

# Caracterización del estado de acoplamiento de las preparaciones de retículo sarcoplásmico e interacción de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa con vanadato

POR

ANTONIO ORTIZ LOPEZ \*

## ABREVIATURAS

ATP, Adenosina-5'-trifosfato; ATPasa o  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, enzima hidrolítico del ATP de las membranas del retículo sarcoplásmico;  $\text{C}_{12}\text{E}_0$ , Polioxietilén-9-lauril éter; EGTA, Acido etilén-glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético; Mops, Acido morfolinopropanosulfónico; NADH, Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida); Tes, Acido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfónico; X537A, Lasalócido.

## ENZIMAS

ATPasa: EC 3.6.1.3.; piruvato quinasa: EC 2.7.1.40; lactato deshidrogenasa: EC 1.1.1.27.

## ABSTRACT

The coupling ( $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$  ratio) of sarcoplasmic reticulum vesicles can be calculated from measurements of ATPase activity by using a pHmeter. Such ratio has been established in about 2 mol  $\text{Ca}^{2+}$ /mol ATP, in agreement with other authors.

(\*) Este trabajo forma parte de una Tesis de Licenciatura realizada en los Laboratorios del Departamento Interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Murcia bajo la dirección de los profesores doctor don Juan C. Gómez Fernández y doctor don F. García Carmona, a los cuales deseo expresar mi más sincero agradecimiento, así como al profesor doctor don F. García Cánovas, por su continuo apoyo y enseñanzas.



The effect of calcium ionophore Lasalocid (X537A) and of non ionic detergents ( $C_{12}E_9$ ) on sarcoplasmic reticulum vesicles is studied. The action of these agents is to give an increase of the calcium dependent ATPase activity, as a consequence of the greatly increasing of the permeability of the membrane to  $Ca^{2+}$ , but they do not affect the basal ATPase (calcium independent activity).

A method to uncouple the sarcoplasmic reticulum vesicles is described, by treatment with EGTA at 37° C. Such uncoupling produces an enhancement of the calcium dependent activity no affecting the basal ATPase.

Preparations of native ATPase, ATPase uncoupled by treatment with EGTA and ATPase purified with detergents have been used to study the interaction of orthovanadate ions with the enzyme.

The dissociation constant of the enzyme-vanadate complex was found to depend on the previous history of the enzyme and therefore it was found to be different in native ATPase, ATPase uncoupled by treatment with EGTA or in ATPase purified with detergents.

The interaction of vanadate ions with the  $Ca^{2+}$ -ATPase is a slow process. A histeretic process is observed when ATPase activity of sarcoplasmic reticulum vesicles, preincubated with vanadate, is assayed in the presence of the substrates of the enzyme,  $Ca^{+2}$  and ATP.

## RESUMEN

El estado de acoplamiento (relación  $Ca^{2+}$  transportado/ATP hidrolizado) de las preparaciones de vesículas de retículo sarcoplásmico se puede determinar por medidas de actividad ATPasa dependiente de calcio por medio del uso de un pHmetro. Dicha relación se ha calculado en unos 2 moles  $Ca^{2+}$ /mol ATP, valor que está de acuerdo con los datos de la bibliografía.

Se estudia el efecto del ionóforo de calcio X537A (lasalócido) y del detergente no iónico  $C_{12}E_9$  sobre las preparaciones de vesículas de retículo sarcoplásmico. Su acción se traduce en un aumento de la actividad ATPasa dependiente de calcio como consecuencia de que inducen un aumento de la permeabilidad de la membrana al  $Ca^{2+}$ , permaneciendo inalterada la ATPasa basal (independiente de calcio).

Se describe un método de desacoplamiento de las preparaciones de vesículas de retículo sarcoplásmico, por tratamiento con EGTA a 37° C. Dicho desacoplamiento produce un significativo aumento de la activi-

dad ATPasa dependiente de calcio no afectando a la actividad ATPasa basal.

Se han utilizado preparaciones de ATPasa nativa, desacoplada por tratamiento con EGTA y purificada con detergentes (octilglucósido o colato), para estudiar la interacción de los iones vanadato con el enzima. La constante de disociación del complejo enzima-vanadato depende de la historia previa del enzima y, por lo tanto, se ha visto que son diferentes para las diferentes preparaciones mencionadas anteriormente.

Se ha observado que la interacción del vanadato con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es un proceso lento, presentándose un proceso histerético cuando se ensaya actividad ATPasa, de vesículas preincubadas con vanadato, en presencia de los sustratos  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP.

## INTRODUCCION

El retículo sarcoplásmico es un conjunto de membranas que se encuentra en las fibras del músculo estriado e incluye dos componentes fundamentales: túbulos transversos y cisternas terminales.

Los estudios estructurales y funcionales de las membranas del retículo sarcoplásmico se han llevado a cabo, fundamentalmente, sobre preparaciones microsomales obtenidas por técnicas de centrifugación diferencial (Muscatello y col., 1961). La membrana microsomal está compuesta por proteínas y lípidos, en una proporción del 65 y 35 % del peso seco, respectivamente. La mayor parte del contenido proteico está proporcionada por una proteína de peso molecular entre 105.000 y 115.000, identificada con una ATPasa activada por calcio (Martonosi y Halpin, 1971; Mac Farland e Inesi, 1971). La capacidad de acumular calcio es una de las funciones específicas de las vesículas de retículo sarcoplásmico (Ebashi y Lipmann, 1962; Hasselbach y Makinose, 1961; Hasselbach y Makinose, 1962). Dicho transporte de calcio se efectúa utilizando la energía de hidrólisis del ATP gracias al enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

La actividad ATPasa, dependiente de calcio de membranas recién aisladas, está estrechamente acoplada al transporte de calcio con una estequiometría de 2 iones calcio transportados/mol de ATP hidrolizado (Weber y col., 1966), según la mayor parte de los autores. Esta relación se obtiene experimentalmente de las velocidades iniciales, ya que, conforme las vesículas van acumulando calcio, la velocidad del transporte declina rápidamente. El transporte de calcio cesa cuando la concentración de este ion en el interior es del orden de 1 mM.

La actividad transportadora de calcio es, en general, más suscepti-

ble de inactivación que la actividad ATPasa dependiente de calcio. Las preparaciones que se presentan así se denominan bajo el término de «desacopladas» y presentan una actividad ATPasa incrementada con respecto a las acopladas, posiblemente debido a que no se produce la inhibición por elevadas concentraciones de calcio interno (Makinose y Hasselbach, 1965; Weber, 1971; Yamada y Tonomura, 1972).

Los procedimientos y las modificaciones químicas de las membranas del retículo sarcoplásmico que se han descrito para «desacoplar» las preparaciones de vesículas de retículo sarcoplásmico se muestran en la tabla I.

Los iones ortovanadato son análogos de los iones fosfato, ya que forman complejos enzima-vanadato similares a los complejos enzima-fosfato intermedios en el ciclo catalítico de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (Lindquist y col., 1973; Van Etten y col., 1974; López y col., 1976). Es por esta razón por lo que el vanadato se muestra como una herramienta muy útil para el estudio, tanto del ciclo catalítico de la ATPasa como para estudiar comparativamente los diferentes tipos de preparaciones de vesículas microsomales, de acuerdo con las diferentes constantes de disociación que presentan.

## MATERIALES Y METODOS

### PRODUCTOS QUÍMICOS

Ortovanadato sódico, ATP exento de vanadato, NADH, fosfoenolpiruvato, piruvato kinasa y lactato deshidrogenasa fueron de Sigma Co., Poole, Dorset, U.K., p-Nitrofenilfosfato fue de Merck. Los demás productos fueron de grado analítico.

### ENSAYOS ANALÍTICOS

La concentración de proteínas se determinó de acuerdo al método de Lowry y colaboradores (1951) o a partir de la absorción molar de la ATPasa (Hardwicke y Green, 1974).

La actividad ATPasa se ensayó a 25° C usando un sistema regenerador de ATP esencialmente igual a como se describe por Gómez Fernández y col. (1980), en un medio que contenía KCL 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, EGTA 0,6 mM, NADH 0,2 mM, fosfoenol piruvato 2 mM, 4 U.I./mg de piruvato quinasa, 6 U.I./mg de lactato deshidrogenasa, 2 mM de ATP (salvo que se indique lo contrario) y  $\text{CaCl}_2$  hasta conseguir una concentración 70  $\mu\text{M}$  de calcio libre.

Otro método también utilizado para medir la actividad ATPasa fue a través de la medida del cambio de pH que se produce como consecuencia de la liberación de protones por la hidrólisis del ATP, en un medio débilmente tamponado (Carafoli y Semenza, 1979). La valoración de los  $H^+$  liberados se realizó con HCl 1 N, valorado con NaOH contrastada. La actividad ATPasa se determina teniendo en cuenta que 1 mol de ATP produce, al hidrolizarse, 0,75 mol de  $H^+$ .

Las medidas de la fluorescencia intrínseca de triptófano se llevaron a cabo en un medio que contenía KCl 100 mM,  $MgCl_2$  100 mM, Mops 50 mM, pH 7,0 en cubetas de 3 ml termostatizadas a 25° C. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y la de emisión de 335 nm.

La concentración de calcio libre se estimó a partir de las de calcio total y EGTA, usando un programa de computador (Fabiato y Fabiato, 1978, 1979), teniendo en cuenta pH, concentración de  $Mg^{2+}$ , fosfoenolpiruvato, fosfato inorgánico y nucleótidos cuando se encontraban presentes. Se usó un microcomputador Commodore equipado con una memoria de 96K y sistema de «floppy-disk».

#### *Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPasa*

El retículo sarcoplásmico se preparó a partir del músculo blanco de las patas traseras y lomos de conejos de la cepa New Zeland de acuerdo al método de Nakamura y col. (1976), pero con la inclusión de 1 mM ditiotreitól y 5  $\mu$ M fluoruro de fenilmetilsulfonilo en todos los tampones. Finalmente, se resuspendió en KCl 1 M, sacarosa 0,25 M, Tes 50 mM, pH 8,0 y fue rápidamente congelado y almacenado, en pequeñas alícuotas, en nitrógeno líquido. Las preparaciones se usaron, como mucho, hasta dos semanas después de su preparación.

#### *ATPasa purificada con octil-glucósido*

Se realizó, a partir de vesículas de retículo sarcoplásmico preparadas como se ha descrito anteriormente, según el método de Banerjee y col. (1979). La concentración de proteínas fue de 5 mg/ml y la de octil-glucósido de 22 mM. Finalmente, se resuspendió, a unos 20 mg de proteína/ml en un medio con sacarosa 0,25 M, Tris 10 mM, pH 8,0 y se congeló en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido.

#### *ATPasa purificada con colato*

Se siguió el método descrito por Warren y col. (1974). Una suspensión de proteínas a unos 10 mg/ml se trató con colato en una relación

de 0,35 mg de colato/mg de proteína. La mezcla final se centrifugó en un gradiente de sacarosa del 20 al 60 %, quedando finalmente la ATPasa purificada en un medio que contenía KCl 1 M, ditiotreitól 2,5 mM, Tes 50 mM, pH 8,0. Las muestras se congelaron en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido.

#### *Desacoplamiento por EGTA*

Las incubaciones con EGTA se llevaron a cabo en un medio que contenía KCl 100 mM, EGTA 5 mM, Tes 50 mM, pH 7,0 a una concentración de proteínas de 1,5 mg/ml. Las muestras se mantuvieron en un baño termostatizado a 37° C. La concentración de EGTA fue de 5 mM salvo en los casos en los que se indica otro valor.

#### *Preincubación con vanadato*

Las preincubaciones con concentraciones variables de vanadato se llevaron a cabo en un medio que contenía KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 5 mM, Tes 50 mM, pH 7,0, en un baño termostatizado a 25° C. Se tomaron alícuotas de esta preincubación para ensayar actividad ATPasa tras un período de 10 minutos. El vanadato libre fue eliminado por centrifugación a través de una columna de Sephadex G-50 fino, de alícuotas de 100 µl, como ya se ha descrito anteriormente (Pick, 1982; Penefsky, 1977). El gel fue previamente equilibrado con el mismo tampón usado para la preincubación. La actividad se ensayó en un período no superior a 5 minutos después de la centrifugación, tiempo en el cual no se observó decrecimiento en la inhibición por vanadato.

## RESULTADOS

### CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE ACOPLAMIENTO DE LAS PREPARACIONES

#### *Efecto del ionóforo X537A(Lasalócido) y del detergente C<sub>12</sub>E<sub>9</sub> sobre la actividad ATPasa*

Tanto los ionóforos como los detergentes son agentes que estimulan la actividad ATPasa dependiente de calcio de vesículas de retículo sarcoplásmico cuando se agregan al medio de medida, pues rompen la estanqueidad de las membranas evitando el efecto inhibitor que se produce por elevación de la concentración de calcio interna (Scarpa y col., 1972). En consecuencia, dichas preparaciones muestran una actividad que corresponde a velocidades iniciales.

Las medidas de actividad se realizaron, según se describe en materiales y métodos, usando un sistema regenerador de ATP. En la tabla II se muestran los resultados obtenidos con vesículas de retículo sarcoplásmico frescas.

La acción del X537A se tradujo en una duplicación, aproximadamente, de la actividad.

El  $C_{12}E_8$  incrementa la actividad ATPasa de 2 a 2,5 veces.

La acción del detergente se debe a una solubilización de la membrana del retículo sarcoplásmico, mientras que el ionóforo actúa creando canales específicos para calcio. En cualquier caso, la acción de ambos impide la acumulación de los iones  $Ca^{2+}$  en el interior de las vesículas.

#### *Medida de la relación de acoplamiento*

La relación de acoplamiento entre el transporte de iones  $Ca^{2+}$  y la actividad ATPasa dependiente de calcio, se expresa en moles de calcio transportado por mol de ATP hidrolizado. Para medir la actividad ATPasa se empleó un pH metro, según se describe en *Materiales y Métodos* (Carafoli y Semejanza, 1979). De esta manera se puede calcular la cantidad de ATP que se ha hidrolizado cuando se añade una cantidad conocida de calcio en presencia de oxalato 5 mM (figura 1). El oxalato penetra libremente al interior de las vesículas y precipita el calcio en forma de oxalato cálcico. Dicha sal sólo precipita en el interior de las vesículas, pues sólo allí se alcanza el producto de solubilidad debido al pequeño volumen de éstas. Esta acción del oxalato es fundamental para evitar el efecto inhibitor que se produce sobre la ATPasa cuando se incrementa la concentración de calcio interna (Scarpa y col., 1972), y hace posible la medida de actividades más próximas a la velocidad inicial.

Se realizaron adiciones de 100 nmol de calcio, obteniéndose relaciones de acoplamiento entre 1,8 y 2,0 mol  $Ca^{2+}$ /mol ATP, que están de acuerdo con los valores citados en la bibliografía (Weber y col., 1966).

#### *Desacoplamiento por tratamiento con EGTA*

Se han descrito varios métodos para obtener preparaciones de vesículas de retículo sarcoplásmico desacopladas (tabla I). En el presente trabajo se describe un método de desacoplamiento por tratamiento con EGTA a 37° C, el cual es perfectamente reproducible según nuestra experiencia.

La ventaja del uso de preparaciones desacopladas radica en poder evitar el efecto inhibitor que se produce al incrementarse la concen-

tración de calcio en el interior de las vesículas, y por otra parte en que se miden velocidades muy próximas a las iniciales.

Las incubaciones con EGTA se realizaron tal y como se describe en el apartado de *Materiales y Métodos* a pH 7,0 y 37° C. Se ensayaron tres concentraciones diferentes de EGTA: 0,05, 0,5 y 5 mM, realizándose siempre un experimento control (sin EGTA), tanto para vesículas preparadas con ditiotreitól y fluoruro de fenilmetilsulfonilo como en su ausencia (figuras 2 y 3). A diferentes tiempos de incubación se tomaron alícuotas de estos medios y se midió actividad ATPasa a pH 7,0 y 25° C con una concentración de 2 mM de ATP y 70  $\mu$ M de calcio libre. Paralelamente se midió actividad ATPasa basal, la cual se mantuvo constante y próxima a 0,15 U.I./mg, por lo cual no se reseña en la figura.

Se produce un incremento máximo de la actividad ATPasa, que coincide con un valor muy bajo en la relación de acoplamiento, a una concentración 5 mM de EGTA y para un tiempo de preincubación de 75 minutos, produciéndose a partir de este momento un decrecimiento en la actividad, probablemente debido a la aparición de fenómenos de desnaturalización a consecuencia del tratamiento prolongado a 37° C.

Sólo se observaron diferencias entre las preparaciones con ditiotreitól y fluoruro de fenilmetilsulfonilo o sin ellos, para una concentración 0,05 mM de EGTA y para el control (sin EGTA). En vesículas preparadas sin ditiotreitól ni fluoruro de fenilmetilsulfonilo se elevó algo la actividad como consecuencia del tratamiento, lo cual no ocurrió para las preparaciones que los contenían.

Se comprobó que tras los 75 minutos de incubación las preparaciones mantienen una actividad constante durante varias horas si se mantienen en hielo a 0° C.

#### INTERACCIÓN CON VANADATO

##### *Cálculo de la constante de disociación $K_v$*

Las diferentes muestras de vesículas de retículo sarcoplásmico se preincubaron con concentraciones variables de vanadato tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. La actividad ATPasa se midió con una concentración de 2 mM de ATP, a 25° C y pH 7,0.

Se observa un período de retardo en la actividad ATPasa dependiente de calcio, que varía hiperbólicamente con la concentración de vanadato (figura 3). Esta dependencia implica un fenómeno de saturación del enzima por vanadato.

Se puede deducir una ecuación (Ortiz, 1983; Ortiz y col., 1983), que se ajusta a las observaciones realizadas:

$$1/\overline{P.R.} = 1/\overline{P.R.m} + \overline{K_v}/\overline{P.R.m}[V]$$

donde  $\overline{P.R.}$  es el período de retardo obtenido a cada concentración de vanadato,  $V$ ;  $\overline{P.R.m}$  es el período de retardo máximo y  $\overline{K_v}$  la constante de disociación del vanadato del complejo enzima-vanadato inhibido. Representando  $1/\overline{P.R.}$  frente a  $[V]$ , se obtiene una línea recta calculándose el valor de  $\overline{K_v}$  a partir de la pendiente y el de  $\overline{P.R.m}$  a partir de la ordenada en el origen. Los valores de  $\overline{P.R.m}$  y  $\overline{K_v}$  obtenidos para las diferentes formas de ATPasa se presentan en la tabla III. Se observa que dichos valores varían con la historia previa del enzima. El valor del período de retardo máximo varía con la concentración de ATP de medida, pero las  $\overline{K_v}$  calculadas en ambos casos presentan prácticamente el mismo valor.

#### *Medidas de fluorescencia intrínseca*

En la bibliografía se ha descrito (Dupont y Benett, 1982), una variación en la fluorescencia intrínseca de triptófano que se produce en la  $Ca^{2+}$ -ATPasa como respuesta al calcio. Dicha variación se ha atribuido a la transición  $E^* \rightarrow E$  que presenta el enzima. Por preincubación de las vesículas de retículo sarcoplásmico con vanadato antes de la adición de  $Ca^{2+}$ , dicha respuesta se hace lenta (similar al período de retardo obtenido en la actividad), lo que se atribuye al desplazamiento lento del vanadato del complejo inhibido. Los principales resultados se resumen en la figura 4.

La adición de EGTA 0,4 mM produce un descenso del 4 % en el nivel de fluorescencia, consecuencia de la eliminación de calcio del medio. La posterior adición de 0,45 mM de calcio libre, produce de nuevo la recuperación rápida del nivel inicial de la fluorescencia.

El descenso que se produce en la intensidad de fluorescencia por la adición de vanadato no se ha de tener en cuenta, pues se debe a un efecto de atenuación inespecífico, ya que se ha comprobado que también se produce sobre otras proteínas, incluso no enzimáticas, como albúmina de suero bovino.

La adición de calcio tras la preincubación con vanadato, hace que la recuperación de la fluorescencia sea lenta. Si junto al calcio se adiciona ATP a baja concentración (20  $\mu$ M), el proceso se acelera notable-

mente con respecto a la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  sólo, pero conservando aún una cierta lentitud.

Estos resultados apoyan los obtenidos por medidas de actividad ATPasa (Ortiz, 1983), de una manera cualitativa.

## DISCUSION

Los métodos usados de adición de detergentes o ionóforos a los medios de medida de la actividad ATPasa permiten establecer claramente el estado de acoplamiento (relación  $\text{Ca}^{2+}$  transportado/ATP hidrolizado) de la muestra utilizada, conjuntamente con la determinación de la razón  $\text{Ca}^{2+}$ /ATP por el método del pHmetro.

En el caso del retículo sarcoplásmico no basta con determinar la actividad específica de la ATPasa dependiente de calcio para reconocer si se encuentra o no en buen estado, debido a que la actividad específica crece enormemente cuando se desacopla la actividad ATPasa del transporte de calcio, al no funcionar el efecto inhibitor de este catión por elevación de su concentración dentro de las vesículas. En vesículas de retículo sarcoplásmico desacopladas se observa una actividad específica similar a la velocidad inicial en vesículas acopladas. Esta actividad inicial, que se observa claramente y sólo en los primeros milisegundos, se inhibe notablemente cuando se saturan los sitios de enlace de baja afinidad para calcio, que se encuentran hacia el interior de las vesículas (Verjovski-Almeida y col., 1978). De esta forma, la actividad que se observa normalmente en vesículas acopladas, corresponde a la de mantenimiento del gradiente de calcio entre el interior y el exterior de las vesículas, en el estado estacionario. Este mantenimiento es necesario por la salida pasiva de iones calcio a través de la membrana microsomal.

La actividad y el acoplamiento varían notablemente con el pH, la temperatura (Rossi y col., 1979) y la concentración de ATP, siendo el efecto del ATP sobre la cinética del enzima muy complejo (De Meis y Vianna, 1979).

De todas estas consideraciones se deduce que es difícil el hacer comparaciones con los valores y datos citados en la literatura. No obstante, nuestras actividades específicas, medidas a 25° C, se comparan muy bien con las publicadas, en condiciones similares, por otros autores (Johanson y col., 1981; Davis y col., 1976). Los valores de actividad específica obtenidos tras el desacoplamiento con EGTA a 37° C concuerdan muy bien con los descritos (Diamond y col., 1980), aunque no se trata de las mismas condiciones.

La actividad específica de vesículas de retículo sarcoplásmico acopladas aumenta notablemente cuando se tratan con detergentes a baja concentración, como colato (Hesketh y col., 1976), desoxicolato (Warren y col., 1974), octilglucósido (Banerjee y col., 1979) o Tritón X100 (Ikemoto, 1975). Estos agentes alteran la membrana impidiendo la acumulación de calcio en el interior de las vesículas.

También el ionóforo X537A provoca desacoplamiento al impedir la acumulación de calcio y, por tanto, hace aumentar notablemente la actividad específica. El X537A parece actuar muy cerca de la proteína, probablemente en la zona de interacción entre lípidos y el enzima (Verjovski-Almeida, 1981).

Se considera que las preparaciones de vesículas de retículo sarcoplásmico están en buen estado de acoplamiento cuando se produce un aumento de la actividad ATPasa de aproximadamente el doble, por acción del ionóforo en el medio de medida, o de 3-4 veces por acción del detergente  $C_{12}E_9$ . En estas condiciones la relación  $Ca^{2+}/ATP$ , medida por el método del pHmetro, en presencia de oxalato, es de 1,8-2,0. El detergente activa más la ATPasa que el ionóforo debido probablemente a que actúa sobre la conformación proteica del enzima.

Los inhibidores enzimáticos, que son análogos estructurales de un sustrato, interaccionan a menudo con el centro activo, por lo que son herramientas muy útiles para el estudio de la cinética de la reacción catalizada. Tal es el caso del vanadato, que presenta una analogía estructural bastante definida con el fosfato.

Los resultados presentados muestran que la interacción del vanadato con la ATPasa es un proceso lento y que el complejo inhibido da un tipo de respuesta histerética cuando se reactiva por los sustratos  $Ca^{2+}$  y ATP.

La interacción del vanadato presenta diferentes características según la muestra de enzima utilizada. Esto refleja probablemente los cambios en la conformación del enzima producidos a consecuencia del tratamiento sufrido (detergentes, desacoplamiento por EGTA, etc.) y que harán que el sitio de unión del vanadato se encuentre más o menos afectado. En el caso de las vesículas de retículo sarcoplásmico nativas, se obtiene una  $K_v$  muy pequeña (1  $\mu M$ ) debido a que el enzima mantiene su estructura inalterada y, por lo tanto, el sitio de unión del vanadato está poco o nada afectado.

Los resultados obtenidos mediante fluorimetría indican, al menos de manera cualitativa, que la adición de ATP junto al  $Ca^{2+}$ , hace que

la transición  $E^* \rightarrow E$  tenga lugar más rápidamente que cuando sólo actúa el calcio, indicando que ambos sustratos son capaces de desplazar al vanadato del complejo enzima-vanadato inhibido, aunque con diferente velocidad.

TABLA I

PROCEDIMIENTOS QUE DESACOPLAN EL TRANSPORTE DE CALCIO RESPECTO DE LA ACTIVIDAD  $ATP_{asa}$  DEPENDIENTE DE CALCIO DE VESICULAS DE RETICULO SARCOPLASMICO

<i>Procedimiento</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Referencia</i>
Envejecimiento ... ..	0°C/2-3 días	Ebashi y Lipmann, 1962
Digestión triptica ... ..	Tripsina 1:20/ 32°C/15 seg.	Shamoo y col., 1977
Condiciones ligeramente ácidas...	pH 5,6/37°C/5 min.	Berman y col., 1977
Tratamiento con n-alcoholes ...	n-butanol 400 mM T ambiente/15 min.	Hara y Kasai, 1977

TABLA II

EFFECTO DEL IONOFORO X537A (LASALOCIDO) Y DEL DETERGENTE  $C_{12}E_9$  SOBRE LA ACTIVIDAD  $ATP_{asa}$  DE VESICULAS DE RETICULO SARCOPLASMICO ACOPLADAS. LA ACTIVIDAD SE MIDIO CON UN SISTEMA DE ENZIMAS ACOPLADOS TAL Y COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS, CON UNA CONCENTRACION DE ATP DE 2mM, A pH 7,0 Y 25°C. LOS VALORES CORRESPONDEN A LA MEDIA DE CUATRO MEDIDAS

<i>Muestra</i>	<i>ATPasa basal</i>	<i>ATPasa total</i>
Control ... ..	0.13 ± 0.01	0.91 ± 0.06
+ X537A 100 $\mu$ M..	0.13 ± 0.01	1.57 ± 0.17
+ $C_{12}E_9$ 100 $\mu$ M ...	0.13 ± 0.01	3.04 ± 0.60

TABLA III

VALORES DEL PERIODO DE RETARDO MAXIMO Y DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION DEL VANADATO PARA DIFERENTES MUESTRAS DE  $ATP_{asa}$  DE RETICULO SARCOPLASMICO

<i>Muestra</i>	<i>P. R. máx. (min.)</i>	<i><math>K_v</math> (<math>\mu</math>M)</i>
VRS nativas *	4.9	1.0
VRS desacopladas por tratamiento con EGTA.	1.6	28.0
VRS desacopladas por tratamiento con EGTA *	5.5	27.0
ATPasa purificada con octilglucósido ... ..	4.0	3.0
ATPasa purificada con colato ... ..	3.6	35.0

(\*) En estos casos la concentración de ATP de medida fue de 20  $\mu$ M. En el resto de las medidas la concentración de ATP fue de 2 mM.

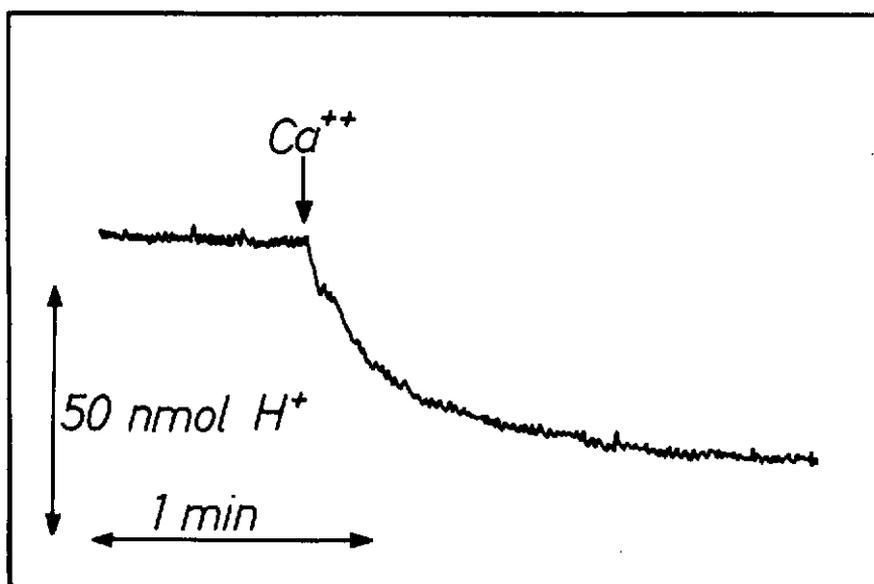


Fig. 1.—Medida de la relación de acoplamiento ( $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ ) mediante el uso de un pHmetro. Se realizaron adiciones de 100 nmol de  $\text{Ca}^{2+}$  calculándose la relación de acoplamiento tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos.

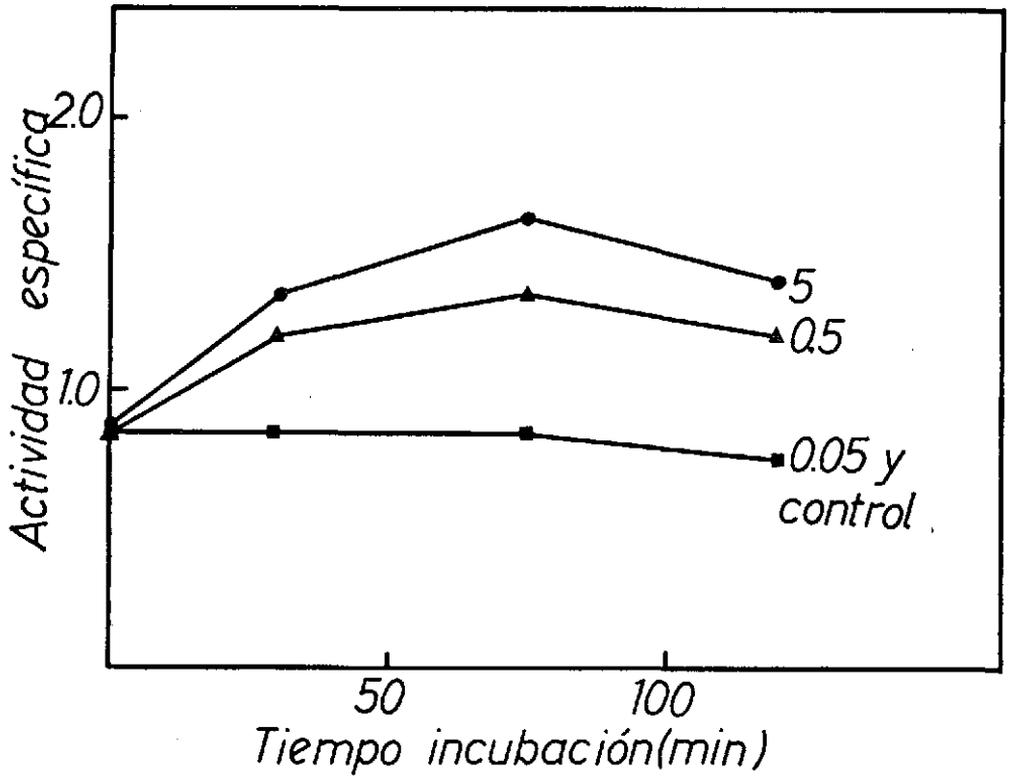


Fig. 2.—Desacoplamiento de la actividad ATPasa respecto del transporte de calcio por incubación con EGTA a 37°C. Se muestra la variación de la actividad ATPasa dependiente de calcio con el tiempo de incubación con EGTA. Los números sobre las curvas indican la concentración de EGTA, en mM, durante la incubación. La actividad se midió con una concentración de ATP 2 mM, a pH 7,0 y 25°C.

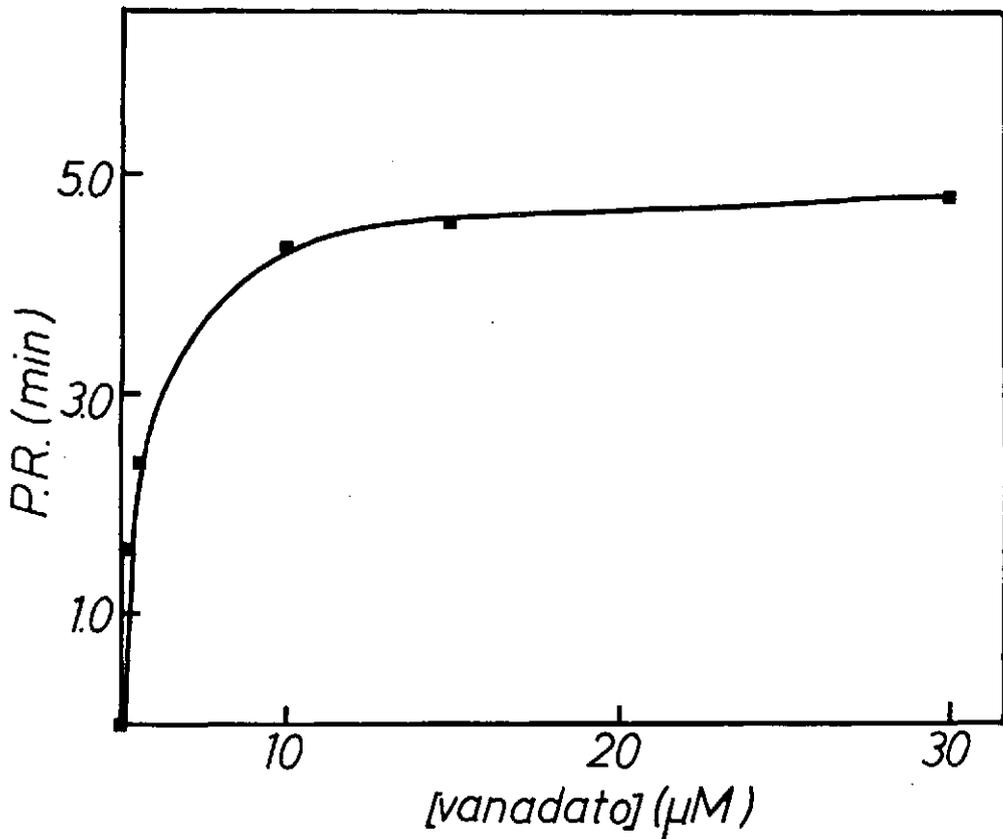


Fig. 3.—Variación del período de retardo, inducido en la actividad ATPasa dependiente de calcio por preincubación de vesículas de retículo sarcoplásmico con vanadato, con la concentración de vanadato. La actividad se midió en las mismas condiciones que las de la figura 2.

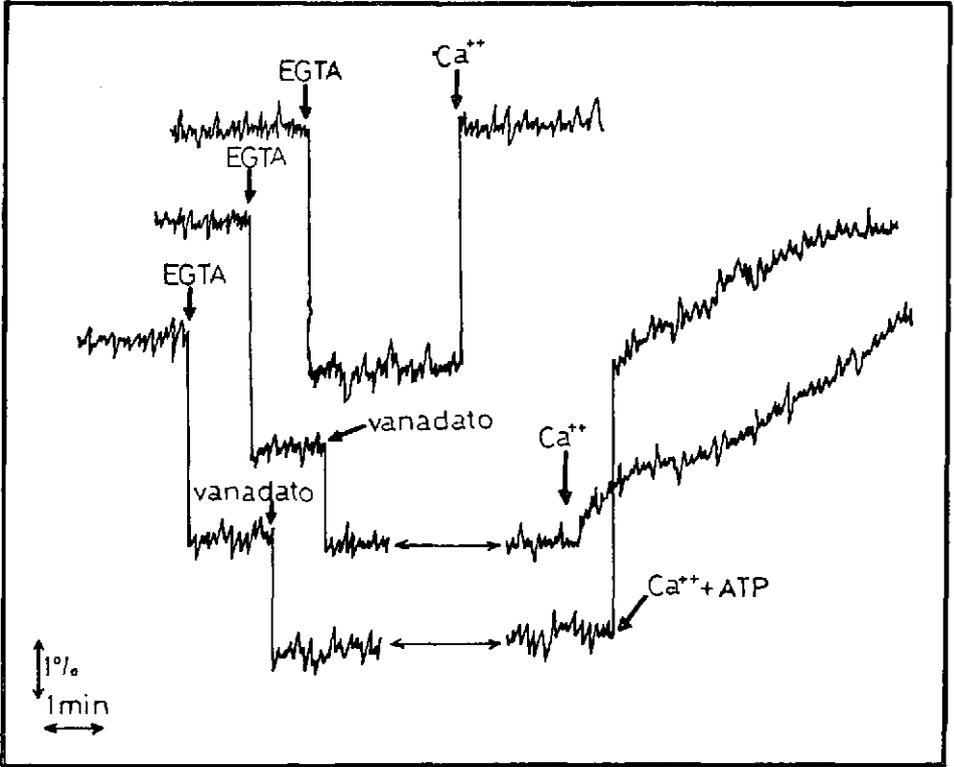


Fig. 4.—Efecto de la preincubación de vesículas de retículo sarcoplásmico con vanadato sobre la transición, en la fluorescencia de triptófano de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, inducida por calcio tras adición de EGTA. Las adiciones de EGTA y de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron de 0,40 y 0,45 mM respectivamente. El ATP fue de 20  $\mu\text{M}$ . Las condiciones de medida se describen en Materiales y Métodos.

## BIBLIOGRAFIA

- BANERJEE, R.; EPSTEIN, M.; KANDRACH, M.; ZIMNIACK, P., y RACKER, E. (1979), *Membr. Biochem.*, 2: 283.
- BERMAN, M. C.; MCINTOSH, D. B., y KENCH, J. E. (1977), *J. Biol. Chem.*, 252: 994.
- CARAFOLI, E., y SEMENZA, G. (1979), *Membrane Biochemistry*, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, New York.
- DAVIS, D. G.; INESI, G., y GULIK-KRZYWICKI, T. (1976), *Biochemistry*, 15: 1271.
- DE MEIS, L., y LUIZ-VIANNA, A. L. (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, 48: 275.
- DIAMOND, E. M.; NORTON, K. B.; MCINTOSH, D. B., y BERMAN, M. C. (1980), *J. Biol. Chem.*, 255: 11351.
- DUPONT, Y., y BENNET, N. (1982), *FEBS Lett.*, 139: 237.
- EBASHI, S., y LIPMANN, F. (1962), *J. Cell. Biol.*, 14: 389.
- FABIATO, A., y FABIATO, F. J. (1978), *J. Physiol.*, 276: 233.
- FABIATO, A., y FABIATO, F. J. (1979), *J. Physiol. (Paris)*, 75: 463.
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; GOÑI, F. M.; BACH, D.; RESTAL, C. J., y CHAPMAN, D. (1980), *Biochim. Biophys. Acta.*, 598: 502.
- HARDWICKE, P. M. D., y GREEN, N. W. (1974), *Eur. J. Biochem.*, 42: 183.
- HASSELBACH, W., y MAKINOSE, M. (1961), *Biochem. Z.*, 333: 518.
- HASSELBACH, W., y MAKINOSE, M. (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7: 132.
- HARA, H., y KASAI, M. (1977), *J. Biochem.*, 82: 1005.
- HESKETH, T. R.; SMITH, C. A.; HOUSLAY, M. D.; MCGILL, D. A.; BIRDSALL, N. J. M.; METCALFE, J. C., y WARREN, G. B. (1976), *Biochemistry*, 15: 1271.
- IKEMOTO, N. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250: 7219.
- JOHANSSON, A.; KEIGHTLEY, A.; SMITH, G. A., y METCALFE, J. C. (1981), *Biochem. J.*, 196: 505.
- LINDQUIST, R. N.; LYNN, J. L. (Jr.), y LIENHARD, G. E. (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, 95: 8762.
- LÓPEZ, V.; STEVENS, T., y LINDQUIST, R. N. (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, 175: 31.
- MAC FARLAND, B., e INESI, G. (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, 145: 456.
- MAKINOSE, M., y HASSELBACH, W. (1965), *Biochem. Z.*, 343: 360.
- MARTONOSI, A., y HALPIN, R. (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, 144: 66.
- MUSCATELLO, U.; ANDERSSON-CEDERGREN, E.; AZZONE, C. F., y VON DER DECKEN, A. (1961), *J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl.*, 10: 201.
- NAKAMURA, H.; JILKA, H. L.; BOLAND, R., y MARTONOSI, A. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251: 5414.
- ORTIZ, A. (1983), Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad de Murcia.
- ORTIZ, A.; GARCÍA CARMONA, F.; GARCÍA CÁNOVAS, F., y GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. (1983), enviado para publicación.
- PENEFSKY, H. S. (1977), *J. Biol. Chem.*, 252: 2891.
- PICK, U. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257: 6111.
- ROSSI, B.; LBONE, F.; GACHE, C., y LAZDUNSKI, M. (1979), *J. Biol. Chem.*, 254: 2302.
- SCARPA, A.; BALDASSARE, J., e INESI, G. (1972), *J. Gen. Physiol.*, 60: 735.
- SHAMOO, A. E.; SCOTT, T. L.; RYAN, T. E. (1977), *J. Supramol. Struct.*, 6: 345.
- VAN EITEN, R. L.; WAYMACK, P. P., y REHKOP, D. M. (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, 96: 6782.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S. (1981), *J. Biol. Chem.*, 256: 2662.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; KURZMACK, M., e INESI, G. (1978), *Biochemistry*, 17: 5006.
- WARREN, G. B.; PENELOPE, A. T.; BIRDSALL, N. J. M.; LEE, A. G., y METCALFE, J. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 622.
- WEBER, A.; HERZ, R., y REISS, I. (1966), *Biochem. Z.*, 339: 94.
- WEBER, A. (1971), *J. Gen. Physiol.*, 57: 50.
- YAMADA, S., y TONOMURA, Y. (1972), *J. Biochem. (Tokyo)*, 72: 417.

