

DETERMINACION DE LA SECCION ECUATORIAL DEL PATRON DE DIFRACCION DE RAYOS-X DE MUSCULO VIVO DE TARANTULA

Hernando Sosa*, Nelly Panté** y Raúl Padrón

* Laboratorio de Biofísica del Músculo, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apdo. 21527, Caracas 1020-A, Venezuela.

** Brandeis University, Waltham, MA02254.

INTRODUCCION

La contracción muscular se produce por el deslizamiento relativo de los filamentos gruesos y delgados (2,6). Se ha propuesto que dicho deslizamiento es ocasionado por el movimiento de las cabezas globulares de las moléculas de miosina que forman los filamentos gruesos, los cuales pueden enlazarse y despegarse de los filamentos delgados de manera cíclica, hidrolizando ATP (5). La comprensión a nivel molecular del mecanismo generador de tensión en el músculo requiere conocer las conformaciones intermedias que presentarían las cabezas globulares de miosina en dicho ciclo contráctil. En músculo estriado es posible estudiar dichos estados intermedios mediante el análisis de la sección ecuatorial de su patrón de difracción de rayos-X, ya que esta sección da información de la distribución transversal de masa en el sarcómero (3,4). Así en diferentes preparaciones como músculo esquelético de vertebrado (4,8); músculo de vuelo de insecto (7) y músculo de cangrejo (11) se ha podido registrar, dependiendo del estado fisiológico del músculo, cambios significativos en las intensidades de al menos las dos reflexiones más internas (10 y 11 según la nomenclatura de Miller) del patrón ecuatorial. Utilizar preparaciones musculares de las cuales se tenga un conocimiento detallado de la estructura de los filamentos contráctiles; y específicamente de los filamentos de miosina, en la superficie de los cuales se encuentran las cabezas globulares de miosina, facilita el análisis de los patrones de difracción de rayos-X, permitiendo así la obtención de un modelo más exacto del mecanismo por el cual se genera tensión. En la actualidad la preparación muscular de la que se dispone de información a mayor resolución acerca de la estructura del filamento de miosina, es el músculo de tarántula, donde se ha logrado visualizar, mediante microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de imágenes, la disposición espacial de ambas cabezas de la molécula de miosina en el estado relajado (1,9). Esto hace que sea particularmente interesante hacer un estudio por difracción de rayos-X de músculos de tarántula, para lo cual es necesario desarrollar una metodología que permita obtener los patrones de rayos-X de dichos músculos. En el presente trabajo presentamos los primeros patrones de difracción de rayos-X ecuatoriales registrados de músculos vivos de tarántula.

MATERIAL Y METODOS

Los dos músculos largos que van de articulación a articulación en la tibia de una de las extremidades de tarántula (*Avicularia* sp.) se montaron entre dos soportes especiales en una cubeta de "Lucite" de pequeño volumen (5 ml) con dos ventanas de "Mylar" para permitir el paso del haz de rayos-X. La longitud del sarcómero se ajustó a 6.7 μ m antes de la exposición a los rayos-X, mediante difracción óptica de rayos laser ($\lambda = 0.6328 \mu$ m) y se verificó después de la exposición (ver figura 1). Mediante estimulación eléctrica y observación de la respuesta contráctil se verificó el estado del músculo antes y después de la exposición. En los resultados reportados aquí los músculos permanecían excitables luego de la exposición a los rayos-X.

Se construyó una cámara de difracción de rayos-X de pequeño ángulo (figura 2) basada en un generador de rayos-X Siemens Kristalloflex 810 de tubo sellado que generaba un haz de rayos-X monocromatizado mediante un cristal de cuarzo cortado asimétricamente a 7° y colocado a 195 mm de la fuente. Se utilizaron reguladores de las aperturas verticales y horizontales para reducir la dispersión secundaria, así como un cañón de vacío interpuesto entre el espécimen y la película para evitar la dispersión producida por el aire. Se seleccionó y enfocó horizontalmente la radiación $\text{Cu}_{K\alpha}$ ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$) mediante combamiento del cristal. El músculo fué colocado con el eje longitudinal en posición vertical a una distancia de 110 mm del monocromador y a 511 mm de la película fotográfica de registro; distancia conveniente para observar la primera reflexión ecuatorial (10) usando un "pararrayo" de plomo de 1.3 mm de ancho. Se utilizó película CEA Verken para rayos-x de de doble cara. El tiempo de exposición necesario para registrar un patrón de difracción ecuatorial fue 5-14 h dependiendo del tamaño del músculo. Las películas fueron densitometradas mediante un microdensitómetro Joyce Loebel Modelo MKIII. Los músculos fueron mantenidos durante cada experimento en solución fisiológica de araña (11) cuya composición es (en mM): NaCl 190; KCl 2; MgCl_2 4; CaCl_2 4; Na_2HPO_4 1; pH=7.8.

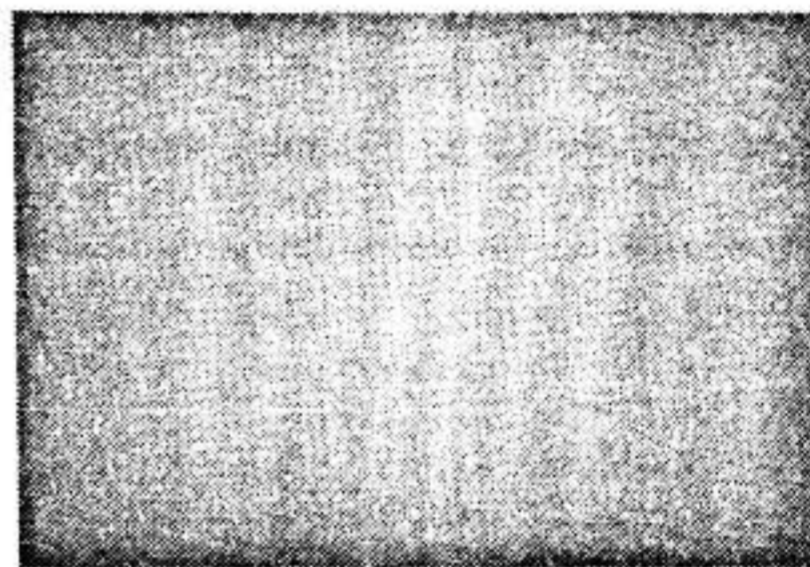


Figura 1.- Patrón de difracción óptico registrado de un músculo vivo de extremidad de tarántula. Longitud del sarcómero 6.7 μ m.

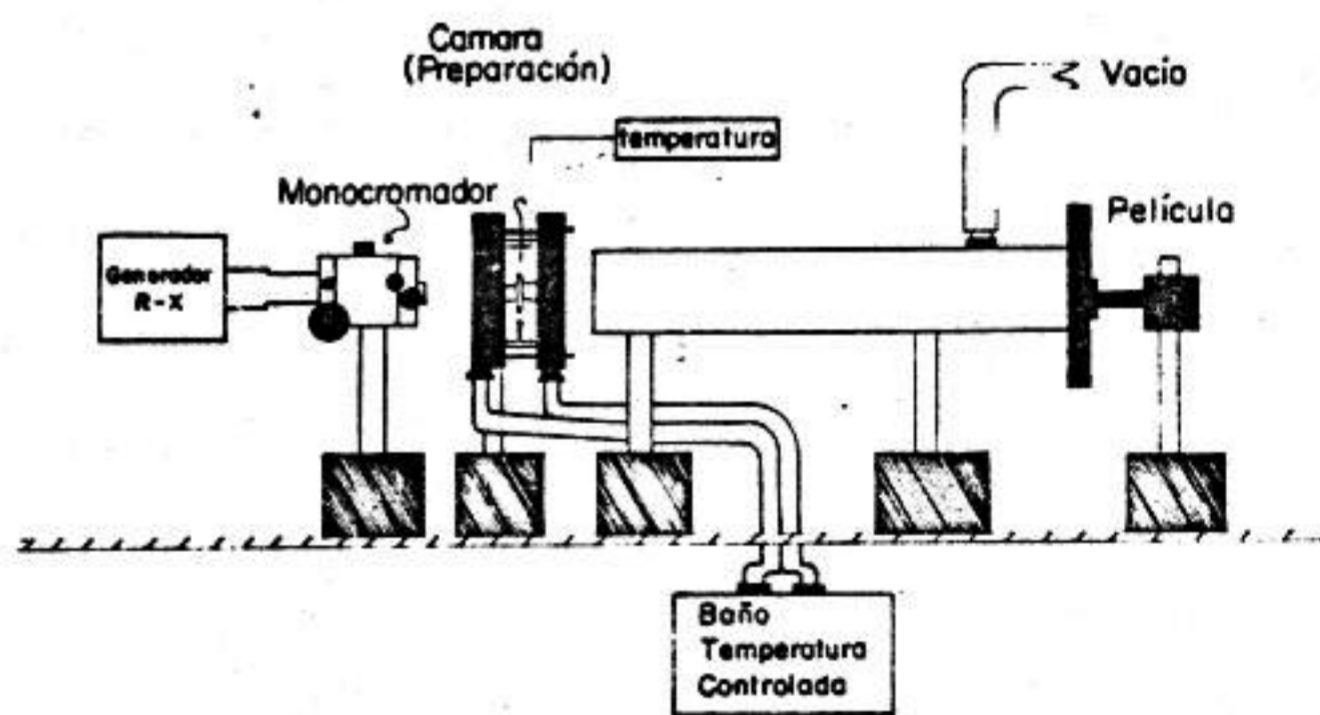


Figura 2.- Diagrama de la cámara de difracción de rayos-X utilizada para registrar la sección ecuatorial de los patrones de difracción de rayos-X.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 3 podemos observar el registro fotográfico del patrón de difracción de rayos-X ecuatorial de músculo vivo de tarántula y en la figura 4 se presenta el trazo obtenido al densitometrar dicho registro fotográfico. En el patrón se pueden identificar dos reflexiones discretas ubicadas en $(48.5 \text{ nm})^{-1}$ y $(27.4 \text{ nm})^{-1}$. Además se puede apreciar una banda centrada en aproximadamente $(15.5 \text{ nm})^{-1}$. El espaciamiento relativo entre las dos primeras reflexiones resultó ser de 1.77 sugiriendo que dichas reflexiones provienen de los planos (10) y (11) de un retículo hexagonal. La figura 5 presenta un esquema de como estarían arreglados hexagonalmente los filamentos de miosina transversalmente en el sarcómero, señalándose los planos que producirían las dos reflexiones registradas. La banda a $(15.5 \text{ nm})^{-1}$ incluiría las reflexiones 21, 30 y 22 las

cuales no estarían resueltas. Asumiendo que los filamentos de miosina forman un retículo hexagonal es posible calcular la distancia entre dos filamentos de miosina adyacentes a partir de la distancia de separación de los planos (10) resultando ser de 56 nm, valor este muy cercano a los 58 ± 4 nm obtenidos por microscopía electrónica en este mismo laboratorio (Guerrero y Padrón, resultados no publicados).

CONCLUSIONES

Hemos desarrollado una metodología que nos permite estudiar la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-x de músculo vivo de tarántula. Esta metodología permite estudiar los cambios en la distribución transversal de masa del sarcómero que acompañarían a diferentes estadios del ciclo de la contracción en el músculo en el cual se conoce la estructura de los filamentos gruesos a mayor resolución.

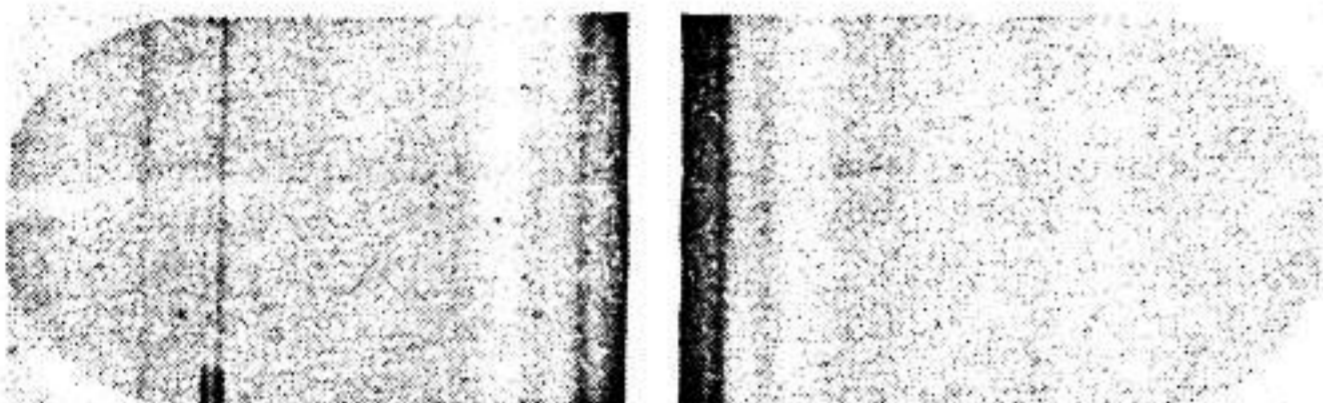


Figura 3.- Sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-x de músculo vivo de extremidad de tarántula. Se observan claramente las reflexiones (10) y (11) a ambos lados del pararrayos central.

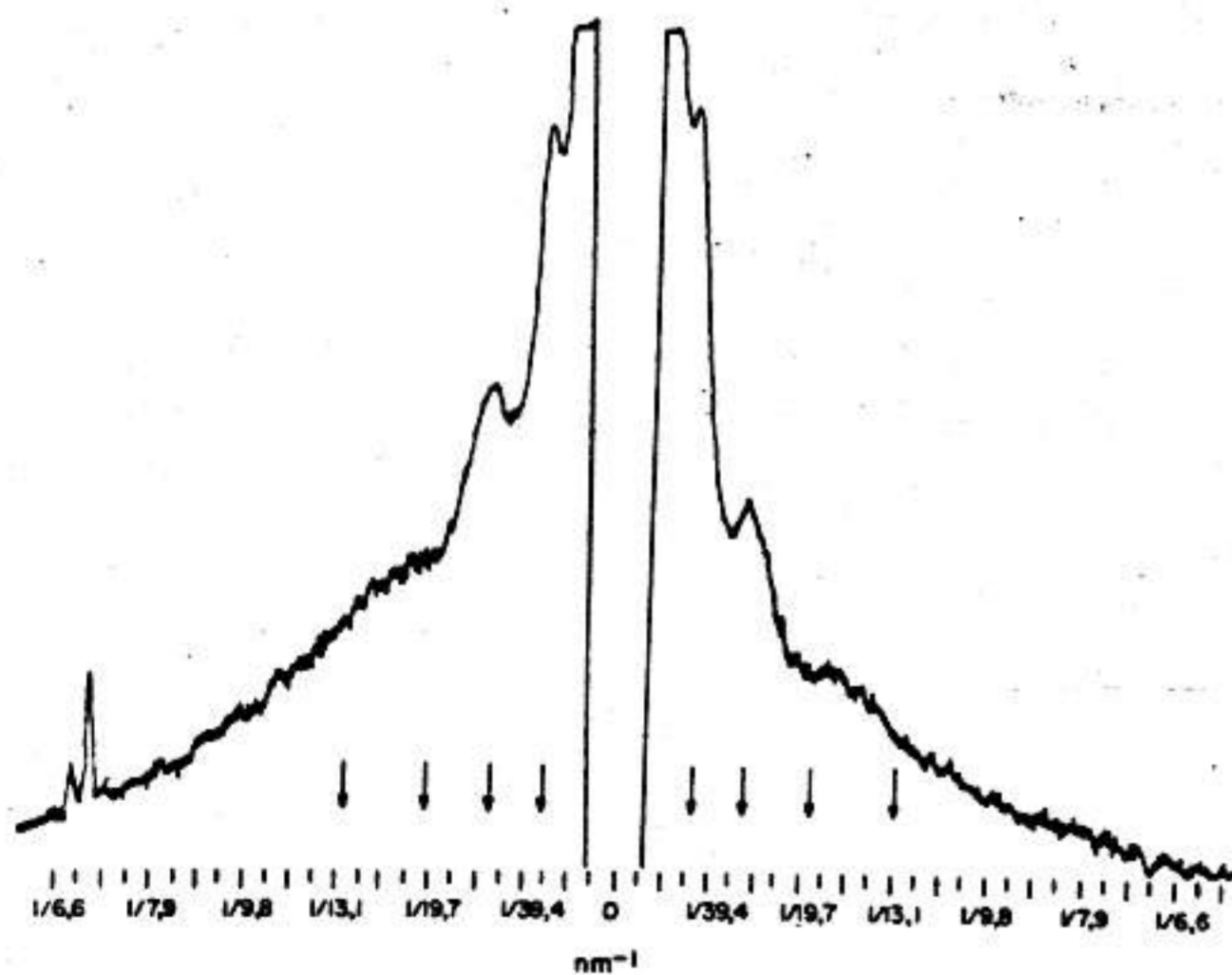


Figura 4.- Trazo densitométrico del patrón ecuatorial de difracción de rayos-x mostrado en la figura 3.

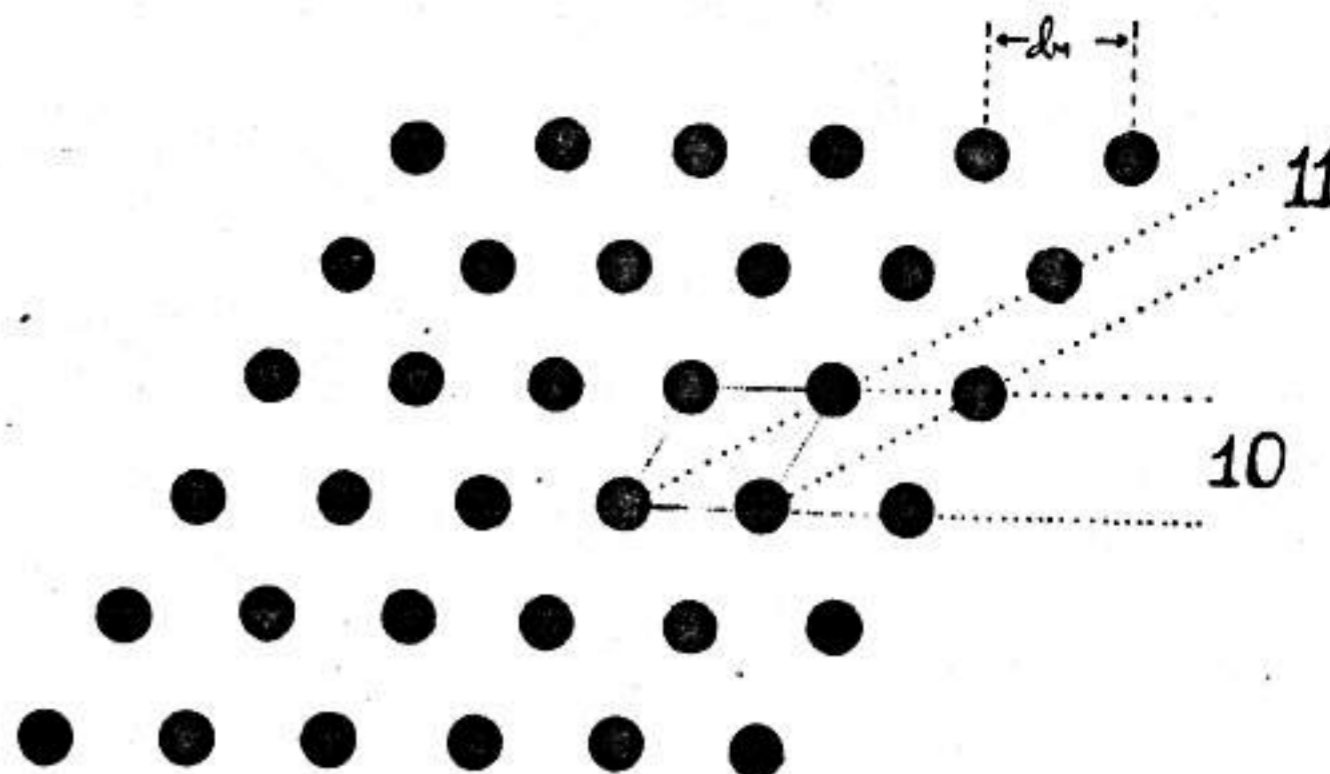


Figura 5.- Diagrama esquemático mostrando el arreglo hexagonal que forman los filamentos gruesos de miosina.

AGRADECIMIENTOS

Financiado parcialmente por CONICIT (Proyecto SI-1460 a R.P.) y la Muscular Dystrophy Association Inc, USA (a R.P.). Los autores agradecen a Elena Suárez y a Mariela Meneses de Nitta por la ayuda secretarial; a Duwya Otero de Palma por los dibujos; a Pedro Pérez y José Mora por la colaboración en la construcción de la cámara de difracción de rayos-x de pequeño ángulo; a Nehemias Mujica, Jesus Figueredo, Helímenas Finol e Isaias Vasquez por la captura y transporte de las tarántulas.

REFERENCIAS

- 1 Crowther, R.A.; Padrón, R. y Craig, R. "Arrangement of the heads of myosin in relaxed thick filament from tarántula muscle". *J. Mol. Biol.* **184**: 429-439, 1985.
- 2 Huxley, A.F. y Niedergerke, R. Structural changes in muscle during contraction. *Nature* **233**:533-538, 1954.
- 3 Huxley, H.E. "X-ray analysis and the problem of muscle". *Proc. Roy. Soc. B.* **141**:59-61, 1953.
- 4 Huxley, H.E. "Structural difference between resting and rigor muscle; evidence from intensity changes in the low angle equatorial x-ray diagram". *J. Mol. Biol.* **37**:507-520, 1968.
- 5 Huxley, H.E. "The Mechanism of Muscle Contraction". *Science* **164**:1356-1366, 1969.
- 6 Huxley, H.E. y Hanson, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**:973-976, 1954.
- 7 Miller, A. y Tregear, R.T. "Evidence concerning cross-bridge attachment during muscle contraction". *Nature* **226**:1060-1061, 1970.
- 8 Padrón, R. y Huxley, H.E. "The effect of the ATP analogue AMPPNP on the structure of crossbridges in vertebrate skeletal muscles: x-ray diffraction and mechanical studies". *J. Musc. Res. Cell. Mot.* **5**:613-655, 1984.
- 9 Padrón, R.; Crowther, R.A. y Craig, R. Three-dimensional reconstruction of native tarantula muscle thick filaments. *Biophys. J.* **45** (2):10a, 1984.
- 10 Schartau, W. y Leidescher, T. "Composition of the hemolymph of the tarantula *Euripelma Californicum*". *J. Comp. Physiol.* **152**:73-77, 1983.
- 11 Wakabayashi, K. y Namba, K. "X-ray equatorial analysis of crab striated muscle in the relaxed and rigor states". *Biophys. Chem.* **14**:111-122, 1981.