

## **LA LLUM DE SINCROTRÓ: ESTRUCTURA MOLECULAR I FUNCIO DELS TEIXITS MUSCULARS**

JOAN BORDAS, JOSEP CAMPANY, JORDI JUANHUIX I AGNETA SVENSSON \*

*Laboratori de Llum de Sincrotró (LLS). Edifici Cn. Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona.*

*\* Professor visitant. Departament de Física i Astronomia. Universitat de Leicester. Leicester. Regne Unit.*

Adreça per a la correspondència: J. Bordas. Laboratori de Llum de Sincrotró (LLS). Edifici Cn. Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Adreça electrònica: [jbordas@ifae.es](mailto:jbordas@ifae.es).

*Paraules clau: Llum de sincrotró, estructura i funció muscular, actina, miosina.*

*Keywords: Synchrotron radiation, structure and function of muscle, actin, myosin.*

### **RESUM**

L'ús de la llum de sincrotró és l'únic mètode que permet l'estudi de l'estructura molecular i la redistribució molecular que experimenten teixits musculars sencers, totalment funcionals i no alterats, durant el procés de contracció muscular. Això és així perquè és l'única tècnica que permet enregistrar diagrames de difracció de raigs X amb una escala de temps de mil·lèsimes de segon o menys, és a dir, commensurable amb les constants de temps de les diverses formes de contracció muscular. Es presenta un breu resum d'alguns dels treballs realitzats durant els darrers vint anys. Els recents resultats han portat a plantejar-se un cert nombre de qüestions noves, que cal resoldre, referents als mecanismes moleculars que controlen la contracció muscular. Es posa èmfasi en la importància de les tecnologies més noves, procedents del desenvolupament de les anomenades *fonts de llum de sincrotró* de tercera generació, en relació a aquestes qüestions.

## SUMMARY

Synchrotron radiation is the only method that allows the study of the molecular structure and molecular rearrangements that whole, fully functional and undisturbed muscle tissues undergo during the process of muscular contraction. This is because it is the only technique that allows the recording of X-ray diffraction data in a time scale of milliseconds or less, i.e. commensurate with the time constants of the various forms of muscular contraction. A brief summary of some of the work carried out in the last twenty years is presented. The latest results have led to a number of new questions, that need to be addressed, regarding the molecular mechanisms governing muscular contraction. The importance of the newer technologies arising from the development of the so-called third generation Synchrotron Radiation sources is emphasised in connection with these questions.

## INTRODUCCIÓ A L'ESTRUCTURA DELS TEIXITS MUSCULARS

La funció dels teixits musculars és convertir energia química en força o moviment. Això s'assoleix utilitzant l'energia alliberada en el trencament de les molècules d'ATP i, d'alguna manera, produint la funció requerida. El procés de transducció de l'energia és realitzat per un ensamblatge complex de proteïnes filamentoses que s'organitzen amb un elevat grau d'ordenació. De fet, l'ordre és d'unes característiques inusualment complexes, per a una estructura biològica en funcionament. En conseqüència, hom pot obtenir i mesurar patrons de difracció de raigs X de teixits musculars no pertorbats. Aquests diagrames porten informació sobre la disposició i estructura de les molècules i àtoms constitutius. Tot i això, desentrellar aquesta informació i aconseguir esbossar els processos moleculars que governen la contracció muscular és extremadament complicat. Ho és tant, que la major part de les idees actuals sobre com succeeix la contracció s'han de considerar encara models de treball, més que hipòtesis provades.

Expliquem breument la base d'aquesta complexitat. L'estructura supramolecular dels teixits del múscul estriat és raonable-

ment ben coneguda (figura 1), encara que no és igual per a totes les espècies. La mostra que s'empra més sovint és el múscul *sartorius* de les granotes, i una altra que també s'utilitza, encara que menys, és el múscul *semitendinosus* de la mateixa espècie. En aquest cas, la major part de la massa (> 75 %) està formada pels filaments primis i gruixuts.

Els filaments primis estan formats per hèlixs de monòmers d'actina G (Kabsch *et al.*, 1990) que tenen aproximadament 1000 nm de llargària. En una primera aproximació, el filament d'actina es pot veure com una hèlix de DNA levògira amb una separació d'uns 5,9 nm, i pas de rosca d'uns 2,73 nm, amb 54 subunitats d'actina en 25 voltes helicoïdals. El fet que dos monòmers consecutius d'actina G estiguin rotats aproximadament  $167^\circ$  (és a dir,  $25/54 \times 360^\circ$ ) confereix a aquesta estructura helicoïdal una apariència de doble hèlix dextògira. Aquesta hèlix forma un complex amb les molècules de tropomiosina que se situen al llarg de la ranura també helicoïdal, però de pas de rosca molt més gran, que deixa oberta l'estructura de doble hèlix. A més, hi ha un parell de molècules de troponina per cada 14 molècules d'actina, és a dir, espaiades uns 38,0 nm al llarg de l'hèlix d'actina (figura 2a). A la pràctica, l'hèlix d'actina no es exactament helicoïdal, i la si-

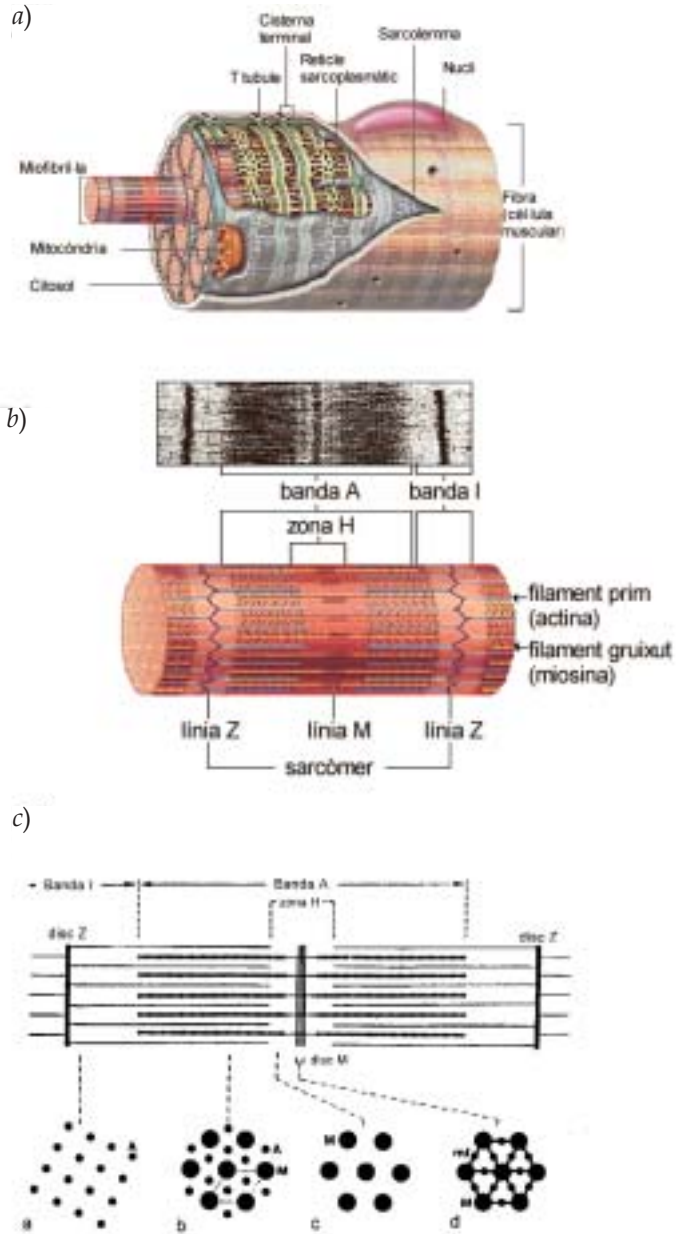


FIGURA 1. a) Detall d'una fibra muscular. b) Aspecte d'un sarcòmer vist amb microscopi electrònic (a dalt), i esquema que representa les diferents parts de què és compost (a sota). La foscor de cada banda o línia en la microfotografia electrònica és directament proporcional a la seva densitat electrònica. c) Seccions transversals del sarcòmer que corresponen a cada zona. a. La banda I conté filaments prim que formen una xarxa aproximadament quadrada. b. A la zona de solapament de la banda A, els filaments prim d'actina se situen en les posicions trigonals de l'estructura haxagonal dels filaments gruixuts de miosina. c. Fora de la zona de solapament, els filaments gruixuts resten amb la mateixa estructura. d. Al disc M, els filaments gruixuts queden units per petits filaments transversals, compostos per diverses proteïnes estructurals.

metria que acabem de descriure s'ha de veure com una aproximació a l'estructura real. L'estructura atòmica del filament d'actina s'ha modelitzat de forma refinada (Holmes *et al.*, 1990) utilitzant l'estructura cristal·logràfica de l'actina G (Kabsch *et al.*, 1990).

Els filaments gruixuts estan formats per unes 300 unitats de l'anomenada *miosina II*, és a dir, la varietat de miosina més abundant als músculs esquelètics. Les llargues cues  $\alpha$ -helicoidals dels parells de molècules de miosina (figura 2b) s'acoblen amb altres per a formar l'«espinada» (esquematzat pel cilindre central de la figura 2c) del filament gruixut. En aquest muntatge, els caps globulars de miosina (sovint designats com a *subfragments S1*; encerclats a la figura 2b) sobresurten d'aquesta espinada del filament gruixut seguint una simetria que aproximadament és una triple hèlix (esquematzats pels cilindres petits a la figura 2c). Cadascuna d'aquestes tres hèlixs consisteix en 9 parells de caps de miosina per una volta d'hèlix d'uns 129 nm, amb un espaiat axial d'uns 14,3 nm, és a dir, una hèlix 9/1 (figura 2c). Malgrat tot, a causa de la disposició en triple hèlix, el filament gruixut es repeteix cada tres voltes d'hèlix o, com sovint es diu a les descripcions, cada tres corones (Luther *et al.*, 1981). Una *corona* és el nom donat a cada nivell de 3 parells de caps de miosina repetits al llarg del filament (figura 2c, a sota i a l'esquerra). Com que cada corona té 3 parells idèntics de caps de miosina, és natural esperar que la seva projecció axial de masses siguin dos lòbuls, on cadascun correspon a la projecció d'un dels caps. Com veurem més endavant, ha estat possible resoldre aquests lòbuls mitjançant la difracció de raigs X. A més, al llarg de tota la llargària dels filaments gruixuts (d'una longitud d'uns 800 nm), es troben tota una sèrie de proteïnes accessòries, com ara la proteïna C, la proteïna X, i la proteïna H (Bennet *et al.*, 1986). Entre elles, la proteïna C és la més

abundant i regularment ordenada al llarg del filament gruixut. La proteïna C és una molècula allargassada d'uns 35-40 nm de llargària i uns 2-3 nm de diàmetre (Offer, 1972), i forma un complex amb els filaments gruixuts, de manera que la unitat que es repeteix és una sèrie de 7-11 amb separacions entre unitats d'uns 44 nm (Offer *et al.*, 1973). De nou, cal emfasitzar que la simetria dels filaments gruixuts que acabem d'esbossar s'ha d'esguardar com una primera aproximació. A la pràctica, hi ha desviacions significatives d'aquesta simetria ideal, tal com clarament proven multitud de pics de difracció que haurien de ser absents del diagrama, i que tot i això apareixen (les anomenades *reflexions prohibides*).

Des d'un punt de vista cristal·logràfic, l'estructura supramolecular que es repeteix als teixits musculars és el sarcòmer (figura 1b) i, per tant, s'ha de considerar la cèl·lula cristal·logràfica unitària. El sarcòmer està delimitat per les anomenades *línies Z*, que es repeteixen més o menys indefinidament al llarg de l'eix muscular. Els filaments primers emanen de cada cara d'aquestes línies Z amb polaritats oposades. Al centre del sarcòmer hi ha un altre pla d'estructures proteíniques, les anomenades *línies M*, que el parteixen per la meitat. Els filaments gruixuts emanen de cada cara d'aquests plans M, també amb polaritats oposades. A la regió on els filaments primers amb llargària de 1000 nm s'interpenetren amb els filaments gruixuts de 800 nm de llargària, els dos conjunts de filaments estan empaquetats formant una xarxa hexagonal (figura 1c), en la qual els filaments primers ocupen les posicions trigonals de la xarxa hexagonal definida pels gruixuts. A la pràctica, com que de cada tres filaments gruixuts un està rotat 60 graus, és a dir, conforma la que es designa com a *xarxa no three alike*, l'empaquetat hexagonal forma una superxarxa, més que no pas la petita xarxa que hom esperaria si cada filament

gruixut tingué la mateixa orientació en cada grup de tres.

De la mateixa manera que els filaments gruixuts surten de la línia M, hi ha una regió d'uns 150 nm, és a dir, aproximadament la longitud de la llarga cua  $\alpha$ -helicoidal de les molècules de miosina, on no hi ha caps de miosina sobresortint de l'«espineda» (regió central de la figura 1c). Això és degut al fet que, atès que les molècules de miosina s'acoblen per a formar els filaments gruixuts, les seves cues terminals són les que s'enganxen a les línies M. Per tant, atesa l'existència d'aquesta zona fosca, tenim un cristallit, o

unitat de difracció, de caps de miosina a cada costat de la línia M, col·locats de forma que tenen polaritats oposades.

Per a una explicació extensa dels detalls estructurals dels filaments prim i gruixut, i sobre l'estructura supramolecular dins del sarcòmer, el lector interessat pot remetre's a Squire (1981).

**Difracció de raigs X amb resolució temporal de teixits musculars funcionals.**

El diagrama de difracció del múscul estriat és molt ric en detalls. Només pel fet que

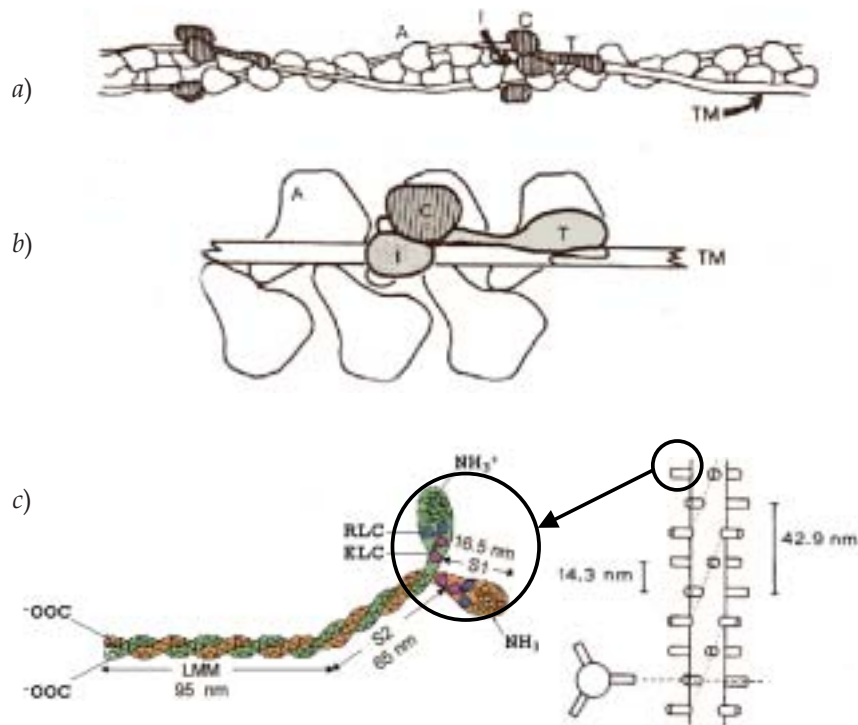


FIGURA 2. a) Disposició de l'actina (A), tropomiosina (TM), i les 3 subunitats de la troponina (Tn-C, Tn-I i Tn-T) en el filament prim. Dessota, mostrem una visió ampliada del punt d'unió de les tres proteïnes. S'observa el punt d'unió de les tropomiosines a l'alçada de la Tn-T. b) Dímer de miosina. Es marquen les cadenes lleugeres RLC i ELC, i les longituds de les parts de la MHC (LMM, S2 i S1, excepte les cadenes lleugeres) que formen cada monòmer. L'extrem carboxílic (C, COO<sup>-</sup>) de la MHC se situa a l'extrem de la LMM, mentre que l'extrem amino (N, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) és al subfragment S1. Els subfragments S1 i S2 formen la HMM (*heavy meromyosin*). c) Esquema de l'arranjament de les corones de caps de miosina en el filament gruixut. Cada corona té tres parells de caps de miosina (cilindres), i se situa a 14,3 nm i 40° de l'anterior. El filament es repeteix idènticament cada 3 × 14,3 = 42,9 nm.

els filaments prim i gruixut tenen simetries helicoidals molt diferents, és possible a la pràctica utilitzar aquests detalls. Això és així perquè, excepte a la part equatorial del diagrama, on contribueixen simultàniament els dos tipus de filaments, pràcticament a tota la resta del diagrama els pics de difracció esperats a partir de les disposicions respectives dels filaments prim i gruixut s'ubiquen en espaiats axials diferents.

Quan un múscul, mantingut en el medi fisiològic apropiat, s'activa mitjançant l'aplicació de l'estímul elèctric adequat, desenvoluparà una tensió (si el múscul se sosté isomètricament) o s'escurçarà (si al múscul se li deixa canviar la longitud lliurement). El temps necessari per a fer la transició entre l'estat de repòs i l'estat de desenvolupar la màxima tensió, per a un múscul *sartorius* de granota, és d'uns 200 ms (aquest temps varia una mica segons les espècies, paràmetres estacionals i, en particular, amb la temperatura a la qual es manté la mostra). Durant aquesta estona, tenen lloc un cert nombre d'esdeveniments: els filaments prim s'activen; els caps de miosina interactuen amb ells i, d'alguna manera, el resultat és la producció de tensió i/o moviment. Relacionar de quina manera el reordenament de l'organització molecular de les proteïnes del múscul porta a la producció de força o tensió és l'objectiu central dels estudis de difracció de raigs X amb resolució temporal. Aquí, la llum de sincrotró és essencial, ja que no hi ha cap altra font de raigs X que pugui donar simultàniament les característiques geomètriques que es necessiten per a resoldre les enormes grandàries de cella unitat dels teixits musculars, d'una banda, i la intensitat necessària per a recollir les dades en un lapse de temps prou curt per a capturar els canvis estructurals que succeeixen durant les diverses formes de contracció muscular.

Amb l'adveniment de la segona generació de fonts de llum de sincrotró, en conjun-

ció amb el desenvolupaments de les cambres de raigs X apropiades i els sistemes de detecció associats, va ser possible resoldre els pics de difracció i, més encara, fer-ho amb resolució temporal durant el cicle de contracció. La figura 3 mostra la diferència entre dos diagrames de difracció de raigs X bidimensionals obtinguts a partir d'un múscul *sartorius* de granota en repòs i al replà de tensió isomètrica. Les àrees més clares corresponen a les línies de difracció que han desaparegut, o que s'han reduït de forma significativa durant la contracció, mentre que les àrees fosques corresponen a línies que apareixen o creixen en intensitat durant la contracció. Sense baixar als detalls més intrincats que requereix qualsevol interpretació quantitativa, és suficient remarcar la gran quantitat d'àrees clares i fosques que són presents en aquest diagrama diferencial de difracció, cosa que clarament indica que hi ha reordenacions substancials en l'estructura molecular del múscul durant la contracció. Les diverses àrees incloses en caixes a la figura 3 mostren les parts del patró de difracció que, des del primer estudi de difracció de raigs X que va tenir èxit (Huxley *et al.*, 1980), s'han explorat amb una resolució temporal d'aproximadament 1 ms.

Un exemple d'aquest tipus d'experiment es dona a la figura 4, on es mostra el canvi de la distància entre la distribució dels caps de miosina simètricament disposats a cada banda de la línia M (longitud d'interferència), després d'imposar un canvi de longitud a un múscul en el pic de la contracció isomètrica. És a dir, durant la transició de contracció isomètrica a isotònica. En aquesta maniobra mecànica la tensió (línia negra contínua) baixa des d'un màxim a 0, mentre que el múscul es contrau a màxima velocitat. Les dades estan escalades respecte del canvi percentual de la distància mitjana entre les unitats de difracció de miosina a cada banda de la línia M. Hi ha dues mesures in-

dependents a aquest canvi (quadrats i rombes), extretes de dues reflexions meridionals del diagrama de difracció mostrat a la figura 3. L'escala de temps està referida a un

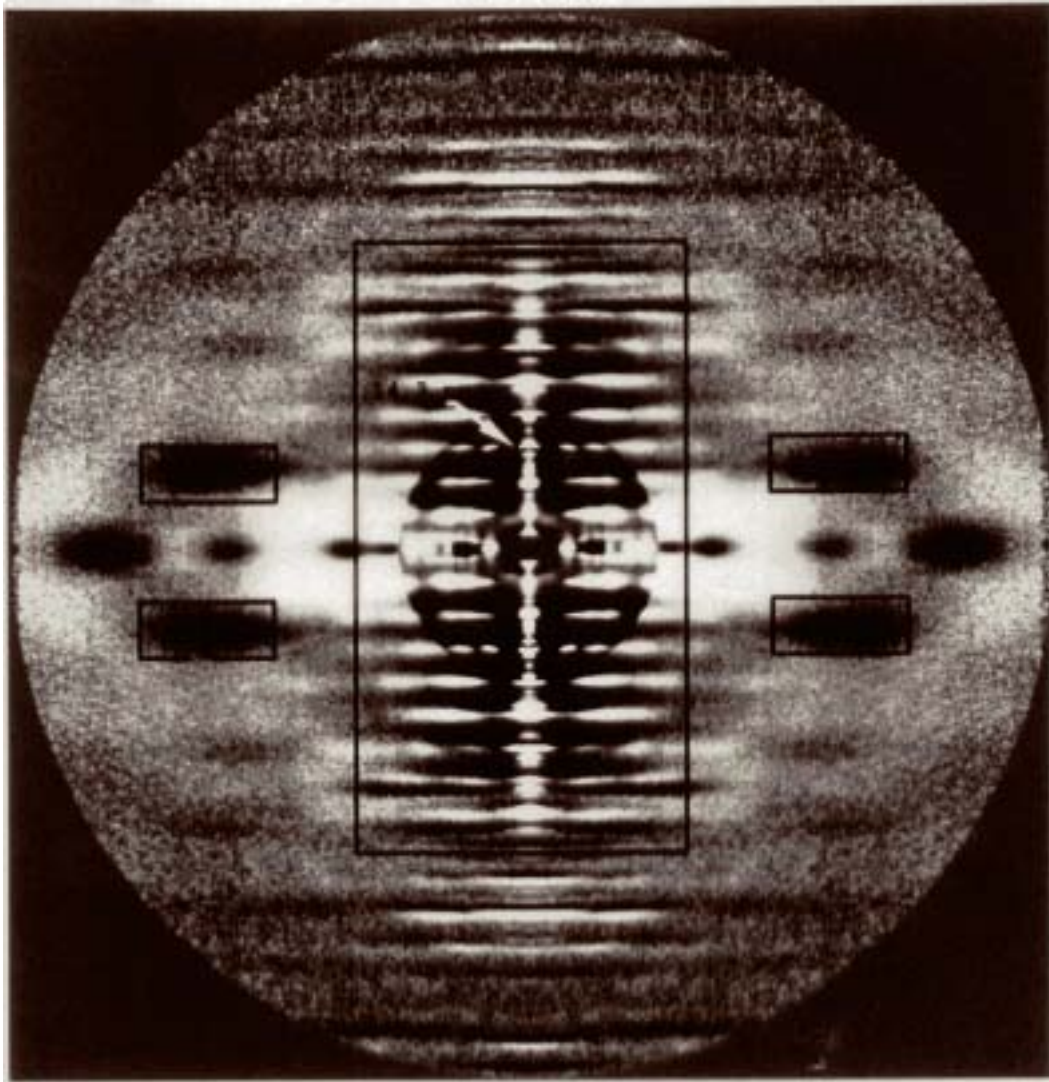


FIGURA 3. Diagrama diferencial de difracció entre els estats de contracció isomètrica i de repòs d'un múscul. Les àrees clares corresponen a pics de difracció que s'esmoreeixen molt durant la contracció, i les fosques als que es fan més intensos. Les caixes marquen les parts del diagrama que s'han mesurat en mode de resolució temporal amb una resolució de prop d'1 ms. La fletxa indica l'espaiat de la reflexió meridional més intensa, que en el múscul en repòs és de 14,34 nm. Per raons gràfiques, la intensitat del disc central s'ha reduït artificialment. Les línies de difracció clares a la caixa rectangular central són produïdes per la desaparició de la primera a la vuitena línies de difracció de la miosina. El parell de línies de difracció més fosques a les vores de la caixa és produït per la intensificació de les línies de difracció a 5,9 i 5,1 nm de l'actina. La causa d'això és, almenys parcialment, la formació del complex actomiosina. Les línies més difuses de les altres caixes corresponen a la intensificació de la segona línia de difracció de l'actina, a causa del moviment de la tropomiosina que succeeix durant l'activació.

zero que coincideix amb el moment d'iniciar el canvi de longitud. En aquest cas, la resolució temporal és de 0,5 ms. Sense entrar en interpretacions detallades d'aquests resultats, és clar que la coincidència temporal d'aquests canvis de longitud d'interferència amb el canvi de tensió indiquen un comportament elàstic dels components estructurals que contribueixen a aquestes reflexions.

S'han dut a terme al llarg dels anys molts experiments d'aquest tipus. Un sumari succint d'aquest coneixement acumulat és que durant la contracció isomètrica es poden distingir i mesurar quatre intervals diferents. L'interval més ràpid correspon a l'activació dels filaments primis. Aquí, la troponina s'aixeca de la posició de repòs i produeix unes reflexions més contrastades —les reflexions provinents de la troponina al meridià del diagrama creixen en intensitat amb una constant de temps d'uns 16 ms (Bordas *et al.*, 1991)—, i pràcticament de forma simultània, les molècules de tropomiosina roden sobre el filament d'actina, presumiblement destapant els punts d'enllaç actina-miosina (Kress *et al.*, 1986). Això induïx un desordre estructural de tota la combinació de proteïnes, on el desordre s'esdevé amb una constant de temps d'uns 35 ms. El desordenament succeeix perquè, encara que els caps de miosina son ara capaços d'interactuar amb el filament d'actina, només ho poden fer abandonant les posicions ordenades que ocupen en repòs. En aquest moment, el mostreig cristal·logràfic relativament fort que s'observa als músculs en repòs pràcticament desapareix. Simultàniament es produeix l'esdeveniment cinètic de la formació d'un complex d'actomiosina (AM) (Bordas *et al.*, 1993; Martín-Fernandez *et al.*, 1994a; Bordas *et al.*, 1999). Finalment, hi ha un cert nombre d'esdeveniments estructurals associats amb la reorientació dels caps de miosina que duren un temps idèntic

al del desenvolupament de la tensió, és a dir, una constant de temps d'uns 65 ms (Martín-Fernandez *et al.*, 1994b).

A més, és possible de seguir els esdeveniments relatius a determinades parts del diagrama de difracció, notablement les reflexions meridionals més fortes de la miosina, que porten informació sobre l'orientació relativa dels caps de miosina durant els estats transitoris que resulten d'aplicar contraccions i estiraments ràpids (al voltant d'1 ms). La hipòtesi que hi havia al darrere d'aquests experiments és que si les diferents disposicions axials dels caps de miosina que interactuen amb l'actina estiguessin sincronitzades amb els canvis mecànics, resultaria que la major part de la població de caps estarien en un estat estructural ben definit (Huxley *et al.*, 1981). Una de les conclusions inqüestionables que es va extreure d'aquest tipus d'experiments és que els caps de miosina passen per un canvi d'orientació significatiu durant els canvis de longitud associats a les contraccions, és a dir, durant els estiraments o arronsaments ràpids, es torcen, de mitjana, cap a una posició menys perpendicular respecte l'eix del filament prim. Malgrat tot, encara hi ha un conjunt d'observacions que cal explicar. La hipòtesi de treball sobre la contracció muscular que té més ressò és que l'energia mecànica necessària per a sostenir la tensió prové dels caps de miosina (Huxley i Simmons, 1971) i, en conseqüència, després d'una contracció ràpida, quan la tensió baixa fins a valors negligibles, s'espera que les intensitats de les reflexions sensibles a aquesta disposició dels caps de miosina segueixin una evolució temporal idèntica a la transició de canvi de longitud o de tensió (és a dir, s'espera un comportament similar de les intensitats al que s'ha trobat per a la longitud d'interferència; veg. la figura 4). A la pràctica, això no passa, i els canvis en la intensitat de les reflexions rellevants estan retardades prop d'1 ms.



Més encara: una altra suposició central és que els únics elements elàstics de l'estructura són als caps de miosina, i llavors l'«espinada» del filament gruixut ha de ser inextensible. Tot i això, gràcies a l'alta brillància de les fonts de llum de sincrotró, es pot mesurar l'extensibilitat dels filaments fins a un nivell de precisió mai assolit fins ara. Aquest tipus de mesures ha demostrat que els filaments primers poden experimentar una extensió d'un 0,3 % de la longitud en repòs durant la transició de l'estat de repòs al replà de contracció isomètrica (Huxley *et al.*,

1994; Wakabayashi *et al.* 1994; Bordas *et al.*, 1999). A més, s'ha pogut mostrar que al llarg d'una maniobra d'arrosament des del replà de contracció isomètrica dissenyada de manera que la tensió desenvolupada caigui fins a zero, el filament prim reduïx la longitud prop d'un 0,4 %, cosa que produeix un canvi molt subtil de la simetria helicoidal (Bordas *et al.*, 1999). La manera en què aquestes observacions es poden incorporar als models clàssics de contracció és actualment objecte de controvèrsia.

Finalment, la importància de la tercera

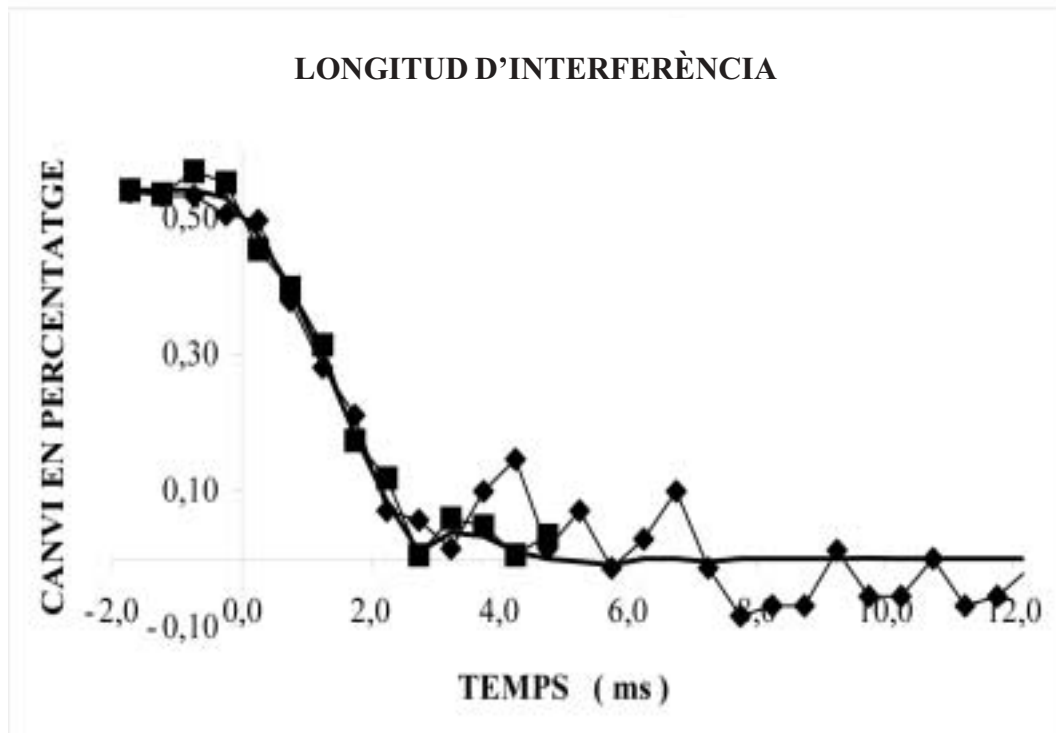


FIGURA 4. Exemple d'informació cinètica obtinguda de l'anàlisi dels diagrames de difracció. Es representa el percentatge de la variació de la distància mitjana, o longitud d'interferència, entre les unitats de difracció de miosina a cada costat de la línia M (figura 1c), quan un múscul en contracció isomètrica s'allibera de sobte i es deixa que s'escurci lliurement. En aquesta situació, la tensió desenvolupada pel múscul (línia negra contínua) decau «instantàniament» des del màxim de contracció isomètrica a zero. Les dades marcades amb quadrats i rombes mostren el canvi de la longitud d'interferència a partir de dos pics de difracció diferents. A l'eix horitzontal, representem el temps passat des del moment en què el múscul es deixa escurçar lliurement. La resolució temporal en aquest cas és de 0,5 ms. Tenint en compte que es necessiten de l'ordre de 24 hores per aconseguir un diagrama de difracció d'un teixit muscular amb una font de raig X convencional, aquest tipus d'experiments són impracticables excepte si es fa servir llum de sincrotró.

generació de font de llum de sincrotró per a la recerca muscular és immensa. El desenvolupament més important aquí ha estat la possibilitat de produir raigs X amb onduldors amb una brillància sense precedents. L'European Synchrotron Radiation Facility és el principal exemple, tot i que no l'únic, d'una font de tercera generació d'aquest tipus. La conseqüència pràctica d'aquesta brillància és que ara és possible de resoldre els diagrames de difracció de raigs X de teixits musculars durant la contracció amb resolucions angulars sense precedent.

És sabut des de fa temps que els mateixos tipus de fenòmens d'interferència presents als pics de difracció meridionals dels músculs en repòs són presents també a l'estat de contracció (Bordas *et al.*, 1995). Tot i això, és només des de l'entrada en funcionament de les fonts de raigs X de tercera generació que aquests fenòmens d'interferència s'han pogut mesurar bé. Aquests efectes sorgeixen del fet que les dues unitats de difracció de la miosina situades a cada cara de la línia M estan separades per una zona neutra, de tal forma que succeeix un fenomen comparable a l'efecte clàssic de difracció de dues esclertes. Tot i això, aquí les projeccions axials de dues unitats de difracció són mirall una de l'altra, a causa de la disposició polar dels filaments gruixuts. En aquesta situació, les intensitats difractades porten la informació de fase necessària per a reconstruir la projecció de masses dels caps de miosina al llarg de l'eix del múscul. Aquest fenomen ja s'ha explotat per a determinar la disposició estructural del parell de caps de miosina a la corona al replà de contracció isomètrica (Juanhuix *et al.*, 2001).

Els resultats són clarament indicatius del fet que cada cap dels parells que formen les corones té disposicions estructurals distintes, i que només un dels caps del parell interactua estereoespecíficament amb el filament prim cada vegada. Per tant, és bas-

tant probable que el 50 % dels caps que estan enllaçats estereoespecíficament a l'actina sigui el responsable de l'aparició de les línies de difracció de l'actina durant la contracció isomètrica, mentre que els caps no enllaçats siguin els responsables de les línies de difracció remanents de l'estat de repòs (Bordas *et al.*, 1993; Martin-Fernandez *et al.*, 1994a; Bordas *et al.*, 1999). Això porta d'alguna manera a explicar les diferències entre els diagrames de difracció mesurats durant la contracció isomètrica i els obtinguts de músculs en rigor.

La situació al replà de contracció isomètrica es presenta a la figura 6, mentre que la figura 5 ilustra una part del diagrama de difracció meridional i mostra els efectes d'interferència pronunciats que afecten els pics de difracció, i que es poden utilitzar per a extreure la informació de fase rellevant (Juanhuix *et al.*, 2001). Atès el comportament de les intensitats de difracció durant un arronsament i, també, els càlculs d'energia que demostren que quan hi ha plena interacció entre miosina i actina amb la formació del complex AM estereoespecífic, el cap de miosina és gairebé perpendicular a l'eix del múscul (Díaz Baños *et al.*, 1996), és molt probable que sigui el cap més perpendicular dels dos mostrats a la figura 4 el que formi el complex AM estereoespecífic responsable d'estirar el filament prim, de forma que incrementi la longitud en un 0,4 % i s'obtingui la simetria helicoidal pròpia del filament prim activat (Bordas *et al.*, 1999). Queda per demostrar si aquesta distorsió del filament prim és capaç d'emmagatzemar, almenys parcialment, la tensió mecànica que el teixit desenvolupa en el replà de contracció isomètrica. És també atractiu especular que el cap inclinat i no enllaçat està disponible per a reemplaçar el que forma el complex AM quan el múscul es sotmet de sobte a un arronsament de llargària apropiada, de forma que la tensió es pugui resta-

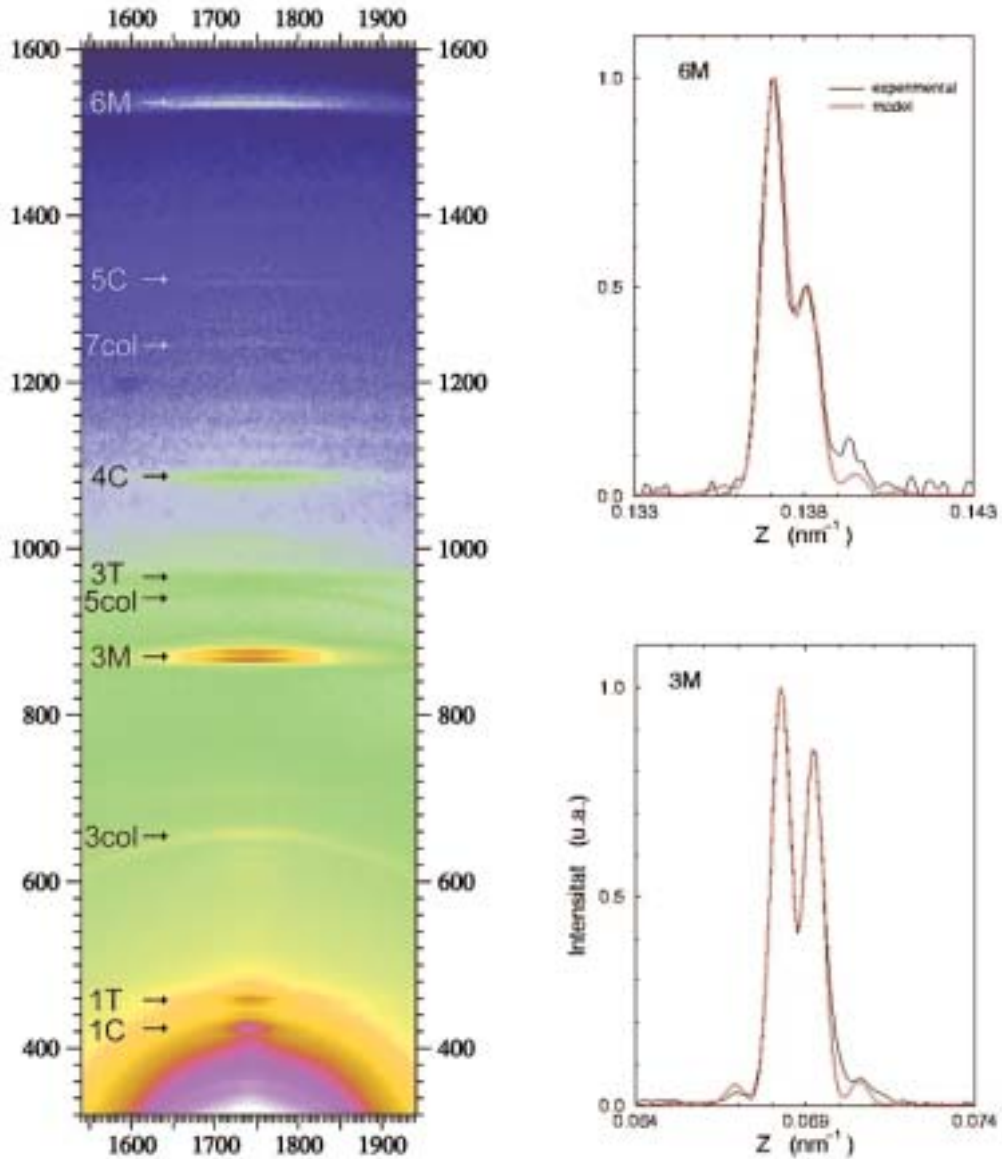


FIGURA 5. Esquerra: Porció del diagrama de difracció meridional produït per un múscul al replà de contracció isomètrica. Mostra els ordres meridionals tercer (3M) i sisè (6M), que són sensibles a la disposició axial dels caps de miosina que sobresurten de l'«espinada» del filament gruixut. Les altres etiquetes apunten a les reflexions produïdes per la proteïna C (C), troponina (T) i col·lagen (col). El col·lagen no té una única orientació en els teixits musculars, i per aquest motiu la seva contribució apareix en forma d'anells de difracció.

Dreta: Empremses molt expandides de la distribució axial d'intensitat, que mostra la divisió dels pics induïda per efectes d'interferència, als ordres meridionals 3M (a sota) i 6M (a dalt) de la miosina. La línia vermella és l'ajustament a les dades experimentals a partir del qual s'ha trobat la fase.

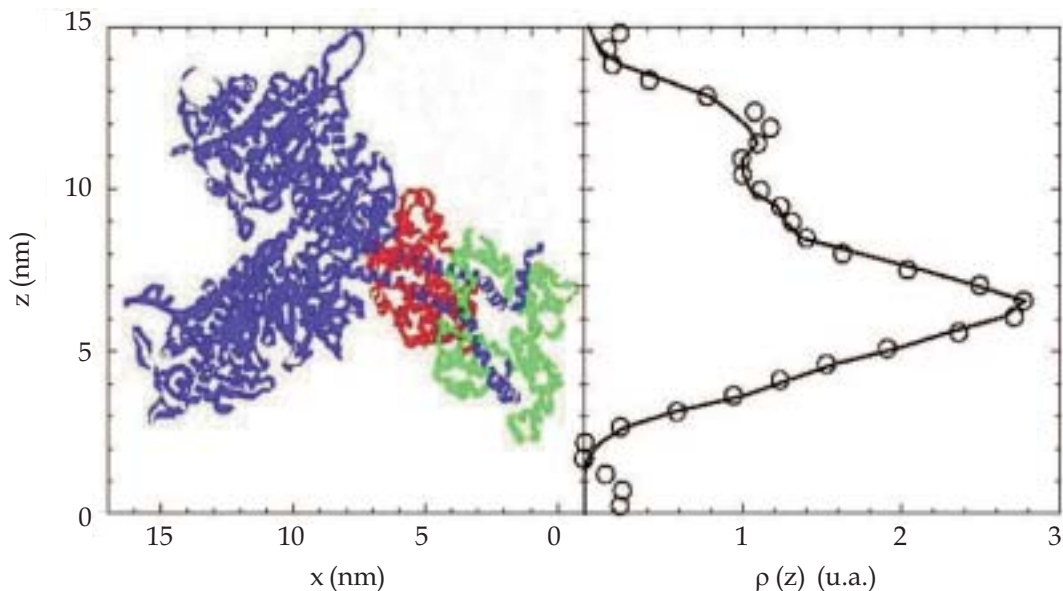


FIGURA 6. Distribució de la densitat electrònica derivada experimentalment que correspon a la projecció axial de masses del parell de caps de miosina en una corona (cercles). La línia és la distribució de densitat electrònica derivada a partir de dos caps de miosina disposats tal com es mostra al panell de l'esquerra. Noteu que al teixit muscular, l'«espinada» del filament de miosina està situat al costat dret i en direcció vertical en aquesta representació; la doble hèlix formada pel filament d'actina hauria de col·locar-se verticalment al costat esquerre.

blir ràpidament. Aquesta possibilitat s'ha proposat (Huxley i Tideswell, 1996) com una manera de reconciliar l'existència de l'elasticitat del filament prim (Huxley *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1999; Bordas *et al.*, 1999) amb el comportament de les fibres musculars subjectes a arronsaments sobtats. A més, una situació estructural com la mostrada a la figura 4 implica que la probable raó per la qual els dos caps no poden tenir posicions idèntiques respecte al filament prim és que el cap que forma el complex AM obstruïria el possible enllaç de l'altre cap, si tinguessin la mateixa configuració.

Cal una gran quantitat de nous experiments per a establir si les idees fins aquí esbossades s'apliquen o no a la pràctica. L'accés a fons de llum de sincrotró de tercera generació continuarà essent el requeriment central per a aquest tipus de recerca.

## BIBLIOGRAFIA

- BENNETT, P.; R. CRAIG; R. STARR; G. OFFER (1986). «The ultrastructural location of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle». *J. Mus. Res. Cell Motility*, núm. 7, pàg. 550-657.
- BORDAS, J.; G. P. DIAKUN; F. G. DIAZ; J. E. HARRIES; R. A. LEWIS; J. LOWY; G. R. MANT; M. L. MARTIN-FERNANDEZ; E. TOWNS-ANDREWS (1993). «Two-dimensional time resolved X-ray diffraction studies of live isometrically contracting frog sartorius muscle». *J. Mus. Res. Cell Motility*, núm. 14, pàg. 311-324.
- BORDAS, J.; G. P. DIAKUN; J. E. HARRIES; R. A. LEWIS; G. R. MANT; M. L. MARTIN FERNANDEZ; E. TOWNS-ANDREWS (1991). «Two-dimensional time resolved X-ray diffraction of muscle: recent results». *Adv. Biophys.*, núm. 27, pàg. 15-33.
- BORDAS, J.; J. LOWY; A. SVENSSON; J. E. HARRIES; G. P. DIAKUN; J. GANDY; C. MILES; G. R. MANT; E. TOWNS-ANDREWS (1995). «X-ray evidence that in contracting muscle there exist two distinct populations of myosin heads». *Biophys. J.*, núm. 68, pàg. 99-105.
- BORDAS, J.; A. SVENSSON; M. ROTHERY; J. LOWY; G. P. DIAKUN; P. BOESECKE (1999). «Extensibility and

- symmetry of actin filaments in contracting muscles». *Biophys. J.*, núm. 77, pàg. 3197-3207.
- DIÁZ-BAÑOS, F. G.; J. BORDAS; J. LOWY; A. SVENSSON; J. CAMPBANY (1996). «Small segmental rearrangements in the myosin head can explain force generation in muscle». *Biophys. J.*, núm. 71, pàg. 576-589.
- HOLMES, K. C.; D. POPP; W. GEBHARD; W. KABSCH (1990). «Atomic model of the actin filament». *Nature*, núm. 347, pàg. 44-49.
- HUXLEY, H. E.; A. R. FARUQI; J. BORDAS; M. H. J. KOCH; J. R. MILCH (1980). «Use of synchrotron radiation in time-resolved X-ray diffraction studies of myosin layer line reflections during muscle contraction». *Nature*, núm. 284, 5752, pàg. 140-143.
- HUXLEY, A. F.; R. M. SIMMONS (1971). «Proposed mechanism of force generation in striated muscle». *Nature*, núm. 233, pàg. 533-538.
- HUXLEY, H. E.; R. M. SIMMONS; A. R. FARUQI; M. KRESS; J. BORDAS; M. H. J. KOCH (1981). «Millisecond time-resolved changes in X-ray reflections from contracting muscle during rapid mechanical transients, recorded using synchrotron radiation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 78, pàg. 2297-2301.
- HUXLEY, H. E.; A. STEWART; H. SOSA; T. IRVING (1994). «X-ray diffraction measurements of the extensibility of actin and myosin filaments in contracting muscle». *Biophys. J.*, núm. 67, pàg. 2411-2421.
- HUXLEY, A. F.; S. TIDESWELL (1996). «Filament compliance and tension transients in muscle». *J. Mus. Res. Cell Motility*, núm. 17, pàg. 507-511.
- JUANHUIX, J.; J. BORDAS; A. SVENSSON; M. L. BASSFORD; T. NARAYANAN (2001). «Axial disposition of myosin heads in isometrically contracting muscles». *Biophys. J.*, núm. 80, pàg. 1429-1441.
- KABSCH, W.; H. H. MANNHERZ; D. SUCK; E. F. PAI; K. C. HOLMES (1990). «Atomic structure of the actin: DNase I complex». *Nature*, núm. 347, pàg. 37-44.
- KRESS, M.; H. E. HUXLEY; A. R. FARUQI (1986). «Structural changes during activation of frog muscle studied by time-resolved X-ray diffraction». *J. Mol. Biol.*, núm. 188, pàg. 325-342.
- LUTHER, P. K.; P. M. MUNRO; J. M. SQUIRE (1981). «Three-dimensional structure of vertebrate muscle A-band. III M-region structure and myosin filament symmetry». *J. Mol. Biol.*, núm. 151, pàg. 703-730.
- MARTIN-FERNANDEZ, M. L.; G. P. DIAKUN; F. G. DIAZ; J. E. HARRIES; R. A. LEWIS; J. LOWY; G. R. MANT; E. TOWNS-ANDREWS; J. BORDAS (1994a). «X-ray diffraction evidence for a specific actomyosin complex in live isometrically contracting frog sartorius muscle». *A: Synchrotron Radiation in Life Sciences*, pàg. 435-442. Oxford University Press.
- MARTIN-FERNANDEZ, M. L.; J. BORDAS; G. P. DIAKUN; J. E. HARRIES; J. LOWY; G. R. MANT; A. SVENSSON; E. TOWNS-ANDREWS (1994b). «Time resolved X-ray diffraction studies of myosin head movements in live frog sartorius muscle during isometric and isotonic contractions». *J. Mus. Res. Cell Motility*, núm. 15, pàg. 319-348.
- OFFER, G. (1972). «C-Protein and the periodicity in the thick filaments of vertebrate skeletal muscle». *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, núm. 37, pàg. 87-96.
- OFFER, G.; C. MOOS; R. STARR (1973). «A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils». *J. Mol. Biol.*, núm. 74, pàg. 653-676.
- SQUIRE, J. M. (1981). *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Nova York: Plenum Press.
- WAKABAYASHI, K.; Y. SUGIMOTO; H. TANAKA; Y. UENO; Y. TAKESAW; Y. AMEMIYA. (1994). «X-ray evidence for the extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction». *Biophys. J.*, núm. 67, pàg. 2422-2435.