MATERIALES

Material biológico

Los animales utilizados fueron hembras adultas de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de raza Nueva Zelanda y peso aproximado de 2 kg. Los ejemplares procedían de una granja local del Cabezo Cortado (Murcia) y se adquirían el mismo día de la preparación. El sacrificio se realizaba por un procedimiento humanitario. Las membranas de RS se obtenían a partir de músculo esquelético blanco de las patas traseras.

Productos químicos

H_2O_2 al 30% (p/p) con estabilizador, DTNB, EDTA, EGTA, BSA, $LaCl_3$, Mops, fosfoenolpiruvato, oxalato potásico, glucosa, sacarosa, fosfato potásico, Sephadex G-50, TG, mezcla de centelleo líquido Sigma-Fluor (S-4023), catalasa de hígado bovino y piruvato quinasa de músculo de conejo fueron productos de Sigma (*www.sigmaaldrich.com*). La disolución de H_2O_2 al 30% se almacenó a 4 ºC en la oscuridad. A partir de esa disolución se preparaba H_2O_2 0´5 M, que se mantenía a 4 ºC durante un tiempo máximo de una semana.

Metavanadato amónico y molibdato amónico tetrahidratado fueron suministrados por Acros Organics (Bélgica).

Carbonato sódico, tartrato sódico, sulfato cúprico pentahidratado, SDS, ácido nítrico y amoníaco se obtuvieron de Scharlau (España).

ATP se obtuvo de Roche Molecular Biochemicals (*www.biochem.roche.com*).

Acido clorhídrico y metanol fueron de Baker (Holanda).

NaOH, KOH, KCl, $MgCl_2$, el reactivo de Folin-Ciocalteu, el papel indicador universal y la disolución patrón de Ca^{2+} Tritisol® se adquirieron de Merck (Alemania).

El ionóforo de Ca^{2+} A23187 aislado de *Streptomyces chartreusensis* y Tris se compraron a Calbiochem (*www.calbiochem.com*).

Los filtros de nitrocelulosa (tipo HAWP) con diámetro de poro de 0´45 μm fueron de Millipore Ibérica (*www.millipore.com*).

Las columnas para la filtración en gel procedían de Bio-Rad (*www.bio-rad.com*).

El nucleótido radiactivo [γ-^{32}P]ATP se adquirió a PerkinElmer Life Sciences (*lifesciences.perkinelmer.com*), $^{45}CaCl_2$ fue suministrado por Amersham Pharmacia Biotech (*www4.amershambiosciences.com*) y [^{3}H]glucosa se obtuvo de DuPont/NEN (EEUU).

Agua purificada

El agua de red se sometió a tratamiento de ósmosis inversa a través de un equipo Milli-RX de Millipore, para obtener agua de grado analítico. Este agua se sometió a una segunda purificación utilizando un equipo Milli-Q modelo A10 de Millipore. Este segundo proceso proporcionó agua de grado reactivo con resistividad de 18 MΩ·cm que denominamos agua Milli-Q. Este agua es la que se utilizó para preparar todas las disoluciones acuosas descritas en este trabajo.

Disolución patrón de Ca^{2+}

La concentración de Ca^{2+} puede ser muy imprecisa cuando se prepara por pesada debido a que el $CaCl_2$ sólido es muy higroscópico. Ese error se evita partiendo de una disolución valorada de $CaCl_2$.

Para preparar $CaCl_2$ 100 mM se toma una ampolla Tritisol® de Merck que contiene 1 g de $CaCl_2$ en HCl al 6´5% (v/v). El contenido de la ampolla se recoge en un vaso de 250 mL. El interior de la ampolla se enjuaga con agua Milli-Q y también se recoge completando el volumen a 150 mL con agua Milli-Q. Después se añade 25 mL de Mops 200 mM (pH 7´0) y se lleva el pH a 7´0 mediante la adición de NaOH 10 N. El volumen final se ajusta a 250 mL con agua Milli Q utilizando un matraz aforado.

Concentración de Ca^{2+} libre

Algunos compuestos de los que se utilizan para preparar los medios de reacción tienen niveles de Ca^{2+} contaminante similares o superiores a los que se pretende preparar. Para conseguir concentraciones precisas de Ca^{2+} en el intervalo μM es necesario utilizar tampones de $CaCl_2$-EGTA.

Las concentraciones de Ca^{2+} y EGTA que hay que añadir para conseguir una determinada concentración de Ca^{2+} libre en el medio se pueden determinar con ayuda de un programa de ordenador tal como describe Fabiato (1988). Este programa tiene en cuenta la constante de afinidad absoluta para el equilibrio: $Ca^{2+} + EGTA^{4-} \square Ca\text{-}EGTA^{2-}$ que es $9´33 \cdot 10^{10}$ M^{-1} (Schwartzenbach y col., 1957) y las constantes de los equilibrios de protonación del EGTA (Blinks y col., 1982) que son:

$$[HEGTA^{3-}]/[H^+]\,[EGTA^{4-}] = 3´8 \cdot 10^9\ M^{-1}$$

$$[H_2EGTA^{2-}]/[H^+]\,[HEGTA^{3-}] = 9´12 \cdot 10^8\ M^{-1}$$

$$[H_3EGTA^-]/[H^+]\,[H_2EGTA^{2-}] = 575\ M^{-1}$$

$$[H_4EGTA]/[H^+]\,[H_3EGTA^-] = 126\ M^{-1}$$

El programa también tiene en cuenta la presencia de otras especies como Mg^{2+} y ATP que afectan a la concentración de Ca^{2+} libre en el medio así como el pH.

Un medio sin Ca^{2+} se consigue añadiendo solo EGTA. La concentración de Ca^{2+} libre se expresa como pCa. Una concentración de Ca^{2+} libre 50 µM corresponde a un pCa = 4´3.

MÉTODOS

Aislamiento de RS

El aislamiento de vesículas de RS se realizó según el método descrito por Electr e Inesi (1972) tal como se detalla a continuación:

El animal se sacrificaba introduciéndolo primero en una cámara con anhídrido carbónico hasta que quedaba aturdido. A continuación se sacaba de la cámara para seccionarle parcialmente el cuello. El conejo se mantenía sujeto por las patas traseras durante unos min para conseguir que el desangrado fuera máximo. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron en una vitrina refrigerada a 4 ºC para minimizar la desnaturalización e hidrólisis de las proteínas.

El músculo más blanco de las extremidades posteriores se extrajo con ayuda de un bisturí (hoja del nº 22). La masa muscular extraída se depositó en 500 mL de EDTA 0´1 mM (pH 7´0) que estaba enfriada a 4 ºC. Los restos de músculo rojo, tejido conectivo y grasa se eliminaron con unas tijeras. El músculo blanco limpio se pasó a otro vaso con 400 mL de agua Milli-Q enfriada a 4 ºC.

El tejido se puso sobre papel de filtro para secarlo y después se fue añadiendo a un granatario hasta alcanzar un peso de 180 g. Este tejido se troceó muy bien con ayuda de las tijeras y se pasó a un vaso que contenía 540 mL de Mops 10 mM (pH 7´0), sacarosa 10% (p/v) y EDTA 0´1 mM que se mantenía fría a 4 ºC. La mezcla se trituró en una batidora de cocina Osterizer, modelo Pulsematic 16 (EEUU). Esto se hizo a velocidad media y durante 1 h, en periodos de 15 s interrumpidos por pausas de 5 min. Durante ese tiempo se vigiló el pH, utilizando papel indicador universal, para mantenerlo entre 6´5 y 7´0. A partir de los 20 min, que es cuando empieza a bajar el pH, se añadió NaOH 10% (p/v) para mantenerlo en el intervalo adecuado.

El homogenado se centrifugó a 9.500 rpm (10.000 xg) durante 25 min y a 4 ºC en una centrífuga Beckman modelo J2-21 (EEUU) utilizando un rotor JA-10. El sobrenadante que contenía los microsomas se filtró por decantación a través de 6 a 8 capas de gasa para eliminar restos de material graso en suspensión.

El filtrado se centrifugó a 18.000 rpm (30.000 xg) durante 75 min y a 4 ºC en una ultracentrífuga Beckman modelo L8-55M (EEUU) con un rotor 19. En este caso se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 48 mL de Mops 10 mM (pH 7´0), KCl 0´6 M enfriado a 4 ºC utilizando un homogenizador Dounce vidrio-vidrio de 40 mL. La suspensión se incubó durante 40 min en un baño de hielo para solubilizar el complejo de proteínas contráctiles (actina y miosina).

La suspensión se centrifugó a 12.500 rpm (12.000 xg) durante 20 min y a 4 ºC en una centrífuga Beckman J2-21 usando un rotor JA-20. Los tubos se sacaron con cuidado al terminar la centrifugación. Los microsomas, que son de color blanco, muestran una

distribución en gradiente. La zona superior del gradiente, que es rica en fragmentos de túbulos T, aparece poco turbia. La zona intermedia, que tiene una turbidez mayor, está compuesta de forma mayoritaria por vesículas de RS procedentes de los túbulos longitudinales. La zona inferior del gradiente, que es muy opaca y tiene una cierta tonalidad marrón, es la fracción enriquecida en cisternas terminales y triadas (asociaciones de cisternas terminales y túbulos T).

La zona superior del gradiente se eliminó mientras que la parte intermedia se recogió con cuidado sin alterar la distribución del gradiente. La fracción recogida se centrifugó a 35.500 rpm (105.000 xg) durante 30 min a 4 ºC en una ultracentrífuga Beckman L8-55M usando un rotor 55´2 Ti. El sedimento que se obtuvo al terminar la centrifugación se resuspendió en 5 mL de Mops 10 mM (pH 7´0), sacarosa 30% (p/v) a 4 ºC. La resuspensión de las vesículas se realizó con ayuda de un homogenizador Dounce vidrio-vidrio de 10 mL.

Los microsomas aislados se distribuyeron en alícuotas de 0´3 mL en tubos Eppendorf y se guardaron en un ultracongelador a –80 ºC. Las propiedades funcionales de la Ca^{2+}-ATPasa se mantienen estables durante varios meses cuando las vesículas se almacenan en las condiciones descritas.

Cuantificación de proteína

La determinación de la concentración de proteína se realizó por el método de Lowry y col. (1951) usando BSA como patrón. El método utiliza los siguientes reactivos:

- Carbonato sódico 2% (p/v), NaOH 0´1 N (Reactivo A).
- Tartrato sódico 1% (p/v) (Reactivo B).
- Sulfato cúprico pentahidratado 0´5% (p/v) (Reactivo C).

En el momento de usar se mezcla: 100 mL de reactivo A + 2 mL de reactivo B + 2 mL de reactivo C, lo que constituye el reactivo del biuret.

- Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido al 50%: 6 mL del reactivo comercial + 6 mL de agua Milli-Q. También se prepara en el momento de usar.

La disolución patrón de BSA se prepara por pesada en agua Milli-Q a una concentración aproximada de 1 mg/mL. Se pesan 5 mg de BSA y se disuelven en 5 mL de agua Milli-Q. La concentración real de BSA se determina experimentalmente por medidas de absorbancia. Para ello se toman tres alícuotas de 0´2 mL de la disolución patrón y a cada una de ellas se le añade 1´8 mL de agua Milli-Q. La absorbancia de las muestras diluidas se mide a 280 nm en una cubeta de cuarzo. El valor medio de absorbancia (Abs) se utiliza para calcular la concentración real (c) según la ecuación: $Abs = \varepsilon \cdot c \cdot d$, donde ε es 15.300 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ y d es 1 cm. La disolución se guarda congelada en alícuotas.

Para la determinación de proteínas se preparan nueve tubos de ensayo. Los seis primeros corresponden a la recta de calibrado y en ellos se añade: 0, 25, 50, 75, 100 ó 125 µL de disolución patrón de BSA (equivalente a 0-125 µg de proteína). A los tres tubos restantes se les añaden 20 µL de la suspensión de vesículas de RS diluída 1:5 con agua Milli-Q. A continuación se añade agua a todos los tubos hasta alcanzar un volumen final de 1 mL.

Después se añade a cada tubo 5 mL de reactivo del biuret agitando en un vortex tras la adición. Los tubos se incuban durante 10 min en un baño de agua a 37 ºC. Seguidamente se añade a cada tubo 0´5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido, agitando tras la adición. La incubación de los tubos se prolonga durante 20 min en un baño de agua a 37 ºC. Por último los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente antes de medir su absorbancia a 700 nm.

Para determinar la concentración de proteína de una muestra se toma el valor medio de las tres lecturas de absorbancia y se multiplica por la pendiente de la recta de calibración (µg BSA/absorbancia). Los µg de proteína se dividen por el volumen de muestra (0´02 mL) para determinar la concentración en µg proteína/mL. Ese valor se multiplica por cinco que es el factor de dilución utilizado. La concentración de vesículas de RS se expresa como mg de proteína total/mL.

La *Tabla I* recoge las diferentes adiciones que requiere el ensayo.

TABLA I

Tubo	BSA 1 mg/mL (mL)	Muestra problema (mL)	Agua Milli-Q (mL)	Reactivo de biuret (mL)	Reactivo de Folin (mL)
1	0´000	---	1´000	5	0´5
2	0´025	---	0´975	5	0´5
3	0´050	---	0´950	5	0´5
4	0´075	---	0´925	5	0´5
5	0´100	---	0´900	5	0´5
6	0´125	---	0´875	5	0´5
7	---	0´02	0´980	5	0´5
8	---	0´02	0´980	5	0´5
9	---	0´02	0´980	5	0´5

Una concentración de 1 mg RS/mL corresponde a una concentración 7 μM de Ca^{2+}-ATPasa teniendo en cuenta que el peso molecular de la proteína es aproximadamente 100.000 y que representa un 70% del contenido total de proteínas en la membrana de RS.

Tratamiento con H_2O_2/catalasa

El procedimiento consistió en incubar a 37 ^{o}C vesículas de RS a una determinada concentración y en un determinado medio con H_2O_2. La reacción de oxidación se detuvo añadiendo catalasa para eliminar el H_2O_2 que no había reaccionado. Las vesículas de RS en un medio con Ca^{2+} libre se denominan en adelante muestras E_1Ca_2 mientras que las vesículas de RS en un medio sin Ca^{2+} se denominan muestras E_2.

Muestras E_1Ca_2

El medio de incubación fue: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´01 mg RS/mL y A23187 0´75 μM

cuando se utilizaron vesículas permeables a Ca^{2+}. El medio de incubación fue: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´04 mg RS/mL y oxalato potásico 5 mM cuando se utilizaron vesículas intactas. Las muestras se incubaron a 37 ºC durante 1 h con una determinada concentración de H_2O_2. Las concentraciones de H_2O_2 y el tiempo de reacción se modificó en algunos experimentos.

Muestras E_2

El medio de incubación consistió en: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, 0´01 mg RS/mL, A23187 0´75 µM y una determinada concentración de H_2O_2 cuando se utilizaron vesículas permeables a Ca^{2+}.

La reacción se detuvo en todos los casos añadiendo catalasa (20 UI/µmol de H_2O_2) e incubando 5 min más a 37 ºC para permitir la acción de catalasa. Transcurrido ese tiempo, las muestras se introducían en un baño de hielo hasta el momento de realizar las correspondientes medidas.

Hidrólisis enzimática de ATP

La actividad enzimática de la Ca^{2+}-ATPasa se determinó por un método colorimétrico discontinuo (Lin y Morales, 1977). El procedimiento se basa en la utilización de un reactivo que forma un complejo coloreado con el P_i liberado durante la hidrólisis del ATP. El complejo de fosfomolibdovanadato es amarillo.

El reactivo se prepara de la siguiente forma:

- Disolver 10 g de molibdato amónico en agua Milli-Q. Añadir 1 mL de amoníaco y completar el volumen con más agua hasta 100 mL.
- Disolver 0´235 g de metavanadato amónico en 40 mL de agua Milli-Q. Calentar para disolver. Una vez disuelto se enfría en baño de hielo y se añade 0´61 mL de ácido nítrico concentrado.
- Disolver 20 g de SDS en 100 mL de agua Milli-Q.

Mezclar las tres disoluciones anteriores y añadir 37 mL de ácido nítrico concentrado. Completar el volumen hasta 1 L con agua Milli-Q. El reactivo se guarda a temperatura ambiente en una botella de color topacio para preservarlo de la luz. En estas condiciones se mantiene estable y puede utilizarse durante dos meses hasta que comience a precipitar el SDS.

Para conocer la relación µmoles P_i/absorbancia se construye una recta patrón utilizando seis tubos que contienen 0, 50, 100, 150, 200 ó 250 µL de una disolución de P_i 1 mM.

A continuación se añade agua Milli-Q a cada tubo hasta completar 1 mL. Después se añade 1 mL de reactivo de Lin y Morales y 4 mL de agua Milli-Q. Tras cada adición es necesario agitar el tubo en un vortex. Por último se mide la absorbancia a 350 nm.

En la *Tabla II* se detallan las diferentes adiciones.

TABLA II

Tubo	Agua Milli-Q (mL)	P_i 1 mM (mL)	Reactivo (mL)	Agua Milli-Q (mL)
1	1´00	0´00	1	4
2	0´95	0´05	1	4
3	0´90	0´10	1	4
4	0´85	0´15	1	4
5	0´80	0´20	1	4
6	0´75	0´25	1	4

Hidrólisis en presencia de Ca^{2+}

Muestras E_1Ca_2 tratadas con H_2O_2

La hidrólisis de ATP se midió a 37 ºC en el medio utilizado para tratar las muestras E_1Ca_2 con H_2O_2: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM,

$CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´01 mg RS/mL y A23187 0´75 µM. La reacción se inició añadiendo ATP.

El procedimiento consiste en preparar cinco tubos con 1 mL de reactivo de Lin y Morales que se mantienen a temperatura ambiente. El ensayo en blanco se realiza añadiendo una alícuota de 1 mL del medio de reacción sin ATP a uno de los tubos preparados con el reactivo de molibdato/vanadato. Tras agitar con ayuda de un vortex se añade ATP 1 mM.

La reacción comienza con la adición de ATP 1 mM al medio que contiene la muestra (4´5 mL) y que se mantiene a 37 ºC. A partir de ese momento y a intervalos de 1 min se sacan alícuotas de 1 mL y se van añadiendo a cada uno de los tubos preparados con el reactivo. Esta adición detiene la reacción de hidrólisis de ATP debido a que el reactivo contiene ácido fuerte. Posteriormente se añade 4 mL de agua Milli-Q a cada tubo y se mide la absorbancia a 350 nm.

El valor de la absorbancia de cada muestra se multiplica por la pendiente de la recta de calibración (µmoles P_i/absorbancia) para determinar los µmoles de P_i liberados en las diferentes alícuotas. Al dividir ese valor por los mg de proteína en cada alícuota se determinan los µmles P_i/mg proteína.

En algunos experimentos se han mantenido las condiciones del pretratamiento con H_2O_2 a 37 ^oC pero la hidrólisis de ATP se ha medido a 25 ºC. La composición del medio de reacción fue idéntica a la descrita anteriormente excepto que la concentración de RS fue 0´02 mg/mL y la de A23187 fue 1´5 µM.

El medio de reacción para el tratamiento con H_2O_2 y las medidas de hidrólisis de ATP en otros experimentos contenía oxalato potásico en lugar de A23187. El medio de reacción estaba compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´04 mg RS/mL, oxalato potásico 5 mM, diferentes concentraciones de H_2O_2. La medida de hidrólisis se realizó a 25 ºC. El inicio

de la reacción tuvo lugar con la adición de ATP 1 mM ó 50 μM. En los ensayos con ATP 50 μM se añadió un sistema regenerador de ATP compuesto por fosfoenolpiruvato 2 mM y piruvato quinasa 6 UI/mL para evitar el agotamiento del sustrato durante el transcurso de la reacción.

La hidrólisis de ATP también se estudió en otras condiciones experimentales que se detallan en los correspondientes pies de figuras.

Muestras E_2 tratadas con H_2O_2

El medio de reacción para el tratamiento con H_2O_2 estuvo compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, 0´01 mg RS/mL, A23187 0´75 μM y la correspondiente concentración de H_2O_2. La reacción se detuvo añadiendo catalasa.

La hidrólisis de ATP se midió a 37 ºC y en presencia de Ca^{2+}. Para ello, se añadió a cada tubo $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3). La reacción de hidrólisis se inició añadiendo ATP tal como se ha descrito antes.

Hidrólisis en ausencia de Ca^{2+}

Las medidas de hidrólisis se realizaron a 37 ºC después de tratar muestras E_2 con H_2O_2. La composición inicial del medio fue: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, 0´1 mg RS/mL y una determinada concentración de H_2O_2. La reacción de oxidación se detuvo añadiendo catalasa.

La reacción de hidrólisis se inició añadiendo ATP 1 mM. Alícuotas de 1 mL de medio de reacción se añadieron cada 2 min a cada uno de los tubos con el reactivo de Lin y Morales.

Transporte de Ca^{2+}

El método utilizado fue el procedimiento descrito por Martonosi y Feretos (1964) en el que se utiliza $^{45}Ca^{2+}$ como trazador radiactivo.

Las muestras E_1Ca_2 se trataban previamente con H_2O_2 durante 1 h a 37 ºC y después se incubaban durante 5 min más con 20 UI catalasa/µmol H_2O_2.

Las medidas de transporte se realizaron a 25 ºC en un medio que contenía: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $^{45}CaCl_2$ 0´551 mM (~ 2000 cpm/nmol) (pCa = 4´3), 0´04 mg RS/mL y oxalato potásico 5 mM.

El medio de reacción sin ATP (5´5 mL) se encontraba en un vaso termostatizado por agua circulante que se situaba sobre un agitador magnético. El ensayo en blanco para conocer el Ca^{2+} inespecífico retenido por las membranas de RS se realizó sacando y filtrando una alícuota de 1 mL del medio de reacción sin ATP. El filtro se lavó 2 veces con 5 mL de medio de lavado compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0) y $LaCl_3$ 1 mM. El medio se mantenía frío dentro de un baño de hielo. Al medio de reacción restante (4´5 mL) se le añadía ATP 1 mM lo que marcaba el tiempo cero de la reacción. Alícuotas de 1 mL se sacaron cada 30 s antes de filtrarlas rápidamente utilizando filtros de tipo HAWP (Millipore) y un colector Hoefer modelo FH 225V (Amersham Pharmacia Biotech) conectado a una bomba de vacío (Millipore). La filtración detiene el transporte al separar las vesículas de RS del medio de reacción. Los filtros, que retienen las vesículas de RS con el $^{45}Ca^{2+}$ transportado, se lavan inmediatamente con el medio de lavado frío tal como se ha descrito para el ensayo en blanco. Los filtros se depositan en viales de polietileno de 5 mL. A los viales se les añaden 3 mL de mezcla de centelleo y se agitan en un vortex para disolver los filtros. Los viales se someten a contaje por la técnica de centelleo líquido en un contador Packard (EEUU) modelo 2100TR.

El transporte de Ca^{2+} también se estudió utilizando ATP 50 µM. En estos ensayos en los que la concentración de ATP era tan baja se requería la presencia de un sistema regenerador de ATP para evitar el agotamiento del sustrato durante el tiempo de

medida. Por ello se incluyó en el medio de medida un sistema regenerador de ATP compuesto por fosfoenolpiruvato 2 mM y piruvato quinasa 6 UI/mL.

Los nmoles de Ca^{2+} transportado/mg de proteína se determinan a partir de un patrón que se obtiene tomando tres alícuotas de 20 µL del medio de reacción para determinar las cpm de $^{45}Ca^{2+}$ y calcular su valor medio. El valor medio se divide por 11´02, que son los nmoles de Ca^{2+} presentes en cada alícuota, para determinar cpm de $^{45}Ca^{2+}$/nmol de Ca^{2+}. Los nmoles de Ca^{2+} transportado en cada muestra se calculan dividiendo las cpm de $^{45}Ca^{2+}$ de cada punto experimental entre las cpm de $^{45}Ca^{2+}$ correspondientes a 1 nmol de Ca^{2+} patrón. Cada uno de los valores obtenidos se divide por los mg de proteína de las alícuotas sacadas (0´04 mg). Al valor del Ca^{2+} transportado que se determina para cada punto experimental hay que restarle el Ca^{2+} retenido de forma inespecífica que se evalúa con el ensayo en blanco.

Unión de Ca^{2+}

El procedimiento para medir unión de Ca^{2+} a la enzima fue la técnica de doble marcaje radiactivo descrita por Champeil y Guillain (1986). El segundo marcador, que es de baja energía, permite determinar el $^{45}Ca^{2+}$ inespecífico midiendo el volumen de medio de incubación retenido por el filtro. Hay que tener en cuenta que las muestras no se pueden lavar tras la adición de $^{45}Ca^{2+}$ porque la unión del Ca^{2+} no es covalente.

Las muestras E_2 fueron inicialmente tratadas con H_2O_2 en un medio que contenía: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 100 µM, vesículas de RS a una concentración de 0´4 mg/mL y H_2O_2 (0, 2 ó 20 mM). La reacción con H_2O_2 se realizó a 37 ºC y se detuvo añadiendo catalasa (20 UI/µmol H_2O_2) y prolongando la incubación a 37 ºC durante 5 min.

Antes de comenzar el ensayo se preparaba 1 mL de medio con Ca^{2+} y glucosa radiactivos que contenía: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 100 µM, $^{45}CaCl_2$ 3 mM (~8.000 cpm/nmol) y [^{3}H]glucosa 1 mM (~12.000 cpm/nmol).

El procedimiento utiliza nueve tubos de ensayo a los que se les añade 0´6 mL del medio de reacción con las vesículas de RS tratadas con H_2O_2. Después se añade a cada tubo un volumen de la disolución de $^{45}Ca^{2+}$/[^{3}H]glucosa para conseguir una determinada concentración de Ca^{2+} libre (pCa entre 7´0 y 5´2) tal como se muestra en la *Tabla III*.

TABLA III

Tubo	$^{45}CaCl_2$ 3 mM (µL)	$CaCl_2$ total (µM)	pCa
1	3´70	18´44	7´0
2	5´30	26´34	6´8
3	7´30	36´30	6´6
4	9´50	47´60	6´4
5	11´90	59´26	6´2
6	14´00	70´19	6´0
7	15´90	79´65	5´8
8	18´20	90´82	5´5
9	20´00	100´00	5´2

Tras la mezcla, las muestras se incuban durante 5 min a 25 ºC y de cada tubo se saca una alícuota de 0´5 mL (0´2 mg de proteína) que se deposita sobre un filtro Millipore (previamente humedecido con agua Milli-Q). Los filtros se encuentran en un colector Hoefer de filtración conectado a una bomba de vacío.

Tras la filtración, los filtros se introducen en viales de polietileno y se les añade 3 mL de mezcla de centelleo. Los viales se agitan con ayuda de un vortex y se introducen en un contador de centelleo líquido Packard (EEUU) modelo 2100TR. El aparato permite calcular cpm de $^{45}Ca^{2+}$ y cpm de ^{3}H teniendo en cuenta el solapamiento de los espectros de emisión de energía de los dos isótopos.

Alícuotas de 10 µL del medio radiactivo se utilizan como patrón para conocer las cpm de $^{3}H/\mu L$, las cpm de $^{45}Ca^{2+}/\mu L$ y las cpm de $^{45}Ca^{2+}$/nmol presentes en el medio de reacción.

Para cuantificar el Ca^{2+} unido de forma específica a la Ca^{2+}-ATPasa se determina primero el volumen de medio de incubación (V) retenido por cada filtro. Para ello se utilizan las cpm del segundo marcador [^{3}H]glucosa de la siguiente forma:

$$V = \frac{cpm\ ^{3}H_{filtro}}{(cpm\ ^{3}H \cdot \mu L^{-1})_{medio}}$$

Conociendo el valor de V se puede determinar el Ca^{2+} inespecífico retenido por cada filtro:

$$^{45}Ca^{2+}_{inesp.} = (cpm\ ^{45}Ca^{2+} \cdot \mu L^{-1})_{medio} \cdot V$$

El $^{45}Ca^{2+}$ específico unido al enzima se calcula en cada ensayo a partir de las cpm de $^{45}Ca^{2+}$ en el filtro una vez descontado el $^{45}Ca^{2+}$ inespecífico, es decir:

$$^{45}Ca^{2+}_{esp.}\ (nmol) = \frac{(cpm\ ^{45}Ca^{2+}_{filtro}) - (cpm\ ^{45}Ca^{2+}_{inesp.})}{(cpm\ ^{45}Ca^{2+} \cdot nmol^{-1})_{medio}}$$

El valor obtenido se divide por los mg de proteína depositados en cada filtro (0´2 mg) para obtener los nmoles de $^{45}Ca^{2+}_{específico}$/mg de proteína.

Medidas de EP

El procedimiento para evaluar los niveles de EP fue el descrito por de Meis (1988). El EP acumulado se puede determinar iniciando la reacción de hidrólisis con el sustrato radiactivo [γ-^{32}P]ATP y deteniendo la reacción con un ácido fuerte. El ácido fuerte detiene la reacción de hidrólisis porque desnaturaliza a la enzima y no descompone el EP acumulado porque es estable en medio ácido (Yamamoto y Tonomura, 1967; Makinose, 1969; Inesi y col., 1980).

Acumulación de EP

Para realizar estas medidas hay que preparar un medio con ATP radiactivo formado por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3) y [γ-^{32}P]ATP 2 mM (~20.000 cpm/nmol). El medio se mantiene frío en un baño de hielo hasta el momento de usar. También se prepara un medio que contiene: ácido perclórico 125 mM y fosfato sódico 2 mM. Este medio que sirve para detener la reacción de fosforilación/hidrólisis y lavar los filtros también se mantiene en el baño de hielo.

Las muestras E_1Ca_2 se tratan previamente a 37 ºC con H_2O_2. Para ello se preparan seis tubos de ensayo con 0´5 mL de medio que contiene: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3) y vesículas de RS a una concentración de 0´2 mg/mL. La reacción se inicia añadiendo una determinada concentración de H_2O_2. La incubación con H_2O_2 se mantiene a 37 ºC durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se añade catalasa (20 UI/µmol H_2O_2) y se prolonga la incubación otros 5 min a 37 ºC.

Los tubos que contienen las muestras tratadas con H_2O_2 se pasan a un baño de agua-hielo donde va a tener lugar la reacción de fosforilación. El inicio de la reacción se produce añadiendo 12´5 µL del medio que contiene [γ-^{32}P]ATP 2 mM y que se encuentra frío. La concentración final de ATP radiactivo es 50 µM. La reacción de fosforilación se detiene a los 5 s añadiendo 5 mL del medio que contiene ácido perclórico.

En el primer tubo —que sirve como ensayo en blanco— se altera el orden de las adiciones. A los 0´5 mL de medio de incubación se le añade 5 mL de medio con ácido perclórico y a continuación se añade ATP radiactivo agitando con ayuda de un vortex.

Una vez detenida la reacción de fosforilación, los tubos se incuban en un baño de hielo durante 5 min. El contenido de cada tubo se filtra a través de un filtro Millipore (tipo HAWP) colocado sobre el colector de filtración Hoefer/Amersham Pharmacia

Biotech modelo FH 225V conectado a una bomba de vacío (Millipore). Cada uno de los filtros se lava cinco veces con la disolución fría de perclórico utilizando cada vez 5 mL. Las vesículas de RS quedan retenidas en el filtro. Cada filtro se pasa a un vial y a continuación se añade 3 mL de mezcla de centelleo. Los viales se agitan para solubilizar los filtros y se introducen en un contador de centelleo líquido para el contaje del isótopo ^{32}P.

Como patrón se sacan tres alícuotas de 5 µL del medio que contiene el ATP radiactivo (10 nmoles de ATP radiactivo). El valor medio de las cpm de ^{32}P se divide por 10 para determinar las cpm de ^{32}P/nmol de ATP en el patrón.

A las cpm obtenidas en cada punto experimental se le resta el valor de cpm obtenido en el ensayo en blanco. Las cpm resultantes se dividen por las cpm que corresponden a cada nmol de ATP o EP para conocer los nmoles de EP formados. Si se divide por los mg de proteína de cada muestra que se filtra (0´1 mg) se obtienen los nmoles de EP/mg proteína.

Descomposición de EP

Antes de comenzar el ensayo se preparó un medio radiactivo compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM y [γ-^{32}P]ATP 2 mM (20.000 cpm/nmol). También se preparó un medio con ATP no radiactivo: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM y ATP 50 µM. El medio para detener la reacción fue: ácido perclórico 440 mM y fosfato sódico 7 mM. Para lavar los filtros se utilizó: ácido perclórico 125 mM y fosfato sódico 2 mM. Todos estos medios se mantuvieron en baño de hielo antes y durante el procedimiento.

El tratamiento de las muestras E_1Ca_2 con H_2O_2 se realizó a 37 ^oC en dos tubos de ensayo conteniendo cada uno 2 mL de medio de reacción: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM, 0´4 mg RS/mL y H_2O_2 (0 ó 20 mM). La incubación se prolongó durante 1 h a 37 ºC, tras lo cual se añadió catalasa

(20 UI/µmol H_2O_2) y se continuó la incubación durante 5 min a 37 ºC. Los tubos se pasaron a un baño de agua-hielo al acabar la incubación con catalasa.

El medio de reacción de la muestra tratada con H_2O_2 20 mM se repartió en siete tubos de ensayo con 0´25 mL cada uno. Las muestras no tratadas con H_2O_2 —que sirvieron como control— se procesaron de forma similar.

Para determinar la cinética de descomposición de EP se realizó un experimento de pulso y caza. El proceso tuvo lugar en un baño de agua-hielo. La reacción de marcaje radiactivo (pulso) se inició añadiendo 6´25 µL del medio con ATP radiactivo —la concentración final de [γ-^{32}P]ATP fue 50 µM— y se detuvo a los 5 s añadiendo 4´75 mL del medio no radiactivo con ATP 50 µM. Esto permitió mantener constante la concentración química de ATP en el medio al tiempo que disminuía considerablemente (dilución 1:20) la concentración de ATP radiactivo. La caza del EP radiactivo se realizó añadiendo 2 mL de medio ácido a distintos tiempos: 0, 1, 2, 4, 6, 10 ó 15 s. Los tubos se incubaron en un baño de hielo durante 5 min antes de filtrar su contenido.

Para realizar el ensayo en blanco se alteró el orden de las adiciones. A la alícuota de 0´25 mL del medio de reacción que contenía las vesículas se añadió primero 2 mL de ácido desnaturalizante y después de mezclar bien se añadió 6´25 µL del medio con [γ-^{32}P]ATP 2 mM y 4´75 mL de medio con ATP frío 50 µM.

El punto correspondiente a t = 0 s se realizó añadiendo [γ-^{32}P]ATP 50 µM a uno de los tubos que contenía 0´25 mL del medio con las vesículas de RS. Tras incubar 5 s se añadió 2 mL de medio ácido y finalmente se añadió 4´75 mL de medio no radiactivo conteniendo ATP 50 µM. Tras 5 min de incubación en un baño de hielo se procedió a filtrar a vacío el contenido de cada tubo utilizando el mismo sistema de filtro y colector descrito anteriormente.

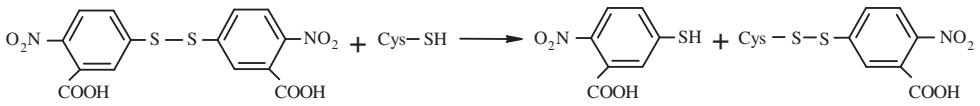
Cada uno de los filtros se lavó cinco veces con ácido perclórico 125 mM y fosfato sódico 2 mM frío utilizando cada vez 5 mL de disolución ácida. Los filtros se depositaron en viales de polietileno y después se añadió 3 mL de mezcla de centelleo. Tras agitar enérgicamente en un vortex para solubilizar los filtros los viales se utilizaron para determinar ^{32}P mediante el contador de centelleo líquido.

Como patrón se utilizaron tres alícuotas con 5 µL del medio con ATP radiactivo (10 nmoles de ATP cada una). El valor medio de las cpm de ^{32}P se dividió por 10 para determinar las cpm de ^{32}P/nmol EP en el patrón.

A las cpm obtenidas en cada punto experimental se les restó las cpm de ^{32}P obtenidas en el ensayo en blanco. Los nmoles de EP se obtienen dividiendo las cpm resultantes entre las cpm de ^{32}P correspondientes a 1 nmol de EP en el patrón. Al dividir por los mg de proteína utilizados (0´1 mg) se obtiene el valor de nmoles de EP/mg proteína.

Determinación de grupos SH

La cuantificación de grupos SH se realizó utilizando DTNB (reactivo de Ellman), según el método descrito por Murphy (1976). DTNB es un compuesto que reacciona con los grupos SH de los residuos de cisteína liberando ácido-5-mercapto-2-nitrobenzoico de color amarillo que se puede valorar a 412 nm.



DTNB ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico

Las muestras E_1Ca_2 se trataron previamente con H_2O_2. El medio de incubación utilizado fue: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM, vesículas de RS a una concentración de 0´4 mg/mL y distintas concentraciones de H_2O_2 (0, 1, 2, 3, 5, 10 ó 20 mM). El volumen final fue de 0´6 mL

con una concentración de Ca^{2+} libre de 50 µM. La incubación se realizó durante 1 h a 37 ºC.

Una vez que las muestras se habían tratado con H_2O_2 se añadía catalasa (20 UI/µmol de H_2O_2) a cada uno de los tubos para eliminar el H_2O_2 que no ha reaccionado con la proteína.

El medio de reacción utilizado para el tratamiento con H_2O_2 no permite la valoración de grupos SH porque interfiere con el reactivo DTNB. Antes de valorar los grupos SH es necesario reemplazar el medio de incubación. Para ello se pusieron a hidratar 5 g de Sephadex G-50 en 100 mL de Tris-HCl 0´1 M (pH 7´8) durante 24 h y a temperatura ambiente. El gel hidratado se utilizó para rellenar columnas de 3´5 x 0´7 cm (1´5 mL) que se centrifugaban a 4.000 rpm durante 1 min en una centrífuga de sobremesa Selecta modelo Mixtasel antes de usar.

A continuación, se sacó una alícuota de 0´5 mL de cada una de las muestras tratadas con H_2O_2 y se añadió a una columna de Sephadex. Estas columnas equilibradas en el medio con Tris se sometían a centrifugación a 4.000 rpm durante 1 min. De este modo se conseguía que las vesículas de RS salieran de la columna equilibradas en el nuevo medio.

Para hacer la valoración de los grupos SH se añadía a cada muestra eluída de la columna (0´5 mL) un volumen de 0´5 mL compuesto por: Tris-HCl 0´1 M (pH 7´8) y SDS 3´2 mg/mL. El medio de reacción con DTNB contiene SDS para exponer todos los grupos SH de la proteína y permitir su valoración con el reactivo.

El inicio de la reacción tuvo lugar con la adición de 20 µL de DTNB 200 mM disuelto en metanol para dar una concentración 4 mM de DTNB. La incubación se prolongó durante 3 min a 25 ºC. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 412 nm. Los grupos SH modificados por el tratamiento con H_2O_2 no darán reacción con DTNB y por tanto provocarán una disminución de la absorbancia respecto al control.

El ensayo en blanco se realizó con 1 mL del medio compuesto por: Tris-HCl 0´1 M (pH 7´8) y SDS 1´6 mg/mL al cual se le añadía 20 µL de DTNB 200 mM, agitando muy bien tras cada adición. Para determinar grupos SH en las muestras, tratadas o no tratadas con H_2O_2, se utilizó el coeficiente de extinción molar $\varepsilon = 13.600\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$. La absorbancia obtenida para cada punto experimental se dividió por el valor de ε obteniendo la valoración de grupos SH como concentración M. Si ese valor se divide por la concentración de Ca^{2+}-ATPasa presente en cada muestra, que es aproximadamente 1´3 µM, obtendremos el número de grupos SH por molécula de ATPasa.

Presentación de datos

Los datos corresponden a la media aritmética ($\bar{x}$) obtenida a partir de al menos tres experimentos independientes:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

La desviación entre la media aritmética y los valores experimentales se expresa mediante la desviación estándar (S):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\bar{x} - x_i)^2}{(n-1)}}$$

El programa de ordenador utilizado para el tratamiento de los datos fue SigmaPlot de Jandel Scientific (EEUU).