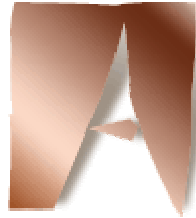


Tesi doctoral



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

Estructura molecular i funció dels músculs vius

Jordi Juanhuix i Gibert

Director: Joan Bordas Orpinell

Tutor: Jordi Pascual Gaínza

Bellaterra, gener de 2001

Cada fulla proclama la certesa del bosc
i cada ocell la densitat de l'aire.

Tot ressona per l'àmbit silenciós del gest
i esclata en cada mot.
Només viu qui pregunta.

MIQUEL MARTÍ I POL

Agraïments

Seguint fidelment la tradició del camp, que estableix que les primeres línies per llegir han de ser les últimes en ser escrites, aquests agraïments neixen amb presses i amb un estat lamentable de l'autor el dia abans de dipositar aquest interessant rajol que teniu a les mans. Tots els que hem passat per aquesta veritable catarsi i, especialment, les persones que ens han viscut de prop, sabem prou bé l'estat de què parlem. Els ulls ullerosos, una hiperactivitat cafeínica, l'obsessió correctora, la pressa, sempre la pressa i, paradoxalment en aquesta tesi, un estat muscular fòfic, en són alguns dels símptomes, per fer-vos-en una idea.

Amb aquest preàmbul vull dir que, si ja és de per si difícil agrair serenament tothom que t'ha ajudat en una activitat durant quatre anys, en l'estat lleugerament neurastènic en què ens trobem la tasca és una utopia. I és que ja no només es tracta de ser exacte, com en tot el treball restant, sinó que, a més, cal ser just, i convindreu amb mi que, si l'exactitud és difícil, la justícia serà un somni. Per això, demano disculpes, ja d'avançada, a qui passi de llarg en aquesta secció, a qui li oblidí esforços, i a qui la vida m'hagi allunyat la memòria. Vagi d'endavant el meu agraïment i un tros de cor a tothom.

I, de tothom a qui recordo prou bé la tasca en favor de la causa, em cal agrair, en primer lloc i de manera especial, al meu director de tesi, en Joan Bordas, l'haver-me induït (o, millor encara, abduït) per fer la tesi sobre un tema del qual, en començar, jo no en sabia un borrall. La seva facilitat per arribar al fons de qualsevol qüestió, o la seva capacitat multitasca que li permet a la vegada parlar amb gran profunditat de músculs i de política ètnica, entre altres habilitats, és digna d'admiració. Agraeixo especialment els seus consells, els més importants dels quals, per desgràcia meva, no he seguit en cap moment. Ah, i òbviament el sou a càrrec del Laboratori de Llum de Sincrotró, és clar.

En Ramon Pascual també hi té molt a veure en tot això, ell em va introduir al Sincrotró, i li ho agraeixo de cor. Igualment, haig d'agrair al meu tutor, en Jordi Pascual, haver-me fet de pont entre el Sincrotró i la UAB, fent fàcils tràmits aparentment difícils. Us imagineu una tesi sobre el múscul en el doctorat de Ciència de Materials? Bé, doncs el miracle és seu.

També ha estat molt important la concessió, per part del *Life Sciences Comitee* de l'ESRF, de tot el temps de llum de sincrotró que hem demanat per realitzar els experiments en què basem la tesi. L'agraïment ha de ser més gran encara quan es té en compte que la demanda de temps de llum és quatre vegades l'oferta. A la línia de llum, cal admirar, tant com agrair, l'enorme treball de T. Narayanan, en temps i qualitat.

Agraeixo també l'ajuda de tots els meus companys del Consorci del Laboratori de Llum de Sincrotró. Ja hem dit que no és fàcil conviure amb tesinands, i ells ho han fet. Agraeixo especialment en Martin per les discussions, la Mariajo per la seva no-tesi, l'Agneta per la voluntat de fer entendre les coses, la Marie, en David, per les famoses plaquetes i altres ents electrònics, i en Pep, per llegir-se tot plegat com ha pogut i per altres favors. Haig d'agrair a l'Albert, en Xavi, en Juan Carlos i en Josep Antoni, per la seva banda, que la tesi encara sobrevisqui informàticament, i a l'Enric, el mag de la instància, que sobrevisqui burocràticament. I, fora del Consorci, m'ha impressionat la correcció, per amor a l'art, d'en Joan Farran. Que cap coma en cap referència estigui en cursiva és cosa seva, i això no quedarà impune.

Més encara. A més de l'ajuda directa que acabo de reconèixer, haig d'agrair a tothom que m'ha ajudat a fer la tesi no ajudant-me a fer la tesi. Ja m'enteneu, vull dir a tothom allunyat dels papers que teniu entre mans, però que ben segur hi tenen molt a veure.

I aquí haig de començar, molt especialment, per la meva mare, la Cinta, que era on jo era encara que no hi estigués. Ja sabem que, de mare, només n'hi ha una, però la meva, a més, és única. Per no allargar-me massa, diria que a casa no ha faltat fill perquè hi havia molta mare. I continuant per casa, haig de donar gràcies a la meva germaneta Marta, i al mosso Jordi de retruc, per un piló de coses que ella sap de sobres i que no diré per vergonya infantil.

També agraeixo molt al meu pare el gran pis on estic ara, els centenars de camises, algun viatge, i l'haver opinat sense voler imposar. Una altra vegada, d'ell haig de dir que m'ha estat fàcil ser-ne fill. I més família encara: l'avi, que ens deixà fa poc, i la Maria, en Jaume i en Jaume.

Els amics no m'han faltat, i d'ells m'omple que, molt sovint, una trucada fos el remei a un problema. A tothom de la colla de Girona els dono, per tant, les gràcies, especialment a en Cesc per alguna classe de VB i molts dubtes informàtics i als exil·lats de Barcelona, pels sopars. També recordo els amics del pis de la Uni, en Jordi, en Tomeu i en Jordi. Tant poc que ens veiem, però tant a prop quan ho fem.

Voldria també donar una volta al món per deixar un agraïment a les persones que estan lluny però que són a dins: Anna, Ricardo, Claudia, Flor, les Spice Girls, Mar, Marce, Carlos o Rosa no són només noms perduts en racons de passat. La tesi sense ells s'hagués rendit abans de néixer.

I finalment, i tan especialment com començava, agraeixo a l'Aurora tota l'ajuda i l'amor ja regalats i que em regalarà, procurarem ser-ne dignes. D'ella apreng cada dia que 700 km no són res, i que la distància no existeix si no te la creus. Impressionant.

A tothom, doncs, gràcies. I a qui oblidi o ometi mèrits, a més a més, perdó. Prometo que no tornarà a passar: de segur que, d'agraïments de tesi, no en faré gaires més... Ah, i si continueu llegint més enllà dels agraïments, tot el que ve a continuació, bon profit!

Índex

| | |
|---|-----------|
| Abreviatures | 11 |
| Prefaci | 13 |
| 1. Anatomia i fisiologia del múscul | 17 |
| 1.1. Anatomia del múscul | 19 |
| 1.1.1. Tipus de músculs | 19 |
| 1.1.2. La cel·la quasicristal·logràfica muscular: el sarcòmer | 20 |
| 1.2. Estructura del sarcòmer | 21 |
| 1.2.1. Bandes A i I, filaments primis i filaments gruixuts | 21 |
| 1.2.2. Estructura del filament gruixut: miosina | 24 |
| 1.2.3. Estructura del filament prim: actina, troponina i tropomiosina | 27 |
| 1.2.4. Proteïnes estructurals del sarcòmer | 30 |
| 1.3. Fisiologia del múscul | 32 |
| 1.3.1. El múscul solament es contrau | 32 |
| 1.3.2. Estimulació del múscul | 33 |
| 1.3.2.1. De l'impuls nerviós a la regulació de $[Ca^{2+}]$ | 33 |
| 1.3.2.2. Model de blocatge estereoespecífic | 35 |
| 1.4. Models de generació de força | 37 |
| 1.4.1. Model de generadors independents (1957) | 38 |
| 1.4.2. Model de caps rotants (1969) | 39 |
| 1.4.3. Models basats en canvis en l'actina | 42 |
| 1.4.4. Noves tècniques | 42 |
| 1.4.5. Estatus actual | 43 |
| 1.4.5.1. Dificultats del model de caps rotants | 44 |
| 1.4.5.2. Model de braç de palanca | 44 |
| 1.4.6. Model bioquímic de la contracció muscular | 46 |
| 1.5. Conclusions | 48 |

2. La difracció del múscul **51**

| | |
|---|-----------|
| 2.1. La difracció de raigs X | 53 |
| 2.1.1. Introducció | 53 |
| 2.1.2. La dispersió de raigs X | 54 |
| 2.1.2.1. La dispersió d'una partícula | 54 |
| 2.1.2.2. L'amplitud de dispersió d'una mostra | 56 |
| 2.1.2.3. L'amplitud de difracció és la Transformada de Fourier de la densitat electrònica | 57 |
| 2.1.3. La difracció de raigs X | 58 |
| 2.1.3.1. Els factors de l'amplitud de difracció | 59 |
| 2.1.3.2. La síntesi de Fourier de la densitat electrònica | 60 |
| 2.2. El diagrama de difracció del múscul | 62 |
| 2.2.1. El desordre del múscul | 62 |
| 2.2.2. El meridià i l'equador del diagrama de difracció | 62 |
| 2.3. La difracció en estructures amb simetria helicoïdal | 65 |
| 2.3.1. L'hèlix contínua | 65 |
| 2.3.2. Deducció intuïtiva de la difracció de l'hèlix contínua | 68 |
| 2.3.3. L'hèlix discontinua | 68 |
| 2.3.4. L'amplitud de difracció d'una proteïna amb simetria helicoïdal | 73 |
| 2.4. La simetria helicoïdal del múscul | 74 |
| 2.4.1. La simetria del filament prim | 74 |
| 2.4.2. La simetria del filament gruixut | 76 |
| 2.5. La simetria transversal del múscul | 77 |
| 2.5.1. La simetria hexagonal | 77 |
| 2.5.2. El mostratge de les línies de difracció | 79 |
| 2.5.3. Els pics equatorials | 80 |
| 2.6. La superxarxa del múscul | 81 |

3. Instrumentació i disseny dels experiments **85**

| | |
|--|------------|
| 3.1. La llum de sincrotró | 87 |
| 3.1.1. Les instal·lacions de llum de sincrotró | 87 |
| 3.1.2. Prestacions requerides a la línia de llum | 89 |
| 3.1.2.1. El límit de la resolució espacial | 89 |
| 3.1.2.2. Les dimensions de la línia i el detector | 90 |
| 3.1.2.3. La font de llum és monocromàtica | 91 |
| 3.1.3. La línia de llum ID2 de la font ESRF | 92 |
| 3.2. El detector: la placa de raigs X | 93 |
| 3.3. Preparació de les mostres | 95 |
| 3.4. El control dels experiments | 98 |
| 3.5. Els protocols experimentals | 100 |
| 3.5.1. Protocol en l'estat de descans | 101 |
| 3.5.2. Protocol en l'estat de contracció isomètrica | 102 |
| 3.5.3. Protocol en l'estat d'escurçament actiu | 103 |
| 3.6. El processament de les dades | 104 |
| 3.6.1. L'escanejament de les plaques de raigs X | 104 |
| 3.6.2. L'extracció dels espais i intensitats dels pics de difracció | 104 |
| 3.6.3. El càlcul d'errors | 105 |
| 3.6.3.1. Els ajustaments per extreure la fase i el mòdul dels factors d'estructura | 105 |
| 3.6.3.2. L'ajustament de la projecció axial de masses | 106 |

4. Resultats experimentals **107**

| | |
|---|------------|
| 4.1. Introducció | 109 |
| 4.1.1. Obtenció del diagrama de difracció bidimensional | 109 |
| 4.1.2. Extracció del meridià | 110 |
| 4.2. El meridià en l'estat de descans | 112 |
| 4.2.1. La complexitat del meridià | 112 |
| 4.2.1.1. Les diverses periodicitats presents al meridià | 114 |
| 4.2.1.2. La bipolaritat dels filaments | 117 |
| 4.2.2. Els perfils meridionals de les reflexions permeses | 119 |
| 4.2.3. El perfil meridional de la regió de la reflexió 1M | 121 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 4.2.4. | El perfil meridional de les reflexions prohibides | 122 |
| 4.3. | El meridià en l'estat de contracció isomètrica | 125 |
| 4.3.1. | El perfil meridional de les reflexions permeses | 128 |
| 4.3.2. | El perfil meridional de les reflexions prohibides | 130 |
| 4.4. | El perfil radial de les línies de difracció | 131 |
| 4.4.1. | El perfil radial de les línies de difracció en descans | 132 |
| 4.4.2. | El perfil radial de les línies de difracció en contracció isomètrica | 135 |
| 4.5. | Conclusions | 136 |

5. L'extracció de les fases en l'estat de contracció isomètrica **139**

| | | |
|-------------|--|------------|
| 5.1. | Objectiu de la modelització del meridià | 141 |
| 5.1.1. | L'amplitud de difracció d'una unitat de repetició | 141 |
| 5.1.2. | El mòdul i la fase dels ordres de difracció | 142 |
| 5.2. | L'aproximació teòrica dels caps de miosina ideal | 143 |
| 5.2.1. | L'amplitud de difracció d'una fila d'unitats | 144 |
| 5.2.2. | L'efecte d'interferència entre dos filaments gruixuts simètrics | 146 |
| 5.2.2.1. | Relació del mòdul i la fase de dues estructures especulars | 146 |
| 5.2.2.2. | L'amplitud de difracció del filament ideal | 147 |
| 5.2.3. | La intensitat de difracció del filament ideal | 149 |
| 5.2.3.1. | Factors de la intensitat de difracció | 149 |
| 5.2.3.2. | Formació dels diferents pics en una mateixa reflexió | 151 |
| 5.2.3.3. | Incertesa en π de la fase | 151 |
| 5.3. | Ajustament de l'aproximació ideal als perfils meridionals | 151 |
| 5.3.1. | Ajustament dels ordres permesos | 152 |
| 5.3.1.1. | Elecció de l'origen de fases | 152 |
| 5.3.1.2. | Resultat de l'ajustament | 153 |
| 5.3.2. | Valoració de l'aproximació ideal | 156 |
| 5.4. | L'aproximació dels caps de miosina amb desordre | 157 |
| 5.4.1. | Tipus de desordre | 157 |
| 5.4.2. | El desordre de segona espècie | 159 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 5.4.2.1. | La distribució de distàncies | 159 |
| 5.4.2.2. | La funció d'interferència i la intensitat d'una sola estructura | 160 |
| 5.4.2.3. | Amplitud de difracció i funció d'interferència amb més d'una estructura | 162 |
| 5.5. | Ajustament de l'aproximació amb desordre als perfils meridionals | 163 |
| 5.5.1. | Ajustament dels ordres permesos | 163 |
| 5.5.2. | Valoració de l'aproximació amb desordre | 166 |
| 5.6. | L'aproximació dels caps de miosina amb dispersió de periodicitats | 167 |
| 5.6.1. | Motivació de la correcció | 167 |
| 5.6.2. | La intensitat de difracció en l'aproximació amb dispersió de periodicitats | 168 |
| 5.7. | Ajustament de l'aproximació amb dispersió de periodicitats als perfils meridionals | 169 |
| 5.7.1. | Ajustament dels ordres permesos | 170 |
| 5.7.2. | Valoració de l'aproximació amb dispersió de periodicitats | 171 |
| 5.8. | Conclusions | 172 |
| 5.8.1. | Els diferents models extreuen les mateixes fases | 172 |
| 5.8.2. | La presència de dues periodicitats sembla explicar correctament els perfils meridionals | 173 |
| 5.8.3. | L'orientació axial dels caps de miosina ha de ser rígida | 174 |
| 6. | L'extracció de les fases en l'estat de descans | 175 |
| 6.1. | Introducció | 177 |
| 6.2. | Les fases de les reflexions 3M i 6M | 178 |
| 6.2.1. | Aproximació teòrica ideal | 178 |
| 6.2.1.1. | Resultat de l'ajustament | 180 |
| 6.2.2. | L'aproximació teòrica dels caps de miosina amb desordre | 182 |
| 6.2.2.1. | Resultat de l'ajustament | 183 |
| 6.2.2.2. | Valoració de l'aproximació teòrica | 184 |
| 6.2.3. | L'aproximació teòrica amb dispersió de periodicitats | 185 |
| 6.2.3.1. | Resultat de l'ajustament | 186 |
| 6.2.3.2. | Valoració de l'aproximació teòrica | 187 |
| 6.2.4. | Conclusions | 188 |

| | |
|--|------------|
| 6.3. Modelització de tots els perfils meridionals en descans | 190 |
| 6.3.1. L'aproximació ideal és adequada per a la modelització | 190 |
| 6.3.2. Ajustament de les línies de difracció | 192 |
| 6.3.2.1. L'origen de les fases del factor d'estructura | 192 |
| 6.3.2.2. El model de 3+3 periodicitats | 193 |
| 6.3.2.3. Possibles fonts d'error en l'ajustament | 194 |
| 6.3.3. Resultats de l'ajustament | 195 |
| 6.3.3.1. Els caps de miosina ha de ser modelats amb dues periodicitats | 195 |
| 6.3.3.2. Les dues periodicitats dels caps de miosina presenten desordre de segona espècie als ordres prohibits | 196 |
| 6.3.3.3. La periodicitat de ca. 47.3 nm de la reflexió 2M | 199 |
| 6.3.3.4. La periodicitat de ca. 45.3 nm de les reflexions 4M i 5M | 199 |
| 6.3.3.5. La presència de la proteïna C | 200 |
| 6.3.3.6. L'origen de la reflexió 11M | 200 |
| 6.4. Conclusions | 202 |
| 6.4.1. Les diferents aproximacions extreuen les mateixes fases dels ordres permesos | 202 |
| 6.4.2. Són necessàries almenys dues periodicitats dels caps de miosina | 203 |
| 6.4.3. La presència de la proteïna C i altres proteïnes | 203 |
| | |
| 7. L'extracció dels mòduls | 205 |
| <hr/> | |
| 7.1. Factors en la intensitat de les línies de difracció | 207 |
| 7.1.1. Introducció | 207 |
| 7.1.2. El perfil radial que genera la simetria helicoidal | 208 |
| 7.1.3. L'efecte dels desordres de la xarxa | 209 |
| 7.1.3.1. El desordre de segona espècie en més d'una dimensió | 210 |
| 7.1.3.2. La funció d'interferència radial | 211 |
| 7.1.3.3. La funció d'interferència axial | 214 |
| 7.1.3.4. La funció d'interferència total | 215 |
| 7.1.4. La desviació angular de les fibres | 216 |
| 7.1.5. El perfil radial de les línies de difracció | 218 |
| 7.2. Els perfils radials en descans | 220 |
| 7.3. Els perfils radials en contracció isomètrica .. | 224 |
| 7.4. Discussió | 226 |
| 7.4.1. Comportament cristal·lí de la mostra | 226 |
| 7.4.2. Comportament no cristal·lí de la mostra | 227 |
| 7.4.3. La correcció augmenta la intensitat dels ordres alts | 227 |

8. Els mapes de densitat electrònica en contracció isomètrica 229

| | |
|---|------------|
| 8.1. El mapa de densitat electrònica en contracció isomètrica | 231 |
| 8.1.1. La resolució de la incertesa de la fase | 231 |
| 8.1.1.1. El teorema de la longitud d'ona mínima | 231 |
| 8.1.1.2. La presència de ripples | 232 |
| 8.1.1.3. La compatibilitat amb l'estructura cristal·logràfica | 232 |
| 8.1.2. Els possibles mapes de densitat electrònica en contracció isomètrica | 232 |
| 8.1.3. Conclusions | 234 |
| 8.1.3.1. La densitat axial és asimètrica | 234 |
| 8.1.3.2. Els dos caps d'un parell poden tenir orientacions idèntiques o diferents, però no perpendiculars | 236 |
| 8.2. Estructura cristal·logràfica del cap de miosina | 237 |
| 8.2.1. Estructura cristal·logràfica sense nucleòtid (2MYS) | 237 |
| 8.2.2. Definició de les direccions i angles del cap de miosina | 237 |
| 8.3. Determinació de l'orientació del parell de caps de miosina | 240 |
| 8.3.1. Restriccions a la variació dels paràmetres que orienten els caps de miosina | 240 |
| 8.3.2. Ajustament als possibles mapes axials | 241 |
| 8.4. Conclusions | 242 |
| 8.4.1. L'orientació axial dels caps de miosina ha de ser rígida | 242 |
| 8.4.2. La fase del factor d'estructura és independent de l'aproximació teòrica del filament gruixut | 243 |
| 8.4.3. Els dos caps de miosina d'un parell tenen diferents projeccions axials de massa | 243 |
| 8.4.4. L'ajustament de l'orientació dels caps a la projecció axial sembla donar una única solució | 244 |
| 8.4.5. Només un dels caps de cada parell està enllaçat estereoespecíficament amb l'actina | 245 |
| 8.4.6. Possiblement, el cap perpendicular d'un parell forma l'enllaç estereoespecífic | 246 |
| 8.4.7. No hi ha certesa de quin dels dos caps del parell forma el complex actina-miosina | 246 |

| | |
|--|------------|
| 9. Els mapes de densitat electrònica en l'estat de descans | 249 |
| <hr/> | |
| 9.1. Introducció | 251 |
| 9.2. Estructura cristal·logràfica del cap de miosina en descans | 251 |
| 9.2.1. Elecció de l'estructura cristal·logràfica: 2MYS i 1B7T | 251 |
| 9.2.2. Eixos, angles de rotació i orientació de l'estructura 1B7T | 251 |
| 9.3. Orientació mitjana dels caps de miosina amb l'ús dels ordres 3M i 6M | 255 |
| 9.3.1. El mapa de densitat electrònica amb l'ús dels ordres 3M i 6M | 256 |
| 9.3.2. Orientació de l'estructura cristal·logràfica 2MYS a la densitat electrònica | 257 |
| 9.3.3. Orientació de l'estructura cristal·logràfica 1B7T a la densitat electrònica | 261 |
| 9.3.4. Conclusions dels ajustaments | 263 |
| 9.4. Densitat electrònica axial dels caps de miosina | 264 |
| 9.4.1. La síntesi de Fourier | 264 |
| 9.4.2. Determinació del mòdul i la fase de la reflexió 1M | 265 |
| 9.4.3. Mòduls i fases considerats en la síntesi de Fourier | 266 |
| 9.4.4. Criteris de determinació de la fase | 267 |
| 9.4.4.1. Elecció de l'origen de les fases | 268 |
| 9.4.4.2. Forma bilobulada del parell de caps de miosina | 269 |
| 9.4.4.3. Els tres parells de caps de la cel·la han d'estar ben definits | 269 |
| 9.4.4.4. Comportament suau de la fase a baixa resolució | 270 |
| 9.4.4.5. Forma coherent dels parells de caps de miosina | 270 |
| 9.4.4.6. La positivitat de l'estructura | 270 |
| 9.4.5. Possibles mapes axials de densitat electrònica | 271 |
| 9.4.6. L'efecte de la reflexió 11M en el mapa axial | 274 |
| 9.5. Ajustament de l'estructura cristal·logràfica 1B7T al mapa axial | 275 |
| 9.5.1. Resultat de l'ajustament | 275 |
| 9.5.2. Conclusions de l'ajustament | 277 |
| 9.5.2.1. L'orientació polar dels dos caps d'un parell és diferent | 280 |
| 9.5.2.2. La rotació intrínseca relativa és relativament petita | 280 |
| 9.6. Conclusions | 281 |
| 9.6.1. Els dos caps de cada parell tenen orientacions similars | 282 |
| 9.6.2. L'estructura 1B7T és adequada per descriure el mapa axial en descans | 282 |
| 9.6.3. No és possible determinar unívocament el mapa axial | 283 |
| 9.6.4. Trets comuns de l'ajustament | 283 |
| 9.6.4.1. Dos dels tres parells de la cel·la elemental tenen perfils similars | 283 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 9.6.4.2. | La rotació intrínseca relativa dels caps de cada parell és petita | 284 |
| 9.6.4.3. | La inclinació dels caps respecte dels filaments és similar i quasi perpendicular | 284 |

10. Difracció del múscul en contracció no isomètrica **285**

10.1. El múscul actiu en condicions no isomètriques **287**

10.2. Comportament de les reflexions meridionals 3M i 6M **290**

10.2.1. Reflexions en l'estat d'escurçament actiu respecte a l'estat de descans 290

10.2.2. Reflexions en l'estat d'estirament actiu respecte a la contracció isomètrica 292

10.3. Implicacions estructurals i fisiològiques **293**

10.4. Línies futures de treball **296**

11. Conclusions **297**

11.1. Conclusions generals **299**

11.2. Descans **299**

11.3. Contracció isomètrica **300**

11.4. Contracció no isomètrica **300**

Apèndix A **301**

| | | |
|---|-------|------------|
| A.1. Origen de la llum de sincrotró | | 303 |
| A.2. Distribució i energia de la llum de sincrotró | | 304 |
| A.3. Característiques de la llum de sincrotró | | 307 |
| A.3.1. Espectre continu | | 307 |
| A.3.2. Gran col·limació | | 308 |
| A.3.3. Gran flux i brillantor | | 309 |
| A.3.4. Polarització | | 311 |
| A.3.5. Estructura temporal | | 312 |

| | | |
|------------------|--|------------|
| Apèndix B | | 313 |
|------------------|--|------------|

| | | |
|---|-------|------------|
| B.1. La generació de llum de sincrotró | | 315 |
| B.1.1. Les instal·lacions de llum de sincrotró | | 315 |
| B.1.2. Fonts de llum de sincrotró | | 316 |
| B.2. Aplicacions de la llum de sincrotró | | 318 |
| B.2.1. Biologia i biotecnologia | | 318 |
| B.2.2. Química | | 319 |
| B.2.3. Física | | 320 |
| B.2.4. Ciència de materials | | 321 |
| B.2.5. La recerca industrial | | 321 |

| | | |
|---------------------|--|------------|
| Bibliografia | | 323 |
|---------------------|--|------------|

Abreviatures

| | |
|-----|---|
| ADP | Adenosin Difosfat |
| ATP | Adenosin Trifosfat |
| ELC | <i>Essential Light Chain</i> |
| HMM | <i>Heavy meromyosin</i> |
| kDa | kiloDalton (mesura de pes molecular) |
| LMM | <i>Light meromyosin</i> |
| LS | Llum de sincrotró |
| Pi | Fosfat inorgànic PO_4H_2^- |
| RLC | <i>Regulatory Light Chain</i> |
| S1 | Subfragment S1 de HMM |
| S2 | Subfragment S2 de LMM |
| SR | Reticle Sarcoplasmàtic, <i>sarcoplasmic reticulum</i> |
| Tm | Tropomiosina |
| Tn | Troponina |

Prefaci

És difícil exagerar la importància que té el sistema muscular, i els músculs com a la seva unitat funcional, en tots els animals i en l'espècie humana en particular. Aquesta importància ha estat sempre entesa i valorada tant des de camps de caire científic com la medicina, la biofísica o l'enginyeria, com del camp artístic, com l'escultura o la pintura. Com a exemples notables, dels primers camps podem recordar els famosos treballs de Leonardo da Vinci, mentre que dels segons són remarcables les escultures de Fídies i Miquel Àngel o el quadre *La lliçó d'anatomia*, de Rembrandt.

La paraula múscul s'ha associat sempre al verb fer, és el sistema muscular qui ens possibilita tota interacció física cap al món exterior. Qualsevol acció pressuposa ineludiblement el funcionament correcte d'una part o de tot el sistema muscular. A més de condicionar el nostre *fer*, la seva funció ens condiona en gran mesura també el nostre *ser*, donat que altres sistemes com el nerviós o el circulatori s'han d'adaptar a les possibilitats motrius del sistema muscular.

El múscul és un fabulós motor orgànic que a nivell molecular és capaç de convertir energia química, provinent essencialment del menjar, en força mecànica. Al seu estudi s'hi han dedicat grans esforços des de camps d'investigació i interessos molt diversos, l'objectiu últim dels quals és trobar la resposta a la pregunta 'd'or':

Com fa força i provoca moviment el múscul?

A resultes d'aquests esforços, el coneixement del múscul ha experimentat un gran avanç durant el segle XX, en paral·lel amb d'altres camps i amb la millora tecnològica. Actualment és clar que la resposta última a la pregunta s'ha de trobar al nivell més bàsic, el molecular, tant des del punt de vista bioquímic com biofísic. L'estudi del seu funcionament a aquest nivell es converteix així en un objectiu de primer ordre.

No obstant això, i malgrat que una gran part de la recerca en tot el camp de la biofísica molecular se centra específicament en el funcionament del múscul, l'anterior pregunta encara no ha estat resolta satisfactòriament i de manera completa. És sorprenent constatar que encara hi ha moltes llacunes importants en el coneixement íntim de la funció muscular, i que es coneix tan sols parcialment la resposta.

En aquest context iniciem la tesi que teniu a les vostres mans. Un aspecte essencial d'aquest problema, l'orientació dels caps de miosina en diferents estats musculars, és, de fet l'objectiu del nostre treball. Aquest s'orienta des de la física, però té en compte aspectes biofísics i bioquímics. Si bé durant molt de temps la física ha estat involucrada a la investigació del múscul, creiem que encara pot aportar noves tècniques i punts de vista molt valuosos per a una comprensió més completa d'aquest.

Un punt clau que fa de la física una disciplina útil en la investigació del múscul, i sobre el qual basem aquest treball, és el fet que el múscul presenta una estructura altament periòdica, on es pot fins i tot definir una cel·la quasicristal·logràfica. Aquesta periodicitat el fa un candidat per ser estudiat amb noves tècniques de difracció basades en l'ús de la llum de sincrotró, en què les condicions experimentals són molt més favorables que amb d'altres equipaments experimentals.

Per les anteriors consideracions, i malgrat que tractem amb mostres purament biològiques, aquesta tesi pot ser considerada com un treball clàssic de difracció de mètodes directes. L'esquema brevíssim del treball realitzat és com segueix. La mostra és el teixit muscular, que s'obté per dissecció; la tècnica experimental és la difracció de raigs X; de l'anàlisi s'extreuen unes fases i uns mòduls que generen un mapa de densitat electrònica en una dimensió; finalment, el mapa és modelat mitjançant l'orientació de l'estructura cristal·logràfica de les unitats que el componen.

La metodologia anterior se segueix en dos estats musculars bàsics: l'estat de descans i l'estat de contracció isomètrica. El primer es dona quan el múscul està relaxat, és a dir, no està estimulat per impulsos nerviosos. El segon estat es produeix quan el múscul fa força sense moviment. L'objectiu d'aquesta tesi no és altre que obtenir l'orientació axial dels caps de miosina d'aquests dos estats, una dada bàsica per comprendre la contracció muscular.

La tesi, doncs, està estructurada en 11 capítols i 2 annexos que desenvolupen tot el treball que permet arribar a les conclusions finals. Els dos primers capítols estan dedicats a introduir l'estructura i fisiologia del múscul, i la teoria de difracció aplicada a la simetria que presenta, respectivament. El capítol 3 exposa el muntatge experimental i els protocols seguits en cada estat muscular estudiat, mentre que el capítol 4 presenta els resultats experimentals. En el capítol 5 s'extreu la fase del factor d'estructura mitjançant l'ajustament de diverses aproximacions teòriques a les dades en contracció isomètrica. En el capítol 6 es realitza el mateix ajustament en l'estat de descans. El mòdul del factor d'estructura en els dos estats és extret al capítol 7. Amb les dades anteriors, als capítols 8 i 9 s'extreu l'orientació dels caps de miosina en contracció isomètrica i en descans, respectivament. Al capítol 10 s'exposen breument els experiments posteriors realitzats en estats no isomètrics, és a dir, estats en què el múscul experimenta un canvi de longitud, així com el treball que ha de continuar la línia d'investigació d'aquesta tesi. Finalment, al capítol 11 s'extreuen les conclusions del treball en tots els estats musculars estudiats.

A conseqüència del caràcter interdisciplinar del camp d'estudi, aquesta tesi doctoral inclou coneixements que no solen relacionar-se. Per facilitar l'associació ràpida dels

conceptes que s'exposen, la primera aparició d'un nou terme es mostra en cursiva, i inclou la traducció de l'anglès, encara que, a voltes, aquesta traducció sigui òbvia. També per aquest motiu s'ha procurat reduir l'aparició de sigles al màxim, i les que apareixen són llistades al glossari d'abreviatures.

El treball pot ser llegit des d'un punt de vista físic, biològic o, fins i tot, cristal·logràfic i, per tant, és difícil de definir un nivell de coneixements equilibrat per a tots els lectors. Així, per exemple, pot sorprendre a un biòleg que en una tesi es defineixin els terminals N i C d'una cadena polipèptida o, per a un físic, pot resultar elemental l'exposició de la teoria de la difracció de raigs X. I, a la inversa, al mateix biòleg pot resultar dur entrar en la teoria de la difracció, mentre que al físic pot arribar a quedar fora de lloc en algunes consideracions de caràcter bioquímic.

Per resoldre aquesta dificultat, s'ha intentat abordar els diferents camps des d'una perspectiva general i ampla, recalcant el significat físic o biològic per sobre del rigor matemàtic o bioquímic. Exemples d'això poden ser el tractament de la cel·la unitat del múscul (en què considerem que cada periodicitat forma una xarxa independent de les altres) o el tractament estereomètric de la conformació cristal·logràfica del cap de miosina (que no té en compte les possibles altres proteïnes que poden limitar els moviments del cap).

Ultra les dificultats lògiques que pot tenir el lector especialitzat en llegir aquesta tesi, hi ha dues justificacions objectives d'aquest tractament. D'una banda, a causa de la pròpia natura de la mostra, les simplificacions que cal realitzar en l'anàlisi de les dades obtingudes amb una tècnica de les anomenades físiques com la difracció quan s'aplica sobre una mostra biològica, han de ser més importants que en el cas d'una mostra inorgànica preparada amb tècniques habituals de la ciència de materials.

D'altra banda, es pot afirmar que la simplificació del tractament és necessària a causa del coneixement limitat que es té de la disposició exacta de les proteïnes en el múscul viu. Per tant, dit planerament, el tractament purament cristal·logràfic del múscul, ara com ara, no és possible. De fet, aquesta tesi suposa el primer intent, del qual en tinguem coneixement, d'extracció de la fase de les reflexions del diagrama de difracció del múscul. De la novetat de la contribució en dona fe el fet que el primer article que surt d'aquesta tesi, referent a l'estat muscular de contracció isomètrica (capítols 5 i 8), ja ha estat acceptat al *Biophysical Journal*.

Per acabar, convé dir uns mots que situen aquest treball en el seu entorn, donat que una tesi és ella i la seva circumstància, i aquesta no n'és excepció. La tesi que teniu a les vostres mans ha estat realitzada en el marc del consorci del Laboratori de Llum de Sincrotró, que té al seu càrrec diverses responsabilitats en el camp de la llum de sincrotró a Catalunya i a la resta de l'Estat. Entre aquestes responsabilitats hi ha la promoció de l'ús de la llum de sincrotró entre els usuaris, un exemple del qual és aquesta tesi. Dins d'aquesta circumstància, doncs, s'explica que aquest treball faci especial esment de l'ús d'aquesta font de raigs X, amb la inclusió de dos annexos que exposen les característiques de la llum, el primer, i la producció i usos d'aquesta, el segon.

Considerem que aquesta tesi no solament pot tenir rellevància pel contingut original que presenta, sinó que, a més, pretén servir d'exemple dels nombrosos usos de la llum de sincrotró, i animar a l'utilització d'aquesta per part del nombrosos equips d'investigació d'arreu del país que en poden treure profit.

Capítol

1

Anatomia i fisiologia del múscul

Aquest capítol exposa l'anatomia i la fisiologia del múscul, tot fent atenció especial a les proteïnes directament involucrades en la contracció muscular, la miosina i l'actina. Posteriorment, es dóna una visió de l'estat actual del coneixement del mecanisme de contracció i es presenten els models proposats que expliquen la contracció des del punt de vista estructural i bioquímic, així com algunes de les dificultats que presenten.

1.1. Anatomia del múscul

Els resultats de l'activitat muscular són visibles fins i tot per a l'observador ocasional: el caminar tranquil d'un gos, el vol d'una mosca o, fins i tot, el moviment d'ulls en llegir aquesta pàgina. Més encara, també són dependents de l'activitat muscular fenòmens menys aparents com les contraccions de l'úter, la contricció de les venes o els moviments del tub digestiu. De fet, qualsevol moviment actiu de tots els animals superiors implica la intervenció d'algun múscul.

El múscul, per aconseguir el moviment del cos, genera un esforç de tracció de manera que tendeix a escurçar la distància entre els seus extrems, formats per tendons, que l'uneixen a la resta de cos. Segons si aquests són fixos o mòbils, el múscul produeix tensió o moviment. La complexitat del moviment de què som capaços s'aconsegueix amb la combinació de diversos músculs, que provoquen moviments específics. El conjunt dels músculs formen un sistema, el *sistema muscular*, controlat pel sistema nerviós i íntimament connectat a l'esquelet i a cartílags per transmetre la capacitat bàsica del teixit muscular per contraure's.

1.1.1. Tipus de músculs

En una funció vital tan essencial en el regne animal com la muscular hi ha d'haver una especialització dels músculs, a fi d'optimitzar completament la seva funció. Això comporta l'aparició de diferents tipus de teixits musculars, molts d'ells presents en el cos humà. En l'ésser humà i, en general, en tots els animals vertebrats, es presenten dos tipus principals de músculs, *llisos* i *estriats* (*smooth, striated*), anomenats així per la manera com apareixen vistos amb el microscopi òptic [Squire, 1981]. Els primers, els músculs llisos, són bàsicament responsables dels moviments involuntaris dels intestins i venes. Dels segons, els músculs estriats, n'hi ha de dues classes: el *cardíac* i l'*esquelètic*. El teixit muscular cardíac, present únicament al cor, és un cas especial, donat que a pesar que el control no és voluntari, anàlogament al múscul llis, sota el microscopi òptic apareix estriat. El múscul esquelètic, finalment, forma pròpiament el sistema muscular i, amb l'esquelet, permet el moviment del cos. Així mateix, en els animals invertebrats es presenten més tipus de teixits musculars que no considerarem en aquest treball.

Al seu torn, els músculs esquelètics es poden classificar en dos tipus principals, diferenciats per la via metabòlica de generació de la font d'energia, l'ATP. D'una banda, les fibres musculars *rojes*, o de tipus I, són de contracció i fatiga lentes i generen l'ATP majoritàriament per catabolisme aeròbic de la glucosa i els greixos. D'altra banda, les fibres musculars *blanques*, o de tipus II, (p. ex. la carn blanca del pollastre) són de contracció i fatiga ràpides, ja que generen ATP principalment per glucòlisi anaeròbica de la glucosa i el glucogen. Aquestes es subdivideixen en les fibres de tipus IIA (*fast oxidative/glycolytic*) i de tipus IIB (*fast glycolytic*). Les primeres tenen una forma mixta de generació de l'ATP, mentre que les segones són pròpiament glucolítiques.

En el mateix múscul esquelètic es poden presentar fibres de tots els tipus mencionats. De tota manera, aquesta diversitat no afecta les conclusions d'aquest estudi, donat que les diverses formes de generació d'energia només provoquen canvis en les propietats fisiològiques, i no modifiquen l'estructura contràctil subjacent. Per tant, els resultats que s'obtenen en aquest treball són generals per a tots els tipus de fibres.

D'ara en endavant ens centrarem en els músculs estriats esquelètics. Això és així per dos motius: per una banda aquest tipus de múscul té un innegable interès mèdic i biològic i, d'altra banda, presenta més facilitats per al seu estudi en el muntatge experimental (vegeu el capítol 3). Amb tot, l'estructura molecular de la funció muscular és molt similar per a tots els tipus de músculs presents en els vertebrats, per la qual cosa algunes conclusions del nostre estudi, centrat exclusivament en el múscul esquelètic, poden ser aplicables als altres tipus, especialment el múscul cardíac, si bé aquest punt no serà comprovat aquí.

1.1.2. *La cel·la quasicristal·logràfica muscular: el sarcòmer*

L'observació pel microscopi electrònic d'un petit fragment de teixit muscular esquelètic permet veure (figura 1.1) una estructura amb una periodicitat longitudinal sorprenentment regular, que es va mantenint a mesura que anem disminuint l'escala. Aquesta unitat de repetició bàsica, anomenada *sarcòmer* (*sarcomere*), presenta una longitud variable, des de 2.2 μm fins 3.2 μm , que depèn linealment de l'extensió a la qual està sotmès el múscul. Transversalment, el sarcòmer té entre 1 μm i 2 μm de diàmetre.

A causa de la seva periodicitat regular i que la subestructura és idèntica en tots els sarcòmers podem tractar el sarcòmer com una cel·la quasicristal·logràfica. Les dimensions d'aquesta cel·la són, típicament, $41 \times 41 \times 2300$ nm, unes dimensions enormes que la fan una de les cel·les cristal·logràfiques més grans mai estudiades. En el capítol següent fem el tractament matemàtic que resulta d'aquesta regularitat.

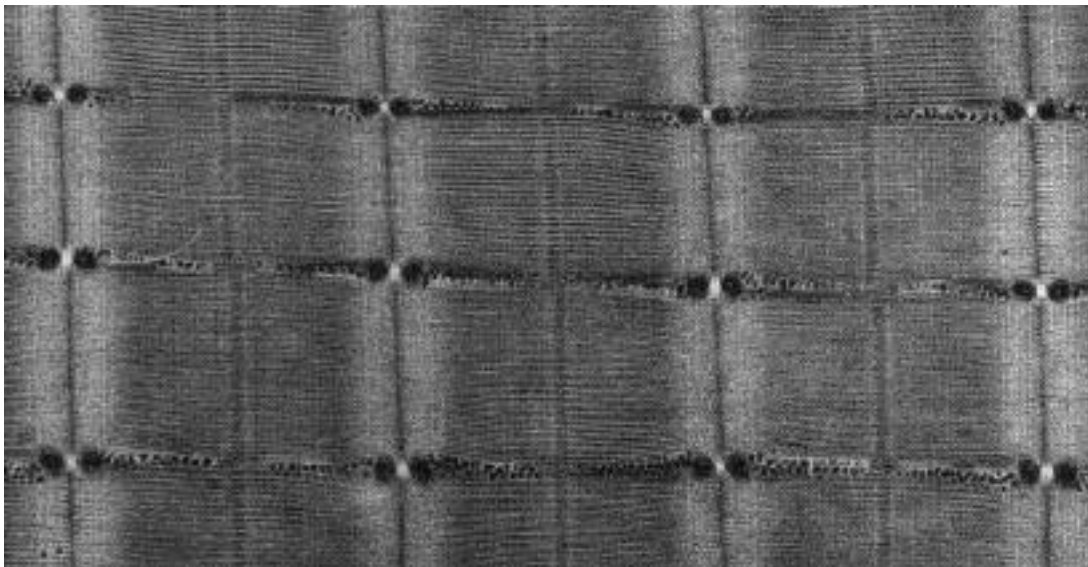


Figura 1.1. Sarcòmers vistos pel microscopi electrònic, amb un augment de ca. 2×10^4 . La successió longitudinal de sarcòmers conforma les miofibril·les. [Craig *et al.*, 1992]

Partint del sarcòmer com a unitat estructural, el múscul esquelètic s'organitza en una supraestructura visible amb microscopi òptic. Els sarcòmers se succeeixen longitudinalment al llarg del múscul, formant *miofibril·les* (*myofibrils*) (figura 1.2). Les miofibril·les s'agrupen paral·lelament formant les anomenades *fibres musculars* (*muscle fibers*), de 1 a 40 mm de llargada i de 20 a 100 μm de diàmetre, que contenen al voltant d'un miler de miofibril·les, cada una de les quals s'estén al llarg de tota la fibra. Aquestes fibres musculars són, de fet, les cèl·lules multinucleades constituents del teixit muscular, i poden arribar a allargar-se tota la longitud del múscul. Al seu torn, les fibres estan agrupades en *fascicles* (*fasciculi*), el conjunt dels quals, juntament amb el teixit cartilaginós, formen finalment el múscul.

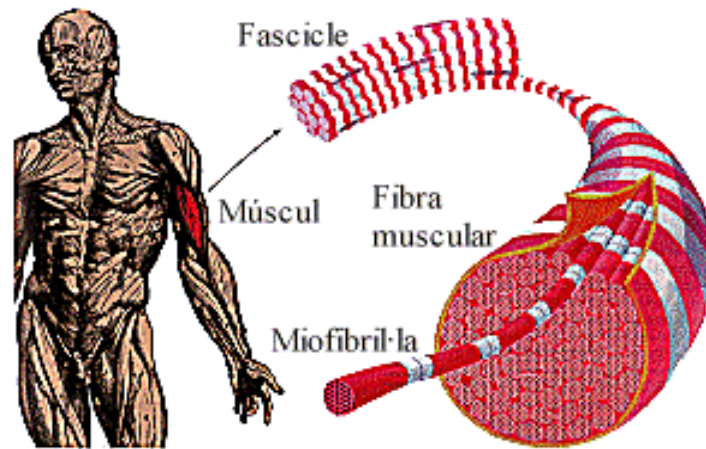


Figura 1.2. Estructura macroscòpica del múscul.

1.2. Estructura del sarcòmer

1.2.1. Bandes A i I, filaments prims i filaments gruixuts

Els components últims del teixit muscular són, en gran part, aigua i proteïnes, tant solubles com insolubles, de funcions molt diverses, algunes de les quals encara no són ben conegudes. Les proteïnes més abundants directament involucrades en la funció muscular són mostrades a la taula 1.1.

El sarcòmer presenta clarament sota el microscopi òptic dues zones o bandes transversals a l'eix del múscul, les *bandes A* i *I* (figura 1.3), anomenades així per la seva aparença anisòtropa i isòtropa, respectivament. En el centre de la banda I apareix molt clarament una línia o disc, la *línia Z*. Igualment, el centre de la banda A presenta una línia de gran densitat, el *disc M*, que és flanquejat per la *zona H*.

Per microscòpia òptica i electrònica, s'observa que la composició en les proteïnes actina i miosina de les bandes I i A és diferent, tal com indica el gran contrast característic de la gran diferència de densitats electròniques, que presenten les dues bandes [Hanson i HE Huxley, 1953; Hasselbach, 1953]. Les bandes han estat reconegudes com ordenacions de dos tipus de filaments parcialment solapats d'estructura molt determinada [AF Huxley i Niedegerke, 1954; HE Huxley i Hanson, 1954].

La primera d'aquestes bandes, la banda I, conté una xarxa aproximadament quadrada de filaments paral·lels ancorats en el disc Z que apunten cap a la línia M, els *filaments primis*, anomenats així pel seu petit diàmetre, ca. 10 nm (figura 1.4a). En aquesta banda, la densitat electrònica és relativament baixa, segons es desprèn de la microscòpia, exceptuant-ne el disc Z, en què la densitat és considerablement més alta.

Taula 1.1. Composició proteínica de les miofibril·les del múscul estriat. A part de les mostrades, les miofibril·les contenen també una vintena de proteïnes més específiques menys abundants, nombroses proteïnes solubles i components de membranes i orgànuls, no específics del teixit muscular. Els pesos moleculars i abundàncies són aproximats i depenen del tipus de fibra i del múscul. A les seccions següents s'explica més detalladament les característiques de cada proteïna. [Alberts *et al.*, 1989]

| Proteïna | Abundància al sarcòmer [%] | Massa molecular [kDa] | Subunitats [kDa] | Funció |
|--------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|---|
| Miosina | 44 | ca. 520 | ca. 2×220 (MHC) 2×22, 2×18 (MLC) | Principal component del filament gruixut. Interacciona amb actina tot hidrolitzant ATP per contraure el múscul. |
| Actina | 22 | 42 | - | Principal component del filament prim. Interacciona amb els caps de miosina per contraure el múscul. |
| Tropomiosina | 5 | 64 | 2×32 | Present en el filament prim, actua en el control de la contracció. |
| Troponina | 5 | 78 | 30 (Tn-T) 30 (Tn-I) 18 (Tn-C) | Present en el filament prim, s'enllaça amb Ca ²⁺ i intervé en el control de la contracció. |
| Titina | 9 | ca. 2500 | - | Forma un esquelet flexible que uneix els filaments gruixuts amb els discs Z. |
| Nebulina | 3 | 776 | - | Forma un esquelet rígid que alinea els filaments primis. |
| -actinina | 1 | 190 | 2×95 | Uneix els filaments primis en el disc Z. |
| Miomesina | 1 | 185 | - | Enllaça els filaments gruixuts en el disc M. |
| Proteïna C | 1 | 150 | - | Present en el filament gruixut. Funció no clara. |

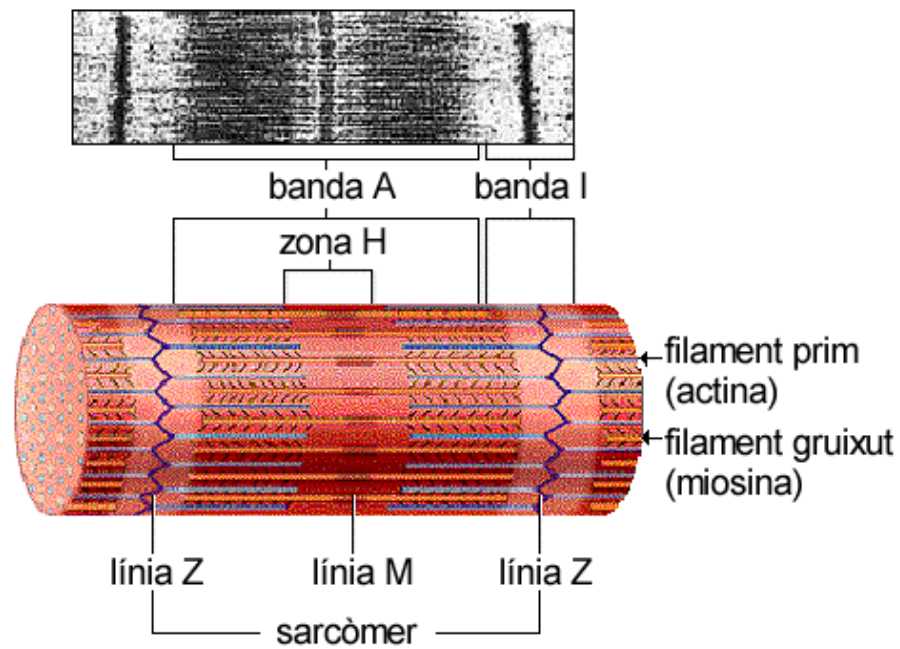


Figura 1.3. Aspecte d'un sarcòmer vist amb un microscopi electrònic (a dalt), i esquema que representa les diferents parts de què és compost (a baix). La foscor de cada banda o línia en la micrografia electrònica és directament proporcional a la seva densitat electrònica.

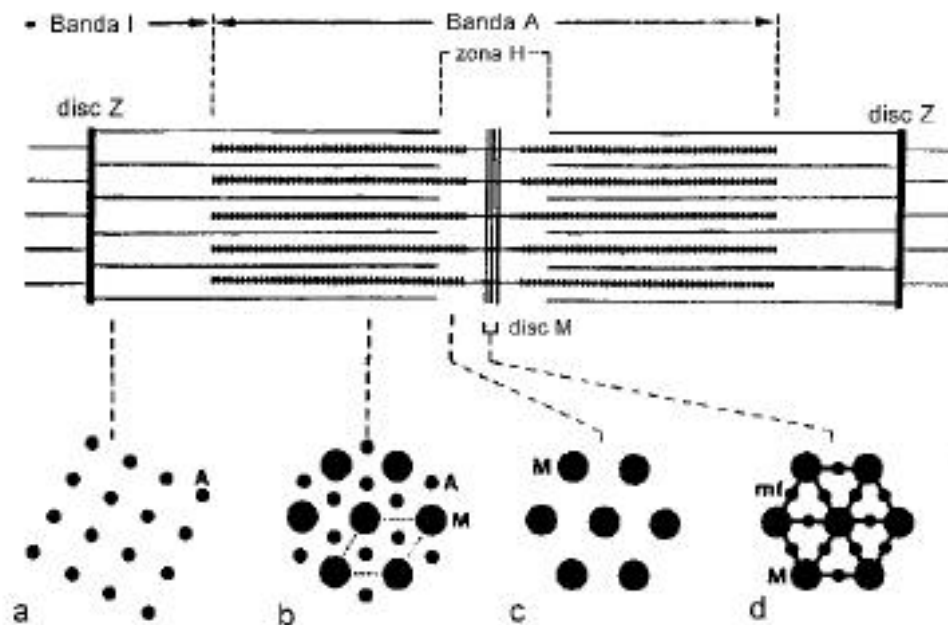


Figura 1.4. Seccions transversals del sarcòmer que corresponen a cada zona. (a) La banda I conté filaments primers que formen una xarxa aproximadament quadrada. (b) A la zona de solapament de la banda A, els filaments primers d'actina (A) se situen en les posicions trigonals de l'estructura hexagonal dels filaments gruixuts de miosina (M). (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 (mf) compostos per diverses proteïnes estructurals. [Squire, 1981]

La segona de les bandes del sarcòmer, la banda A, conté una xarxa hexagonal de filaments paral·lels, els *filaments gruixuts*, de ca. 18 nm de diàmetre, centrats en el disc M i apuntant al disc Z (figura 1.4c). Malgrat que el nombre de filaments primis és el doble, els filaments gruixuts són molt més densos, per la qual cosa la banda A té una major densitat electrònica. En la part lateral de la banda els extrems dels filaments primis s'intercalen en les posicions trigonals de la xarxa hexagonal dels filaments gruixuts (figura 1.4b), i separen la banda en dues parts amb diferent densitat electrònica: la part central (zona H), amb una densitat electrònica relativament menor, on només hi són presents els filaments gruixuts, i la part lateral, la zona de solapament dels filaments, amb una gran densitat electrònica.

1.2.2. Estructura del filament gruixut: miosina

Cada filament gruixut s'estén per una meitat de la banda A d'un sarcòmer i és compost principalment per una oligomerització d'unes 300 unitats de proteïna miosina [Squire, 1981], arranjades longitudinalment per formar un filament de ca. 0.8 μm de longitud [Sjöström i Squire, 1977, Luther *et al.*, 1981, Knight i Trinick, 1984, Squire, 1986]. En l'altra meitat de la banda A es troba un altre filament gruixut situat amb una simetria bipolar, amb el centre de simetria situat al mig de la banda, en el disc M.

A més de la miosina, al filament gruixut hi trobem una sèrie de proteïnes, les proteïnes *accessòries*, la disposició i funció d'algunes de les quals encara no són clares, com la proteïna C (*myosin binding protein C*, MyBP-C), la proteïna H (MyBP-H) i la proteïna X (MyBP-X) [Bennett *et al.*, 1986]. Així mateix, el filament gruixut interacciona amb altres proteïnes, especialment la titina, que formen part d'altres filaments (vegeu la secció 1.2.4).

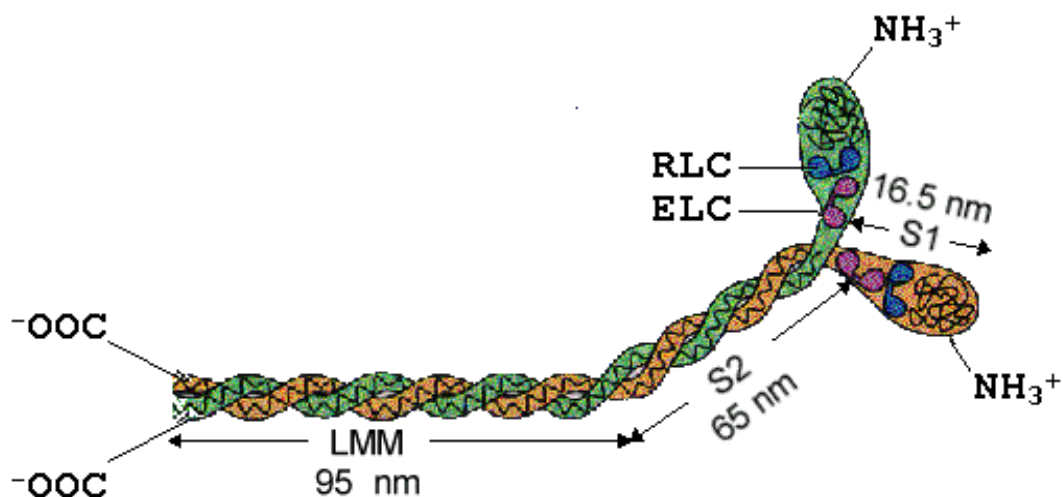


Figura 1.5. Dímer de miosina. Es marquen les cadenes lleugeres RLC i ELC i les longituds de les parts de la MHC (LMM, S2 i S1, excepte les cadenes lleugeres) que formen cada monòmer. L'extrem carboxílic (C, COO⁻) de la MHC es situa a l'extrem de la LMM, mentre que l'extrem amino (N, NH₃⁺) està al subfragment S1. Els subfragments S1 i S2 formen la HMM (*heavy meromyosin*).

La miosina és una proteïna força corrent en diferents funcions relacionades amb el transport intracel·lular, fet que comporta l'existència de moltes varietats. Aquí ens referirem a l'anomenada miosina II, la varietat més nombrosa, present en el múscul esquelètic. Aquesta varietat de la miosina consisteix en 6 cadenes polipeptídiques: dues cadenes pesades (*myosin heavy chains*, MHC, en verd i taronja a la figura 1.5) de massa molecular ca. 220 kDa cada una d'elles, i dos parells de cadenes lleugeres (*essential light chain*, ELC, i *regulatory light chain*, RLC, en blau i lila a la figura 1.5), d'entre 15 i 22 kDa cadascuna, depenent del teixit. Es conforma així un dímer de 3 cadenes polipeptídiques en cada monòmer. L'estructura de la miosina és poc freqüent, en el sentit que la cadena principal MHC té a la vegada una zona filamentosa, en l'extrem C, i una altra globular, a l'extrem N (recordem que la cadena polipeptídica, que enllaça els aminoàcids que formen la proteïna, té dos extrems N i C corresponents als extrems positiu amino i negatiu carboxílic, respectivament).

El monòmer de miosina sotmès a un tractament amb tripsina es divideix en dues parts: la LMM (*light meromyosin*), de ca. 150 kDa de pes molecular i que conté la major part del fragment filamentós de la cadena MHC, i la HMM (*Heavy Meromyosin*), de ca. 370 kDa, amb les dues cadenes lleugeres (ELC i RLC), la part globular de la cadena MHC i la resta del seu fragment filamentós. Un tractament posterior amb papaïna parteix la HMM en dos subfragments, S1 i S2. El subfragment S2 és la part filamentosa restant, mentre que S1 constitueix enterament la part globular.

El subfragment S1, també anomenat *cap de miosina* (*myosin head*), és realment la part activa de la proteïna, donat que té activitat ATPasa (hidròlisi de l'ATP) i conté els llocs d'enllaç amb la molècula d'actina. El cap de miosina pot ser trencat per la tripsina en 3 segments [Mornet *et al.*, 1979] de 25 kDa, 50 kDa (domini motor, *motor domain*) i 20 kDa (domini regulador, *regulatory domain*) respectivament, seguint la cadena del terminal N al C. Si bé històricament se'ls anomena dominis, en realitat els límits dels segments marquen solament les parts de la cadena sensibles a la proteòlisi de la tripsina.

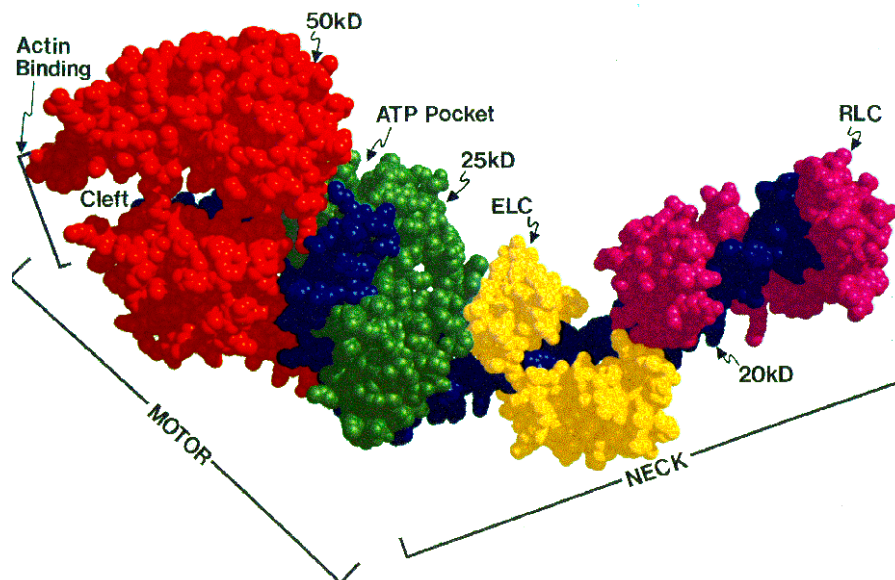


Figura 1.6. Estructura resolta del subfragment S1 (cap de miosina) de la proteïna miosina amb les cadenes lleugeres ELC (groc) i RLC (magenta). Es mostren els 3 segments de la cadena pesada: 25 kDa (verd), 50 kDa (vermell) i 20 kDa (blau marí), així com les zones d'enllaç amb l'actina (*actin binding*) i l'ATP (*ATP pocket or cleft*). [Rayment *et al.*, 1993a]

Com a resultat de l'activitat ATPasa, en el cap de miosina es poden presentar diferents estats de nucleòtid, més o menys estables, que influeixen en la conformació (ATP, ADP, ADP-Pi, etc.). L'estructura del cap de miosina sense nucleòtid ha estat resolt estructuralment per cristal·lografia de proteïnes en llum de sincrotró [Rayment *et al.*, 1993a] (figura 1.6). Apareix amb una forma elongada, de dimensions $16.5 \times 6.5 \times 4$ nm i amb una estructura clarament diferenciada en dues parts que aproximadament coincideixen amb els *dominis* identificats per l'hidròlisi amb la tripsina. Més recentment s'ha aconseguit resoldre l'estructura del cap de miosina amb anàlegs de nucleòtid [Holmes, 1997; Houdusse *et al.*, 1999] (vegeu la secció 9.1.2).

En l'estructura cristal·logràfica hi trobem, per una banda, el domini motor, de forma globular i que conté, entre d'altres elements, una llarga sèrie de 7 bandes β (β -sheets) repartides en part dels 3 segments, els punts d'enllaç amb l'actina, i un espai on suposadament entra l'ATP i s'hidrolitza (*ATP binding pocket*) [Rayment *et al.*, 1993b]. Dins el domini motor, hi ha també una escletxa (*cleft*) que el separa en dos (*upper* i *lower motor domains*) i per on probablement surt el fosfat inorgànic (PO_3H_3 , Pi) que resulta de la hidròlisi del nucleòtid [Yount *et al.*, 1995]. Per altra banda, el domini regulador és format per una llarguíssima α -hèlix de 8.5 nm de llarg, al voltant de la qual s'uneixen les cadenes lleugeres ELC i RLC. Aquest domini forma així una cua o coll (*neck*) que uneix la part filamentosa de la molècula (LMM i subfragment S2) amb el domini motor.

El subfragment S1 en solució presenta una gran afinitat per la proteïna actina. En absència de nucleòtid, les dues proteïnes s'enllacen amb enllaços hidròfobs, formant un complex anomenat *actomiosina*. Aquest complex és el format quan el múscul assoleix l'estat de *rigor mortis*.

La part filamentosa de la MHC (LMM i S2) consisteix en dues llargues α -hèlixs enrotllades helicoidalment l'una amb l'altra formant una cua fibrosa i llarga d'uns 160 nm de longitud, i un pas de rosca (*pitch*) de 14.1 nm [Quinlan i Stewart, 1987]. La seva agregació lateral a causa dels residus externs de l'hèlix enrotllada forma el cos o esquelet dels filaments gruixuts (*backbone*), i ordena i suporta el subfragment S1.

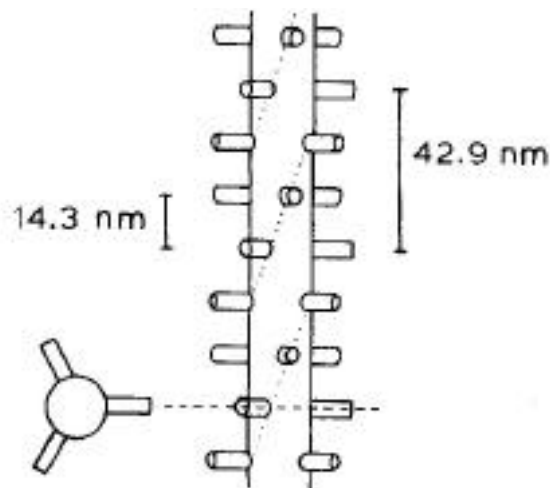


Figura 1.7. Esquema de l'arranjament de les corones de caps de miosina en el filament gruixut. Cada corona té 3 parells de caps de miosina (cilindres), i se situa a 14.3 nm i 40° de l'anterior. El filament es repeteix idènticament cada $3 \times 14.3 = 42.9$ nm. [Offer, 1974]

En el múscul esquelètic dels animals vertebrats, el filament gruixut, que resulta de l'agregació de la miosina, presenta una zona pròxima al disc M desprovista de caps, la *zona nua* (*bare zone*), i de longitud aproximadament igual a una cua de miosina, fora de la qual a cada extrem van sorgint els caps de miosina agrupats a parells, de manera simètrica a ambdós extrems i seguint una simetria helicoidal [HE Huxley i Brown, 1967]. Els caps dobles de miosina es van ordenant en un total de, probablement, entre 48 i 50 *corones* o nivells a cada filament [Squire, 1981]. Cada corona està formada per tres parells de caps separats azimutalment 120° (figura 1.7), disposada longitudinalment al filament cada ca. 14.3 nm i rotada 40° respecte l'anterior corona.

Els caps de miosina segueixen així una simetria d'hèlix de 3 cordes (3 subfilaments rotant sobre el mateix eix) amb simetria 9/1, és a dir, 9 miosines per cada volta d'hèlix ($9 \times 40^\circ = 360^\circ$), si bé, a causa de les 3 cordes, el filament es repeteix idènticament cada tres corones, a ca. $3 \times 14.3 = 42.9$ nm. La simetria que en resulta és el grup puntual 32 (D_3) [Luther *et al.*, 1981].

A part de la miosina, al filament gruixut s'hi troben les anomenades proteïnes accessòries: proteïna C (MyBP-C), proteïna X (MyBP-X) i proteïna H (MyBP-H) [Bennett *et al.*, 1986]. D'aquestes, la proteïna C, de 150kDa de pes molecular, té particular rellevància per l'abundància i, especialment, per la disposició regular que pren en el filament gruixut. La proteïna C és una molècula allargada de 35-40 nm de longitud i 2-3 nm de diàmetre [Offer, 1972]. A cada banda del filament gruixut presenta una distribució regular d'entre 7 i 11 repeticions, amb una separació entre repeticions de ca. 44 nm [Offer *et al.*, 1973] i una distància entre la línia M i la primera repetició de ca. 120 nm [Craig *et al.*, 1976b]. La situació i el nombre d'aquesta proteïna no està aclarit encara, segurament a causa del diferent marcatge dels anticossos utilitzats.

Malgrat aquesta simetria, la regularitat de l'estructura dels caps de miosina no és perfecta, com mostra la presència en el diagrama de difracció de reflexions *prohibides* (vegeu el capítol 2). Aquestes poden ser causades bé sigui pel diferent ancoratge dels caps de miosina en el filament [Maw i Rowe, 1980], bé per la influència d'altres proteïnes presents en el filament, principalment la proteïna C. En capítols posteriors aquestes irregularitats seran tractades àmpliament.

1.2.3. Estructura del filament prim: actina, troponina i tropomiosina

El principal component del filament prim és la G-actina, una proteïna bastant corrent i de funcions múltiples, descoberta per Schaub (1948). A més, al filament prim també hi són presents les proteïnes troponina i tropomiosina, responsables del control de la contracció mitjançant els ions Ca^{2+} . L'estructura de la G-actina ha estat resolta mitjançant la difracció de raigs X del cristall d'actina i proteïna DNasa I en proporció 1:1 [Kabsch *et al.*, 1990]. La G-actina té una forma globular, amb dimensions 5.5×3.5 nm i 42 kDa de pes molecular, i comprèn dos dominis, anomenats *domini petit* i *domini gran* (*small domain*, *large domain*), cadascun dels quals està subdividit en els subdominis 1 i 2, i 3 i 4, respectivament (figura 1.8, esquerra). La proteïna s'enllaça reversiblement amb un àtom de Ca^{2+} (o Mg^{2+}) i amb una molècula d'ATP [Rees i Young, 1967], de funció purament estructural.

Els filaments prim del sarcòmer es formen bàsicament per la polimerització de la G-actina, anomenada F-actina, l'estructura de la qual ha estat descrita a partir de l'estructura de la G-actina (figura 1.8, dreta) [Holmes *et al.*, 1990]. La polimerització origina una

fibra de 10 nm de diàmetre amb simetria helicoidal, on cada unitat de G-actina es disposa amb un avanç axial (*axial rise*) c' de ca. 2.73 nm i rotada uns 166° respecte de l'anterior (figura 1.9). La simetria resultant és, aproximadament, una hèlix 13/6 de mà esquerra (*genetic helix*), és a dir, que conté aproximadament 13 monòmers d'actina per cada 6 voltes. Per tant, cada volta, amb un pas de rosca (*pitch*) C de 5.9 nm, conté ca. 2.16 monòmers de G-actina [Hanson i Lowy, 1963]. Atès que dos monòmers de G-actina consecutius es disposen formant un angle de quasi 180° , l'aparença d'aquesta disposició és una doble hèlix de mà dreta de ca. 72 nm de pas de rosca o *pitch* (que pel fet de ser una hèlix doble dóna un pas de rosca efectiu de ca. 36 nm), i amb un avanç axial de ca. 5.46 nm.

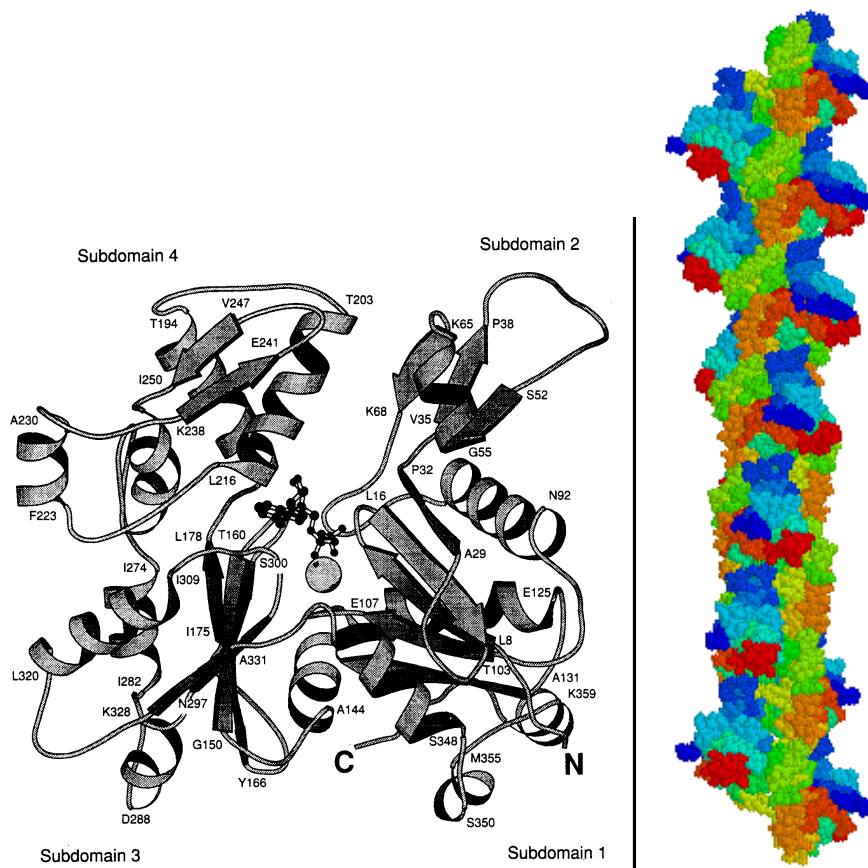


Figura 1.8. (Esquerra) Estructura de bandes de la G-actina. La posició del nucleòtid, de funció purament estructural, és mostrada en el centre de l'estructura, entre el domini petit (subdominis 1 i 2) i el domini gran (subdomini 3 i 4) [Kabsch *et al.*, 1990]. (Dreta) Filament d'actina que mostra l'exposició dels diferents dominis i on s'observa clarament la doble hèlix de mà dreta [Holmes *et al.*, 1990].

En el filament prim, les G-actines s'orienten en la mateixa direcció, amb el domini petit apuntant a l'exterior. L'eix llarg del monòmer és projectat perpendicularment al filament, tot seguint a grans trets l'hèlix de 13/6 i apuntant el disc Z [Taylor i Amos, 1981]. Aquesta orientació dóna una polaritat a la F-actina que probablement determina els extrems de creixement ràpid (+, *barbed*) i lent (-, *pointed*) i, conseqüentment, la direcció de polimerització de la fibra [Toyoshima, 1991]. L'enllaç que s'estableix entre monòmers

ressegueix l'hèlix de 13/6, entre un domini gran i el domini petit del monòmer següent, si bé també hi ha interacció entre dominis grans al llarg de la doble hèlix. També, per últim, hi ha una connexió entre monòmers situats en cordes oposades de la doble hèlix [Spudich *et al.*, 1972; Seymour i O'Brian, 1980; Milligan *et al.*, 1990].

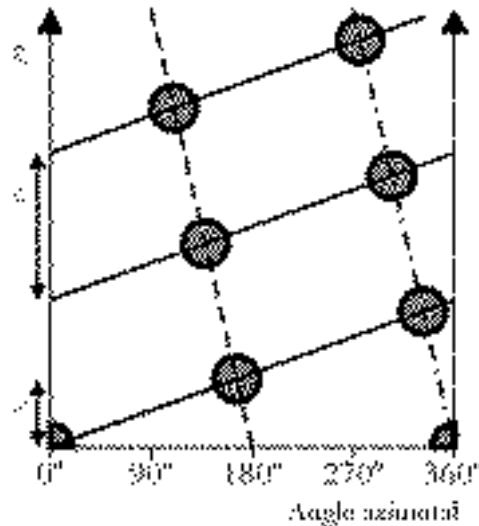


Figura 1.9. Diagrama que mostra la disposició dels monòmers d'actina en el filament en funció de la seva orientació (angle azimutal) i la posició en l'eix z. Cada monòmer apareix desplaçat 166° i amb un avanç axial (*axial rise*) c de 2.73 nm respecte l'anterior. Aquesta disposició pot ser interpretada bé com una sola hèlix (*genetic helix*) amb un pas de rosca C de 5.9 nm (representada per una línia contínua) o bé com una doble hèlix amb un avanç axial doble i pas de rosca efectiu de 36 nm (representades per dues línies amb punts diferents).

El filament de F-actina s'enllaça amb els caps de miosina formant el complex actomiosina, amb hidròlisi d'una molècula d'ATP, mitjançant un conjunt de punts d'enllaç. Aquest conjunt de punts d'enllaç possibilita l'existència de diferents estats del complex actomiosina, alguns no específics i d'altres estereoespecífics, de diferent energia d'enllaç, rellevants per la contracció [Das Gupta i Reisler, 1989; Schröder *et al.*, 1993; Bonafe i Chaussepied, 1995; Díaz-Baños *et al.*, 1996]. De tota manera, l'estat actual de les investigacions encara no ha permès aclarir definitivament quins són aquests enllaços i en quin moment de la contracció muscular intervenen.

A part de la F-actina, les proteïnes tropomiosina (Tm) i troponina (Tn) formen també part integral del filament prim (figura 1.10). La seva funció és modificar la interacció actina-miosina a partir de la sensibilitat que tenen amb la concentració de Ca^{2+} lliurat al citosol a causa de l'estímul nerviós (vegeu la secció 1.3.2). Efectivament, la interacció actina-miosina només depèn de la concentració de Ca^{2+} quan la Tm i la Tn s'afegeixen a la F-actina per recuperar la totalitat del filament prim [Ebashi, 1980].

La segona proteïna del filament prim, la tropomiosina, descoberta per Bailey *et al.* (1948), és una proteïna formada per dues cadenes idèntiques, formades quasi

completament per α -hèlixs, enrotllades entre si, de 32 kDa de pes molecular i 40 nm de llargada [Stone *et al.*, 1975]. La Tm presenta 14 zones quasiequivalents que poden actuar com a dos conjunts de punts d'unió amb l'actina [Parry, 1975; McLachlan i Stewart, 1976]. En el filament prim, dues molècules de Tm es situen en els dos solcs que van deixant els dominis llargs de les actines en resseguir la doble hèlix, amb un solapament entre Tm consecutives d'aproximadament 8 residus (figura 1.10a). Amb aquesta disposició, la Tm forma una doble hèlix de 38.5 nm de pas de rosca, i cobreix 7 monòmers d'actina per molècula [Phillips *et al.*, 1979, 1980, 1986].

Finalment, la tercera proteïna present en el filament prim és la troponina (Tn), que fou isolada per Ebashi i Kodama (1966). És un complex de 3 polipèptids, Tn-T, Tn-I i Tn-C, anomenats així per les seves activitats d'enllaç amb la Tm, inhibidora i d'enllaç amb ions Calci, respectivament. El complex té una forma elongada, en què les subunitats C i I formen una regió globular i la T forma una llarga cua (figura 1.10b) que s'enllaça amb la tropomiosina en la regió d'unió entre dues tropomiosines consecutives.

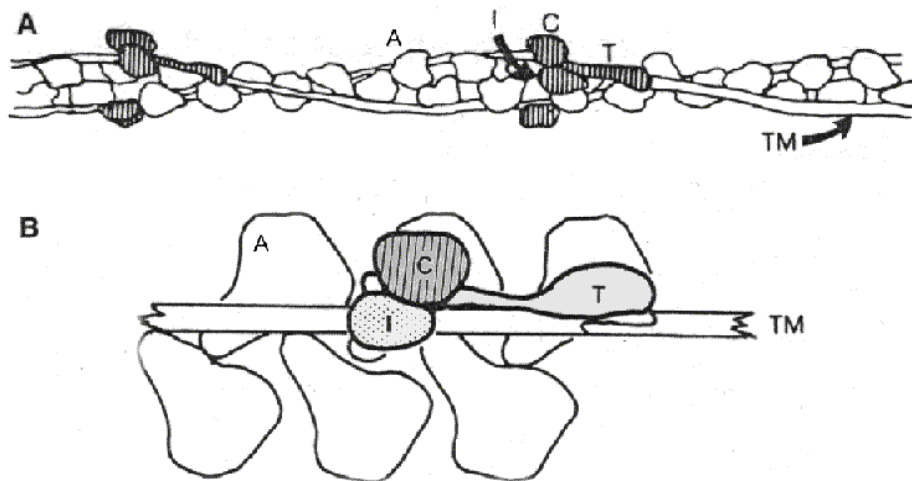


Figura 1.10. (a) Disposició de l'actina (A), tropomiosina (TM) i les 3 subunitats de la troponina (Tn-C, Tn-I i Tn-T) en el filament prim. (b) Visió ampliada del punt d'unió de les 3 proteïnes. S'observa el punt d'unió de les tropomiosines a l'alçada de la Tn-T. [Phillips *et al.*, 1986].

1.2.4. Proteïnes estructurals del sarcòmer

El sarcòmer es manté com una estructura ordenada a causa d'un gran nombre de proteïnes, les anomenades proteïnes estructurals, que formen una bastida en la qual s'hi inclouen els elements actius de la contracció muscular, els filaments gruixuts i els filaments prim. Aquestes proteïnes, entre altres estructures, formen els anomenats filaments intermedis (*intermediate filaments*, IF) i els discos M i Z.

Paral·lelament als filaments gruixut i prim, el sarcòmer és atravesat pel més important dels filaments intermedis, el filament de *titina*. La titina, també anomenada connectina, és la proteïna més gran descoberta fins ara amb una cadena de ca. 3000 kDa i una longitud

de ca. 1 mm. Les unitats d'aquesta proteïna s'estenen des del disc Z (terminal N) fins al disc M (terminal C), tot abastant mig sarcòmer, amb una estructura molt regular. El 90% de la massa de la titina és formada per 132 còpies d'un subdomini pertanyent a la superfamília fibronectina de tipus III (*fibronectin type III*, FNIII) i fins a 166 còpies d'un subdomini de la superfamília de la immunoglobulina (Ig). Aquests dominis, d'aproximadament 100 residus, formen una estructura regular amb una repetició de ca. 4 nm que recorda a un collaret d'unes 300 perles que s'estén mig sarcòmer [Gregorio *et al.*, 1999].

La titina sembla actuar a tall de bastida elàstica del sarcòmer que situa la banda A en el centre del sarcòmer [Wang, 1985]. Efectivament, el sarcòmer és una estructura espontàniament inestable en què, si una banda A es desplaça lleugerament cap una banda Z en un múscul actiu, aquesta experimentarà com més va més força en la direcció del moviment, a causa del major solapament dels caps de miosina amb els filaments primers en aquella direcció [Squire, 1997]. La titina pot reduir aquest efecte no desitjable subministrant una força que apunta al centre, anàlogament a l'acció una molla. La titina també pot tenir un paper en el manteniment del paral·lelisme entre filaments i en la definició de la longitud dels filaments gruixuts, donada la seqüència de repetició de la titina a la banda A (on són presents els caps de miosina) i la seva seqüència específica al final d'aquesta banda [Labeit i Kolmerer, 1995a, 1995b; Trinick, 1996]. Finalment, a més d'aquestes funcions, s'ha especulat que la titina té un paper important com a proteïna reguladora en el procés de diferenciació cel·lular [Wang i Ramírez-Mitchel, 1983; Wang, 1985].

A més de la titina, un altre element important del sarcòmer que estabilitza l'estructura dels filaments gruixuts és el disc M. Està situat al centre de la banda A, i enllaça transversalment els filaments gruixuts mitjançant petits filaments (figura 1.4e). Conté 3 proteïnes: la creatina kinasa, que manté els nivells intracel·lulars d'ATP, i les proteïnes M (165 kDa) i miomesina (185 kDa), que s'uneixen a la titina i la LMM [WUSM, 1999].

Un altre element estructural és el disc Z, que consisteix en una o diverses capes (fins a 4) en forma de ziga-zaga amb simetria tetragonal (grup espacial $P4_32_12$), la funció principal de les quals és ancorar l'extrem (+) dels filaments primers [Squire, 1997]. La proteïna majoritària del disc Z és la α -actinina, si bé hi són presents altres proteïnes com la bloquejadora de F-actina capZ (68 kDa), l'amorfina, la desmina, la miotilina i la supervilina [Fowler, 1996; WUSM, 1999; Darnell *et al.*, 1995].

En tota l'extensió del filament prim hi ha dues unitats d'una altra proteïna estructural longitudinal al sarcòmer, la *nebulina*. La nebulina és una proteïna gegant de ca. 776 kDa, composta bàsicament de α -hèlixs amb unes superrepeticions de 38.5 nm, una repetició idèntica a la del filament de F-actina. Aquest punt fa pensar que la nebulina té una funció reguladora del filament prim [Labeit, 1995; Fowler, 1996]. Els enllaços de la nebulina en el filament prim no estan completament establerts, si bé es creu que cada unitat pot localitzar-se en un dels solcs centrals de la F-actina [Pfuhl *et al.*, 1994]. Alternativament, una proposta recent [Root i Wang, 1994] suggereix un paper de la nebulina en la contracció muscular, basat en la capacitat d'alguns fragments de nebulina d'inhibir l'activitat ATPasa de l'actomiosina i el lliscament dels filaments. En el múscul cardíac ha estat trobada la proteïna *nebulette* (107 kDa), d'estructura i disposició similars a la nebulina, que abasta aproximadament un quart de la longitud del filament prim [Moncman i Wang, 1995].

Finalment, associada també al filament prim hi trobem la proteïna *tropomodulina* (40 kDa), que actua de terminador de l'extrem (-) del filament d'actina i controla la polimerització de l'actina [Weber *et al.*, 1994].

1.3. Fisiologia del múscul

1.3.1. El múscul solament es contrau

El conjunt d'accions que realitza el múscul es resumeix en una funció bàsica: la contracció. Les altres funcions, bàsicament generació de força i de moviment, són producte de la combinació d'accions de diferents músculs, amb la contracció com a llur propietat bàsica. Aquesta contracció es pot observar clarament en els actes reflexos, o bé estimulant un múscul disseccionat i submergit en una solució fisiològica. Segons quin sigui l'estímul aplicat al múscul, es provoquen dos tipus de reacció, anomenades totes dues *contracció* per raons històriques. D'una banda, amb els extrems lliures i mòbils, el múscul varia de longitud sense alterar la tensió que genera, i realitza l'anomenada *contracció isotònica*. De l'altra, quan els extrems són fixos, el múscul genera força mentre manté la seva longitud, un estat muscular anomenat *contracció isomètrica*. Les accions que realitzarà correntment un múscul en viu seran una combinació de les anteriors.

Convé remarcar que el fet que el múscul únicament es contragui no es contraposa a la visió intuïtiva que es té sobre el funcionament del sistema muscular. L'acció contrària a la d'un múscul és el producte de l'acció d'un altre múscul, anomenat *contramúscul*, amb funció antagònica, que possibilita així accions reversibles. Els dos músculs s'anomenen *flexor* i *extensor*, en relació a l'acció que realitzen. D'aquesta manera, el múscul es contrau activament, i s'estira pasivament.

El suport a tot aquest sistema dinàmic el dona l'esquelet, i a ell s'uneixen els músculs pels extrems. Aquests extrems, els tendons, són formats de teixit cartilaginós i són el punt d'ancoratge necessari per a la generació de força (en el cas de *contracció isomètrica*) o per la transmissió de moviment (en el cas de *contracció isotònica*).

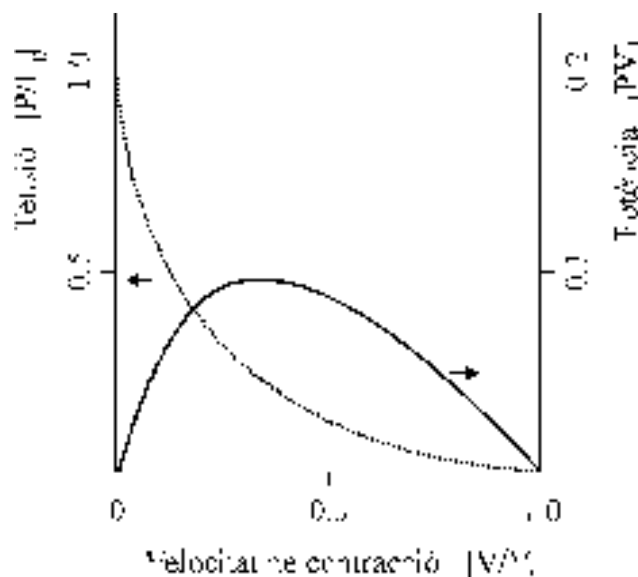


Figura 1.11. L'equació de Hill (línia de punts) dona la relació entre la velocitat de contracció i la tensió desenvolupada pel múscul. La potència desenvolupada pel treball (línia contínua) és el producte de la velocitat per la tensió i té un màxim a ca. $0.3 V/V_0$.

Les característiques de la contracció d'un múscul depenen essencialment de la càrrega que suporta o, equivalentment, de la tensió que produeix. Amb una tensió nul·la (cas de contracció isotònica pura) la velocitat d'escurçament és la màxima que pot desenvolupar el múscul (V_0). Inversament, la velocitat és nul·la quan el múscul produeix la màxima tensió, la tensió isomètrica, P_0 (cas de la contracció isomètrica pura). Aquesta relació és expressada per l'equació de Hill, i és il·lustrada en la figura 1.11. La potència màxima produïda es dona aproximadament a un terç de la velocitat màxima V_0 . El múscul està preparat per aguantar fins una càrrega de $2 P_0$, per sobre de la qual el límit elàstic se supera, les fibres es trenquen i el múscul queda desconfigurat.

La forma de l'estímul determina la tensió amb què respon un múscul. Si mantenim els extrems fixos (contracció isomètrica) i amb un estímul puntual (*twitch*), la tensió del múscul puja fins a un nivell màxim després d'uns 100-200 ms de rebre l'estímul i decau més lentament (figura 1.12a), segons quin sigui el tipus de múscul i la temperatura. Si es dona una sèrie d'estímuls puntuals, les respostes s'encavalquen (figura 1.12b), fins que, amb una successió prou ràpida, es produeix la situació de *tètanus* (figura 1.12c), en què la tensió queda estabilitzada en un plateau de tensió màxima P_0 o T_0 .

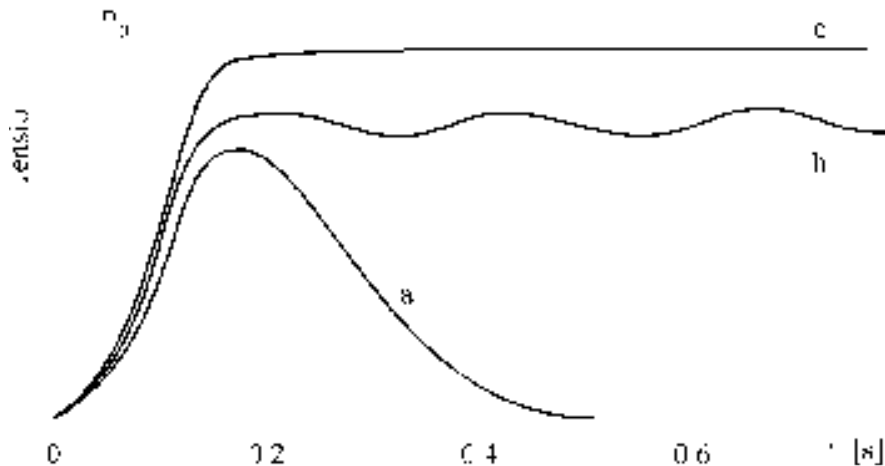


Figura 1.12. Tensió del múscul provocada per (a) un sol estímul o *twitch*, (b) una sèrie separada d'estímuls i (c) una sèrie d'estímuls a més alta freqüència, en què s'assoleix l'estat de tètanus. El pendent fins assolir la tensió de tètanus depèn de l'espècie animal, el tipus de múscul, i les condicions físiques i fisiològiques a què és sotmès (en particular la longitud i el cansament, respectivament).

1.3.2. Estimulació del múscul

1.3.2.1. L'impuls nerviós i la regulació de $[Ca^{2+}]$

Els músculs esquelètics són excitats per impulsos elèctrics, tal com van posar de relleu per primera vegada els experiments de Luigi Galvani al segle XVIII [Galvani, 1791; resum a Bordas, 1998]. Galvani va trobar que un impuls elèctric extern aplicat a les anques d'una granota les estimulava i feia contraure. En el múscul viu, on l'activació prové dels impulsos elèctrics del sistema nerviós, la situació és anàloga. Quan un impuls arriba a

l'extrem de la neurona motor associada a una fibra muscular, la neurona allibera una substància transmissora, la acetilcolina (*ACh*), que despolaritza la membrana plasmàtica de la fibra muscular, el *sarcolemma*. El canvi de polarització es transmet a l'interior de la fibra per unes fines invaginacions del sarcolemma, els *túbuls T* o *transversals* (*T tubules*), situades a prop del *reticle sarcoplasmàtic* (*sarcoplasmic reticulum, SR*) (figura 1.13). El SR forma una xarxa de vesícules membranoses i cisternes que envolten les regions externes de les bandes A de cada miofibril·la, que és on es localitzen els caps de miosina. El SR forma també un canal membranós continu, anomenat *cisterna terminal*, que rodeja els discos Z de cada miofibril·la, i que connecta amb els túbuls T.

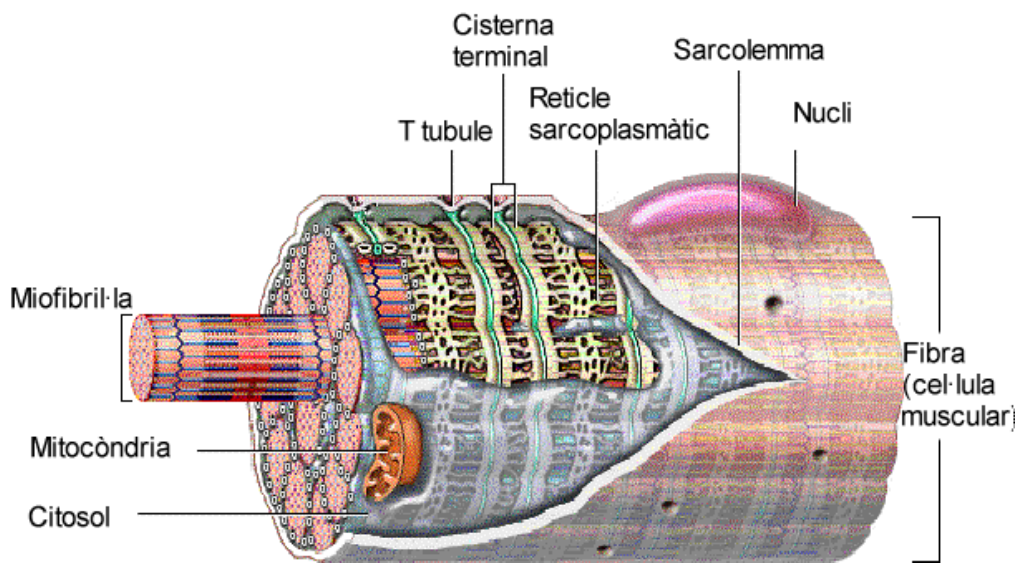


Figura 1.13. Detall d'una fibra muscular

El SR serveix de reserva d'ions Ca^{2+} , que són l'element que actua directament en el sarcòmer i activa els mecanismes bioquímics a nivell macromolecular (figura 1.14). Quan la membrana plasmàtica externa, el sarcolemma, es despolaritza, una proteïna canal en la membrana del reticle sarcoplasmàtic s'obre amb consum d'ATP i es produeix l'alliberament dels ions Ca^{2+} del SR al *citosol*, on estan situades les miofibril·les. La concentració d'ions Ca^{2+} augmenta així de $0.1 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$, i es manté elevada amb una estimulació contínua del múscul. En presència dels ions Ca^{2+} , la troponina té un canvi estructural que provoca un moviment de la tropomiosina que, al seu torn, deixa interaccionar la miosina amb l'actina. Els canvis en cadena d'aquestes proteïnes són descrits pel model del blocatge estereoespecífic, explicat a continuació.

Quan el múscul es relaxa els ions Ca^{2+} tornen a dins del SR amb consum d'ATP i el procés descrit s'efectua en sentit contrari. Tant l'estimulació com el relaxament es realitzen en temps de mil·lisegons, a causa de les invaginacions del sarcolemma que porten el senyal a l'interior de la fibra, i de la poca distància entre les invaginacions i el reticle sarcoplasmàtic, ca. 16 nm.

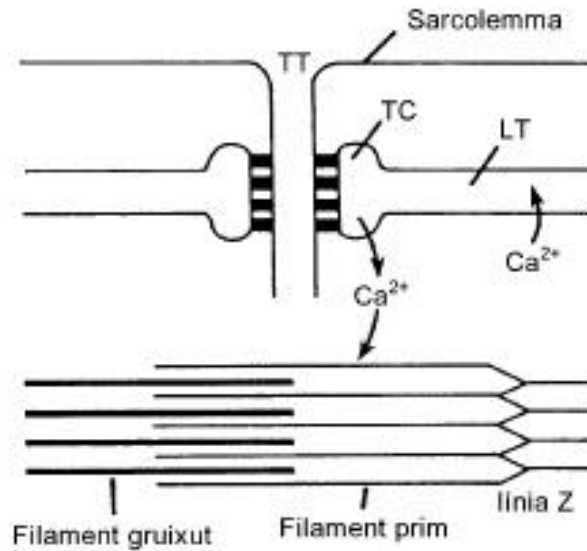


Figura 1.14. Procés d'activació del teixit muscular. La despolarització del sarcolemma arriba a través dels túbuls T (TT) a les cisternes terminals (TC) del reticle sarcoplasmàtic, alliberant el Ca^{2+} . La desactivació es produeix amb el procés invers.

1.3.2.2. Model de blocatge estereoespecífic

El model de blocatge estereoespecífic (*steric blocking model*) pretén explicar com l'afinitat de la troponina (Tn) pels ions Ca^{2+} i el moviment de la tropomiosina (Tm) porta a la contracció [Vibert *et al.*, 1972; Haselgrove, 1973; Parry i Squire, 1973]. En descans, quan la concentració $[\text{Ca}^{2+}]$ és baixa, la tropomiosina, enllaçada amb 7 monòmers d'actina, segueix la doble hèlix que formen les actines, de tal manera que els punts d'unió que el filament d'actina té amb la miosina estan oclosos i, per tant, l'acció ATPasa queda inhibida. Quan el múscul s'estimula i s'alliberen els ions Ca^{2+} , aquests s'uneixen amb la Tn-C, que passa a tenir més afinitat per la Tn-I (figura 1.15). L'enllaç de la Tn-C i la Tn-I allibera els enllaços de la segona amb l'actina, i permet que la Tm s'allunyi de la posició que tenia en descans. Els punts d'enllaç que l'actina té amb la miosina queden ara oberts perquè puguin formar el complex actomiosina i generar força.

En una primera formulació, el model de blocatge estereoespecífic descrivia el filament prim en dos estats: relaxat (en què la Tm inhibeix l'enllaç actina-miosina) i activat (amb la Tm desplaçada). No obstant això, en treballs posteriors s'observà que l'activitat ATPasa de l'actomiosina requeria una presència mínima de caps de miosina, per la qual cosa calia incloure aquesta influència [Greene i Eisenberg, 1983]. Seguint aquesta línia, diversos treballs han ampliat el model a tres possibles estats [Phillips *et al.*, 1986; Poole *et al.*, 1991; Popp *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1999]: *tancat*, *activat* i *potenciat* (*switched-off*, *activated* i *potentiated*).

Estat tancat del filament prim

L'estat tancat del filament prim es dona en descans, quan la Tm obstrueix els punts d'enllaç de l'actina amb els caps de miosina, tot i que aquests encara poden enllaçar-s'hi en l'anomenat estat d'enllaç dèbil (*weakly bound state*), que no és capaç de generar força [Greene i Eisenberg, 1980; Milligan i Flicker, 1987]. La microscòpia electrònica sembla confirmar també aquest punt [Milligan *et al.*, 1990].

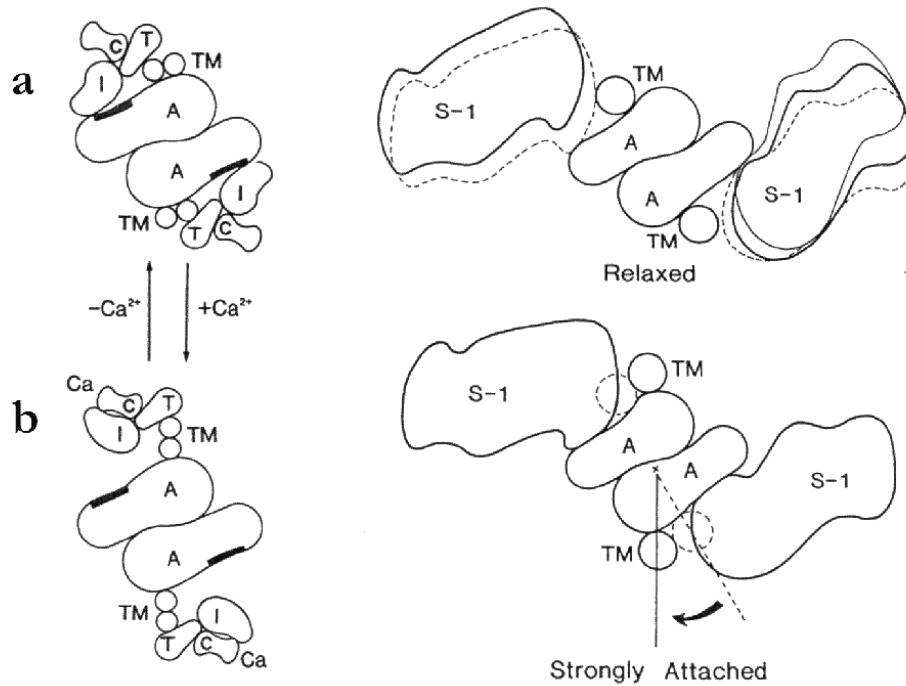


Figura 1.15. Esquema que mostra el procés d'activació en el filament prim segons el *steric blocking model*. *a)* Els punts d'enllaç de l'actina amb la miosina queden obstruïts per la tropomiosina (Tm), que els allibera quan *b)* hi ha presència d'ions Ca^{2+} que a través de la troponina (Tn-I, Tn-C, Tn-T) desplacen la tropomiosina. [Phillips *et al.*, 1986]

L'estat activat del filament prim

El segon estat, l'estat activat, es dona en experiments en què el filament prim és activat amb una gran concentració $[\text{Ca}^{2+}]$, però hi ha una baixa presència de caps de miosina. En aquest cas, la Tm no es desplaça una distància suficient com per deixar exposats plenament els punts d'enllaç actina-miosina. La influència de la concentració de caps de miosina en el desplaçament de la Tm es pot explicar de dues maneres.

Per una banda, la inestabilitat de la Tm podria ser deguda a efectes tèrmics que la farien oscil·lar entre dues posicions, sense que hi hagués cap factor estabilitzador, com ho podria ser el cap de miosina, per fixar-la en una posició [Phillips *et al.*, 1986].

Per altra banda, la segona possibilitat fóra que el cap de miosina s'enllaçés estereoespecíficament amb l'actina [Andreev i Borejdo, 1991] de manera activa. En aquest cas, alguns dels enllaços actina-miosina no són exposats únicament pel moviment actiu de la tropomiosina que els descobreix, sinó que el propi moviment del cap de miosina provoca canvis al filament prim que fan que els enllaços exposin a aquest [Wakabayashi *et al.*, 1988].

Aquesta interpretació es veu reforçada per l'observació per raigs X de fibres musculars desmembranades en estat de rigor en les quals hi ha més concentració de Ca^{2+} en les zones de solapament dels filaments, fet que suggereix que la presència de caps de miosina afavoreix l'enllaç del calci per la Tn-C [Cantino *et al.*, 1993]. Altres estudis que apliquen un marcatge sobre la Tn-C subratllen que l'enllaç del Ca^{2+} a la Tn-C i l'enllaç del cap de miosina al filament prim són efectes additius [Güth i Potter, 1987; Zot i Potter, 1989]. Com a conseqüència important, cal remarcar que aquesta darrera possibilitat implica que

el moviment de la Tn, i en general l'estimulació del múscul, és més un procés cooperatiu que un procés de control jeràrquic.

L'estat potenciat del filament prim

Finalment, el tercer estat del filament prim, l'estat potenciat, és el de més baixa energia. Segons el model, s'estableix quan hi ha prou presència de caps de miosina per establir la posició de la Tm, fet que permet l'enllaç fort del cap de miosina a l'actina [Ishii i Lehrer, 1985]. Les observacions per microscopia electrònica [Vibert *et al.*, 1997] han donat una estimació del desplaçament azimutal de la Tm de 25° per a l'estat activat, en el qual s'alliberen parcialment els enllaços actina-miosina, i de 10° més per l'estat potenciat, que deixa els enllaços plenament alliberats. La conformació i possible paper dels 3 tipus d'interacció actina-miosina són explicats a la següent secció.

1.4. Models de generació de força

La clau per al coneixement dels principis de la funció muscular és la comprensió del mecanisme de generació de força. Després dels primers models proposats, que postulaven una estructura que es torçava o s'enrotllava segons la longitud del múscul, les observacions en microscopia electrònica a la dècada 1950 van aclarir la composició proteica de les bandes i els seus canvis durant l'estimulació. S'evidencià que les miofibril·les consisteixen en dos tipus de filaments que s'entrecreuen [HE Huxley, 1953], i que la banda A, l'única banda que conté miosina [Hasselbach, 1953; Hanson i HE Huxley, 1953], no canvia de longitud quan s'estira o s'escurça el sarcòmer [AF Huxley i Niedergerke, 1954; HE Huxley i Hanson, 1954], mentre que les longituds de la zona H i de la banda I varien proporcionalment al canvi de longitud del múscul.

Aquestes observacions van ser explicades independentment per dos grups [HE Huxley i Hanson, 1954; AF Huxley i Niedergerke, 1954], que proposaren el principi bàsic de la contracció muscular: el model de filaments entrecreuats (*sliding filament model*, figura 1.16). El model, ara com ara acceptat unànimament, postula que la contracció s'origina pel progressiu entrecreuament dels filaments prim amb els gruixuts.

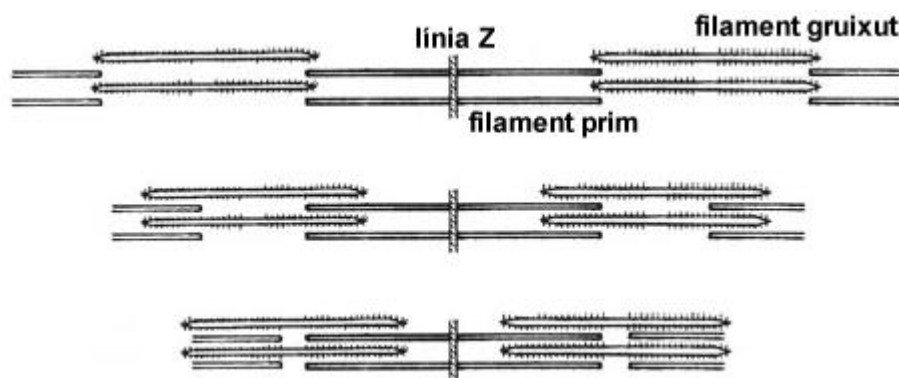


Figura 1.16. Principi del model de filaments entrecreuats: el solapament dels filaments prim (en el centre de la figura i representats amb el disc Z que els uneix) i els filaments gruixuts determina la longitud del sarcòmer i del múscul [Gordon *et al.*, 1966].

El model dels filaments entrecreuat donà un marc estructural bàsic de la funció muscular, però no resol el fonament bioquímic i mecànic últim de la contracció. Dins d'aquest marc general, s'han anat desenvolupant diferents models, dels quals farem seguidament un resum històric, que concreten la interacció entre els dos filaments.

1.4.1. Model de generadors independents (1957)

El primer dels models proposats és el de generadors de força independents (*independent force generators*) [AF Huxley, 1957]. La formulació del model va ser inspirada en: (a) el descobriment de projeccions del filament gruixut apuntant cap al filament prim, els anomenats ponts o *crossbridges*, després identificats com caps de miosina, i (b) l'observació que la tensió i la velocitat d'escurçament amb una càrrega donada depenen del grau de solapament entre filaments [Ramsey i Street, 1940; Jasper i Pezard, 1934], però no en depèn la velocitat màxima a càrrega nul·la [Gordon *et al.*, 1966].

El model, a grans trets, postula un sistema de contracció basat en un conjunt de generadors de força distribuïts per tot el filament que exerceixen força entre els filaments en la direcció de l'escurçament (figura 1.17a). Se suposa que aquests elements estan connectats elàsticament al filament gruixut i operant en un cicle de dos estats, enllaçat i lliure, caracteritzat per dues constants $f(x)$ i $g(x)$ d'associació i dissociació, que depenen de la posició, (figura 1.17b). En el primer estat del cicle, els caps de miosina s'enllacen al llocs actius del filament prim quan $f > g$, que es dona en les x positives. En el segon estat, els filaments enllaçats tenen un desplaçament relatiu entre ells que situa a l'element de força en posicions de x negatives, en què la constant de dissociació g és molt més gran que f i per tant l'enllaç es desfà, i el cicle pot tornar a començar (figura 1.17b).

El model de generadors independents va poder explicar satisfactòriament l'equació de Hill, que relaciona la força i la velocitat, i la relació entre la càrrega i l'energia alliberada [Julian, 1969].

Amb tot, algunes dades semblaven contradir la teoria. D'una banda, l'energia alliberada i la velocitat d'ATPasa comencen a decréixer amb la velocitat d'escurçament quan aquesta és aproximadament la meitat de la velocitat màxima V_0 [Hill, 1964; Homsher *et al.*, 1981]. Això no hauria de ser així segons el model, que prediu un creixement continu de l'energia alliberada i de la velocitat d'ATPasa amb la velocitat d'escurçament. Per solucionar-ho, es van proposar dues etapes, la primera reversible i la segona amb la hidròlisi d'ATP que provoca un cop de força, o *power stroke* [AF Huxley, 1973]. D'aquesta manera, alguns cicles no es completen amb les dues etapes i no desenvolupen força, i solament ho poden fer els cicles amb una energia tèrmica alta en la distribució de Boltzmann [Bagshaw, 1993]. El decreixement de l'energia alliberada s'explica així perquè una velocitat d'escurçament massa gran reduiria també el temps de què disposa el cap de miosina per moure's del primer estat al segon, i per tant els caps serien incapaços de fer el cicle prou ràpidament com per enllaçar-se a les actines.

Un problema que aquesta modificació afegeix en el model és la dificultat que presenta per explicar la rapidesa del cicle, atès que aquest és dirigit solament per l'estat tèrmic del cap de miosina.

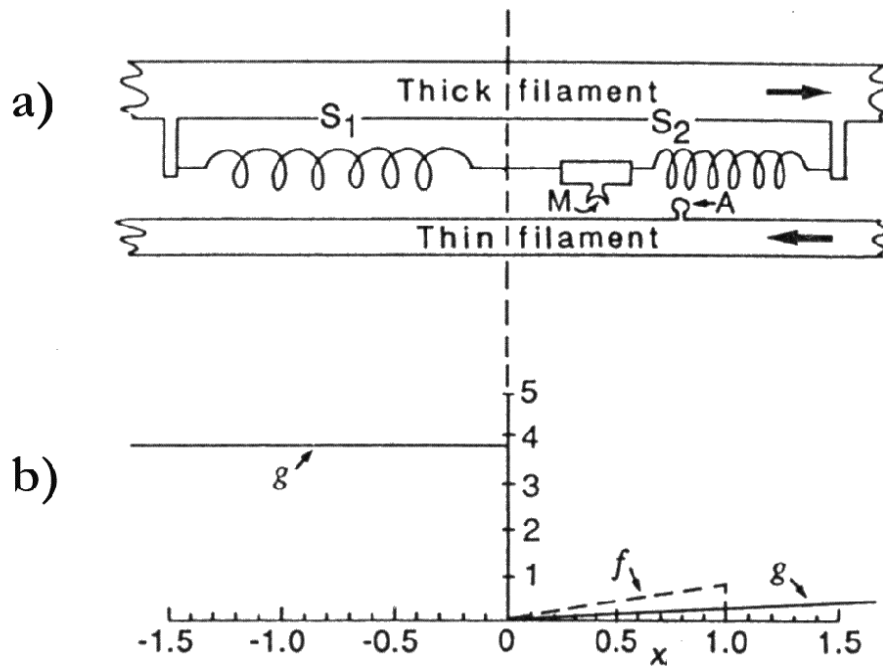


Figura 1.17. Esquema del mecanisme del model de generadors independents. a) Analogia mecànica del model: l'element de força (cap de miosina, M) és acoplat al filament gruixut per dues molles, S_1 i S_2 . El punt d'ancoratge A permet enllaçar els dos filaments i produir el seu lliscament. b) Valor de les constants d'associació f i de dissociació g entre els dos filaments en funció de la longitud de l'element elàstic [HE Huxley, 1957].

D'altra banda, un altre problema del model són els canvis transitoris en la longitud d'un feix de fibres quan hi ha un canvi sobtat en la càrrega [Podolsky, 1960; Civan i Podolsky, 1966]. Aquest efecte, però, va ser modelat suposant un temps d'espera entre l'enllaç del cap de miosina a l'actina i el seu alliberament [White i Thorson, 1973], si bé el temps d'espera postulat té la conseqüència indesitjada de predir un augment no observat en el nombre d'enllaços a altres velocitats d'escurçament.

1.4.2. Model de caps rotants (1969)

Els problemes mencionats i els nous experiments de microscòpia electrònica van portar a la formulació del model de caps rotants, (*tilting head model* o *swinging crossbridges model*) [Reedy *et al.*, 1965; HE Huxley, 1969]. Els nous experiments van mostrar com els caps de miosina, també anomenats *crossbridges* en el model, es projecten perpendicularment a l'eix del filament en l'estat de descans (*rest*) i amb un angle de 45° en l'estat de rigor. Segons el model, els caps de miosina, en la seva funció de ponts o *crossbridges* entre els filaments primis i gruixuts, són els elements actius que generen força mitjançant el seu moviment rotacional. Els caps de miosina actuarien de manera asíncrona com a generadors de força independents i, amb la hidròlisi d'una molècula d'ATP, produirien un cop de força (*power stroke*). Aquest seria el responsable del desplaçament relatiu dels filaments [HE Huxley, 1969], anàlogament a l'avançament d'una embarcació impulsada per remers descoordinats entre ells.

El model fou plenament compatible amb una sèrie d'importants experiments mecànics [AF Huxley i Simmons, 1971] en els quals es va fer canviar instantàniament la longitud del múscul en tensió (figura 1.18a). L'experiment semblava mostrar que la causa de la rotació dels caps de miosina era la presència d'elements elàstics i d'elements elàstics esmorteïts, a semblança d'un element de Voigt. Es va postular que cada cap de miosina podia incloure ambdós elements, situats en diferents parts del cap [AF Huxley, 1974].

L'experiment es descriu a continuació. En l'estat inicial, el múscul desenvolupa una tensió T_0 o P_0 i té una longitud L . Instantàniament, s'escurça la longitud del múscul en DL i, per tant, es redueix la tensió de T_0 a T_1 (figura 1.18a). S'obté així la corba T_1/T_0 (figura 1.18b) que dona la tensió T_1 en funció del canvi de longitud. La relació és lineal, i segueix la llei de Hooke anàlogament a una molla, fet pel qual es postulà l'existència de l'element elàstic en els caps de miosina, possiblement situat en el punt d'unió entre el cap de miosina i el filament gruixut, responsable de l'acció mecànica del desplaçament relatiu dels filaments. En aquest model de la funcionalitat del cap de miosina, però, s'assumeix que tota l'elasticitat de les fibres rau en els caps de miosina i que, per tant, els filaments són inextensibles. Aquest punt no ha estat confirmat per experiments posteriors (vegeu la secció 1.4.5.1).

Continuant amb l'experiment, després del canvi de longitud instantani la tensió es recupera, i s'assoleix un *plateau* a una tensió T_2 . La corba T_2/T_0 (figura 1.18b), mostra una tensió constant per petits canvis, per la qual cosa s'induí l'existència d'un altre element, esmorteïdor i no elàstic, en el cap de miosina. La corba de la tensió (T_0 , T_1 i T_2), finalment, té l'aspecte d'un element de Voigt, en què un element elàstic està en sèrie amb una combinació en paral·lel d'un element elàstic i un element elàstic esmorteït [Jung, 1988].

Aquest experiment conclou dues idees clau. D'una banda, el moviment pel qual el *crossbridge* realitza treball mentre està enllaçat es dona en un nombre reduït d'estats d'enllaç que tenen una energia d'enllaç progressivament més gran (figura 1.19a). D'altra banda, hi ha una elasticitat virtualment instantània en l'enllaç que permet passar d'un estat d'enllaç al següent sense un desplaçament relatiu dels dos filaments.

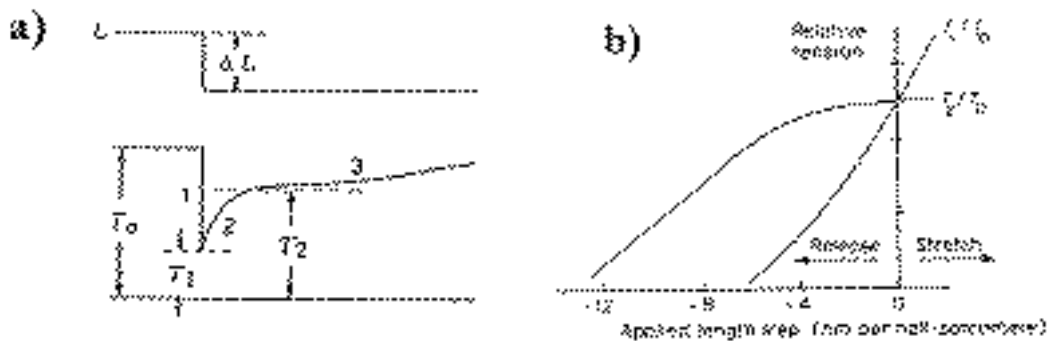


Figura 1.18. Experiments de Huxley i Simmons (1971). En registrar les tensions T_1 i T_2 per diferents canvis de longitud del múscul (a) s'obtenen les corbes T_1/T_0 i T_2/T_0 (b), compatibles amb l'existència d'un element elàstic i d'un altre element elàstic esmorteït, respectivament, en el cap de miosina.

El resultat de l'experiment no demostra el model de caps rotants, si bé n'és plenament compatible. Efectivament, el múscul estimulat dona una tensió T_0 perquè, segons els experiments de caps rotants i els experiments de Huxley i Simmons, l'element elàstic està tensat, amb un angle d'inclinació sobre el filament d'actina de probablement ca. 90° . Després d'un escurçament sobtat, els filaments es desplacen l'un respecte l'altre i l'element elàstic allibera energia, que dona peu a l'establiment d'enllaços més estables. Els nous enllaços provoquen una rotació del cap de miosina, que s'orienta a 45° del filament, fent tensar altre cop l'element elàstic i generant la tensió T_2 . El punt clau del procés és la transducció d'energia de l'element elàstica energia de l'enllaç entre l'actina i la miosina (figura 1.19b).

Huxley i Simmons van trobar que l'element elàstic es descarrega totalment (zero de la corba T_1/T_0 de la figura 1.18b) quan l'escurçament és de ca. 6 nm per mig sarcòmer, fet que indica que la constant elàstica característica és ca. $K = 6 \text{ nm}/T_0$. Igualment, amb un escurçament del sarcòmer de ca. 13 nm, la corba T_2/T_0 s'anul·la, i suggereix que l'escurçament és suficient com per mantenir l'element elàstic sense tensió fins i tot després d'establir els nous enllaços més estables. Aquest valor representa, per tant, la distància màxima que pot recórrer un cap de miosina enllaçat a una mateixa actina, és a dir, la distància del cop de força, o *step size*. Més recentment, la reproducció d'aquest experiment amb nous mitjans tècnics ha donat uns valors més reduïts de 3.6 nm/ T_0 i 10.5 nm per les dues corbes T_1 i T_2 , respectivament [Piazzesi *et al.*, 1995].

El model de caps rotants, amb progressives i importants modificacions, s'ha mantingut molt popular entre la comunitat científica. Les seves discrepàncies amb alguns experiments i les posteriors modificacions del model a què han donat lloc són discutides a la secció 1.4.5.

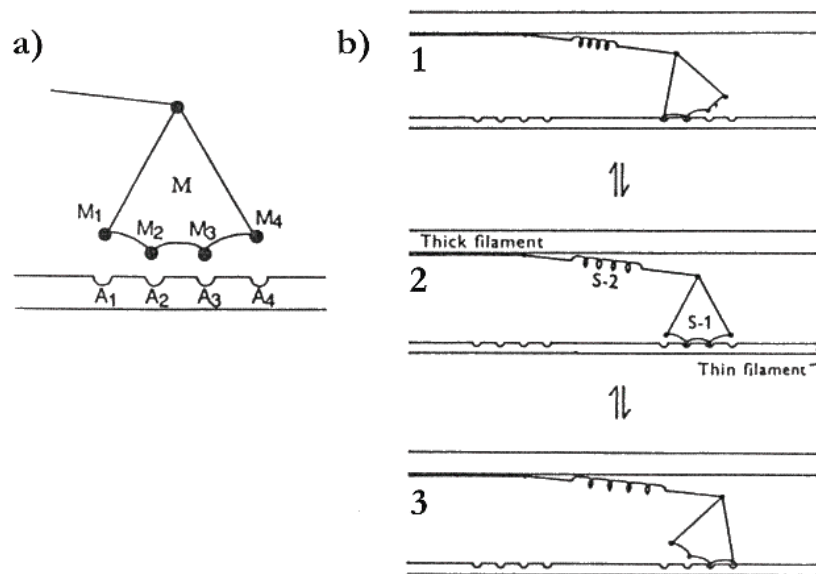


Figura 1.19. Mecànica de la contracció muscular segons el model de *swinging crossbridges*. a) El cap de miosina conté diversos punts d'enllaç (en aquest exemple 4 enllaços, M_1 - M_4) específics per alguns punts del filament d'actina (A_1 - A_4), amb una energia d'enllaç progressivament més gran. L'element elàstic (S-2) es suposa localitzat en el braç del cap de miosina. b) L'energia del sistema es conserva al passar de l'estat d'enllaç dèbil (1) a l'estat de tensió (3), on l'increment d'energia elàstica és compensat per una energia lliure de l'enllaç més negativa, via el pas successiu per diferents estats d'energia com més va més baixa (2).

1.4.3. Models basats en canvis en l'actina

Paral·lelament a l'anterior model, l'estructura flexible i helicoidal del filament d'actina ha inspirat models basats en canvis estructurals en el filament prim a partir de la hidròlisi d'ATP [Hanson i Huxley, 1955; Asakura *et al.*, 1963], en lloc de canvis en el cap de miosina.

Un model recent proposa el canvi d'una estructura helicoidal del filament d'actina (h-actina) a una estructura en cinta (r-actina, de *ribbon*), trobada en cristalls d'actina:profilina [Schutt *et al.*, 1989], com el generador de tensió i de canvi de longitud del múscul [Schutt i Lindberg, 1992]. Segons aquest model, quan un cap de miosina s'enllaça al filament de h-actina en l'estat ADP·Pi, el filament pateix un canvi conformacional i passa a ser r-actina.

Segons el model, el canvi de conformació de l'actina es dona perquè l'enllaç r-actina-miosina és més estable que l'enllaç h-actina-miosina. Això és així ja que els dos filaments que formen són commensurables i, per tant, tots els caps poden assolir la situació de mínima energia al mateix temps. Finalment, el canvi de h-actina a r-actina tensa la tropomiosina, que transmet la tensió al disc Z i a tot el sarcòmer. L'escurçament ocorre quan el filament torna al seu estat helicoidal, més curt.

El model explica raonablement les dades mecàniques, i prediu amb encert alguns resultats de difracció de raigs X, com l'augment en la periodicitat de la línia de difracció 6A i un debilitament de la primera *layer line* (vegeu el capítol 2). De tota manera, el model necessita més estudis sobre l'evidència de la r-actina en el múscul actiu i la transició entre els dos estats de l'actina, entre d'altres aspectes.

1.4.4. Noves tècniques

Durant les dècades del 1970 i del 1980, els models de contracció i, especialment, els moviments que predeia el model de caps rotants (rotació del cap de miosina), van intentar ser unívocament provats mitjançant sofisticades tècniques biofísiques, entre les quals hi havia EPR, espectroscòpia de fluorescència, FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) difracció de raigs X i neutrons o birefringència [Block, 1996]. Malgrat tot, aquests mètodes es mostren limitats i no han portat, almenys fins a l'estat actual, a conclusions inequívokes.

En la dècada 1990 han aparegut o millorat tres fonts d'informació importants: la cristal·lografia de proteïnes, la difracció a angles baixos (*small angle X-ray scattering*, SAXS), i els experiments de mobilitat de proteïnes *in vitro*.

En primer lloc, la cristal·lografia de proteïnes s'ha desenvolupat mitjançant una gran millora de les tècniques i les fonts de raigs X disponibles, i ha permès resoldre les estructures atòmiques de l'actina [Kabsch *et al.*, 1990; Schutt *et al.*, 1993; McLaughlin *et al.*, 1993] i del fragment S1 de la miosina [Rayment *et al.*, 1993a] a alta resolució. A partir d'aquestes estructures i de les del filament d'actina (resolt a més baixa resolució per difracció de raigs X) i del complex actomiosina (resolt per microscòpia electrònica) s'han pogut formular models a escala atòmica del filament d'actina, tant aïllat [Holmes *et al.*, 1990], com decorat amb els caps de miosina en estat de rigor [Rayment *et al.*, 1993b; Schröder *et al.*, 1993].

En principi, la cristal·lografia de proteïnes permet tenir indicis de les conformacions que pot adoptar el cap de miosina en les diferents etapes del cicle amb l'ús de compostos

anàlegs al nucleòtid associat a cada estat. Uns resultats concloents en aquest sentit establirien la relació entre els canvis conformacionals i bioquímics en la miosina, i es donaria un pas fonamental en el coneixement de la contracció. Això no obstant, hi ha dificultats per establir resultats concloents en aquesta direcció, ja que, en general, cal l'ús de caps de miosina truncats (únicament amb el domini motor) en lloc de tot el subfragment S1 per facilitar la cristal·lització [Fisher *et al.*, 1995]. A més, hi ha discrepància en l'establiment de la correspondència entre els compostos anàlegs ($\text{Mg}\cdot\text{ADP}\cdot\text{BeF}_x$, $\text{Mg}\cdot\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4^-$, $\text{Mg}\cdot\text{ADP}\cdot\text{VO}_4$, $\text{Mg}\cdot\text{PPi}$) i el nucleòtid associat (ATP, $\text{ADP}\cdot\text{Pi}$) [Holmes, 1996; Dominguez *et al.*, 1998].

En segon lloc, l'ús de la difracció de raigs X a angles baixos amb llum de sincrotró en mesures amb resolució temporal i en músculs vius ha estat també molt efectiu per determinar aspectes estructurals importants, com la disposició dels caps de miosina en diferents estats musculars [HE Huxley *et al.*, 1980; Bordas *et al.*, 1993; Martín-Fernández *et al.*, 1994], o mecànics, com l'elasticitat del filament prim [Wakabayashi *et al.*, 1994; HE Huxley *et al.*, 1994; Bordas *et al.*, 1999]. Actualment, l'aparició d'instal·lacions de llum de sincrotró de tercera generació i de detectors més eficients permeten augmentar la resolució i l'escala temporal dels experiments fins a valors significatius en l'escala de temps de les reaccions involucrades en la contracció.

Finalment, la tercera font d'informació important de la dècada ha estat la millora dels experiments de mobilitat de les proteïnes *in vitro* mitjançant instrumentació làser, bé a través de trampes òptiques (*optical tweezers*) [Svoboda *et al.*, 1993; Molloy *et al.*, 1995], bé a través de microganxos (*fine glass microneedles*) [Ishijima *et al.*, 1994]. Amb aquestes tècniques, s'ha estimat que sola interacció amb el filament d'actina provoca un desplaçament del cap de miosina d'entre 5 nm i 25 nm, i genera una gorça d'entre 1 pN i 5 pN, depenent dels estudis. El punt clau que provoca aquesta disparitat de valors és la consideració de si la hidròlisi d'una sola molècula de ATP correspon a un esdeveniment mecànic (és a dir, el desplaçament del cap) o bé a diferents passos enregistrats en el procés [Yanagida *et al.*, 1993; Finer *et al.*, 1994].

1.4.5. Estatus actual

El model de caps rotants [Huxley, 1969; Huxley i Simmons, 1971], que explica el comportament mecànic del *crossbridge* (que és el nom donat a l'enllaç actina-miosina en el model) i el relaciona amb el balanç de l'energia en el cicle, s'ha consolidat com el model de contracció muscular més a bastament acceptat per la comunitat científica, en detriment d'altres models de generació de força, basats igualment en el concepte de *crossbridge*, però que assumeixen diferents mecanismes [Davies, 1963; Gray i Gonda, 1977; Harrington, 1979; Huxley i Kress, 1985]. L'objectiu perseguit en els experiments des de la formulació del model ha estat l'observació de la rotació dels caps de miosina durant el cicle de contracció i la mesura de l'avançament del cop de força en cada cicle del cap de miosina. L'evidència experimental que n'ha resultat de les dues mesures ha estat equívoca, i presenta dificultats per encaixar amb el model.

1.4.5.1. Dificultats del model de caps rotants

La principal dificultat del model ha estat la no observació per difracció de raigs X de la idea central del model, és a dir, de la rotació dels caps de miosina en músculs actius [Tsukita i Yano, 1985; Hirose i Wakabayashi, 1993; Wakabayashi *et al.*, 1993; Martín-Fernández *et al.*, 1994]. El nombrós corpus experimental obtingut mitjançant difracció de raigs X en els estats musculars de descans i contracció isomètrica porta a la conclusió que,

o bé la fracció de caps de miosina que realitzen la rotació és molt baixa, o bé la major part de la seva massa no rota [Goody i Holmes, 1983; Cooke, 1986; Bordas *et al.*, 1992].

El segon punt important del model de caps rotants encara no resolt és la determinació precisa de l'avançament que produeix el cop de força, o *step size*. Mitjançant l'ús, en la major part de les mesures, de tècniques de trampes òptiques, hom ha mesurat valors de l'avançament del cop de força de 4-6 nm [Molloy *et al.*, 1995; Mehta *et al.*, 1997], de 8 nm [Toyoshima *et al.*, 1990], de 10-20 nm [Finer *et al.*, 1994; Ishijima *et al.*, 1996; Guilford *et al.*, 1997], de 20-30 nm [Yanagida, 1985; Uyeda *et al.*, 1990] i fins i tot de més de 200 nm [Harada *et al.*, 1990]. Les discrepàncies probablement són degudes tant a artefactes que provenen del muntatge experimental com a la pròpia definició de cop de força, identificat de manera diferent segons el tipus d'efecte: bioquímic, mecànic, etc. Els darrers experiments, també discrepants, estableixen un valor de l'avançament del cop de força de 5.3 nm mitjançant les tècniques de trampes òptiques [Kitamura *et al.*, 1999; Ruff *et al.*, 1999], i d'aproximadament 10 nm per mitjà de la difracció de raigs X amb resolució temporal [Dobbie *et al.*, 1998] o per estructures del cap de miosina o del seu domini motor obtingudes amb diferents anàlegs [Holmes, 1997; Dominguez *et al.*, 1998].

Finalment, el model conté la suposició que tota o la major part de l'elasticitat del sarcòmer està continguda en l'element elàstic del cap de miosina i, per tant, que els filaments són rígids [Ford *et al.*, 1981]. Aquesta suposició és contradita per algunes observacions obtingudes per difracció de raigs X [Bordas *et al.*, 1993; Wakabayashi *et al.*, 1994; HE Huxley *et al.*, 1994; Bordas *et al.*, 1999], microscòpia electrònica [Julian i Morgan, 1981; Bagni *et al.*, 1990] i nanomanipulació *in vitro* [Kojima *et al.*, 1994]. En incloure l'elasticitat dels filaments en el model i resoldre així la dificultat, la corba T_z/T_0 que en resulta no s'ajusta a les dades experimentals [Huxley i Tideswell, 1996; Forcinito *et al.*, 1997].

Darrerament s'ha suggerit que la diferent configuració i estat d'enllaç de cadascun dels caps de miosina en un parell pot reconciliar el model amb les observacions anteriors [Huxley i Tideswell, 1997]. En aquest sentit, creiem que aquest treball aporta noves dades que poden aclarir la qüestió.

1.4.5.2. Model del braç de palanca

Aquestes dificultats han portat a la reformulació del model de caps rotants. Atès que la major part de la massa no pot rotar, la hipòtesi per salvar el model és que la interacció actina-S1 té una sola geometria estàndard, i que els grans canvis conformacionals del cap es limiten a l'orientació de la part distal del cap, propera a l'esquelet del filament gruixut. Segons el model, aquesta part distal del cap de miosina actua d'aquesta manera de *braç de palanca* (figura 1.20), que amplifica petits canvis en el domini motor provocats pels processos bioquímics de la hidròlisi de l'ATP o de l'alliberament dels seus productes ADP i Pi [Spudich, 1994]. La palanca, accionada amb els canvis que origina la hidròlisi de l'ATP, faria així avançar la resta del cap de miosina, i el filament prim en cas que hi estigui enllaçat.

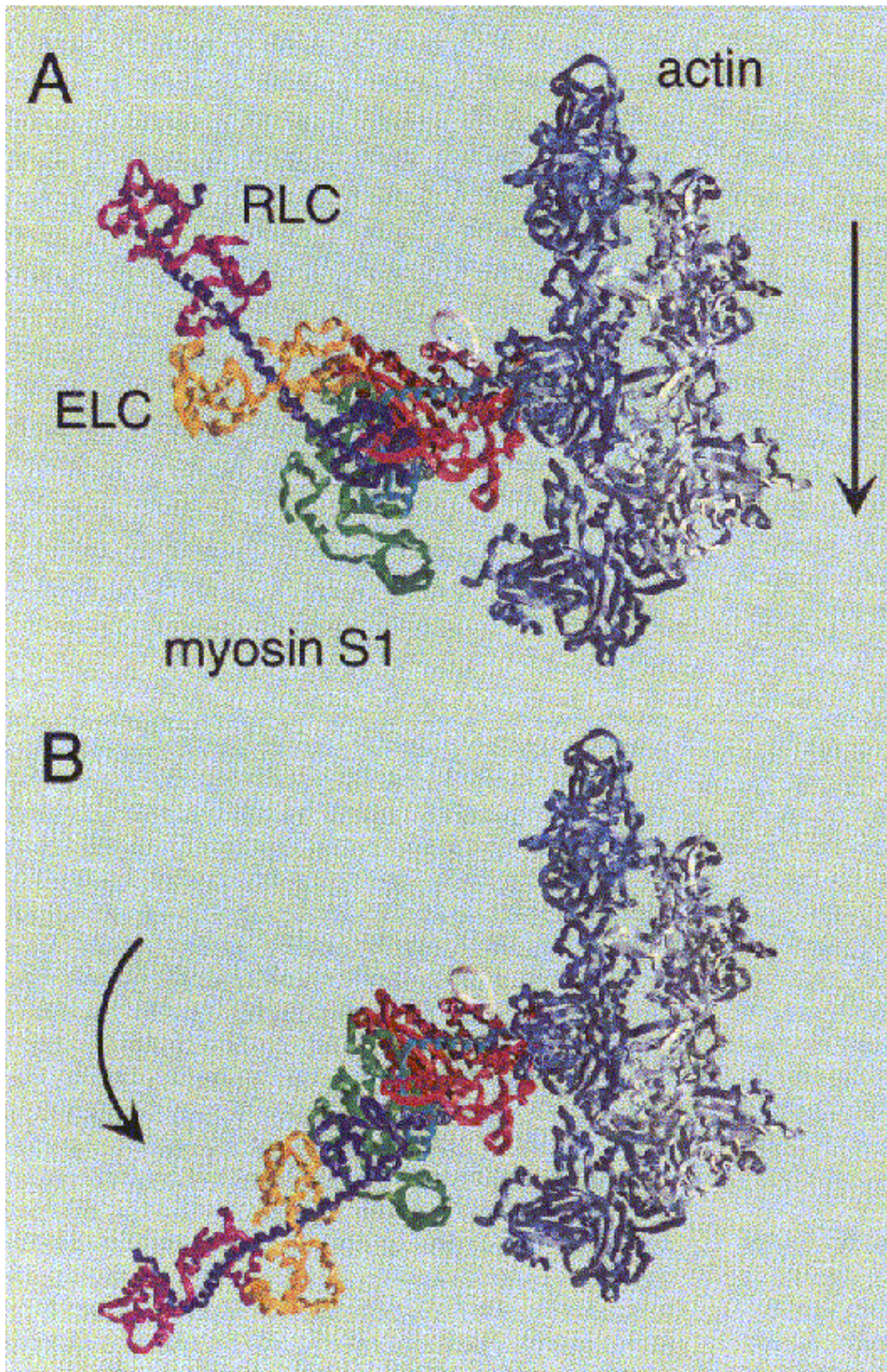


Figura 1.20. Conformació de la miosina abans (A) i després (B) del cop de força segons el model de braç de palanca. Els 5 monòmers apareixen en blanc, i la coloració dels dominis de la miosina és la de la figura 1.6. La miosina es mou respecte de l'actina en la direcció de la fletxa recta [Block, 1996].

La resolució de l'estructura del cap de miosina [Rayment *et al.*, 1993a] ha representat una prova circumstancial posterior i ha popularitzat aquest nou model fins convertir-lo en l'acceptat per la major part de la comunitat científica. En l'estructura del cap de miosina

s'observa que el coll del cap (la part distal del cap respecte del filament d'actina) està formada per una llarguíssima α -hèlix de 8.5 nm que forma part de la MHC i que es manté rígida a causa de les seves interaccions amb les cadenes lleugeres ELC i RLC. Per tant, el cap de miosina sembla tenir les condicions mecàniques necessàries per a actuar efectivament com a braç de palanca. La presència de dos grups sulfhídrics reactius en les cisteïnes CYS707 i CYS697 (anomenats SH1 i SH2, respectivament), localitzades en la suposada base del braç de palanca i a prop del punt d'enllaç amb l'ATP, fa pensar també que hi ha grans canvis conformacionals en la part distal del cap associats als canvis bioquímics. El pivot de la rotació podria estar situat a l'aminoàcid GLY699 de la cadena, donat que la mobilitat del cap de miosina observada en experiments *in vitro* disminueix d'un factor 100 amb la seva mutagènesi per alanina [Kinose *et al.*, 1996].

Igualment, els experiments en trampes òptiques han assenyalat una dependència lineal molt clara de l'*step size* amb la longitud del braç de palanca, modificada amb la substitució de les cadenes primitives per motius rígids d'a-actinina de longitud variable [Ruff *et al.*, 1999]. Aquesta dependència lineal aporta una nova prova circumstancial al model de braç de palanca, per bé que no demostra que aquest sigui l'element actiu de la contracció.

En resum, a pesar del corpus d'informació bioquímica i biofísica, especialment de la molècula de miosina, i de la informació circumstancial a favor del model de braç de palanca, la qüestió fonamental que plantejàvem a l'introducció, això és, l'origen de la generació de força i moviment, continua sense resposta clara i indiscutida. Fins i tot es pot afirmar que no hi ha consens unànim sobre si el moviment és produït per canvis en el cap de miosina (el model acceptat actualment per la gran majoria de la comunitat científica) o per canvis de forma del filament d'actina com els exposats a la secció 1.4.3. Les dues possibilitats són, en principi, formalment possibles. L'avançament del cap de miosina en un cop de força, amb valors reportats que, com hem esmentat a la secció 1.4.5.1, varien dels 4 nm fins als 30 nm i àdhuc els 200 nm, o l'equivalència dels compostos anàlegs en les estructures cristal·lines del cap de miosina, que repercuteix en l'acoblament del model mecànic i el bioquímico (vegeu la secció següent) són qüestions rellevants de la contracció muscular que encara resten per aclarir.

1.4.6. Model bioquímico de la contracció muscular

El model de filaments solapats i els models mecànics posteriors que se'n deriven requereixen del seu equivalent bioquímico per explicar totalment el procés de contracció muscular, és a dir, quines reaccions vénen associades als canvis conformacionals, principalment del cap de miosina.

L'energia necessària per portar a terme els canvis estructurals, independentment de quins siguin, és obtinguda a través del cicle d'hidròlisi d'ATP, que es realitza amb una freqüència de ca. 20 s^{-1} per molècula de miosina en el múscul actiu. Malgrat que l'ATP s'enllaci solament amb la miosina, els estudis cinètics *in vitro* de molècules de miosina aïllades donen una freqüència de tan sols ca. 0.1 s^{-1} [Szent-Gyorgi, 1951; Hasselbach, 1952; Eisenberg i Moos, 1968]. De tota manera, amb l'agregació de filaments de F-actina a la miosina, la freqüència del cicle augmenta 200 vegades, un valor similar al del múscul actiu (de fet, l'actina fou així anomenada perquè *activava* la miosina). Aquest augment de la velocitat del cicle fa que no es pugui parlar pròpiament de la funció ATPasa de la miosina sinó del complex actomiosina (*actomyosin*), que es forma de la unió de les dues proteïnes. La catalisi és deguda a que la miosina aïllada hidrolitza ràpidament l'ATP però, en canvi, allibera molt lentament els productes ADP+Pi. L'actina actua en el procés i

l'accelera enllaçant-se al complex miosina-ADP-Pi i estimulant l'alliberament del Pi, primer, i de l'ADP, posteriorment. El complex miosina-ADP-Pi no pot ser format simplement mesclant els seus components, fet que suggereix que aquest complex és un pas intermig d'alta energia, en què s'ha conservat l'energia lliure que ha donat la hidròlisi de l'ATP [Voet, 1995].

Les anteriors observacions van portar a un model del cicle de la hidròlisi de l'ATP catalitzada per l'actomiosina [Lymn i Taylor, 1971] basat en 4 passos (figura 1.21).

1. Partint del complex actomiosina, una molècula d'ATP s'enllaça al punt d'enllaç que té la miosina, fet que provoca la dissociació de l'actina i la miosina. La velocitat de reacció és alta.
2. L'ATP enllaçat amb la miosina és hidrolitzat ràpidament, per formar un complex miosina-ADP-Pi estable d'alta energia. La velocitat de reacció també és alta.
3. L'actina s'enllaça finalment amb el complex miosina-ADP-Pi. Aquest és el pas que limita la rapidesa del cicle, a causa de la lenta velocitat de la reacció.
4. El complex actina-miosina-ADP-Pi allibera progressivament el Pi i l'ADP acompanyat de canvis estructurals. Es forma el complex actomiosina i es torna al pas 1.

Si bé els passos del cicle de la hidròlisi de l'ATP estan prou establertes, no es té un coneixement precís ni de les constants cinètiques del cicle ni de l'acoblament d'aquest als canvis estructurals associats a cada pas.



Figura 1.21. Seqüència de reaccions de la hidròlisi de l'ATP catalitzada per l'actomiosina.

En aquest sentit, hi ha diverses propostes. Segons diverses evidències estructurals per difracció de raigs X [Matsubara i Yagi, 1978; Huxley, 1979], el desenvolupament de tensió implica l'existència de dos estats d'enllaç actina-miosina, un de dèbil i un de fort (*weak* i *strong binding state*), i la transició essencialment unidireccional del primer al segon. Els estudis mostren que les intensitats de les reflexions equatorials (vegeu la secció 2.2) canvien abans de desenvolupar la tensió, fet que indica un moviment de masses des de les

proximitats del filament gruixut a les del filament prim causat per l'enllaç dels caps de miosina a l'actina [Yagi *et al.*, 1998].

Els estudis posteriors [Harford i Squire, 1992], també de difracció de raigs X, també semblen indicar l'existència d'aquests dos tipus d'enllaç entre miosina i actina i la seva natura. El primer, dèbil i no estereoespecífic, es dona en la primera fase del procés, mentre que el segon, fort i estereoespecífic, és present en la fase final del desenvolupament, tot acompanyant la generació de força. El fet que l'enllaç fort sigui estereoespecífic implica que la regió del cap de miosina que s'enllaça amb l'actina té una geometria específica i característica relativa al monòmer d'actina al qual s'enllaça. Així, l'orientació del cap de miosina és única i característica i, per tant, la seva determinació és clau per al coneixement de la contracció muscular.

La presència de dos tipus d'enllaç comporta que l'alliberament de la miosina del filament d'actina no sigui un pas obligatori en la hidròlisi de l'ATP, un fet que no pot ser explicat pel cicle de Lymn-Taylor, d'una sola via. En el nou model bioquímic que sorgí per donar cabuda als resultats [Eisenberg i Green, 1980], cada cicle no està lligat a una cadena de passos, sinó que el cap de miosina alterna entre una conformació amb enllaç dèbil i una altra amb enllaç fort. L'orientació en equilibri del cap de miosina unit al filament d'actina amb un enllaç dèbil és de 90° respecte a aquest, mentre que amb un enllaç fort és de 45°. Quan un cap de miosina passa de l'enllaç dèbil al fort, l'orientació roman en la posició d'equilibri del primer, és a dir 90°, fet que origina una tensió. Aquesta tensió es resol alliberant l'energia i provocant el lliscament relatiu dels filaments fins assolir la posició d'equilibri [Holmes, 1995].

1.5. Conclusions

La conjunció de les dades del cicle mecànic i del cicle bioquímic ha de portar finalment a l'elaboració d'un model complet del procés de contracció que expliqui els processos fisiològics, bioquímics i estructurals que es donen al sarcòmer durant la contracció, així com el paper de les diferents proteïnes involucrades. De tota manera, la major dificultat per assolir aquest objectiu prové de la contradicció entre les conclusions extretes de la gran quantitat de tècniques i experiments realitzats [Block, 1996].

Tal com hem discutit a la secció 1.4, les discrepàncies apareixen tant a nivell bioquímic, especialment en el nombre de molècules de ATP per cicle i les constants cinètiques, com estructural, en particular en el moviment de la part distal del cap de miosina o els moviments en el filament d'actina. Tot plegat ha comportat la formulació de diferents models, amb més o menys diferències entre ells [Schutt i Lindberg, 1992; Rayment i Holden, 1994; Spudich, 1994; Piazzesi i Lombardi, 1995]. En les figures 1.22 i 1.23 es mostren dos models del cicle de contracció basats en el model mecànic del braç de palanca [Rayment i Holden, 1994; Spudich, 1994]. Les diferències es centren en la correspondència que té cada pas del cicle bioquímic en els canvis conformacionals del cap de miosina.

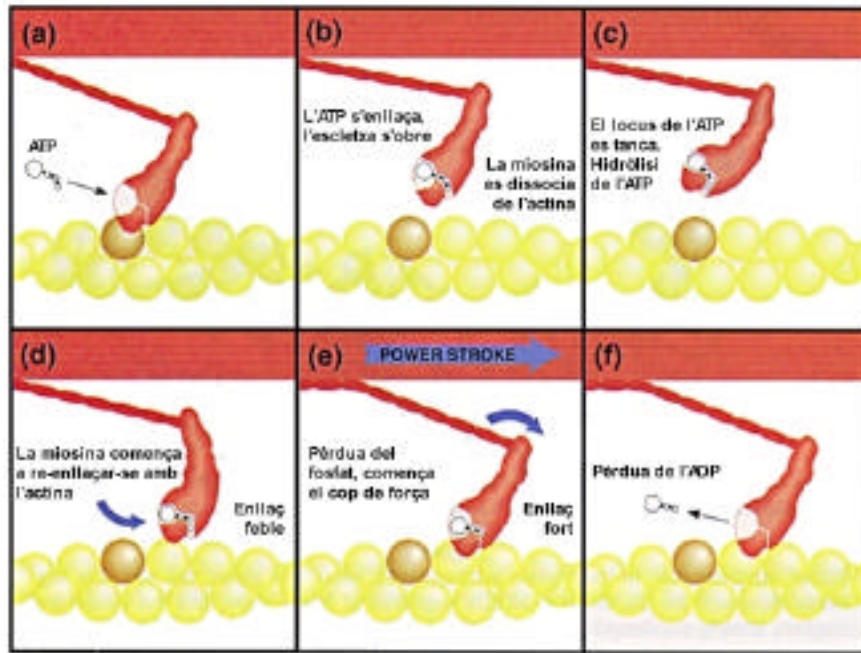


Figura 1.22. Model de cicle de contracció muscular [Rayment i Holden, 1994]. El cicle s'esdevé de (a) a (f), si bé per a cada reacció hi ha una constant d'equilibri que permet la reacció en sentit invers. El cap de miosina (vermell) pateix una sèrie de canvis estructurals provocats per la hidròlisi de l'ATP, que perd el fosfat (Pi). La part proximal al filament prim (groc) del cap de miosina, el domini motor, no canvia d'orientació, mentre que la part distal, el coll del cap, fa la funció de braç de palanca que amplifica el cop de força, o *power stroke* (e).

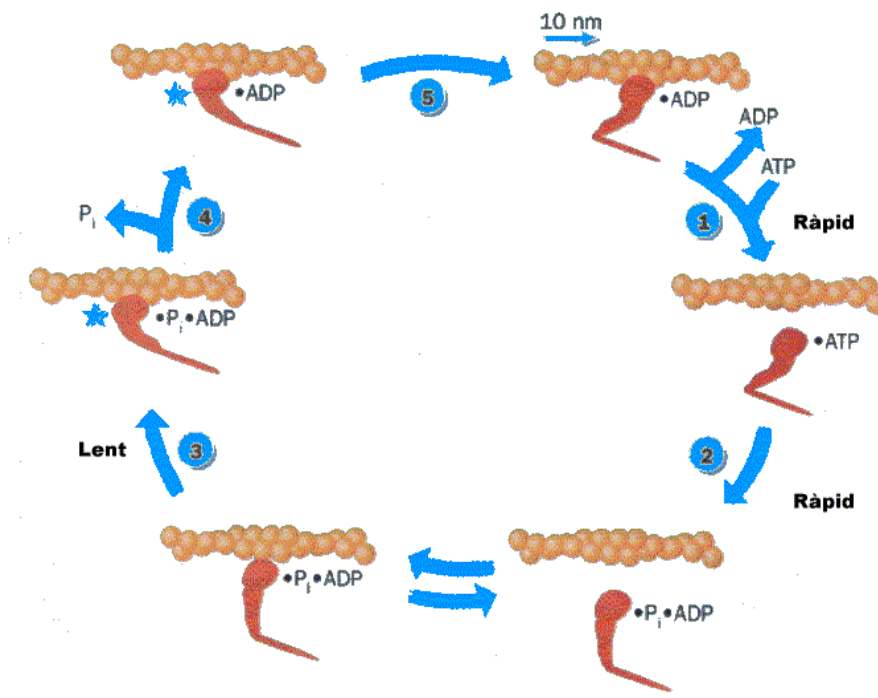


Figura 1.23. Model de cicle de contracció [Spudich, 1994]. El cop de força, de 10 nm, és postulat en el pas 5. Les estrelles simbolitzen un estat excitat del cap de miosina. A l'igual del model anterior el cicle bioquímic de la hidròlisi de l'ATP provoca canvis conformationals solament en la seva part distal.

Malgrat els nombrosos punts on existeixen dubtes raonables sobre la natura i característiques de la contracció muscular, hi ha una sèrie de punts bàsics provats, i sobre els quals ens basarem per interpretar les dades. Aquests punts són:

1. La unitat de contracció en el múscul esquelètic és el sarcòmer, consistent en dos tipus de filaments, prims i gruixuts que s'interdigiten amb major o menor grau en escurçar o allargar el múscul.
2. La interdigitació té lloc a causa de la interacció entre actina i miosina, dirigida per l'activitat ATPasa del cap de miosina potenciada per l'actina,
3. La regulació o control de la interacció depèn de la concentració d'ions Ca^{2+} , que afecta al sistema troponina-tropomiosina del filament prim.
4. Els generadors de força del múscul són asíncrons i es comporten independentment.

Aquests punts seran acceptats com a fets certs. Si bé, amb aquests punts, el model mecànic de contracció no queda ben definit, són suficients per poder elaborar els resultats que es presenten en aquest treball i aportar noves dades sobre aquest model.