DISCUSIÓN

La Ca^{2+}-ATPasa de RS transporta 2 iones Ca^{2+} por cada ATP hidrolizado en condiciones óptimas de actuación (Hasselbach, 1964). La concentración de Ca^{2+} dentro de las vesículas se eleva al nivel mM en unos pocos s porque el volumen de las vesículas es de ~ 5 μL/mg de proteína (Duggan y Martonosi, 1970) y eso produce inhibición del transporte. En estas condiciones sólo sería posible medir velocidades iniciales en la escala de tiempo de ms. Con el fin de medir la velocidad de transporte en una escala de tiempo de min es por lo que se incluye oxalato potásico en el medio de reacción. El anión oxalato, que se equilibra dentro y fuera de las vesículas, evita la elevación del Ca^{2+} libre interno al formarse oxalato cálcico cuyo producto de solubilidad es muy bajo ($2´7 \cdot 10^{-9}$ M^2 a 25 ºC). Por tanto, oxalato evita la inhibición de la velocidad de transporte por acumulación de Ca^{2+} dentro de las vesículas.

Al utilizar una concentración 50 μM de ATP se incluía fosfoenolpiruvato y piruvato quinasa en el medio de ensayo. Fosfoenolpiruvato transfiere su grupo fosfato al ADP —producto de reacción de la Ca^{2+}-ATPasa— para regenerar ATP en un proceso que cataliza piruvato quinasa. De esta forma el ATP que va hidrolizando la Ca^{2+}-ATPasa se regenera y eso permite mantener constante la concentración de sustrato durante el tiempo de medida, a pesar de que la concentración de ATP que se usa es baja.

El transporte activo de Ca^{2+} requiere que se produzca hidrólisis de ATP pero no siempre que hay hidrólisis de ATP se produce transporte de Ca^{2+}. Cuando hay hidrólisis de ATP pero no transporte de Ca^{2+} se dice que hay desacoplamiento. Al tratar vesículas de RS con H_2O_2 se observa que el tratamiento produce una inhibición del transporte de Ca^{2+} que es dependiente de la concentración de peróxido utilizada (*Figura 4*). Los datos se obtuvieron a dos concentraciones distintas de ATP (50 μM ó 1 mM) con el fin de observar si el efecto era dependiente de la concentración de ATP. En este caso se ve que el grado de inhibición del transporte de Ca^{2+} es independiente de la concentración de ATP.

Al estudiar el efecto del H_2O_2 sobre la velocidad de hidrólisis de ATP —en las condiciones descritas para el transporte— se observa que la velocidad de hidrólisis de ATP se afecta en menor grado por H_2O_2 (*Figura 5*). La inhibición es menor cuando se utiliza ATP 1 mM que cuando se utiliza ATP 50 μM. Estos datos indican que el ATP ejerce un efecto protector de la actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} frente a la inhibición por H_2O_2. En cualquier caso la actividad ATPasa no llega a inhibirse como el transporte.

La existencia de desacoplamiento queda patente al determinar el factor de acoplamiento Ca^{2+}/P_i (*Figura 6*). El factor de acoplamiento en muestras no tratadas con H_2O_2 es mayor cuando se utiliza ATP 1 mM que cuando se utiliza ATP 50 μM aunque en ningún caso se alcanza el valor óptimo de 2. Al calcular el factor de acoplamiento en muestras tratadas con H_2O_2 se observa que hay un descenso que depende de la concentración de H_2O_2 utilizada. El acoplamiento llega a ser prácticamente cero cuando se hace el tratamiento con H_2O_2 3 mM.

La utilización de TG, que es un inhibidor específico de la Ca^{2+}-ATPasa de RS, sirve para obtener información del mecanismo de hidrólisis cuando hay desacoplamiento inducido por H_2O_2. TG es un sesquiterpeno que se extrae de la raíz de la planta mediterránea *Thapsia garganica*. Este compuesto impide la unión de Ca^{2+} a la enzima (Sagara y col., 1992). Por tanto, TG inhibirá la actividad ATPasa si durante el ciclo de reacción se acumulan formas enzimáticas (fosforiladas y no fosforiladas) con Ca^{2+} unido y no tendrá efecto sobre la actividad si solo se acumulan formas sin Ca^{2+} unido. En estos experimentos se utilizó H_2O_2 3 mM con objeto de que el desacoplamiento fuera total. En estas condiciones experimentales se observa que al añadir concentraciones crecientes de TG se produce una inhibición progresiva de la hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+} (*Figura 7*). Esto indica que la proteína tratada con H_2O_2 realiza la hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+} a través de las conformaciones E_1Ca_2 y $E_1P{\cdot}Ca_2$ de lo contrario TG no tendría efecto alguno sobre la velocidad de hidrólisis de ATP. Sabemos que la hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} no se afecta por TG (Fortea y col., 2001).

Cuando la hidrólisis de ATP da lugar a transporte de Ca^{2+} se produce un ciclo acoplado de reacción que denominamos ciclo E_1-E_2 (*Esquema 1*). Este ciclo requiere la formación del intermedio de reacción $E_1P{\cdot}Ca_2$ y su posterior ruptura secuencial. En primer lugar se disocia el Ca^{2+} dentro de las vesículas y después se libera P_i al medio externo. Cuando hay hidrólisis de ATP pero no transporte de Ca^{2+} se produce un ciclo desacoplado de reacción que denominamos ciclo E_1 (Fernández-Belda y col., 2001). En este ciclo se produce primero la liberación de P_i y después la disociación de Ca^{2+}, ambas al medio externo. El ciclo E_1 es operativo cuando las vesículas de RS se tratan con concentraciones de peróxido hasta ~ 3 mM.

El efecto del H_2O_2 sobre el transporte de Ca^{2+} y la hidrólisis de ATP que hemos descrito se ha evaluado a una temperatura de 25 ºC y utilizando vesículas intactas en presencia de oxalato potásico. El efecto inhibidor de H_2O_2 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa en las condiciones descritas es bastante limitado. Esto nos llevó a buscar otras condiciones de ensayo en las que se pudiera analizar mejor el efecto del H_2O_2 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa. Así estudiamos la influencia de la temperatura a la que se hacían las medidas de actividad enzimática (25 ó 37 ºC) y el estado de la membrana (permeable o impermeable a Ca^{2+}). Los datos obtenidos muestran que la temperatura de medida no influye en el grado de inhibición inducido por H_2O_2 (*Figura 8*).

Al hacer un estudio comparativo entre vesículas nativas (impermeables) y tratadas con ionóforo (permeables al Ca^{2+}) se vio que las vesículas permeables eran más sensibles a la inhibición por H_2O_2 que las vesículas intactas (*Figura 8*). Este comportamiento de mayor inhibición cuando se utilizan vesículas permeables es un hecho conocido. Este fenómeno se ha descrito al estudiar la hidrólisis de p-nitrofenilfosfato por la Ca^{2+}-ATPasa de RS (Fernández-Belda y col., 2001). La actividad hidrolítica de p-nitrofenilfosfato es inhibible por vanadato. Esa inhibición es dependiente del estado de la membrana ya que vesículas permeabilizadas con A23187 presentan una mayor sensibilidad a vanadato que vesículas impermeables incubadas con oxalato potásico. Por tanto, el estudio del efecto inhibidor del H_2O_2 sobre la actividad ATPasa se hizo a 37 ºC, puesto que los valores de actividad son más altos que a 25 ºC, y

con vesículas permeables a Ca^{2+} lo que permite conseguir un mayor grado de inhibición. La actividad Ca^{2+}-ATPasa se inhibe en un alto porcentaje cuando la concentración de H_2O_2 se eleva hasta al menos 20 mM.

La difracción de rayos X indica que las conformaciones E_1Ca_2 y E_2 tienen estructuras tridimensionales muy distintas (*Figura 2*) (Toyoshima y col., 2000; Toyoshima y Nomura, 2002). Esto nos llevó a estudiar si el efecto inhibidor dependía de que la proteína se expusiera al peróxido en una conformación u otra. El experimento consistió en utilizar muestras E_1Ca_2 o muestras E_2. La relación encontrada al estudiar la actividad enzimática de las muestras en presencia de Ca^{2+} y la concentración de peróxido utilizada fue la misma en ambos casos (*Figura 9*). Esto indica que el peróxido es igualmente accesible a la proteína en una u otra conformación.

Esa misma conclusión se alcanza cuando se estudia el efecto del tiempo de incubación con peróxido sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa al preincubar muestras E_1Ca_2 o muestras E_2 ya que la dependencia fue similar tanto en una conformación de la enzima como en otra (*Figuras 10 y 11*). Con este otro ensayo se confirma que el H_2O_2 no tiene preferencia para actuar sobre una determinada conformación de la enzima.

Al incubar Ca^{2+}–ATPasa purificada con ATP en un medio sin Ca^{2+} se observa que la proteína es capaz de hidrolizar ATP aunque a una velocidad unas diez veces menor que cuando hay Ca^{2+} (Fortea y col., 2001). La existencia de una ruta de hidrólisis en ausencia de Ca^{2+} —denominada actividad basal— es importante para conocer el mecanismo de acción de la enzima en determinadas situaciones experimentales (Fernández-Belda y col., 2001; Soler y col., 2002). El tratamiento con H_2O_2 produce una activación en la hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} lo que indica que el mecanismo de hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+} es distinto al que opera en ausencia de Ca^{2+}. Esa activación es dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de peróxido si bien tiende a alcanzar un nivel máximo (*Figura 12*). Ese efecto de saturación que se observa en la activación de la enzima hace que al utilizar una concentración de peróxido superior a las que se muestran en la figura —por

ejemplo 10 mM— la dependencia de la actividad respecto al tiempo de incubación sea exactamente la misma que la mostrada para una concentración 5 mM de peróxido (datos no mostrados).

Un conocimiento más profundo del efecto del H_2O_2 se consigue estudiando el ciclo de reacción de la Ca^{2+}–ATPasa. La primera etapa del ciclo es la unión de Ca^{2+} a la enzima lo que corresponde a la reacción parcial: $E_2 + 2Ca^{2+} \rightarrow E_1Ca_2$. La capacidad de unión de Ca^{2+} apenas se afecta con H_2O_2 2 mM mientras que H_2O_2 20 mM disminuye aproximadamente a la mitad la capacidad de unión de Ca^{2+} (*Figura 13*). Esto indica que la etapa de unión de Ca^{2+} no está afectada en las condiciones en las que hay desacoplamiento (H_2O_2 2 mM), si bien no hay transporte de Ca^{2+} al interior de la vesícula, mientras que esa etapa está parcialmente afectada cuando se eleva la concentración de H_2O_2 hasta 20 mM.

La interacción de E_1Ca_2 con ATP da lugar a la acumulación de EP lo que también ha sido objeto de estudio en este trabajo. Concentraciones 2-3 mM de peróxido no tienen efecto sobre la acumulación de EP en estado estacionario mientras que una concentración 20 mM produce un descenso de ~ 25 % (*Figura 14*). Esto indica que la fosforilación de la enzima en presencia de Ca^{2+} no está afectada en condiciones de desacoplamiento. El descenso en la acumulación de EP a altas concentraciones de peróxido puede ser debido a que la capacidad de unión de Ca^{2+} está disminuida. Sin embargo la actividad Ca^{2+}–ATPasa en muestras tratadas con H_2O_2 20 mM está muy inhibida (*Figura 9*). Esto indica que la etapa limitante de velocidad es posterior a la etapa de fosforilación. Los datos sobre desfosforilación de la enzima en condiciones de estado estacionario revelan que el tratamiento con peróxido 20 mM disminuye unas 5 veces el valor de la constante aparente de velocidad (*Figura 15*). La desfosforilación de la enzima —que en condiciones habituales de ensayo es la etapa limitante del ciclo— se encuentra afectada por el tratamiento con peróxido y es por tanto responsable del alto grado de inhibición de la actividad enzimática.

El efecto oxidativo del peróxido da lugar a la modificación química de grupos funcionales de los aminoácidos. La modificación de cisteínas es uno de los efectos más conocidos. La valoración de grupos SH de la Ca^{2+}-ATPasa demuestra que el tratamiento con H_2O_2 produce un descenso que es dependiente de la concentración utilizada (*Figura 16*). El efecto observado es saturable y puede estimarse que hasta un máximo de 10 cisteínas pueden verse afectadas.

A lo largo del trabajo nos hemos referido al efecto inhibidor del peróxido aunque sería más correcto hablar de efecto inactivador o de inhibidor irreversible ya que el H_2O_2 no responde al comportamiento de un inhibidor michaeliano que es reversible.

En definitiva, el tratamiento con H_2O_2 puede ejercer dos efectos funcionales diferentes sobre la proteína Ca^{2+}–ATPasa. El efecto observado depende de la concentración de peróxido utilizada. Una concentración más baja (hasta 2-3 mM) inhibe el transporte de Ca^{2+} con un efecto mucho menor sobre la hidrólisis de ATP lo que origina un desacoplamiento entre ambos procesos. Cuando se eleva la concentración de H_2O_2 (20 mM) se puede conseguir una clara inhibición de la actividad enzimática. Concentraciones μM de H_2O_2 —que se generan en el medio intra y extracelular en determinadas situaciones— pueden ser responsables del desacoplamiento de esta enzima y de la consiguiente elevación del Ca^{2+} libre en el citoplasma. Una elevación prolongada del Ca^{2+} intracelular da lugar a una serie de respuestas nocivas que pueden llegar a desencadenar la apoptosis celular. Hay que señalar que el efecto del H_2O_2 sobre la Ca^{2+}-ATPasa no es específico. Es bien conocido que otras proteínas e incluso otras macromoléculas son también diana de este agente oxidante.