M i 6M

Els nous experiments, en resum, han permès l'enregistrament del diagrama de difracció en quatre estats musculars: descans, contracció isomètrica, escurçament i estirament actius (figures 10.1 i 10.2). Els nous diagrames de difracció inclouen fins a la reflexió 6M, és a dir, estan limitats a una resolució de 7.2 nm. Si bé la resolució és inferior que en els estats de referència presentats anteriorment en aquest treball, descans i contracció isomètrica, és suficient per donar una indicació de quin pot ser el comportament dels caps de miosina en condicions no isomètriques.

En particular, dels diagrames de difracció, analitzarem el comportament dels caps de miosina mitjançant les reflexions permeses 3M i 6M dels caps de miosina en els 4 estats musculars. D'aquestes reflexions, són rellevants els perfils meridionals, que permeten extreure un valor de la fase del factor d'estructura. A més, s'estudiaran els perfils radials de les reflexions 1M-6M, que permetran extreure un valor acurat del mòdul del factor d'estructura de les reflexions permeses.

Les figures 10.3 i 10.4 comparen els perfils meridionals de les reflexions 3M i 6M, respectivament, en els estats de descans, contracció isomètrica, escurçament i estirament. D'entrada, cal destacar que, en tots els estats musculars, aquestes reflexions estan formades, com a mínim, per dos pics d'espaiat i intensitat clarament diferent (taula 10.1). Tal com s'ha exposat al capítol 4, aquest perfil complex és el resultat del fenomen d'interferència causat per la simetria bipolar dels filaments gruixuts. Això implica que els caps de miosina mantenen un ordre axial considerable en tots els estats musculars i que, per tant, poden ser estudiats mitjançant les aproximacions teòriques desenvolupades en tots els capítols anteriors.

10.2.1. Reflexions en l'estat d'escurçament actiu respecte a l'estat de descans

En relació amb l'estat muscular d'escurçament actiu, cal destacar que, a grans trets, el perfil meridional de les dues reflexions presenten aproximadament el mateix espaiat i forma similar que el perfil en l'estat de descans. Així, les intensitats relatives dels dos pics principals en la reflexió 3M són les mateixes en els dos estats, 85-15%, mentre que, per a la 6M, les intensitats relatives són 60-40% i 80-20% pels estats de descans i escurçament actiu, respectivament. Aquests espaiats i pesos relatius similars indiquen que les fases del factor d'estructura de les reflexions 3M i 6M han de ser igualment similars en ambdós estats. Els caps de miosina, per tant, tenen una disposició molt similar, o fins i tot idèntica, en els dos estats.

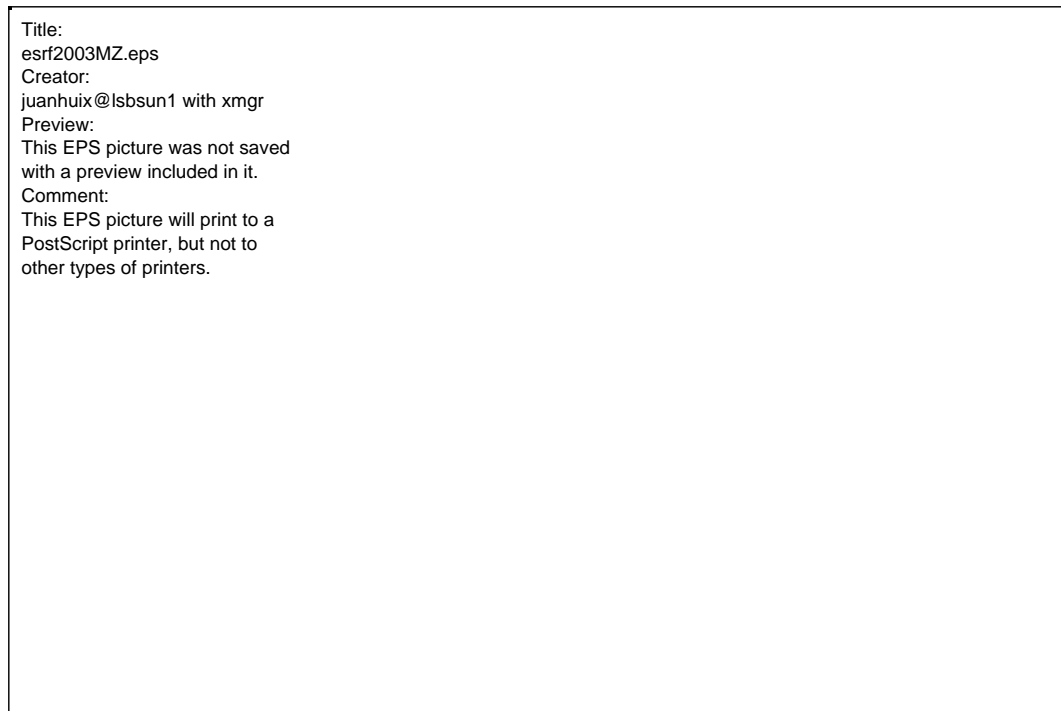


Figura 10.3. Perfils meridionals de la reflexió 3M en els estats de descans, contracció isomètrica, escurçament actiu (*release*) i estirament actiu (*stretch*).

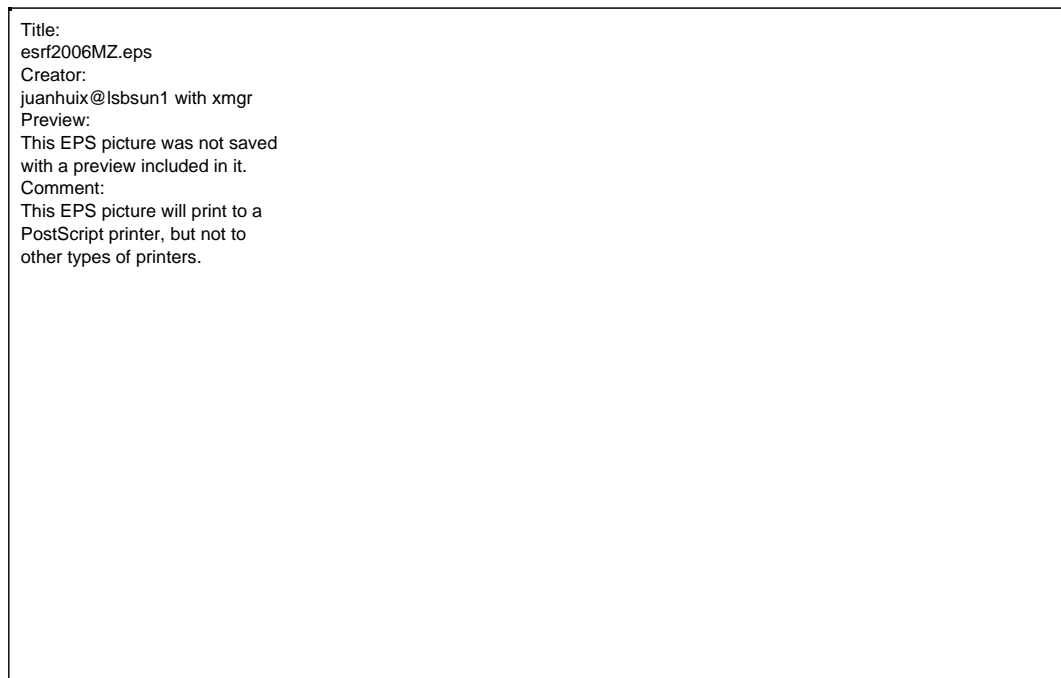


Figura 10.4. Perfils meridionals de la reflexió 6M en els estats de descans, contracció isomètrica, escurçament actiu (*release*) i estirament actiu (*stretch*).

Taula 10.1. Espaiats i intensitats relatives dels pics principals que formen les reflexions 3M i 6M en els estats de descans, contracció isomètrica, escurçament (*release*) i estirament (*stretch*).

Estat	3M		6M	
	1r pic	2n pic	1r pic	2n pic
Muscular	d [nm]	d [nm]	d [nm]	d [nm]
	int relativa	int relativa	int relativa	int relativa
descans	14.336 [0.86]	14.132 [0.14]	7.174 [0.59]	7.118 [0.41]
contracció isomètrica	14.630 [0.60]	14.411 [0.40]	7.292 [0.65]	7.234 [0.35]
escurçament	14.323 [0.86]	14.117 [0.14]	7.211 [0.78]	7.126 [0.22]
estirament	14.671 [0.49]	14.450 [0.51]	7.300 [0.76]	7.239 [0.24]

La intensitat de pic aparent, és a dir, l'altura del pic al meridià, és sensiblement més baixa en l'estat d'escurçament actiu que en descans. La intensitat de la reflexió 3M en escurçament és un 25% de la de descans, mentre que la intensitat de la 6M és un 45%.

Malgrat la disminució de la intensitat, l'amplada meridional total de la reflexió 6M en l'estat d'escurçament actiu és aproximadament un 40% més gran que l'amplada en descans. Aquest efecte indica amb claredat que el grau de desordre axial és molt superior. Això és coherent amb una situació on es permet un destensament del múscul (*floppyness*), en què, inevitablement, augmenten el desordre i l'arquejament, que provoca un eixamplament de la línia cap als angles baixos. En particular, la notable diferència de posicions del pic principal de la reflexió 6M en descans i en escurçament actiu pot explicar-se, almenys parcialment, pel notable arquejament que presenta (figura 10.1).

Una altra diferència de les reflexions 3M i 6M entre aquests dos estats és el fet que la intensitat total integrada de la reflexió 3M en l'estat d'escurçament disminueix a un 40%, mentre en la reflexió 6M es manté constant.

10.2.2. Reflexions en l'estat d'estirament actiu respecte a la contracció isomètrica

El perfil meridional en l'estat muscular d'estirament actiu és semblant al perfil en l'estat de contracció isomètrica, si bé hi ha diferències clares. En la reflexió 3M, la intensitat relativa dels dos pics principals és ca. 40% i ca. 60% en contracció isomètrica, mentre que són aproximadament iguals en l'estat d'estirament. En la reflexió 6M, les proporcions són 35-65% en contracció isomètrica i 25-75% amb estirament actiu. El canvi en les intensitats relatives denota un canvi clar en la longitud d'interferència i, possiblement, en la fase del factor d'estructura d'aquestes reflexions i, per tant, un canvi en la disposició axial dels caps de miosina.

Les intensitats totals integrades de les reflexions 3M i 6M en l'estat d'estirament són un 70% de les intensitats en contracció isomètrica, si bé les intensitats relatives són les mateixes. La diferència d'intensitats absolutes pot ser explicada, almenys parcialment, perquè el grau de solapament entre els filaments és, òbviament, més petit. La intensitat de pic, per la seva banda, disminueix aproximadament a un 60% i un 70% de la intensitat de pic en contracció isomètrica, mentre que l'espaiat és, en tots els pics d'interferència, un 0.3% més alt, és a dir, ca. 14.6 nm.

10.3. Implicacions estructurals i fisiològiques

Fins ara, les dades exposades són les aparents a partir dels diagrames de difracció dels diferents estats musculars. Mostrarem a continuació una primera anàlisi, necessàriament superficial, dels mòduls del factor d'estructura de les reflexions dels caps de miosina fins a la 6M, que inclou, per tant, les reflexions prohibides.

Com hem vist al capítol 7, el valor del mòdul del factor d'estructura extret a partir de l'arrel quadrada de la intensitat de pic (altura) de les reflexions no és exacte a causa, especialment, de la manca de cristal·linitat de la mostra. En lloc d'aquesta manera simple, l'extracció precisa del mòdul implica l'ajustament dels perfils radials de les reflexions considerades amb la formulació teòrica desenvolupada al mateix capítol.

No obstant això, a ordres baixos, el mòdul del factor d'estructura es pot calcular, en una bona aproximació, amb el valor de la intensitat de pic ponderada per l'amplada radial DR_l (vegeu la secció 7.4, expressió 7.29), és a dir,

$$F_l = F_{l, \text{exp}} R_l \quad (10.1)$$

En passant, notem que aquesta mateixa correcció es pot obtenir calculant les intensitats integrades per a tota la reflexió, i ponderant-les pel quadrat de l'amplada radial. Independentment del mètode, els factors d'amplitud obtinguts són els mateixos.

L'amplada radial de les reflexions 1M-6M té una dependència aproximadament lineal per a tots els quatre estats musculars considerats, especialment als ordres més baixos (figura 10.5). Com s'exposa a la secció 7.4, aquesta dependència indica que aquesta aproximació és aplicable.

L'estat muscular més ordenat és, amb diferència, l'estat de descans, ja que presenta una amplada radial de tots els ordres menor que tots els altres estats. Els estats d'escurçament actiu, de contracció isomètrica i, especialment, d'estirament actiu apareixen més desordenats. Remarquem, en aquests dos darrers estats, la linealitat no es manté exactament i, als ordres alts, l'amplada augmenta considerablement, fet que indica que comença a ser visible la condició de no cristal·linitat, en què el factor principal de l'amplada radial deixa de ser el mostratge de la xarxa hexagonal per ser la funció de Bessel pròpia de les estructures helicoidals. Amb tot, l'efecte és encara menor al de la linealitat i, per tant, la correcció 10.1 és encara una bona aproximació.

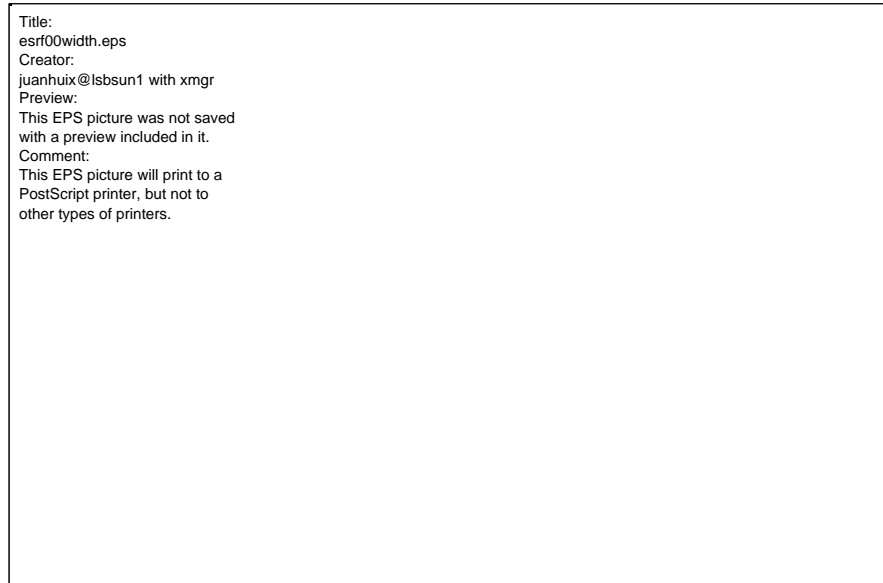


Figura 10.5. Amplada radial de les reflexions 1M-6M en els estats de descans, contracció isomètrica, escurçament actiu (*release*) i estirament actiu (*stretch*). S'observa la relació aproximadament lineal de l'amplada amb l'ordre, indicativa de la validesa de l'aproximació considerada en el càlcul dels mòduls del factor d'estructura.

A conseqüència d'aquesta linealitat de l'amplada radial, per tant, és possible calcular, amb una bona aproximació, els mòduls del factor d'estructura de les diferents reflexions a partir de l'expressió 10.1. Els mòduls extrets d'aquesta manera, i normalitzats respecte la reflexió 3M, es mostren a la figura 10.6.

L'efecte principal de la correcció és augmentar el pes relatiu dels ordres més alts. Així, les amplituds dels ordres 4M i 5M, amb aquesta correcció, són comparables a l'amplitud de la 2M, quan experimentalment són molt inferiors. També, per la mateixa raó, l'amplitud de difracció de la reflexió 6M es sobrevalora d'un factor 2 en relació a la reflexió 3M. Notem que aquests efectes ja han estat observats anteriorment en els càlculs més elaborats (vegeu el capítol 7).

L'amplitud de difracció dels ordres prohibits en els estats de contracció isomètrica i estirament actiu és molt baix respecte de l'amplitud en els altres dos estats considerats, descans i escurçament actiu. Aquesta situació és d'esperar a causa de, com s'ha vist anteriorment en contracció isomètrica, les distorsions axials de les corones de caps de miosina que trenquen la simetria helicoïdal de 3 cordes perfectes, són negligibles en aquests casos. De fet, en aquest cas, l'amplitud de difracció residual dels ordres prohibits és causada per altres estructures del sarcòmer apart de la dels caps de miosina.

D'altra banda, el comportament de les reflexions durant l'escurçament actiu indica que els caps tendeixen a tornar a una situació similar a la que tenen en l'estat de descans. A més, no tan sols els caps de miosina tornen a la situació de descans, sinó que tota l'estructura també tendeix a recobrar l'empaquetament cristal·logràfic típic al descans. Noteu a les figures 10.1 i 10.2 la presència del mostratge (*sampling*) de les línies de difracció d'ordre més baix en *release*, després d'haver-lo perdut en contracció isomètrica. No és possible un retorn complet de l'estructura típica del descans no s'aconsegueix a causa del temps limitat (ca. 40 ms) en què el múscul pot mantenir les condicions d'escurçament actiu.

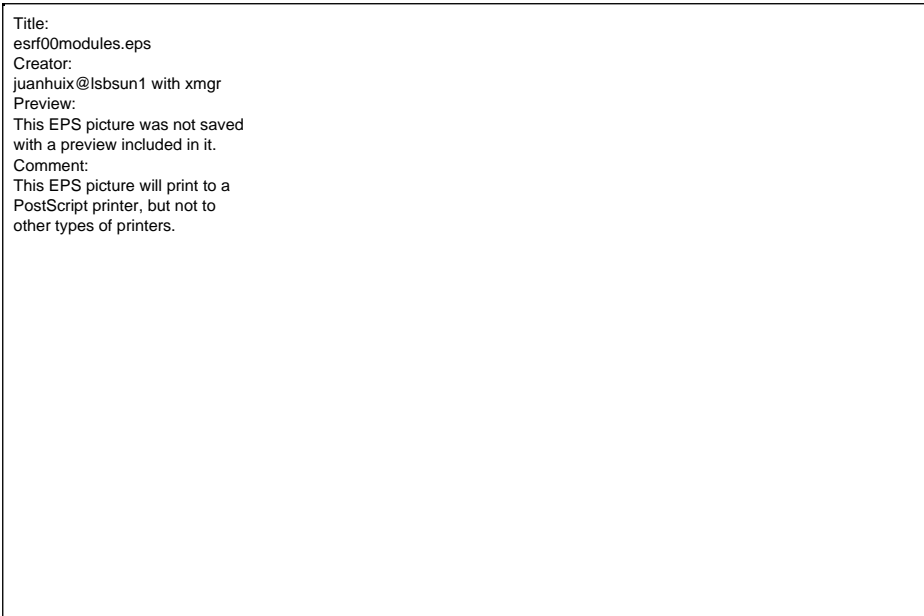


Figura 10.6. Amplituds de difracció F_p , normalitzades a la reflexió 3M i corregides amb l'expressió 10.1, de les reflexions 2M-6M en els estats de descans, contracció isomètrica, escurçament actiu (*release*) i estirament actiu (*stretch*). La correcció té l'efecte d'augmentar el pes relatiu dels ordres superiors.

Donada la similitud, tant en la fase com en el mòdul, dels diferents ordres en els estats de contracció isomètrica i d'estirament actiu, la conformació dels caps de miosina serà molt similar. De tota manera, la longitud d'interferència aparent en aquest darrer estat augmenta d'un 0.3% respecte de la longitud en contracció isomètrica. Aquest efecte, en principi, pot ser degut bé per un estirament de l'esquelet del filament gruixut (*backbone*), bé per l'estirament del filament prim. De tota manera, la primera possibilitat, l'estirament de l'esquelet del filament gruixut, és bastant improbable. D'entrada, cal dir que aquest estirament no ha estat mai observat. A més, l'esquelet d'aquest filament és una estructura rígida i, molt probablement, sense elasticitat, donat que està formada per una gran quantitat de cues de molècula de miosina agregades amb un enllaç fort.

La segona explicació de l'augment de la periodicitat, l'elasticitat del filament prim, és, en canvi, molt més plausible. Efectivament, una experiments anteriors han indicat que el filament prim activat té una elasticitat de ca. 0.4% per filament prim i per unitat de tensió isomètrica P_0 [Bordas *et al.*, 1999]. D'altra banda, en els experiments realitzats en l'estat d'estirament actiu, la tensió aconseguida ha estat ca. $1.8 P_0$, és a dir, un factor 0.8 superior a la contracció isomètrica. Per tant, reunint aquestes dades, l'augment esperat de la periodicitat en l'estat d'estirament a causa de l'elasticitat del filament prim és $0.4\% \times 0.8 = 0.32\%$. Aquesta diferència de periodicitats és, justament, essencialment la mateixa que la diferència mesurada, 0.3% i, per tant, amb tota probabilitat, ha de ser causada per l'elasticitat del filament prim.

10.4. Línies futures de treball

Si bé cal tenir present que l'anàlisi de les dades introduïdes en aquest capítol estan encara en progrés, les conclusions generals presentades són fermes. Estem en condicions, per tant, en base als nombrosos resultats presentats tant ara com en el cos de la tesi, de suggerir un bon nombre de nous experiments i línies d'investigació, que exposem tot seguit:

1. Estendre la resolució de les dades presentades en els estats de contracció isotònica (escurçament i estirament actius) a la resolució dels estats de descans i contracció isomètrica, és a dir, fins a la reflexió 15M.
2. Una observació superficial de les línies de difracció en l'estat de descans (figura 10.1 i 10.2) indica que el tipus interferència analitzada al meridià en aquest treball també es manifesta en la regió no meridional de les línies de difracció. L'efecte és evident, per exemple, en la reflexió (113) de la superxarxa (vegeu la secció 2.6). Això dóna, almenys teòricament, una possibilitat de trobar les fases a tot el diagrama de difracció, no només en el meridià, en cas que sigui possible aconseguir preparacions musculars molt ordenades, per exemple fibres musculars vives i actives.
3. Els diagrames de difracció bidimensionals (figura 10.1 i 10.2) mostren també que les línies de difracció de baix ordre de la miosina i l'actina en l'estat d'estirament actiu (*stretch*) apareixen més ben definides que en contracció isomètrica. Això suggereix que el nombre de caps enllaçats en aquell estat sigui superior al nombre de caps en contracció isomètrica. Això contradiu la visió establerta en el camp, que suposa que tots els caps ja estan enllaçats en contracció isomètrica, i dóna una explicació raonable al fet que la tensió augmenti tan substancialment en l'estirament. L'obtenció de noves dades que aclareixin aquest punt és, per tant, important des del punt de vista de fisiologia muscular.
4. Atès que la reflexió 11M apareix com a resultat de la presència de la titina i, tenint en compte que aquesta proteïna té una funció de bastida del sarcòmer (vegeu la secció 1.2.4), l'estudi d'aquesta reflexió en diferents estats musculars pot aportar informació directa de la seva funció mecànica i fisiològica.
5. Si bé, fins ara, ens hem limitat a definir l'estructura dels caps de miosina en la contracció muscular, aquest treball es pot i s'ha d'estendre per incorporar altres estructures (proteïna C, etc.) al mapa de densitat electrònica.
6. Finalment, l'extensibilitat del filament prim durant l'estirament actiu ha estat suggerida a partir de l'anàlisi de les reflexions no meridionals 6A i 7A, que en permeten una mesura relativament indirecta. La determinació directa de l'extensibilitat requereix experiments que permetin mesurar, amb alta precisió, les periodicitats causades pel desplaçament axial (*axial rise*) de l'actina, és a dir, la reflexió de 2.7 nm. Dit d'altra manera, calen els experiments, en condicions d'estirament, similars als realitzats per Bordas *et al.* (1999) en condicions d'escurçament.

Capítol

11

Conclusions

El capítol final presenta les conclusions principals de la tesi, separades per estats musculars.

11.1. Conclusions generals

1. El tractament teòric de la interferència que genera la simetria bipolar del sarcòmer ha demostrat clarament la possibilitat d'extreure informació de fase. Això ha aportat, per primera vegada, una informació directa de l'estructura molecular de teixits musculars vius.
2. Les noves fonts de llum de sincrotró de tercera generació ofereixen una resolució angular sense precedents en el diagrama de difracció. Aquesta resolució és suficient per realitzar els experiments necessaris que extreuen la informació del punt anterior
3. L'orientació axial dels caps de miosina ha de ser rígida en tots els estats musculars, ja que els efectes de la interferència són importants en tots els estats i en totes les reflexions considerades.
4. Com a conseqüència dels punt anterior, si hi ha moviments asíncrons axials en qualsevol estat, aquests només poden ser causats per un nombre de caps molt petit o per una fracció total de la massa molt petita.
5. El grau de desordre cristal·lí en teixits musculars és relativament baix en l'estat de descans, augmenta en els estats d'escurçament actiu a càrrega nul·la i contracció isomètrica, i és alt en l'estirament actiu.

11.2. Descans

1. La fase del factor d'estructura és independent de l'aproximació teòrica del filament gruixut utilitzada. Podem negligir, per tant, desordres axials i dispersions de periodicitats fins, almenys, a la resolució de la reflexió 15M.
2. Els caps de miosina de cada parell tenen, de mitjana, una orientació axial relativa similar, però no idèntica, com ho mostra la forma bilobulada del mapa simplificat de densitat electrònica.
3. La presència de reflexions prohibides helicoïdalment prové de la projecció axial d'un de cada tres parells de corones, que és clarament diferent a la dels altres dos.
4. L'angle de rotació intrínseca dels dos caps de miosina d'un parell és similar, però no idèntic. Possiblement, la petita diferència d'angles facilita l'enllaç estereoespecífic dels caps al filament prim.
5. L'enllaç de la titina al filament gruixut sembla ser específic a les molècules de miosina, donat que les periodicitats de les dues proteïnes són commensurables.

6. Aquesta darrera conclusió dóna suport a la idea que la titina, a més de la funció de bastida del sarcòmer, pot actuar de regulador en la diferenciació cel·lular.

11.3. Contracció isomètrica

1. La fase del factor d'estructura és independent de l'aproximació teòrica del filament gruixut utilitzada. Podem negligir, per tant, desordres axials i dispersions de periodicitats fins, almenys, a la resolució de la reflexió 15M.
2. Els dos caps de miosina d'un parell tenen una diferent projecció axial de massa. Aquesta diferent projecció es dóna en tots els mapes de densitat electrònica possibles abans de l'aplicació dels criteris per escollir la combinació de les fases.
3. L'ajustament de l'orientació dels caps a tots els possibles mapes axials de densitat electrònica dóna una única solució. Els dos caps d'aquesta solució tenen una orientació clarament diferent, de manera coherent amb la conclusió anterior.
4. Només un dels caps de cada parell està enllaçat estereoespecíficament amb l'actina. Això és un conseqüència inevitable del fet que hi hagin dues projeccions axials de massa diferents.
5. Possiblement, el cap més perpendicular d'un parell forma l'enllaç estereoespecífic. De tota manera, hi ha un dubte raonable que sigui altrament.

11.4. Contracció no isomètrica

1. Durant l'escurçament actiu, l'orientació axial dels caps de miosina és molt similar, però no necessàriament idèntica, a l'orientació en l'estat de descans.
2. Del punt anterior s'extreu que els caps de miosina retornen a la situació en descans quan no poden formar enllaç amb cap filament prim.
3. Durant l'estirament actiu, l'orientació axial dels caps de miosina és molt similar, però no necessàriament idèntica, a l'orientació que tenen en contracció isomètrica.
4. Durant l'estirament actiu, es manifesta clarament un augment de la longitud d'interferència que probablement reflexa l'elasticitat del filament prim.