



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL MÚSCULO
ESQUELÉTICO RÁPIDO POR LAS CISTEÍNAS VECINALES DE
LA SERCA1.**

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

PÁVEL VÁZQUEZ ORTEGA



MÉXICO D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dra. Rosario Muñoz Clares

VOCAL: Profesor: Dr. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Profesor: Dra. Alicia Ortega Aguilar

1er. SUPLENTE: Profesor: M.C. Elpidio García Ramírez

2° SUPLENTE: Profesor: Dra. María del Pilar Cañizares Macías

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: _____

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: **DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR**

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay): **QFB. ROCÍO ÁLVAREZ MEDINA**

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): **PÁVEL VÁZQUEZ ORTEGA**

(nombre (s) y firma (s))

“Sólo cuando el hombre haya adquirido el conocimiento de todas las cosas podrá conocerse así mismo. Pues las cosas no son más que las fronteras del hombre”
Nietzsche, Friedrich

“Es increíble que la matemática, habiendo sido creada por la mente humana, logre describir a la naturaleza con tanta precisión”
Albert Einstein

Agradecimientos

Primero y como más importante, me gustaría agradecer sinceramente a mi director y tutor de trabajo de investigación a la Dra. Alicia Ortega por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, orientación, manera de trabajar, su persistencia, paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación en este camino de la investigación.

Ella ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa como investigador. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con ella por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado este trabajo de investigación.

También me gustaría agradecer los consejos recibidos a lo largo de los últimos años por otros profesores del Departamento de Bioquímica de la UNAM y del Instituto Nacional de Perinatología que de una manera u otra han aportado su granito de arena a mi formación. Destacar al Dr. Hugo González Serratos y a la QFB Rocío Álvarez Medina quienes me han apoyado a lo largo de estos años.

Agradezco el apoyo de el CONACyT (24792) y a DGAPA (IN227106) otorgados a la Dra. Ortega, para la realización de éste proyecto.

Y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecido a mis compañeros de trabajo.

Para ellos,

Muchas gracias por todo.

Dedicatoria

Me gustaría dedicar este Trabajo de Investigación a toda mi familia y amigos. Este trabajo representa un parteaguas entre una etapa muy enriquecedora y el camino que el tiempo obliga. Ha habido personas que merecen las gracias por su valiosa aportación y también por haber plasmado su huella en mí camino. En adelante pondré en práctica mis conocimientos y el lugar que en mi mente ocuparon mis libros, ahora será de ustedes, esto, por el tiempo que les robé pensando en mí.

Gracias a mis padres porque sus brazos siempre se abren cuando necesito un abrazo. Su corazón sabe comprender cuándo necesito un amigo. Sus ojos sensibles se endurecen cuando necesito una lección. Su fuerza y su amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar. Gracias porque me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor. A quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho. A quien nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Son madre tu mirada y tu aliento. Son padre tu trabajo y esfuerzo. Son hermana tu amistad y los sueños que hemos compartido.

A todos mis amigos muchas gracias por estar conmigo y por compartir muchos momentos que llevaré en mi corazón. Gracias por recordarme que existen personas valiosas en el mundo y gracias por ser parte del mío.

Por último quiero agradecer a esta gran Universidad por darme la oportunidad de crecer en todos los aspectos de mi persona, por brindarme todo el aliento que contribuyó a mi formación y porque aquí he vivido la mejor etapa de mi vida.

A todos ellos,

Muchas gracias de todo corazón.

Índice

	Pág.
Resumen	2
Introducción	4
Objetivo	7
Materiales y métodos	7
• <i>Disección</i>	7
• <i>Procedimiento experimental</i>	8
• <i>Protocolo experimental</i>	8
• <i>Preparación de vesículas de la membrana</i>	9
• <i>Marcaje de tioles vecinales presentes en las proteínas del retículo sarcoplásmico con N-Iodoacetil-L-[¹²⁵I]-3-Iodotirosina (IAIT)...</i>	10
• <i>Captura de calcio</i>	11
• <i>Actividad hidrolítica de la SERCA1</i>	11
• <i>Inactivación térmica de la SERCA1</i>	11
• <i>Calorimetría diferencial de barrido</i>	12

Resultados	13
• <i>Pureza de las membranas del RSL y pegada de IAIT a SERCA1</i>	13
• <i>Efecto del PAO sobre la función hidrolítica y la captura de Ca²⁺ ATP-dependiente de la SERCA1</i>	14
• <i>Efecto de PAO y BAL en la inactivación térmica de la SERCA1</i>	15
• <i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	19
Discusión	21
• <i>Importancia de los grupos tiol vecinal en la actividad y en los cambios conformacionales de la SERCA1</i>	21
• <i>Inhibición de SERCA1 por PAO y el efecto reversible de BAL</i>	23
• <i>Estudios de calorimetría diferencial de barrido de la SERCA1</i>	24
• <i>La importancia de los tioles vecinales sobre la actividad y los cambios conformacionales de la SERCA1 durante la fatiga</i>	24
Revisión bibliográfica	27
Artículo	33

Resumen

El músculo es un tejido que se caracteriza por su capacidad para contraerse como respuesta a un estímulo nervioso. Está formado por miofibrillas, las cuales son las principales estructuras funcionales de la fibra muscular. Las miofibrillas están entre un elaborado sistema de membranas que corresponden al retículo sarcoplásmico, siendo el principal almacén de calcio intracelular en el músculo esquelético. Éste, se encuentra formando parte de lo que se conoce como “triadas”, que constan de un túbulo transversal situado entre dos cisternas terminales y que están asociados con la línea Z.

En las cisternas terminales se encuentran localizados los receptores de rianodina o canales liberadores de calcio, que, mediante una despolarización de los túbulos transversos, lo liberan hacia el citosol. El aumento en la concentración de calcio en el citosol permite la contracción muscular y, mediante la remoción del mismo, se da la relajación muscular.

Mediante la SERCA1 (*ATPasa de Calcio del retículo sarcoplásmico*), se lleva a cabo la captura de calcio hacia el retículo sarcoplásmico. Esta proteína tiene un peso molecular de 110 KDa con una longitud de 994 residuos de aminoácidos, dentro de los cuales están presentes 24 residuos de cisteína y una región transmembranal de 10 α -hélices en donde se encuentra el sitio de pegada de calcio.

Las proteínas que contienen residuos de cisteínas, con una proximidad de $n = 2$ a 6 aminoácidos (Cys(X) n -Cys) entre ellas en el mismo polipéptido o cadenas cercanas del mismo o de diferente polipéptido, se denominan proteínas tioles vecinales. Esta proximidad entre cisteínas les permite llevar a cabo la formación de puentes disulfuro, los cuales son totalmente reversibles dependiendo del potencial Redox.

La secuencia de la SERCA1, muestra la presencia de 4 pares de cisteínas (Cys³⁴⁴⁻³⁴⁹, Cys⁴¹⁷⁻⁴²⁰, Cys⁶⁷⁰⁻⁶⁷⁴ y Cys⁶⁷⁴⁻⁶⁷⁵), conocidos como grupos tiol vecinal, los cuales están a una distancia de 3 – 9 Å entre ellos. Estos grupos tiol vecinal se localizan en la región citosólica de la proteína, además de estar cercanos al residuo de Lisina (K⁵¹⁵) el cual es el sitio de pegada del nucleótido (NBS) y al residuo de Aspartato (D³⁵¹), sitio de fosforilación (PS). El sitio de pegada de calcio (CBD) está en la región transmembranal, entre la α -

hélice 2 y la α -hélice 3, las cuales se encuentran lejos de los grupos tiol vecinal. Los residuos de Cys⁸⁷⁶ y Cys⁸⁸⁸ forman un puente disulfuro entre la α -hélice 7 y la α -hélice 8, el cual es necesario para que se lleve a cabo el transporte de calcio hacia el interior del retículo sarcoplásmico. La formación de este puente disulfuro se debe a que el potencial redox dentro del RS se encuentra más oxidado (-180mV) que en el citosol (-230mV) donde todos los residuos de cisteína se encuentran en forma reducida.

El óxido nítrico (NO) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) tienen la capacidad de regular una variedad de procesos biológicos incluyendo la fuerza de contracción. Estas moléculas se sintetizan a bajas concentraciones cuando el músculo se encuentra en reposo pero la concentración aumenta durante la contracción muscular y durante periodos de actividad muscular prolongada, debido a un incremento en el consumo de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno actúan sobre los grupos sulfhidrilo de las cisteínas presentes en el receptor de rianodina y en la SERCA1, presentando un efecto regulador sobre estas dos proteínas.

En este estudio proponemos que la relación SERCA1 (SH)₂/SERCA1-S₂, es decir, el estado redox modifica la estructura y por consiguiente la función de la proteína, principalmente disminuyendo su actividad y, por consiguiente la relajación del músculo. Los experimentos que se realizaron nos permiten entender el mecanismo molecular por el cual los grupos tiol vecinal pudieran estar involucrados en la estructura y función de la SERCA1. Se estudio su actividad hidrolítica y el transporte de calcio después de bloquear selectivamente a los grupos tiol vecinal tanto en músculo fatigado como en reposo, determinando posteriormente los cambios estructurales mediante un estudio de los parámetros termodinámicos de la desnaturalización de la proteína.

Con esto podemos demostrar que después de una actividad muscular prolongada, SERCA1 muestra cambios conformacionales relacionados con la disminución de su actividad, similares a lo que pasa cuando los grupos tiol vecinal son oxidados con un arsenical. Debido a que el efecto de la oxidación de los tioles vecinales de la SERCA1 es un proceso reversible, esto nos permite proponer a la SERCA1 como la responsable de los cambios que experimenta el músculo durante la fatiga, que es un proceso fisiológico reversible.

Introducción

Cuando un músculo estriado esquelético se le estimula repetidamente, la fuerza que desarrolla durante cada contracción decae al cabo de varias contracciones y se vuelve refractario a las estimulaciones siguientes. Este proceso se le conoce como fatiga del músculo esquelético y es una condición intrínseca de las células musculares o sea no es determinada por cambios en el sistema nervios central. Los músculos estriado cardiaco y liso no se fatigan en condiciones normales. La fatiga es un proceso debilitante que aparece y es característico en condiciones más o menos fisiológicas como después de un esfuerzo físico intenso o en condiciones fisopatológicas como la insuficiencia cardiaca. El mecanismo que lleva a la fatiga ha sido investigado desde hace más de seis décadas sin haberse descubierto su causa. Se ha encontrado que algunos de los mecanismos que acoplan la excitación con la contracción (acople de e-c) están alterados durante la fatiga (teoría de de acople e-c de la fatiga). También se han descrito alteraciones de los productos secundarios que se liberan debido al rompimiento del ATP durante la contracción y que aparecen en cantidades altas durante la fatiga (teoría metabólica de la fatiga). Pero ninguna de las dos teorías explican en conjunto e inequívocamente el mecanismo que lleva a la fatiga ni como podrían interactuar (si lo hacen) entre ellas.

La actividad muscular está acompañada de un incremento en el consumo de O_2 , lo que genera una cascada de moléculas de muy bajo peso derivadas del O_2 a las que se les conoce como Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). La molécula común en la cascada de ERO es el radical súperoxido. El Oxido Nítrico (ON) es otra molécula de muy bajo peso molecular que se encuentra también en baja concentración en músculo en reposo pero aumenta durante periodos de actividad muscular prolongada. La formación de otros radicales libres a partir de las moléculas mencionadas anteriormente tienen una alta selectividad para reaccionar con grupos tioles (-SH). La oxidación reversible de las cisteínas (Cys)-SH en las proteínas en general, modifica sus funciones a través de la S-glutatiolación; S-

nitrosilación; formación de ácido sulfénico; ácido sulfínico y formación de sulfenil amida, así como también la formación de puentes disulfuro reversible entre -SH de grupos tioles vecinales dentro de la misma proteína. Las Cys-SH son altamente sensibles al ambiente reductor de la célula por lo que las Cys regulan la actividad de la proteína en función a las condiciones redox del microambiente. Por lo que se ha sugerido que el aumento en la concentración intracelular de ERO contribuye al desarrollo de la fatiga muscular, a través de su efecto probablemente sobre los grupos SH de los RyRs y SERCA1 (Fig. 1). Por ello se ha propuesto que tienen un efecto fisiológico regulador sobre la actividad fisiológica de las proteínas RyR y SERCA1. Es importante mencionar que tanto la miosina como la actina, proteínas del aparato contráctil no son afectadas por estos procesos bioquímicos ya que carecen de grupos tioles vecinales.

Por lo que en la presente trabajo, se dan evidencias para proponer la hipótesis de que; a) la bomba de calcio (SERCA1) conocida también como factor relajante, pertenece a una fracción importante de proteínas celulares conocidas como proteínas tioles vecinales (aproximadamente 5% de las proteínas celulares), esto es, proteínas que regulan su estructura y por lo tanto su actividad de manera dependiente del potencial redox, b) durante la actividad muscular prolongada que lleva al fenómeno conocido como fatiga, se produce tensión oxidativa que puede modificar la estructura de estas dos proteínas del RS. Esta hipótesis de trabajo esta basada en que se ha propuesto que los radicales libres como metabolitos, están involucrados en el desarrollo de la fatiga. Proponemos que un mecanismo novedoso a través del cual los radicales libres interactúan con la SERCA1, es la oxidación reducción de los residuos de Cys de los tioles vecinales de la proteína, siendo la oxidación de grupos tioles vecinales un efecto que se puede prevenir o una vez oxidados, el efecto es reversible, lo que adquiere particular importancia en la fisiología, bioquímica y farmacología del músculo esquelético.

La estrategia metodológica para estudiar los cambios de la estructura y función del RyR y SERCA1 correlacionados a diferentes grados de actividad muscular, antes, durante y después de la fatiga desarrollada en la misma preparación fisiológica.

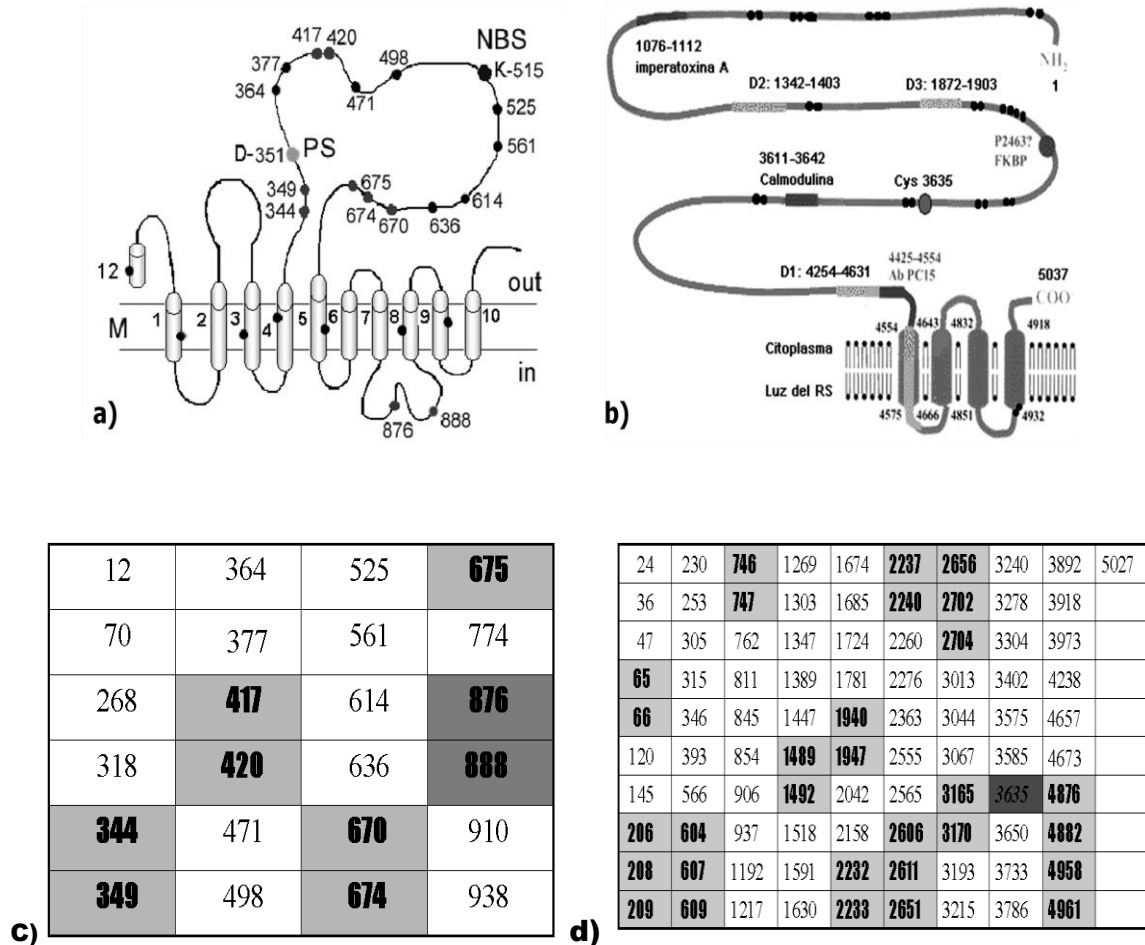


Fig.1 a) Representación esquemática de la SERCA1 (*ATPasa de Calcio del Retículo Sarcoplásmico*) y b) RyR (*receptor de rianodina*). Las tablas c (SERCA1) y d (RyR) muestran la posición de los residuos de cisteína presentes en las secuencias de ambas proteínas.

Objetivo

Determinar la participación del estado redox de las cisteínas adyacentes presentes en la SERCA1 en su participación durante el proceso de fatiga en el músculo esquelético rápido.

Materiales y métodos

Disección

Para realizar estos experimentos se utilizaron conejos Blancos Nueva Zelanda cuyo peso oscilaba entre los 3 y 3.5 Kg. Dichos conejos fueron anestesiados con una inyección intramuscular de 200 mg de ketamina. Una vez que los conejos se encontraban anestesiados, se canuló la vena de la oreja siendo perfundida con solución de Krebs, la cual contenía en mM: NaCl 142, KCl 4, CaCl₂ 5, MgCl₂ 3, and HCO₃ 27. Después se inyectaron 2 ml de pentobarbital a una concentración de 0.06 g/ml en la solución de perfusión. La piel que rodea la pierna superior fue anestesiada localmente con xilocaina al 2%.

Una pequeña porción de aproximadamente 1.5 cm del nervio tibial en el muslo, se aisló, se ató y se cortó entre el nudo y la médula espinal. La porción del nervio que estimula al músculo disecado fue puesta dentro de una cámara pequeña de plástico que contiene electrodos de platino para pasar corriente y estimular a través del nervio la contracción muscular.

El tendón del músculo tibial anterior fue atado fuertemente con un anillo de acero inoxidable. La circulación sanguínea se dejó intacta y cualquier sangrado fue detenido inmediatamente cauterizando los vasos sanguíneos. El tendón proximal se dejó intacto y las partes del tejido conectivo entre el músculo y otros músculos circundantes se cortaron cuidadosamente.

Como la disección se realizó en conejos vivos, nos percatamos de que tuvieron la anestesia adecuada.

Procedimiento experimental

Después de que se terminó con la disección, los conejos fueron colocados en un cojín con calefacción fija a 37°C. Posteriormente se atornilló una barra de metal en la parte más baja del hueso del fémur del conejo. La barra fue atada firmemente a un soporte para mantener la rodilla en una posición fija. El músculo *tibial anterior* fue atado a través del alambre de acero a un transductor de la fuerza FT03 (Grass, Astro-MED, Inc. RI, LOS E.E.U.U.). El transductor de fuerza fue alineado perpendicularmente a lo largo del eje del músculo. Después de atar el alambre al transductor, el experimento comenzó.

Protocolo experimental

La estimulación se realizó con pulsos eléctricos de 0.8 ms de duración y con un voltaje variado aplicados al nervio mientras se registraba la fuerza desarrollada por el músculo. Una vez que se encontró el voltaje de estimulación para la respuesta máxima, los siguientes pulsos estimulantes tuvieron la misma duración. Para encontrar el voltaje de respuesta máxima los músculos se estiraron cuidadosamente y cada 0.5 milímetros se estimulaban hasta que se obtuviera la longitud a la cual la tensión de contracción era la máxima. La longitud óptima correspondió a una longitud de sarcómera media de aproximadamente 2µm (Brown y otros 1984). Posteriormente los nervios fueron estimulados para obtener una serie de contracciones cada 3 s hasta que la fuerza máxima de la contracción fuera igual por 5 veces consecutivas.

Las contracciones fueron seguidas por estímulos eléctricos en el nervio de 60 Hz por 2 s. El protocolo de estimulación fue repetido con un periodo de descanso de 4.5 minutos para asegurarse de que por lo menos tres fuerzas tetánicas del control eran similares. Se dejó reposar al músculo durante 10 minutos, seguido por una sola contracción y un solo estímulo tetánico, registrados en 0.2 s/mm antes de iniciar con el protocolo de fatiga.

La fatiga se indujo con estímulos eléctricos con ciclos de 60 Hz y 2 s de duración repetidos cada 4.5 s durante 70 minutos. Al final de los 70 minutos la fuerza tetánica disminuyó de un 100% hasta un 36.9 ± 4.4 ($n = 3$). En este momento el ciclo de estimulación se detuvo, y se añadió nitrógeno líquido sobre el músculo para congelar cualquier cambio, finalmente el músculo congelado se extrajo rápidamente y se guardó en nitrógeno líquido para su análisis posterior.

Los experimentos se realizaron después de que se estableció que la fatiga disminuía la fuerza de contracción al 25%.

Después de terminar los experimentos, los conejos se sacrificaron aumentando las dosis de anestesia. Los animales muertos se desecharon de acuerdo a las disposiciones de las reglas oficiales mexicanas establecidas para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio (código NOM-062-Z001999).

Preparación de vesículas de la membrana

Las membranas del retículo sarcoplásmico se obtuvieron del músculo tibial anterior que había sido previamente congelado como se describió anteriormente. El aislamiento se realizó por centrifugación diferencial y gradientes discontinuos de sacarosa, en ausencia de cualquier reductor en el medio amortiguador. El primer gradiente de sacarosa fue de 25, 27.5, y 35% p/v que fue utilizado para separar las membranas de superficie. La interface entre el 27.5 y 35% se colocó

en un segundo gradiente discontinuo de de 27.5, 30, 32, 35, y 45% de sacarosa. La banda obtenida en la interface entre el 32 y 35% corresponde al retículo sarcoplásmico ligero (LSR), detectado por la actividad máxima de la ATPasa estimulada por Ca^{2+} . La concentración de la proteína se determino usando el reactivo de Coomassie (Pierce, Rockford, IL, los E.E.U.U.) con albúmina sérica bobina (BSA) como el estándar.

Marcaje de tioles vecinales presentes en las proteínas del retículo sarcoplásmico con N-Iodoacetil-L-[¹²⁵I]-3-Iodotirosina (IAIT)

La síntesis de N-iodoacetil- [¹²⁵I] 3-iodotirosina fue descrita previamente (Gitler et al. 1994, 1997). Primero el [¹²⁵I] - IAIT se disuelve en benceno que consistía en 0.25% de dimetilformamida (DMF) con una radiactividad específica de 20 Ci/mmol y almacenado por un período de 6 semanas o menos. La cantidad deseada de la solución del benceno-DMF (~1μCi/ μl) se evapora en un tubo de micro centrifuga en el Speed Vac (savant) disolviéndose en una solución amortiguadora a pH 7.4. Esta solución se agrega a las muestras que se marcaran con IAIT, el cual es estable a pH 7.4 por varias horas, o el material que se desea marcar, puede ser agregado directamente al IAIT seco en cada tubo. El marcaje se realizo en una solución que contiene: 1mM de EDTA o EGTA. La reacción se detiene después de 30 minutos a temperatura ambiente (25°C) adicionando ½ volumen de buffer con SDS (30% glicerol, 9% SDS, 0.61% de azul de bromofenol en 0.46mM de buffer de Tris-HCl, pH 6.8). Para distinguir entre tioles vecinales y monotioles, el marcaje se llevo a cabo en ausencia y presencia de 20μM PAO. El DTT por arriba de 10mM no compite con [¹²⁵I] – IAIT para el marcaje de tioles vecinales en las proteínas (Gitler et al. 1994, 1997).

Captura de calcio

El transporte del calcio fue determinado a temperatura ambiente por el método de filtración en una solución que contenía (en mM): 100 KCl, 5 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 1 μCi 45 [CaCl₂], Tris-Malato 20 (pH 7.0), y ATP 4 con 0.05 mg de proteína/ml. La reacción se detuvo con 0.5 ml de solución amortiguadora fría que contenía (en mM): 5 MgCl₂, 4 EGTA, y Tris-Malato 20 (pH 7.0). Las vesículas de RL (0.9 ml) se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 μm, lavaron, secaron y después se contaron por centelleo. Los experimentos fueron hechos en la ausencia y en presencia de PAO y del BAL.

Actividad hidrolítica de la SERCA1

La actividad total de la ATPasa fue determinada por colorimétrica del Pi utilizando verde de malaquita. Alícuotas de 5 μg/ml de proteína fueron incubadas en una solución que contenía (en mM): 100 KCl, 5 MgCl₂, 5 NaN₃, 1 ouabaina y 20 Tris-Malato, pH 7. La reacción fue detenida con una solución que contiene: 0.045% verde de malaquita hidrociorado, 4.2% de molibdato de amonio 4N en HCl, 0.8 ml Triton-X100 por cada 100 ml de solución, y 0.25 ml de citrato de sodio (34%), la absorbencia fue leída en 660 nm. Los experimentos fueron hechos en la ausencia y en presencia de PAO y del BAL.

Inactivación térmica de la SERCA1

Las membranas del retículo sarcoplásmico ligero (2mg/ml) fueron incubadas en una solución 0.3M de sacarosa que contenía (en mM): 20 Tris-Malato, 100 KCl, pH 6.8 en un equipo de PCR a una velocidad de calentamiento de 1°C/min. Las muestras fueron recuperadas a intervalos de tiempo de 1 minuto entre los 18° a 70°C y colocadas posteriormente en hielo aproximadamente el mismo tiempo,

antes de determinar la actividad de ATPasa a temperatura ambiente (25°C) hasta que todas las muestras fueran colectadas. Con la determinación de la actividad hidrolítica de la ATPasa a 30 min, se generó una curva de inactivación. La primera derivada de la curva de inactivación se utilizó para determinar la temperatura de transición (T_i), definida como la temperatura registrada a la mitad de la curva. Para todos los experimentos de la inactivación, las curvas no son simétricas por lo tanto, T_i no corresponde a la temperatura máxima.

Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) fue utilizada para medir la temperatura de transición (T_m) de SERCA1 en presencia y la ausencia de PAO. T_m se define como temperatura a la cual la capacidad calorífica es máxima. LSR fue disuelto en un buffer que contenía (en mM): 100 KCl y Tris-Malato 20 (pH 7.0). El registro de la capacidad calorífica (C_p) en función de la temperatura de barrido a una velocidad de 1 C/min, se realizó con un calorímetro diferencial de barrido de alta resolución VP-DSC. (MicroCal Inc., MA USA). Las muestras y las soluciones de la referencia fueron degasificadas cuidadosamente al vacío por 5 minutos antes de ser inyectados a las celdas del DSC cuya capacidad es de 0.56 ml. Cuando se llega al equilibrio a los 10°C, se incrementa la temperatura hasta los 100°C. Para determinar la reversibilidad de la desnaturalización de la proteína, se desciende la temperatura hasta los 10°C y se vuelve a barrer hasta los 100°C. La línea basal se corrige restando el prebarrido del barrido original. En todos los casos no hay evidencia de reversibilidad. Los perfiles de desnaturalización de SERCA1 analizados a partir de un ajuste teórico de las curvas, se calculó asumiendo la irreversibilidad del proceso de desnaturalización de la proteína según lo descrito previamente para el RS (Lepock y otros 1990).

Resultados

Pureza de las membranas del RSL y pegada de IAIT a SERCA1

La figura 2 muestra; 1.- un gel de acrilamida (SDS-PAGE) en donde el 75% de las proteínas de membrana en el RSL corresponden a SERCA1 (columna 3). 2.- Un Western Blot donde se utilizo anti-SERCA1 para confirmar la presencia de SERCA1 en vesículas de RSL (columna 4). 3.- La autorradiografía (columna 5) de RSL marcado con [¹²⁵I] - IAIT que corresponde a las proteínas marcadas con IAIT, y se demuestra que SERCA1 es una Proteína Tiol-Vecinal (n = 3).

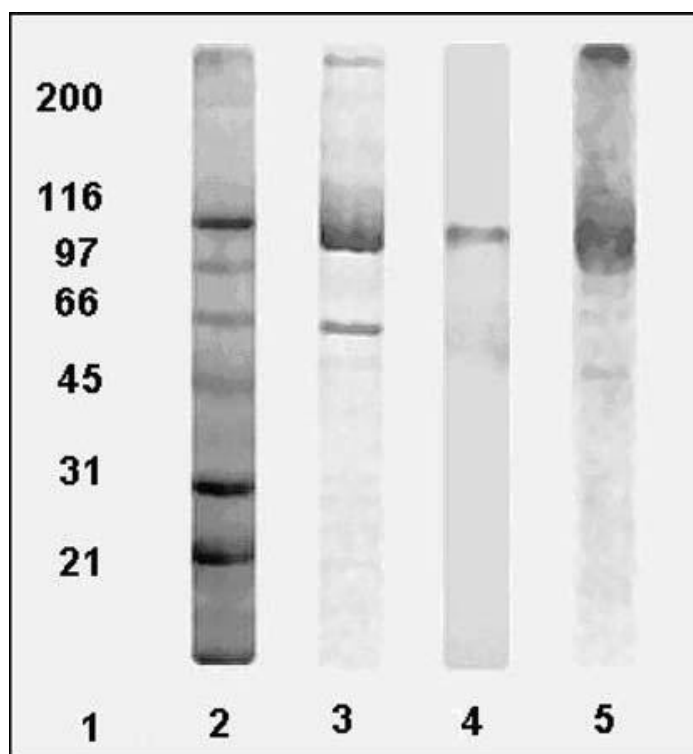


Fig. 2 *Columna 1 y 2* marcadores de masa molecular para el SDS-PAGE. La *Columna 3* muestra el SDS-PAGE de las membranas del RS. *Columna 4* muestra el Western Blot de SERCA1 en vesículas del RS utilizando el anticuerpo *anti-SERCA1* y la *Columna 5* muestra la autorradiografía del RSL marcado con IAIT.

Efecto del PAO sobre la función hidrolítica y la captura de Ca^{2+} ATP-dependiente de la SERCA1

La actividad hidrolítica de la SERCA1 se inhibe con PAO de manera dosis dependiente como se aprecia en la figura 3a con una inhibición máxima del $60 \pm 3\%$ ($n=3$) con 0.1mM de PAO. La actividad de la SERCA1 con 0.1mM de PAO en función del tiempo, se muestra en la figura 3b. El fuerte efecto inhibitorio de 0.1mM de PAO sobre la actividad de la SERCA1 es completamente reversible con 1mM de BAL ($n=3$). El BAL *per se* no tiene efecto alguno sobre la actividad de la SERCA1, pero cuando es añadido previamente a la SERCA1 inhibida con 0.1mM de PAO, la actividad hidrolítica de la SERCA1 se ve completamente recuperado (figura 3b). Como la hidrólisis de ATP está relacionada con el transporte de calcio, hemos examinado el papel que juegan los tioles vecinales sobre el transporte de calcio por la SERCA1. En la figura 4 se muestra que la captura de calcio ATP-dependiente se ve inhibida en un $67 \pm 9\%$ en presencia de 0.1mM de PAO ($n=3$).

Después de 30 minutos el efecto inhibitorio se completo, y así permaneció en el mismo nivel. El BAL no revierte el efecto inhibitorio del PAO en el transporte de calcio aún a concentraciones mayores a 10mM. El transporte pasivo de calcio en el RSL no se vio afectado ni por PAO ni por BAL.

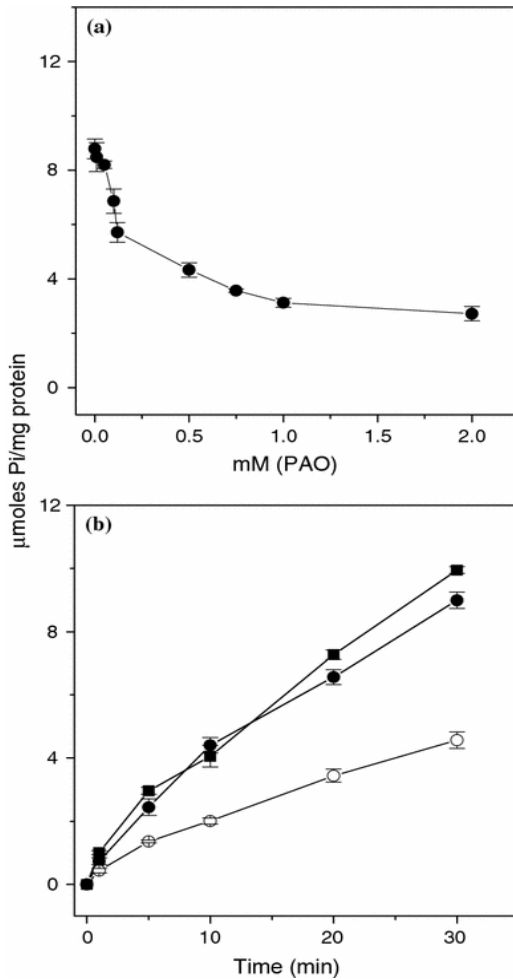
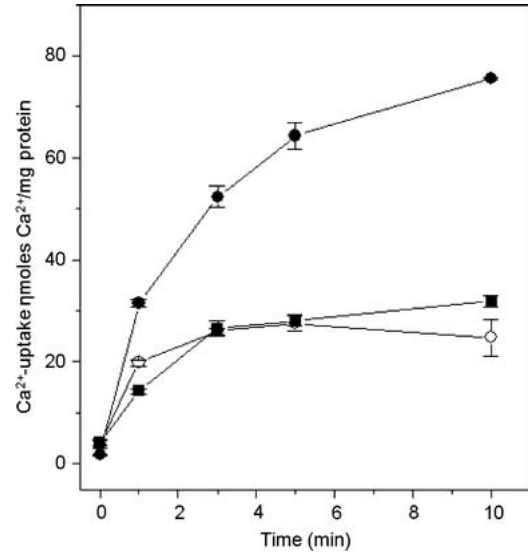
Fig. 3**Fig. 4**

Fig. 3 a Actividad de la ATPasa en presencia de diferentes concentraciones de PAO (o), y **b** actividad de la ATPasa del RS en función del tiempo en la ausencia (●) y en la presencia (○) de 0.1mM de PAO. Actividad de la ATPasa en presencia de 1mM BAL después de haber estado inhibido con 0.1mM PAO (■).

Fig. 4 Captura de Ca^{2+} en función del tiempo en ausencia (●), en presencia (○) de 0.1mM PAO y en presencia de de 1mM de BAL después de haber sido inhibido previamente con 0.1mM de PAO (■).

Efecto de PAO y BAL en la inactivación térmica de la SERCA1

El efecto inhibitorio del PAO sobre la actividad de la SERCA1 puede deberse a un cambio conformacional de la proteína. Los cambios conformacionales de la proteína pueden estudiarse a partir de un análisis de estabilidad térmica en la

proteína. Hemos estudiado esta posibilidad en la SERCA1, en presencia y en ausencia de PAO y BAL. En la figura 5 se muestran las curvas de inactivación térmica de la ATPasa después de calentarla a 1°C/min, ocurriendo una inactivación irreversible a temperaturas superiores a 30-40°C dependiendo de la concertaciones de PAO y BAL y se completo después de calentar hasta los 60°C. Las curvas de inactivación térmica en ausencia de PAO (control), en presencia de 0.1mM de PAO, y con 1mM de BAL se muestran en la figura 5 a, b y c respectivamente. La primera derivada de las curvas de inactivación da una determinación más exacta de la transición entre las formas activa e inactiva de la enzima como se muestra en la figura 5d (control), e (con PAO) y f (con BAL). La temperatura de inactivación (Ti) se calculó para cada curva en d, e y f (figura 5). En los experimentos control el RSL solamente tenía una transición a $T_i = 49 \pm 0.12^\circ\text{C}$ (n = 4) (figura 5d). Sin embargo cuando el RSL se incubo con 0.1mM de PAO, como se muestra en la figura 6e se muestran dos transiciones bien definidas a $T_i = 34 \pm 0.9^\circ\text{C}$ y $T_i = 27 \pm 1.2^\circ\text{C}$ (n = 4). En presencia de 1mM de BAL se observa una sola transición más aguda con $T_i = 49 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (n = 4) como se muestra en la figura 5f.

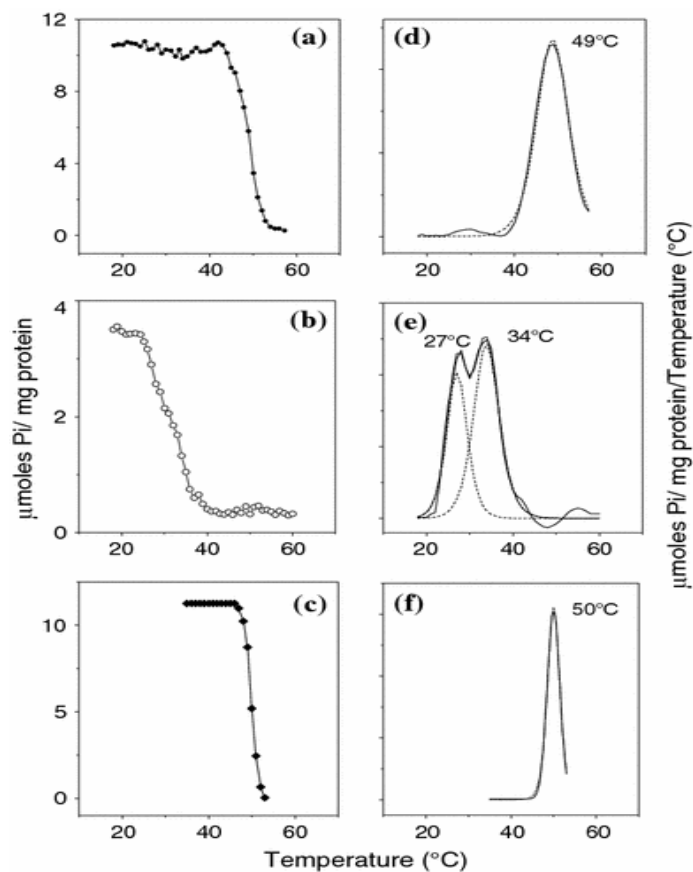


Fig. 5 Efecto del PAO y BAL en la inactivación térmica de la SERCA1. **a** en ausencia (●) de PAO, **b** en presencia (○) de 0.1mM PAO y la presencia (■) de de 1mM de BAL. Los gráficos **d**, **e** y **f** muestran la primera derivada de las curvas de inactivación **a**, **b** y **c**.

Como la fatiga muscular puede tener un posible efecto sobre la actividad de la SERCA1, hemos estudiado mediante análisis térmico el perfil de inactivación de la SERCA1 en el músculo fatigado.

En la figura 6 se muestra un experimento representativo de la actividad de la ATPasa del RSL aisladas de músculo en reposo con y sin 0.1mM de PAO y en músculo fatigado sin PAO y BAL. Desde que se vio que PAO tenía un efecto sobre la conformación de la SERCA1 como se mostró en la figura 6, comparamos la diferencia en los cambios conformacionales entre la SERCA1 obtenida del RSL aislado de músculo en reposo y después fatigado. En la figura 6 se muestran las membranas del RS aisladas de músculo en reposo en ausencia de PAO (línea

continua), en presencia de 0.1mM de PAO (línea discontinua) y de músculo fatigado (línea oscura). En el músculo en reposo solamente se observa una transición, la T_i de la SERCA1 en ausencia de PAO es $49 \pm 0.12^\circ\text{C}$ ($n = 4$). En presencia de 0.01mM de PAO se observan dos transiciones a una $T_i = 44.8 \pm 0.79^\circ\text{C}$ ($n = 4$) y $30.9 \pm 0.36^\circ\text{C}$ ($n = 4$). Bajo condiciones de fatiga, la T_i de la transición principal es a $48 \pm 0.79^\circ\text{C}$ ($n = 4$) mientras que la segunda transición es a $T_i = 31 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ($n = 4$) esta segunda transición no se observa en el perfil de inactivación de la SERCA1 determinada de músculos en reposo.

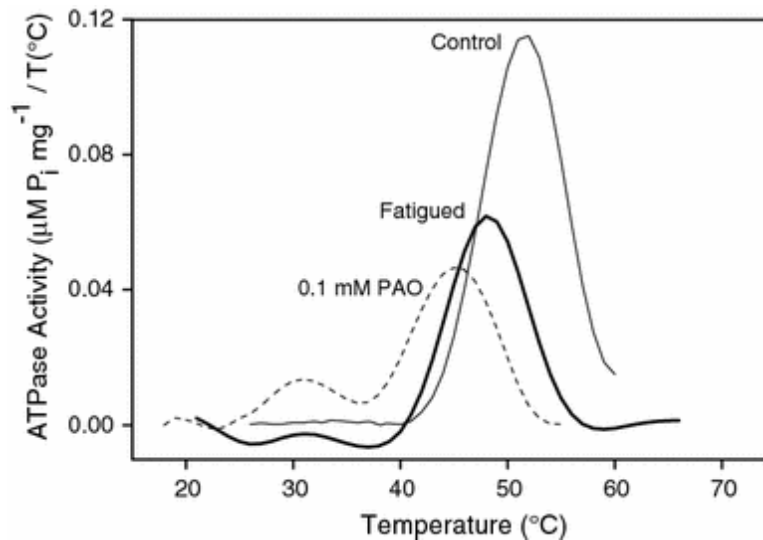


Fig. 6 Inactivación térmica. En la figura se muestra la primera derivada de las curvas de inactivación de la SERCA1 en función de la temperatura. La inactivación térmica de la de las vesículas del RS obtenidas de músculo en reposo (***línea delgada***). Inactivación de RS obtenido de músculo en reposo en presencia de 0.1mM PAO (***línea punteada***) y RS obtenido de músculo fatigado (***línea oscura***).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Lepock et al. (1990) demostraron que el perfil de desnaturalización de la SERCA1 por calorimetría diferencial de barrido muestra dos picos (transiciones endotérmicas) correspondientes a la desnaturalización del sitio de pegada del nucleótido (NBD) en la región citosólica y en el sitio de pegada de calcio (CBD) en la región transmembranal de la SERCA1. Basados en la evidencia anterior, se usaron las membranas de RSL para obtener los perfiles de desnaturalización de SERCA1 de músculos en reposo, después del desarrollo de fatiga y expuestos a 1mM de BAL después de la fatiga. La figura 7 muestra los perfiles de la DSC, donde se grafica, el calor específico (C_p) de la desnaturalización de SERCA1 en función de la temperatura. La figura 7a muestra el perfil de desnaturalización de la SERCA1 en RSL aislado de músculos en reposo. SERCA1 se desnaturaliza en dos principales endotermas. La temperatura de transición para la desnaturalización (T_m) se determinó por deconvolución de las dos endotermas descritas previamente (Lepock et al.1990). El principal componente marcado como NBD, el cual corresponde a la desnaturalización del sitio de pegada del nucleótido, tuvo una T_m de $51.5 \pm 1.3^\circ\text{C}$ ($n = 3$). El segundo componente, CBD, el cual corresponde al sitio de pegada de calcio en la región transmembranal, tuvo una T_m de $63 \pm 1.02^\circ\text{C}$ ($n = 3$). En la figura 7b se muestra el termograma del RSL obtenido a partir de músculos fatigados. Se observaron tres transiciones con un promedio de T_m (NBD) $46.8 \pm 1.03^\circ\text{C}$ ($n= 3$) y T_m (CBD) a $60.2 \pm 0.58^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Una tercera transición nombrada dominio indeterminado (UD), T_m (UD) a $36.5 \pm 0.33^\circ\text{C}$ ($n = 3$) aparece después de la fatiga. La tercera transición que no está presente en el perfil de desnaturalización de la SERCA1 obtenida de músculo en reposo, está presente en el perfil de desnaturalización del músculo fatigado y en presencia de PAO (0.01, 0.02, 0.1mM), donde el UD muestra una T_m de 44 ± 0.92 , 37.8 ± 0.25 , and $36.9 \pm 0.47^\circ\text{C}$ ($n = 3$), respectivamente. En la figura 7c se muestra que cuando el RSL obtenido de músculo fatigado se incubaba con 1mM de BAL y la transición del UD se pierde. Sin embargo, en presencia de BAL la T_m para la transición del NBD es de $49 \pm 1.05^\circ\text{C}$ ($n = 3$) y la transición del CBD es de

$62.3 \pm 0.82^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$). No cambió el T_m inicial observado en el RSL aislado del músculo en reposo.

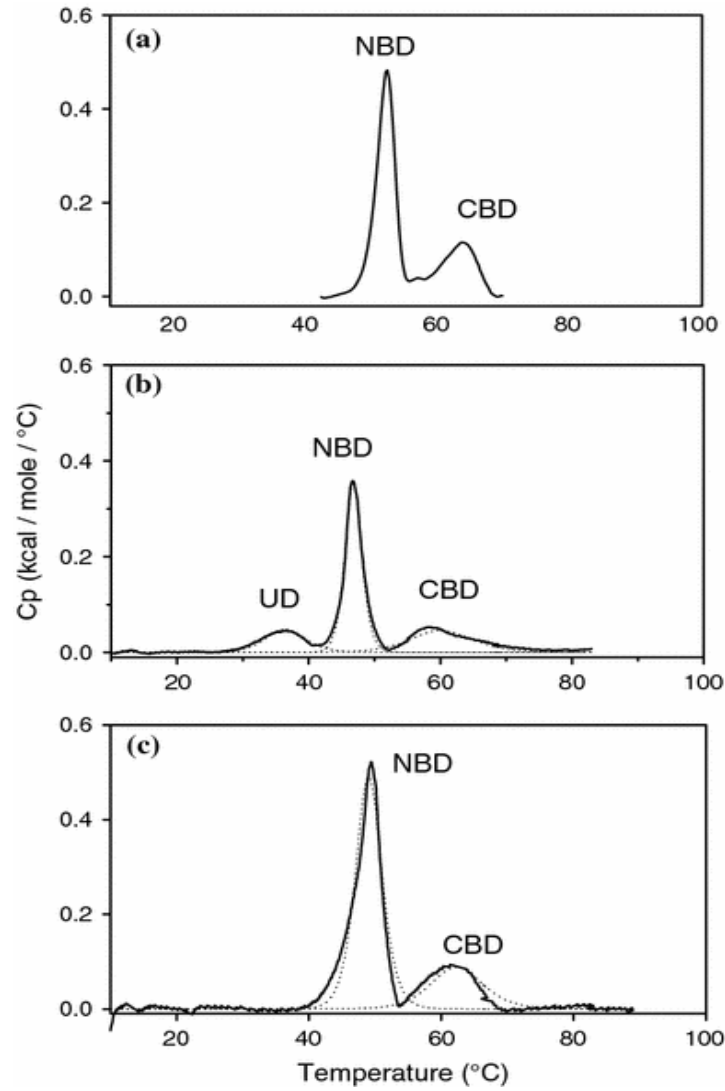


Fig. 7 Calorimetría diferencial de barrido del RSL. El barrido se realizó con incremento de temperatura de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. **a)** Control, RSL de músculo en reposo, **b)** RSL de músculo fatigado, **c)** RSL de músculo fatigado en presencia de 1mM BAL

Discusión

El presente estudio muestra que SERCA1 es 1) una proteína tiol vecinal, 2) los tioles vecinales de la SERCA1 se oxidan selectivamente con PAO, un arsenical trivalente, inhibiendo la actividad hidrolítica de la ATPasa y el transporte de calcio, 3) el efecto de la oxidación de los tioles vecinales con PAO sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa es reversible con BAL pero no sobre el transporte de calcio, 4) los cambios conformacionales de SERCA1 observados mediante análisis térmico, demuestran que la oxidación de los tioles vecinales de la SERCA1 inducen un cambio conformacional que es reversible al reducirlos nuevamente y 5) el RS aislado de músculo fatigado muestra un cambio conformacional en la SERCA1 el cual es completamente reversible después de exponer a los tioles vecinales a un agente reductor como el BAL.

Importancia de los grupos tiol vecinal en la actividad y en los cambios conformacionales de la SERCA1

El 60% de la inhibición de la actividad hidrolítica de la SERCA1 por el PAO nos indica que los grupos tiol vecinal tienen un efecto regulador sobre la función de SERCA1. Este hallazgo implica que la actividad de la SERCA1 se ve parcialmente inactivada en ambientes que producen la oxidación de los tioles vecinales. De tal modo, que esto sugiere que la oxidación de los tioles vecinales de la SERCA1 causado por un estrés oxidativo bajo condiciones fisiológicas, tienen un efecto sobre la contracción muscular.

El 40% restante de la actividad hidrolítica que no se ve afectado por la presencia de PAO, podría corresponder a parte de la estructura de la SERCA1 que no depende de la disponibilidad de grupos tiol vecinal.

El hecho de incrementar la concentración de PAO hasta 2mM o arriba de 10mM no presenta inhibición adicional sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa y en la captura de calcio, indicándonos que el PAO tiene una concentración de saturación sobre la SERCA1, manteniendo a la enzima en una conformación con actividad reducida. Como el PAO es una molécula con una fuerte reactividad sobre los tioles vecinales accesibles, es poco probable que el PAO no reaccione con estos tioles al aumentar su concentración, por lo que es posible que la SERCA1 experimente cambios conformacionales que resulten en una disminución de la interacción de los tioles con el PAO.

El cambio conformacional de la SERCA1 en presencia de PAO y durante la fatiga, resultó en una reducción de la actividad, no presentando relación entre la hidrólisis de ATP con el transporte de calcio. La adición de un agente reductor como lo es el BAL, recobra la actividad hidrolítica pero no el transporte de calcio, manteniéndolo inhibido aún a altas concentraciones de BAL. El BAL al poder ser permeable a la membrana puede atravesar para reducir el puente disulfuro entre las Cys⁸⁷⁶ y Cys⁸⁸⁸, el cual es necesario para el transporte de calcio. Los mecanismos moleculares que amortiguan el potencial redox *in vivo*, están ausentes en un modelo *in vitro*.

SERCA1 es una proteína con una longitud de 994 residuos de aminoácidos que tiene 24 residuos de cisteína. La secuenciación de la SERCA1 ha mostrado que 4 pares de cisteínas se encuentran dentro de una distancia (~3–9 Å) entre ellas. Estos pares hacen referencia a los grupos tiol vecinal.

Los estudios de cristalografía han demostrado la distribución de los tioles vecinales a lo largo de la SERCA1 localizándose en la región citosólica de la proteína. Los sitios de fosforilación y el sitio de pegada del nucleótido de la SERCA1 se encuentran cerca de grupos tiol vecinal, por lo tanto cualquier cambio conformacional inducido por una oxidación-reducción de los tioles vecinales podría

afectar la conformación de los sitios de fosforilación y del sitio de pegada del nucleótido.

El hecho de que el sitio de pegada de calcio se encuentra en la región transmembranal lejos de los grupos tiol vecinal, nos permite proponer que el sitio de pegada de calcio tenga una menor probabilidad de ser afectado directamente por el potencial redox. Por lo tanto la irreversibilidad del transporte de calcio después de la reducción de los tioles vecinales podría deberse a que los cambios conformacionales no recobran el transporte de calcio.

Inhibición de SERCA1 por PAO y el efecto reversible de BAL

Nuestros estudios confirman que el BAL es un potente quelante de triarsenicales que mantiene inalterada la actividad de la SERCA1 además de revertir el efecto del triarsenical PAO en el comportamiento termotrópico de la SERCA1. La inactivación térmica de la SERCA1 en presencia de PAO muestra dos transiciones con una diferente temperatura de inactivación (T_i) que en aquella transición observada para la actividad de la SERCA1 control en ausencia de PAO. La transición adicional que hemos observado en presencia de PAO sugiere la pregunta de si hay otras ATPasas de calcio que estén contaminantes en nuestra preparación de RS. Nuestros resultados indican que no hay contaminación con la ATPasa mitocondrial, ya que su actividad fue eliminada por la adición de azida de sodio al medio de reacción como se describió en el procedimiento experimental.

Además los resultados previos mostraron que la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de la membrana de los túbulos transversos tenía una T_i de 56°C en vez de 51°C como la SERCA1 además que PAO a una concentración de hasta 5mM no afectaban ni a la actividad hidrolítica de la ATPasa de calcio ni a la de la ATPasa de magnesio. Por lo tanto, concluimos que cuando la segunda transición de la SERCA1 observada en nuestro estudio a bajas temperaturas es inactivada en presencia de

PAO; no corresponde a ninguna otra actividad proteica. Las membranas del RS aisladas de músculo fatigado muestran una inactivación térmica de la SERCA1 con dos transiciones en comparación con la SERCA1 del RS aislado de músculo en reposo la cual mostró solamente una transición. Esto va de acuerdo con resultados similares obtenidos durante la fatiga usando diferentes métodos que mostraban una inhibición parcial de la actividad de la SERCA1 (Luckin et al.1991; Briggs et al. 1990).

Estudios de calorimetría diferencial de barrido de la SERCA1

De acuerdo con resultados previos (Lepock et al. 1990; Ortega and Lepock 1995), encontramos que el perfil de desnaturalización de la SERCA1 muestra dos transiciones las cuales han sido previamente correlacionadas con las transiciones marcadas como NBD y CBD. Como se describe aquí, cuando los tioles vecinales forman ditioarsinas con el PAO, ambas transiciones del NBD y del CBD cambian a temperaturas más bajas. Además aparece una tercera transición a una temperatura más baja similar a la observada por la inactivación térmica, la cual demuestra que la oxidación de los tioles vecinales resulta en un cambio conformacional de la SERCA1. Nosotros proponemos que esta oxidación corresponde a una menor actividad proteica conformacional para hidrolizar ATP y transporta calcio.

La importancia de los tioles vecinales sobre la actividad y los cambios conformacionales de la SERCA1 durante la fatiga.

Las evidencias fisiológicas indican que la actividad del RS es inhibida durante el desarrollo de la fatiga muscular lo cual sugiere que este efecto inhibitorio puede ser el resultado de la expresión de diferentes isomorfias o cambios conformacionales de la SERCA1. En este estudio damos nueva información sobre

el mecanismo potencial por el cual SERCA1 es regulado a través del estado redox modificando a los TV dentro de la SERCA1. Los presentes resultados del análisis térmico de la actividad de la SERCA1 y la DSC del RSL aislado de músculo fatigado mostraron la aparición de una transición más a una menor temperatura. Esta transición marcada como UD en el perfil de DSC de la SERCA1 de las vesículas de RS obtenidas de músculo fatigado también es evidente después de la inactivación térmica de la SERCA1, cuando los TV de la SERCA1 forma ditioarsinas con el PAO. El hecho de que en ausencia de PAO, la transición del UD esté presente solamente en músculo fatigado pero no en el músculo en reposo, sugiere un cambio conformacional de la SERCA1 es similar al formado por SERCA1-PAO.

La transición del UD observada en el perfil de desnaturalización de la SERCA1 del músculo fatigado desaparece en presencia de BAL. Este hecho nos permite concluir que la oxidación de los tioles vecinales durante la fatiga están involucrados en los cambios conformacionales de la SERCA1 y por lo tanto en la regulación de la actividad de la SERCA1. La reducción de los tioles libres de la SERCA1 o de los puentes disulfuro con DTT a altas concentraciones no se alcanza completamente sin la presencia de Calcio y ATP, esto significa que se ha llevado a cabo un importante cambio conformacional. Estos resultados pueden ser explicados por la reducción de monotioles con DTT en lugar de competir por uno de los dos tioles que forman un tiol vecinal. Por lo tanto los cambios conformacionales observados en la SERCA1 que son reversibles con BAL indican que los TV de la SERCA1 están involucrados durante la fatiga.

Durante un incremento en la actividad muscular hay un incremento en el consumo de oxígeno, lo que sugiere que la regulación redox es un mecanismo probable que se ve modificado durante la actividad muscular como en la fatiga. Nosotros proponemos que el estrés oxidativo causada por una actividad muscular prolongada durante el proceso de la fatiga puede llevar a un efecto inhibitorio sobre el transporte de calcio de la SERCA1 por una oxidación de los SH de los TV

formando disulfuros intraproteicos. La formación de disulfuros intraproteicos dentro de los grupos TV cercanos al sitio de fosforilación y al sitio de pegada del nucleótido de la SERCA1 puede deberse a cambios conformacionales involucrados en la regulación de la contractilidad del músculo esquelético.

Los cambios conformacionales observados por un análisis térmico y por calorimetría diferencial de barrido descritos en este estudio están asociados con una oxidación selectiva de los TV por el PAO en un modelo in vitro de la oxidación selectiva de los TV de la SERCA1, como en el caso del músculo fatigado. Presumimos que un importante mecanismo responsable de la función de la SERCA1 durante la actividad muscular es un intercambio redox tiol/disulfuro. Demostramos que los TV de la SERCA1 son capaces de actuar como un interruptor redox, por el cual la actividad enzimática de la SERCA1 se enciende o se apaga de acuerdo al potencial redox del medio.

Es difícil comparar el transcurso del tiempo en el desarrollo de la fatiga reportado aquí con otras publicaciones de otros autores que han utilizado diferentes protocolos de estimulación, tipos de músculo y otras especies animales para producir la fatiga. Estudios similares, como los descritos aquí, han sido llevados a cabo después de ejercitar a los sujetos hasta el agotamiento. Ellos también han reportado que los cambios oxidativos que no involucran residuos de cisteína, aparece en sujetos ejercitados hasta el cansancio, lo cual también implica el desarrollo de una fatiga extrema y prolongada. Sin embargo, Matsunaga et al. (2003, 2007) no encontraron cambios en los grupos tiol vecinal como los reportados aquí. La diferencia en los resultados puede ser debido al hecho de que los experimentos fueron hechos en diferentes tipos de músculo a los que nosotros utilizamos, los cuales fueron los gastrocnemios y el músculo vasto externo (principalmente tipo I o lento) en vez de los tibiales anteriores (que son principalmente del tipo rápido). También hicieron los experimentos con microsomas, sin el aislamiento de las membranas del RS. Los microsomas del músculo esquelético lento a menudo tienen contaminación por mioglobina y por lo

tanto, metales de transición, los cuales se necesitan para iniciar la formación de radicales de oxígeno y la carbonilación proteica. En el caso del RS ligero altamente enriquecido, donde más del 85% de las proteínas de la membrana son SERCA1, como las usamos aquí, no hay metales de transición que pudieran iniciar una carbonilación en la proteína. Aunque Matsunaga et al. (2003, 2007) no mostraron evidencia de cisteínas involucradas en la fatiga muscular mediante la reducción con DTT que reduce monotioles pero no tioles vecinales (Gitler et al 1997). Los autores no exploraron el estado redox de los grupos tiol vecinal como se hizo en el presente estudio.

En nuestro estudio probablemente se inició la producción de especies reactivas de oxígeno en exceso con respecto a lo que ocurriría con ejercicio normal debido al tipo de procedimientos de estimulación usados.

Sin embargo, los cambios de la bomba de Ca^{2+} que describimos aquí son relevantes porque: a) aunque los otros autores también han observado el efecto en la alteración y oxidación de la bomba de Ca^{2+} del RS de humanos y animales ejercitados y b) nuestros resultados son relevantes por la importancia en condiciones patológicas o en ejercicio extremo donde probablemente haya una producción excesiva de oxidantes.

Referencias

- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H (2008) Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* 88:237–332
- Banhegyi G, Lusini L, Puskas F, Rossi R, Fulceri R, Braun L, Mile V, Di Simplicio P, Mandl J, Benedetti A (1999) Preferential transport of glutathione versus glutathione disulfide in rat liver microsomal vesicles. *J Biol Chem* 274(18):12213–12216

- Becker V, González-Serratos H, Álvarez R, Bäermann M, Irles C, Ortega A (2004) Effect of endurance exercise on the Ca^{2+} pumps from transverse tubule and sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J Appl Physiol* 97(2):467–474
- Belia S, Pietrangelo T, Fulle S, Menchetti G, Cecchini E, Felaco M, Vecchiet J, Fano G (1998) Sodium nitroprusside, a NO donor, modifies Ca^{2+} transport and mechanical properties in frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 19(8):865–876
- Briggs FN, Lee KF, Feher JJ, Wechsler AS, Ohlendieck K, Campbell K (1990) Ca-ATPase isozyme expression in sarcoplasmic reticulum is altered by chronic stimulation of skeletal muscle. *FEBS Lett* 259(2):269–272
- Brown H, Gonzalez-Serratos H, Huxley AF (1984) Sarcomere and filament lengths in passive muscle fibres with wavy myofibrils. *J Musc Res Cell Motil* 5:293–314
- Cumming RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH, Schubert D (2004) Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* 279(21):21749–21758
- Daiho T, Yamasaki K, Saino T, Kanidochi M, Satoh K, Iizuka H, Suzuki H (2001) Mutations of either or both Cys876 and Cys888 residues of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase result in a complete loss of Ca^{2+} transport activity without a loss of Ca^{2+} -dependent ATPase activity. Role of the CYS876–CYS888 disulfide bond. *J Biol Chem* 276(35):32771–32778
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47–95
- Duhamel TA, Stewart RD, Tupling AR, Ouyang J, Green HJ (2007) Muscle sarcoplasmic reticulum calcium regulation in humans during consecutive days of exercise recovery. *J Appl Physiol* 103(40):1212–1220
- Essig DA, Nosek TM (1997) Muscle fatigue and induction of stress protein

genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol* 22(5):409–428

- Eu JP, Hare JM, Hess DT, Skaf M, Sun J, Cardenas-Navina I, Sun QA, Dewhirst M, Meissner G, Stamler JS (2003) Concerted regulation of skeletal muscle contractility by oxygen tension and endogenous nitric oxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 100(25):15229–15234
- Gitler C, Mogyoros M, Kalef E (1994) Labeling of protein vicinal dithiols: role of protein-S₂ to protein-(SH)₂ conversion in metabolic regulation and oxidative stress. *Methods Enzymol* 233:403–415
- Gitler C, Zarmi B, Kalef E (1997) General method to identify and enrich vicinal thiol proteins present in intact cells in the oxidized, disulfide state. *Anal Biochem* 252:48–55
- Heilmann C, Pette D (1979) Molecular transformations in sarcoplasmic reticulum of fast-twitch muscle by electro-stimulation. *Eur J Biochem* 93(3):437–446
- Hua S, Inesi G (1997) Lys515–Lys492 cross-linking by DIDS interferes with substrate utilization by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biophys J* 73(4):2149–2155
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257:1496–1502
- Kalia J, Raines RT (2006) Reactivity of intein thioesters: appending a functional group to a protein. *Chem Bio Chem* 7:1375–1383
- Lamb GD, Posterino GS (2003) Effects of oxidation and reduction on contractile function in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 546:149–163
- Lanzetta PA, Alvarez LJ, Einach PS, Candia OA (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100(1):95–97

- Lepock JR, Rodahl AM, Zhang C, Heynen ML, Waters B, Cheng KH (1990) Thermal denaturation of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 29(3):681–689
- Luckin KA, Favero TG, Klug GA (1991) Prolonged exercise induces structural changes in SR Ca(2+)-ATPase of rat muscle. *Biochem Med Metab Biol* 46(3):391–405
- Mac Lennan DH, Rice WJ, Green NM (1997) The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* 272:28815–28818
- Matsunaga S, Inashima S, Yamada T, Watanabe H, Hazama T, Wada M (2003) Oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflüger Arch-Eur J Physiol* 446:394–399
- Matsunaga S, Mihima T, Yamada T, Inashima S, Wada M (2007) Alterations in in vitro function and protein oxidation of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase during recovery from high-intensity exercise. *Exp Physiol* 93:426–433
- McIntosh DB, Woolley DG, MacLennan DH, Vilsen B, Andersen JP (1999) Interaction of nucleotides with Asp (351) and the conserved phosphorylation loop of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *J Biol Chem* 274:25227–25236
- O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst JC (1996) Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol* 81(3):1197–1206
- Ortega A, Lepock JR (1995) Use of thermal analysis to distinguish magnesium and calcium stimulated ATPase activity in isolated transverse tubules from skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta* 1233(1):7–13
- Ortega A, Gonzalez-Serratos H, Lepock JR (1997) Effect of organic Ca²⁺ channel blocker D-600 on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in skeletal

muscle. Am J Physiol 272(Cell Physiol):C310–C317

- Ortega A, Becker VM, Alvarez R, Lepock JR, González-Serratos H (2000) Interaction of D-600 with the transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase. Am J Physiol 279:C166–C172
- Ortega A, Alvarez R, Perez F, Jimenez A, Gutierrez J, Vazquez P (2004) Redox regulation of vicinal thiol groups of the SERCA1 participates in muscle fatigue. J Mus Res Cell Motil 25:597–598
- Perreault C, Gonzalez-Seratos H, Letwin E, Sun X, Franzini-Armstrong C, Morgan P (1993) Alterations in contractility and intracellular Ca²⁺ transients in isolated bundles of skeletal muscle fibers from rats with chronic heart failure. Circulation Res 73(2):405–412
- Pessah IN, Feng W (2000) Functional role of hyperreactive sulfhydryl moieties within the ryanodine receptor complex. Antioxid Redox Signal 2(1):17–25
- Reid MB (2001) Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. Med Sci Sports Exerc 33(3):371–376
- Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. Physiological Rev 81(1):209–237
- Sun J, Xin C, Eu JP, Stamler JS, Meissner G (2001) Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. Proc Natl Acad Sci USA 98:11158–11162
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 a resolution. Nature 405:647–655
- Viner RI, Huhmer AF, Bigelow DJ, Schoneich C (1996) The oxidative inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase by peroxynitrite. Free Radic Res 24:243–259

- Voss AA, Lango J, Ernst-Russel M, Morin D, Pessah IN (2004) Identification of hyperreactive cysteines within ryanodine receptor type 1 by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279:34514–34520
- Winterbourn CC (2003) Radical scavaging by thiols: implications for redox signaling and antioxidant effect. In: Gitler C, Danon A (eds) *Cellular implications of redox signalling*. Imperial College Press, London
- Xia R, Stangler T, Abramson JJ (2000) Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *J Biol Chem* 275(47):36556–36561
- Xu KY, Zweier JL, Becker LC (1997) Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res* 80(1):76–81
- Zhang JS, Kraus WE, Truskey GA (2004) Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(2):C292–C299

Regulation of fast skeletal muscle activity by SERCA1 vicinal-cysteines

Rocío Álvarez · Pável Vázquez · Francisco Pérez ·
Aura Jiménez · Aldo Tirado · Claudine Irlles ·
Hugo González-Serratos · Alicia Ortega

Received: 16 July 2008 / Accepted: 25 November 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract During prolonged skeletal muscle contractions free radicals are produced that may lead to fatigue. Vicinal cysteines, known as a Vicinal-thiol groups react preferentially among them depending on redox potential. Therefore, we examined the role of VT groups on the activity and conformational changes of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase (SERCA1) from rabbit skeletal muscle isolated SR, by selective oxidation–reduction of VT-groups. After Ca^{2+} is released from the SR to start contraction, SERCA1 pumps this cytosolic Ca^{2+} back to the SR leading to muscle relaxation. Phenylarsine oxide (PAO) reacts selectively with VT-proteins forming dithioarsines, which are stable but exchanges rapidly with 2,3-dimercaptopropanol (BAL). When 0.1 mM PAO is added to isolated SR, 60 and 67%

inhibition of SERCA1 hydrolytic and Ca^{2+} uptake activities, respectively is observed. ATPase activity was fully reversible with 1 mM BAL. The SERCA1 thermal inactivation determined from isolated SR from muscle at rest showed a single transition for inactivation (T_i) at $49 \pm 1.12^\circ\text{C}$. In the presence of 0.1 mM PAO, SERCA1 shows two transitions at T_i $34 \pm 0.9^\circ\text{C}$ and at $27 \pm 1.2^\circ\text{C}$. The thermal denaturation profile of SERCA1 from muscle at rest, showed two transitions at $T_m = 51.5 \pm 1.3^\circ\text{C}$ and $63 \pm 1.02^\circ\text{C}$ related to nucleotide and Ca^{2+} binding domains, respectively. Whereas isolated SR obtained after a protocol of tetanic stimulation to produce muscle fatigue, showed three transitions in the SERCA1 denaturation profile similar to the effect of PAO, addition of 1 mM BAL reverted the effect of fatigue on SERCA1 denaturation profile. These results indicate a mechanism relating VT group's oxidation to muscle fatigue.

R. Álvarez · P. Vázquez · F. Pérez · A. Jiménez · A. Tirado ·
A. Ortega
Department of Biochemistry, School of Medicine, Universidad
Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

C. Irlles · A. Ortega
Department of Biochemistry, National Institute of Perinatology,
Mexico City, Mexico

H. González-Serratos
Department of Physiology, School of Medicine, Universidad
Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

H. González-Serratos
Department of Physiology, School of Medicine, University
of Maryland, Baltimore, MD, USA

A. Ortega (✉)
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México,
A.P. 70-159, C.P 04510 Mexico D.F., Mexico
e-mail: aortega@servidor.unam.mx

Keywords Vicinal-thiol protein · SERCA1 ·
 Ca^{2+} -ATPase · Skeletal muscle · Sarcoplasmic reticulum ·
Thermal stability · Calorimetry · Muscle fatigue

Abbreviations

ATPase	Adenosine triphosphatase
BAL	(British anti-lewisite) 2,3-dimercaptopropanol
Cys	Cysteine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTNB	Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)
DTT	Dithiothreitol
PAO	Phenylarsine oxide
IAIT	<i>N</i> -Iodoacetyl-L-[^{125}I]-3-iodotyrosine
LSR	Light sarcoplasmic reticulum
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleimide
SR	Sarcoplasmic reticulum

VT	Vicinal-thiol
VTP	Vicinal-thiol proteins
Redox	Reduction oxidation

Introduction

The SR is an elaborated intracellular skeletal muscle membrane system that wraps around the contractile apparatus and spans between two transverse tubules (TT) that flank each side of the sarcomeres. Facing each side of the TT are the terminal cisternae (TC) of the SR that contain the Ca²⁺ release channels, known as ryanodine receptors (RyRs). Depolarization of the TT voltage sensors induces the opening of RyRs causing a rapid release of stored Ca²⁺ inside the TC into the cytosol. This increased cytosolic Ca²⁺ brings about contraction. In skeletal muscle, the SR is the primary site of intracellular Ca²⁺ storage. The removal of cytosolic Ca²⁺ released after excitation brings about relaxation. This removal of Ca²⁺ takes place primarily in the fenestrated collar located in the mid-portion of the SR.

Ca²⁺ sequestration into the SR in fast skeletal muscle is regulated by the Ca²⁺ ATPase pump, SERCA1, a 110-kDa transmembrane protein (Mac Lennan et al. 1997). SERCA1 is a 994-residues long protein whose schematic representation structure is illustrated in Fig. 1 (Mac Lennan et al. 1997), which has 24 cysteines (Cys) residues. Proteins with Cys in close proximity that undergo reversible dithiol/disulfide conversion are referred to as vicinal-thiol containing proteins (VTP) (Gitler et al. 1994). The cysteines of the type Cys-(X)_n-Cys, where X is any other residue and n is the number (2–6 residues) between Cys, which are sequenced proximally or can be formed by juxtaposition of cysteineyl residues present in distant segments of the same or different polypeptides are called vicinal-thiol (VT) groups (Gitler et al. 1994, 1997; Winterbourn 2003). Based on a sequence analysis of SERCA1, it has been shown that this protein has 4 Cys pairs Cys^{344–349}, Cys^{417–420}, Cys^{670–674} and Cys^{674–675} and that they are within * 3 and 9 Å between them (Kalia and Raines 2006). These pairs are referred to as VT-groups which are labeled with red dots in Fig. 1a. Crystallographic studies of SERCA1 have been shown that some Cys residues have the potential to be part of VT-groups that form reversible disulfide par bonds (Toyoshima et al. 2000). These VT-groups along the SERCA1 (Toyoshima et al. 2000) are located in the cytosolic region of the protein. The nucleotide-binding site (NBS) located in residue Lysine K⁵¹⁵ (blue dot in Fig. 1 a) (Hua and Inesi 1997) and particularly the phosphorylation site (PS) located in the residue Aspartate D³⁵¹ (green dot in Fig. 1a) (Mcintosh et al. 1999), are in close proximity to the VT groups that are labeled Cys^{349–344} (red dots, in Fig. 1a). The sequence number of Cys in SERCA1 is shown in the Table of Fig. 1b.

The Ca²⁺-binding domain (CBD) is located in the transmembrane region between α-helix 2 and α-helix 3 distant from VT groups. Due to the distance between the CBD and the VT-groups the probability that the CBD can be affected directly by redox potential is very low. On the other hand, the SR luminal loops of SERCA1 that connects transmembrane α-helix 7 and α-helix 8, contain two Cys residues (Cys⁸⁷⁶ and Cys⁸⁸⁸) that form a disulfide bond, which is necessary for Ca²⁺ transport into the SR lumen (Daiho et al. 2001). Thereby, formation of the S–S bond within Cys⁸⁷⁶ and Cys⁸⁸⁸ is due to the redox potential in the luminal side of the SR where it is more oxidized than in the cytosol (Hwang et al. 1992; Banhegyi et al. 1999; Cumming et al. 2004) where most of the Cys residues in the protein surface are reduced. It has been estimated that the cytosolic redox potential in most mammalian cells is approximately – 230 mV (Xu et al. 1997) and inside the SR is approximately –180 mV (Hwang et al. 1992; Banhegyi et al. 1999).

Reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) have the ability to modulate a variety of biological processes, (Droge 2002) including contractile force (Reid 2001; Lamb and Posterino 2003). These molecules are synthesized at low

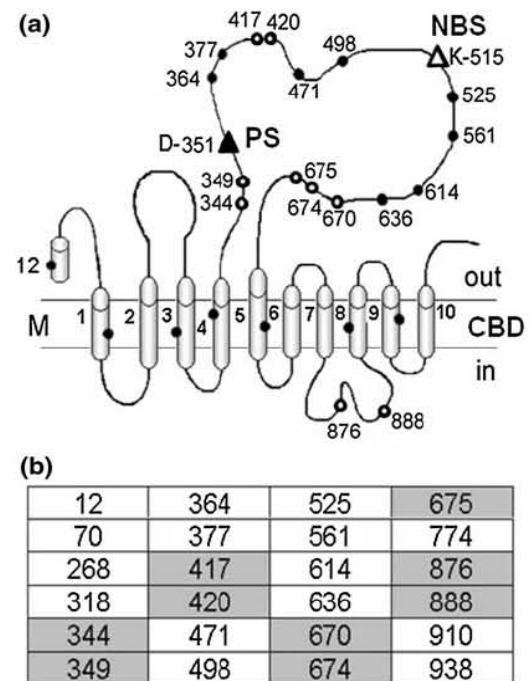


Fig. 1 a Schematic representation of SERCA1. Cys residues distribution and Cys residues position along the SERCA1 sequence. Solid circles (●) correspond to all Cys residues in SERCA1. Open circles (○) correspond to the vicinal Cys residues of SERCA1. Open triangle (△) corresponds to the nucleotide binding site. Solid triangle (▲) corresponds to the phosphorylation site. b The table shows the position number in the sequence of all Cys residues, in the dark boxes is numbered the vicinal cysteines

levels when the muscles are at rest but their production increases with muscle contraction and during periods of prolonged muscle activity where there is an increase in oxygen consumption (Reid 2001; O'Neill et al. 1996; Belia et al. 1998). It has been shown that muscles exposed to high concentrations of exogenous ROS and NO develop less force during activation when compared with control fast skeletal muscles (Stamler and Meissner 2001). The concentration of both radicals increase during mechanical activation (Lamb and Posterino 2003; O'Neill et al. 1996; Eu et al. 2003; Zhang et al. 2004). ROS and N radicals target sulfhydryl groups of RyR (Sun et al. 2001; Pessah and Feng 2000; Voss et al. 2004; Xia et al. 2000) and SERCA1 (Xu et al. 1997; Viner et al. 1996) and appear to have a biological regulatory effect on them. Although a comprehensive study of this effect has been related to muscle activity, the study of the role of vicinal thiols on SERCA1 and RyR has not been done so far.

We propose that the ratio SERCA1-(SH)₂/SERCA1-S₂ (redox state) modify the structure and function of SERCA1, leading to a decreased activity of SERCA1 and thereby decreasing muscle relaxation. The present experiments were undertaken to understand the molecular mechanism by which the VT-groups could be involved in the function and structure of SERCA1. We studied the effect of selectively blocking VT groups on SERCA1 hydrolytic activity and Ca²⁺ transport from resting and fatigued fast skeletal muscles. Structural changes of SERCA1 were determined by studying the thermodynamic parameters of thermal protein unfolding (Lepock et al. 1990). We demonstrated that after prolonged repetitive muscle activation, SERCA1 showed conformational changes related to a reduction of SERCA1 activity similar to when VT-groups are oxidized. A reversible effect on the ATPase activity and protein conformation upon selective reduction of VT-groups, led us to conclude that SERCA1 is a VTP that is affected by the oxidation state of VT-groups, and that these changes play an important role in fatigue development.

Experimental procedures

Dissection

For these experiments we used New Zealand rabbits that weighed between 3 and 3.5 kg. The rabbits were first tranquilized and anesthetized with an intramuscular injection of 200 mg ketamine. Once the rabbits were anesthetized, the ear vein was cannulated and perfused continuously with a Krebs's solution containing in mM: Na⁺ 142; K⁺ 4; Ca²⁺ 5; Mg²⁺ 3; Cl⁻ 103 and HCO₃ 27. Next, 2 ml of Pentobarbital at a concentration of 0.06 g/ml was injected with the

perfusion solution. Afterwards the skin surrounding the upper leg was locally anesthetized with 2% xylocaine. A small portion of approximately 1.5 cm of the tibial nerve in the thigh was isolated, tied and cut between the knot and the spinal cord. The nerve portion running into the muscle was placed inside of a small plastic cuff containing the stimulating cathode and anode platinum wire electrodes to pass current. After care was taken to ensure that the nerve and electrodes made good contact, the nerve was then tied onto the cuff plastic cover. The lower third of the right tibialis anterior muscle was isolated and its lower tendon insertion was tied and cut close to the metatarsal insertion. A stainless steel wire loop was strongly tied to this tendon. The circulation was left intact and any bleeding was stopped immediately by closing the bleeding vessels. The proximal tendon was left intact and the connective tissue attachments between the muscle and other surrounding muscles were carefully cut. Whenever rabbits gave indications of awakening further anesthetic was injected.

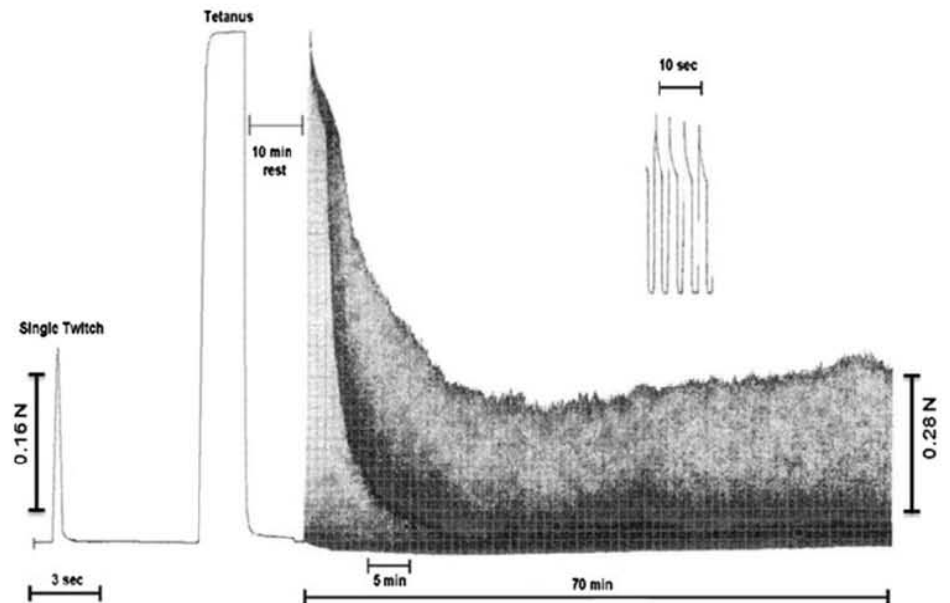
Experimental procedure

After the dissection was finished the rabbits were moved to the experimental set up and laid down on a heating pad set at 37°C. In the experimental set up, a metal bar was screwed into the rabbit's lower femur bone. The bar was then tightly attached to a holder to maintain the knee in a fixed position. The tibial anterior muscle was attached through the steel wire to a FT03 Grass force transducer (Grass, Astro-Med, Inc. Product Group, RI, USA). The force transducer was aligned perpendicularly to the muscle's long axis. After attaching the metal loop to the transducer, the experiment was started.

Experimental protocol

Stimulating electric pulses of 0.8 ms duration and variable voltage were delivered to the nerve while the force developed by the muscle was recorded on a paper chart recorder. Once the voltage of stimulation for maximal response was found, the subsequent stimulating pulses had the same duration and 1.5 × the maximum voltage. Then muscles were carefully stretched or released in 0.5 mm steps until the length at which maximal twitch tension was obtained. Optimal length corresponded to an average sarcomere length of approximately 2 μm per sarcomere (Brown et al. 1984). Afterwards the nerves were stimulated with series of single twitches elicited every 3 s until the peak twitch force was the same for 5 consecutive times. Twitches were followed by 60 Hz 2 s nerve stimulations. The stimulating protocol was repeated as necessary with 4.5 min resting periods to ensure that at least three control tetanic forces were similar. The preparations rested for

Fig. 2 Time course of fatigue development induced with repetitive electrical stimulation. Fatigue was induced with 2 s duration cycles of 60 Hz tetanic stimulation repeated every 4.5 s. Development of fatigue was recorded at slow speed as shown with the calibration time under the fatigue recording. The repetitive stimulation was preceded by a control twitch and control tetanus recorded at faster speed as shown with the calibration time under the twitch. The inset shows four fast recording traces of the tetanic stimulation obtained when the force development had declined to the value shown in the slow recording trace under them. Force calibration: 0.28 N



10 min followed by a single twitch and a single tetanic stimulation, recorded at 0.2 s/mm before the fatigue protocol began) (Fig. 2). Fatigue was induced with electrical stimulation cycles of 60 Hz and 2 s duration repeated every 4.5 s for 70 min (Fig. 2). At the end of the 70 min stimulation the tetanic force decreased in these experiments from 100% of the control tetanic force value to 36.9 ± 4.4 ($n = 3$). At this moment the stimulation cycle was stopped, liquid nitrogen poured on to the muscle and the whole muscle was excised very quickly and submerged into liquid nitrogen for further analysis. Since the experiments were done by stimulating the motor nerve, we used this long period of fatigue development before freezing the muscles for further studies to ensure that: (a) at least twice the time after a maximal decrease of force (fatigue) had elapsed and (b) that the degree of fatigue development was steady without large oscillations of force development. The experiments performed after the establishment of fatigue showing force development changes of more than 25% were discarded. We expected that at the time of fixation with liquid nitrogen all of the changes that we measured were complete and had fully occurred, and that they did not change substantially during the time elapsed between the end of the stimulation and the fixation.

After the experiments were finished, rabbits were killed by increasing the anesthetic doses and forcing the animal to breathe chloroform. Dead animals were disposed by the University's animal facility. The experimental care and disposition of experimental animals followed the Official Mexican rules established for care and use of laboratory animals (Code NOM-062-Z001999).

Preparation of membrane vesicles

SR membranes were obtained from previously frozen *tibial anterior* muscle as described above. The isolation was performed by differential centrifugation and a discontinuous sucrose gradient in the absence of any reducing agent in the buffer medium. A first sucrose gradient of 25, 27.5, and 35% w/v was used to separate the surface membranes. The 35% band was placed on a second discontinuous gradient consisting of 27.5, 30, 32, 35, and 45% sucrose. The band obtained at the 32 and 35% interfaces were identified as light SR (LSR), detected by the maximum ATPase activity stimulated by Ca^{2+} . Protein concentration was determined using Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) with BSA as the standard.

N-Iodoacetyl-L-[^{125}I]-3-Iodotyrosine (IAIT) labeling of vicinal-thiol containing proteins in SR

The synthesis of N-iodoacetyl-[^{125}I]-3-iodotyrosine was described previously (Gitler et al. 1994, 1997). First the [^{125}I]-IAIT was dissolved in benzene consisting of 0.25% dimethylformamide (DMF) with a specific radioactivity of 20 Ci/mmol stored for a period of 6 weeks or less. Then the desired quantity of the benzene-DMF solution ($\sim 1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) was evaporated in a microcentrifuge tube in the Speed Vac (Savant) and was either dissolved in a buffer and then added to the samples to be labeled (IAIT is stable at pH 7.4 for several hours) or the material to be labeled was added

directly to the dry IAIT in each tube. Labeling was performed in a buffer of pH 7.4 containing 1 mM EDTA or EGTA. The reaction was stopped after 30 min at room temperature (25°C) by adding 1/2 volume of high SDS sample buffer (30% glycerol, 9% SDS, 0.61% bromophenol blue in 0.46 M Tris-HCl buffer, pH 6.8). To distinguish between VT and monothiols, labeling was performed in the absence and presence of 20 μ M PAO. DTT up to 10 mM does not compete with [¹²⁵I]-IAIT labeling of thiol proteins (Gitler et al. 1994, 1997). This allows the labeling of proteins in their completely reduced state. Because alkylation with [¹²⁵I]-IAIT introduces a double negatively charged residue in each thiol in the labeled proteins, polypeptide mobility in SDS-PAGE is shifted toward higher apparent molecular weights of the labeled proteins when compared to the unlabeled polypeptides.

Calcium uptake

Calcium transport was measured at room temperature by the filtration method in a solution containing (in mM): 100 KCl, 5 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 1 μ Ci ⁴⁵[CaCl₂], 20 Tris-Malate (pH 7.0), and 4 ATP with 0.05 mg of protein/ml. The reaction was stopped with 0.5 ml of ice-cold quenching solution containing (in mM): 5 MgCl₂, 4 EGTA, and 20 Tris-Malate (pH 7.0). Membrane vesicles (0.9 ml) were filtered through 0.45 μ m Millipore filters, washed, dried, and then counted by scintillation. Experiments were done in the absence and in the presence of PAO and BAL at the concentrations as indicated in Fig. 5.

SERCA1 hydrolytic activity

Total ATPase activity was measured by colorimetric determination of P_i using malachite green as described before (Lanzetta et al. 1979). Aliquots of 5 μ g/ml of protein were incubated in a solution containing (in mM): 100 KCl, 5 MgCl₂, 5 NaN₃, 1 ouabain and 20 Tris-Malate, pH 7. The reaction was stopped with a solution containing: 0.045% malachite green hydrochloride, 4.2% ammonium molybdate in 4N HCl, 0.8 ml Triton-X100 for each 100 ml of solution, and 0.25 ml Na-citrate (34%), absorbance was read at 660 nm. Experiments were done in the absence and in the presence of PAO and BAL in the concentrations indicated in Figs. 2 and 4–6.

Thermal inactivation of ATPase activity

LSR membranes (2 mg/ml) were incubated in 0.3 M sucrose containing in (mM): 20 Tris-Malate, 100 KCl, pH 6.8 in a PCR device at a heating rate of 1°C/min as described previously (Lepock et al. 1990). Samples were

recovered at time intervals of 1 min from 18 to 70°C as indicated in the corresponding figure legends and placed in ice for approximately the same amount of time before the assay for ATPase activity was made at room temperature (25°C) until all samples were collected. An inactivation curve was generated. The first derivative of the inactivation curve was used to determine the Temperature of Inactivation (T_i), defined as the temperature recorded for half inactivation. For all inactivation experiments the curves are not symmetrical therefore, T_i does not correspond exactly to the peak temperature.

Differential scanning calorimetry

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to measure the transition temperature (T_m) of the SERCA1 in the presence and absence of PAO. T_m is defined as the temperature at which excess heat capacity is maximal. LSR was dissolved in a buffer containing (in mM): 100 KCl and 20 Tris-Malate (pH 7.0). Excess heat (C_p) versus temperature scans were obtained from approximately 1 mg/ml protein using a high sensitivity differential scanning calorimeter VP-DSC. (MicroCal Inc., MA USA). The samples and reference solutions were carefully degassed under vacuum for 5 min before fully loading the DSC containers with a capacity of 0.56 ml. When equilibrium at 10°C was reached, the temperature was increased to 100°C. Each scan was performed at the rate of 1°C/min. To assess for protein denaturation reversibility, the temperature was cooled down to 10°C and rescanned up to 100°C. The baseline was corrected by subtracting the re-scan from the scan. In all cases there was no evidence of reversibility. DSC profiles were deconvoluted and the best theoretical fit was calculated assuming irreversible denaturation occurred as previously described for SR (Lepock et al. 1990).

All values are expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M.).

Results

Purity of LSR membranes and IAIT binding to SERCA1

Figure 3 is a SDS-PAGE where 75% of the protein components of LSR correspond to SERCA1 (column 3). The Western Blot using anti-SERCA1 shown in Fig. 3 (column 4) confirms the presence of SERCA1 in LSR vesicles. The autoradiography (column 5) of LSR marked with [¹²⁵I]-IAIT correspond to proteins labeled with IAIT, and revealed that SERCA1 is a VTP. Every SR isolation experiment was analyzed for IAIT binding ($n = 3$).

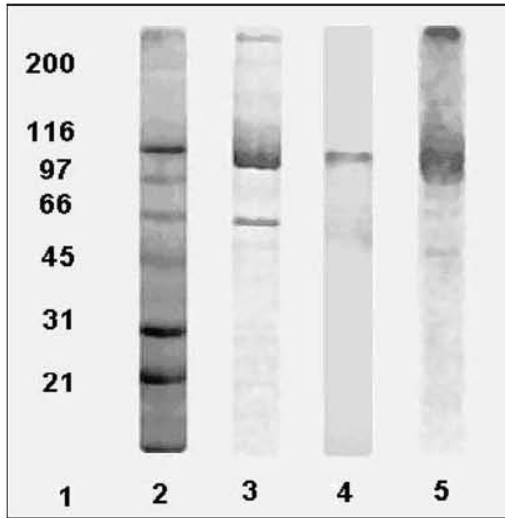


Fig. 3 SERCA1 is a Vicinal-Thiol protein. Molecular mass markers are indicated for the SDS-PAGE in *Column 1* and *2*. *Column 3* shows a SDS-PAGE from SR membranes. *Column 4* shows a Western Blot from SR vesicles with anti-SERCA1 antibody. *Column 5* shows the autoradiography of selectively labeled VTP with [¹²⁵I]-IAIT in SR. The labeled protein corresponds to SERCA1 molecular weight

Effect of PAO on the hydrolytic function and ATP-dependent Ca²⁺-uptake of the SERCA1

The ATPase hydrolytic activity of SERCA1 is inhibited by PAO in a dose dependent manner as shown in Fig. 4a with a maximal inhibition of approximately 60 ± 3% (n = 3) by a 0.1 mM PAO. The time course of inactivation of the ATPase with 0.1 mM PAO is shown in Fig. 4b. The strong inhibitory effect of 0.1 mM PAO on the activity of the SERCA1 is completely reversed by 1 mM BAL (n = 3). BAL per se does not have any effect on the activity of the SERCA1 (experiments not shown) but when it is added to a previously inhibited SERCA1 with 0.1 mM PAO, the hydrolytic activity level of SERCA is fully recovered (Fig. 4b). Since ATP hydrolysis is coupled with calcium transport, we examined the role of VT groups on Ca²⁺-transport. Figure 5 shows that the ATP-dependent Ca²⁺-uptake is inhibited by 67 ± 9% in the presence of 0.1 mM PAO (n = 3). After 30 min this inhibitory effect was completed, and thereafter remained at approximately at the same level. BAL did not reverse the effect on the PAO inhibition of calcium transport even at high concentration (10 mM). LSR passive calcium efflux was not affected either by PAO or BAL (Ortega et al. 2004).

Effect of PAO and BAL on the thermal inactivation of SERCA1

The inhibitory effect of PAO on SERCA1 activity could be due to a change in the protein conformation. Protein

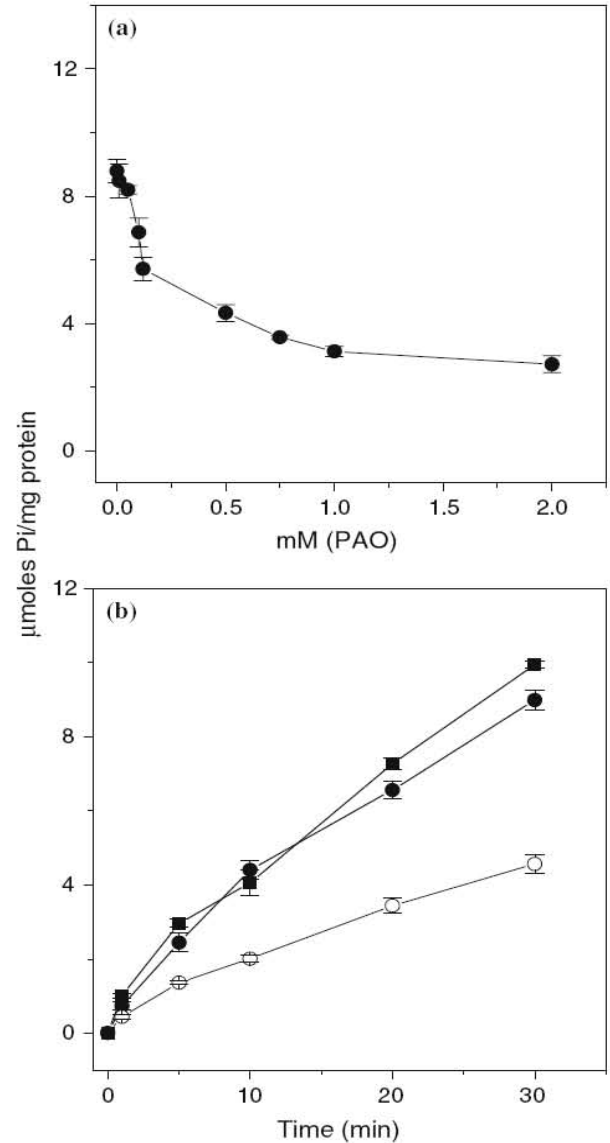


Fig. 4 Concentration-dependent inhibition of SERCA1 hydrolytic activity and time course effect of PAO and the reversible inhibitory effect of BAL. **a** ATPase activity in the presence of different concentrations of PAO (○) and **b** SR ATPase activity as a function of time in the absence (●) and in the presence (○) of 0.1 mM PAO. ATPase activity in the presence of 1 mM BAL after having been previously inhibited by 0.1 mM PAO (■). Bars indicate standard error

conformational changes can be deduced by analyzing the thermal stability of the protein. We studied this possibility measuring SERCA1 thermal stability in the presence and in the absence of PAO and BAL. Figure 6 shows thermal inactivation curves of the ATPase activity after heating at rate of 1°C/min irreversible inactivation occurred at

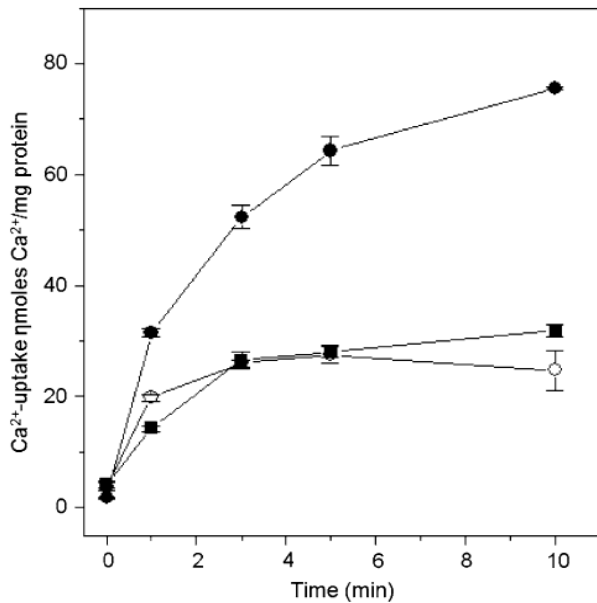


Fig. 5 Effect of PAO and BAL on ATP-dependent Ca^{2+} -uptake from SR. SR vesicles Ca^{2+} -uptake as a function of time in the absence (●), in the presence of 0.1 mM PAO (○) and in the presence of 1 mM BAL after having been previously inhibited by 0.1 mM PAO (■). Bars indicate standard error

temperatures in excess of 30–40°C depending on PAO and BAL concentrations and was completed after heating to 60°C. The thermal inactivation curves of the ATPase activity in the absence of PAO (control) in the presence of 0.1 mM PAO, and with 1 mM BAL are shown in Fig. 6a, b and c, respectively. The first derivative of the inactivation curves gives a more accurate determination of the transition between the active and inactive forms of the enzyme are shown in Fig. 6d (control), e (with PAO) and f (with BAL). The inactivation temperature (T_i) was calculated from each component of curves in *D*, *E* and *F* (Fig. 6). When all of the control SR membrane experiments are taken into consideration, there is only one transition at $T_i = 49 \pm 0.12^\circ\text{C}$ ($n = 4$) (Fig. 6d). However, when the SR was incubated in 0.1 mM PAO, as seen in Fig. 6e, two well defined transitions at $T_i = 34 \pm 0.9^\circ\text{C}$ and $T_i = 27 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ($n = 4$) were observed. In the presence of 1 mM BAL a single sharper transition with $T_i = 49 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ($n = 4$) was observed as in Fig. 6f. The inactivation curves of SERCA1 in Fig. 6 have been fitted with a curve predicted for thermal inactivation curves of the ATPase activity as a single irreversible transition of the form: $\text{N} \xrightarrow{k} \text{D}$ where N and D are the native and denatured forms, respectively.

As muscle fatigue may have a possible effect on the SERCA1 activity, we study by thermal analysis the inactivation profile of SECA1 in fatigued muscle.

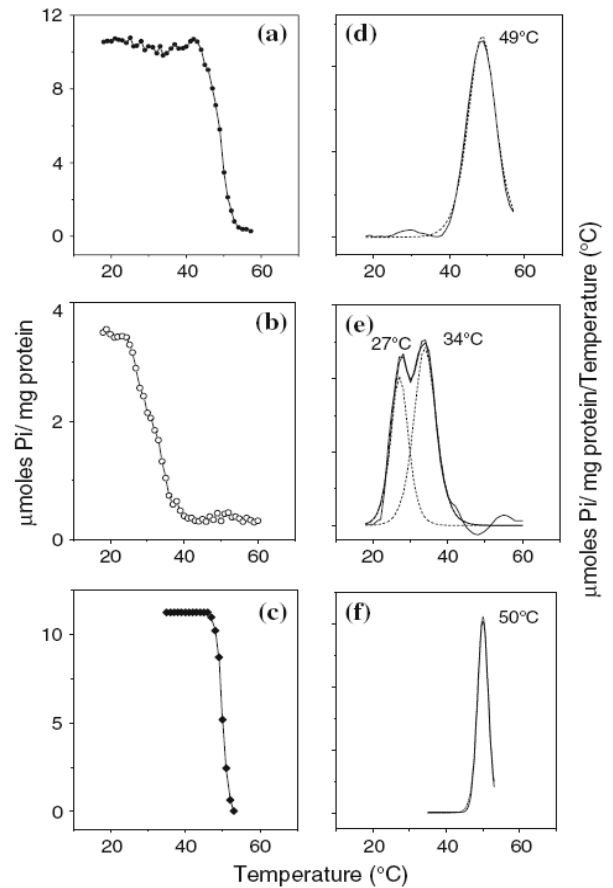


Fig. 6 Effect of PAO and BAL on the thermal inactivation of SERCA1. **a** in the absence (●) of PAO, **b** in presence (○) of 0.1 mM PAO and **c** in the presence (■) of 1 mM BAL. The above curves, corresponded to thermal inactivations of ATPase activity of SERCA1 as a function of temperature (scan rate of 1°C/min). Plots in Fig. 4d, e and f are the first derivative of the inactivation curve (**a**, **b** and **c**) of the ATPase activity as a function of temperature. Plots **a** and **d** show of Ca^{2+} -ATPase activity and its first derivative, respectively in control SR vesicles. Plots **b** and **e** show the Ca^{2+} -ATPase activity and its first derivative in the presence of 0.1 mM PAO. Plots **c** and **f** show the Ca^{2+} -ATPase activity in the presence of 1 mM BAL and its first derivative as a function of temperature ($^\circ\text{C}$), respectively

Figure 7 illustrates a representative experiment of ATPase activity of SR membranes isolated from resting muscles with and without 0.1 mM PAO and in fatigued muscles alone. Since PAO has an effect on the SERCA1 conformation as shown above (Fig. 6), we compared the difference in conformational changes between SERCA1 obtained from SR isolated from muscles at rest and after fatigue. Figure 7 show SR membranes isolated from resting muscles in the absence of PAO (continuous line), in the presence of 0.1 mM PAO (dashed line) and from fatigued muscles (dark line). In rested muscles only one transition is

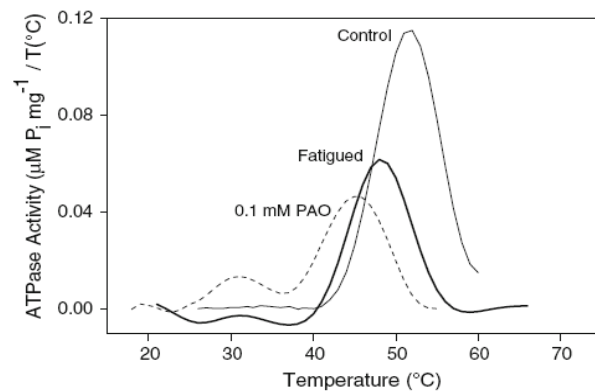


Fig. 7 Thermal inactivation profile of SR vesicles obtained from rested and fatigued muscles. Figure shows that the first derivative of the inactivation curves of SERCA1 as a function of temperature. The heating rate for all experiments is 1°C/min and the ATPase activity was determined as mentioned under Experimental procedures. Thermal inactivation of SR vesicles obtained from muscle at rest (*solid line*). Thermal inactivation of SR vesicles obtained from muscles at rest in the presence of 0.1 mM PAO (*dotted line*) and SR vesicles obtained from fatigued muscles (*darker solid line*)

observed, the average T_i of SERCA1 in the absence of PAO is $49 \pm 0.12^\circ\text{C}$ ($n = 4$). In the presence of 0.01 mM PAO two transitions are observed with average of $T_i = 44.8 \pm 0.79^\circ\text{C}$ ($n = 4$) and $30.9 \pm 0.36^\circ\text{C}$ ($n = 4$). Under fatigue conditions, the T_i of the main transition is at $48 \pm 0.79^\circ\text{C}$ ($n = 4$) while the second transition is at $T_i = 31 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ($n = 4$) this second transition is not observed in the inactivation profile of SERCA1 determined from muscles at rest.

Differential scanning calorimetry (DSC)

Lepock et al. (1990) have shown that the DSC profile obtained from highly purified LSR membranes has two peaks (endothermic transitions) corresponding to the denaturation of the cytosolic nucleotide-binding domain (NBD) and the transmembrane calcium-binding domains (CBD) of SERCA1. Based on the above evidence, we also used LSR membranes to obtain a set of SERCA1 DSC denaturation profiles from muscles at rest, after development of fatigue and exposed to a 1 mM BAL after fatigue. Figure 8 shows the DSC profile as excess specific heat of denaturation (C_p) vs. temperature of SERCA1. Figure 8a shows the denaturation profile from SR vesicles isolated from muscles at rest. SERCA1 denatures in two major endotherms. The transition temperature for denaturation (T_m) was determined by deconvolution of the two endotherms as previously described (Lepock et al. 1990). The main component labeled as NBD, which corresponds to the denaturation of the cytosolic nucleotide-binding domain, had a T_m of $51.5 \pm 1.3^\circ\text{C}$ ($n = 3$). The second component, CBD, which corresponds

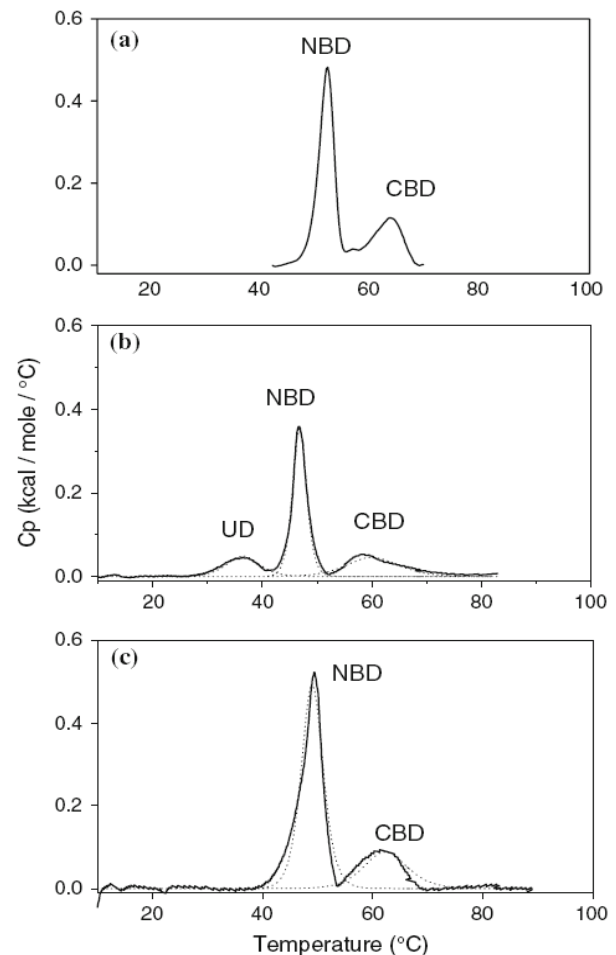


Fig. 8 Differential scanning calorimetric profiles of LSR. Representative experiment of scanning calorimetric profiles LSR membranes (1–2 mg protein/ml) scanned with temperatures increasing at a rate of 1°C/min in a solution containing 10% sucrose, 100 mM KCl, 20 mM Tris–Malate and 1 mM CaCl_2 pH 6.8 either: **a** from control resting muscle LSR, shows two peaks labeled NBD and CBD **b** LSR obtained from fatigued muscle, the two peaks labeled NBD and CBD are the same as in control scanning calorimetric profiles. The transition labeled UD appears only in LSR obtained from a fatigued muscle and **c** LSR membranes from fatigued muscle in the presence of 1 mM BAL, the transition labeled UD disappears

to the denaturation of the transmembrane calcium-binding domain, had a T_m of $63 \pm 1.02^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Figure 8b shows the thermogram of LSR obtained from fatigued muscles. Three transitions were observed with an average T_m (NBD) at $46.8 \pm 1.03^\circ\text{C}$ ($n = 3$), T_m (CBD) at $60.2 \pm 0.58^\circ\text{C}$ ($n = 3$). A third transition named undetermined domain (UD) T_m (UD) at $36.5 \pm 0.33^\circ\text{C}$ ($n = 3$) appears after fatigue. The third transition that is not present in the denaturation profile of SERCA1 obtained from rest muscle, is present in the denaturation profile of fatigued muscle and in

the presence of PAO (0.01, 0.02, 0.1 mM) where the UD, shows up at $T_m = 44 \pm 0.92$, 37.8 ± 0.25 , and $36.9 \pm 0.47^\circ\text{C}$ ($n = 3$), respectively (plots not shown). Figure 8c shows that when LSR obtained from fatigued muscle is incubated with 1 mM BAL transition UD is lost. However, in the presence of BAL the T_m for transition (NBD) = $49 \pm 1.05^\circ\text{C}$ ($n = 3$) and transition (CBD) = $62.3 \pm 0.82^\circ\text{C}$ ($n = 3$) did not shift to the initial T_m observed in the LSR isolated from muscle at rest.

Discussion

The present study shows that: (1) SERCA1 is a vicinal-thiol Protein, (2) SERCA1 vicinal-thiol groups are oxidized selectively with the trivalent arsenical PAO inhibited the ATPase hydrolytic activity and calcium transport, (3) The effect of oxidizing VT-groups with PAO on ATPase hydrolysis is reversible with BAL but does not reverse Ca^{2+} -transport, (4) SERCA1 conformational changes observed by thermal analysis demonstrate that oxidizing SERCA1 VT-groups induce a reversible conformational change by reduction of VT-groups, and (5) SR isolated from fatigued muscle shows a conformational change of SERCA1 that is almost fully reversible after exposure to the VT-groups reducing agent BAL.

Importance of VT-groups on the activity and conformational change of SERCA1

The 60% inhibition of the hydrolytic activity of SERCA1 by PAO indicates that VT groups have a regulatory effect on the function of SERCA1. This finding implies that SERCA1 activity is partially inactivated in environments that produce oxidation of VT groups. Thereby, it also suggests that the oxidation of SERCA1 VT-groups caused by an oxidative stress under physiological conditions have an effect on muscle contraction.

The fact that increasing the concentration of PAO as high as 2 mM (Fig. 5a) or up to 10 mM (data not shown) does not create additional inhibition of ATPase hydrolytic or Ca^{2+} -uptake activities, indicates that PAO has a concentration of saturation on SERCA1 that holds the enzyme in a reduced activity conformation.

The conformational change of SERCA1 in the presence of PAO and during fatigue resulted in reduced activity, uncoupled ATP hydrolysis and Ca^{2+} transport. Addition of the reducing agent BAL recovered hydrolytic activity but Ca^{2+} transport remained inhibited even at higher concentrations of BAL. The membrane permeability of BAL may have reduced the disulfide bond between Cys⁸⁷⁶ and Cys⁸⁸⁸ that is necessary for Ca^{2+} transport (Daiho et al. 2001). The

molecular mechanisms that buffered redox potential *in vivo* are absent in an *in vitro* model.

SERCA1 is a 994-residues long protein that has 24 Cys residues. Sequencing of SERCA1 has shown that 4 Cys pairs are within a distance ($\sim 3\text{--}9 \text{ \AA}$) between them. These pairs are referred to as VT groups. Crystallographic studies have demonstrated the distribution of potential VT groups along the SERCA1 and are located in the cytosolic region of the protein (Kalia and Raines 2006). The phosphorylation and nucleotide-binding sites of SERCA1 are close to the VT groups, therefore any conformation change induce by oxidation-reduction of VT groups could affect the conformation of the PS and NBS. The fact that the Ca^{2+} -binding domain is located in the transmembrane region distant from VT groups leads us to propose that the Ca^{2+} -binding domain has a minor probability to be directly affected by the redox potential. Therefore the irreversibility of calcium transport after VT groups' reduction could be due to conformational changes that do not recover the calcium transport.

SERCA1 inhibition by PAO is reverted by BAL

Our study confirms that BAL is a potent triarsenical remover that maintains unaltered SERCA1 activity and reverses the effect of the triarsenical PAO on the thermotropic behavior of SERCA1. Thermal inactivation of SERCA1 in the presence of PAO shows two transitions with a very different temperature of inactivation (T_i) than the one transition observed for SERCA1 control activity in the absence of PAO (Lepock et al. 1990; Ortega et al. 1997; Becker et al. 2004). The additional transition that we have observed in the presence of PAO raises the question as to whether other proteins with a Ca^{2+} -ATPase activity are or are not present within the isolated SR membrane used in our study. The findings described here are not due to mitochondria ATPase contamination, since this activity was eliminated by the addition of sodium azide to the reaction medium as described in Experimental Procedures. In addition, previous results (Ortega and Lepock 1995) have shown that transverse tubule membrane $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase has a T_i at 56°C instead of 51°C of SERCA1 and 5 mM PAO do not affect the hydrolytic activity of either the Mg^{2+} or Ca^{2+} -ATPases (results not shown). Consequently, we have concluded that when the second transition of SERCA1 observed in our present studies at lower temperatures is inactivated in the presence of PAO; this does not correspond to any other protein activity. SR membranes isolated from fatigued muscle show a thermal inactivation of SERCA1 with two transitions in compared with to the SERCA1 of isolated SR from muscle at rest that showed only one transition. This is in agreement with similar results obtained during fatigue using different methods that

show partial inhibition of SERCA1 activity (Luckin et al. 1991; Briggs et al. 1990).

Differential scanning calorimetric studies of SERCA1

In agreement with previous results (Lepock et al. 1990; Ortega and Lepock 1995), we found that the denaturation profile of SERCA1 shows two transitions which have been previously correlated with transitions labeled NBD and CBD. As described here, when VT groups formed dithioarsines with PAO, both the NBD and the CBD transitions shifted to lower temperatures. In addition, a third transition appears at a lower temperature similar to the one observed by thermal inactivation, which demonstrated that oxidation of VT groups resulted in a major conformational change of SERCA1. We propose that this oxidation corresponds to a lesser protein conformation activity to hydrolyze ATP and Ca^{2+} transport.

The importance of VT-groups on the activity and conformational changes of SERCA1 during fatigue

Physiological evidences indicate that SR activity is inhibited during the development of muscle fatigue that suggests that this inhibitory effect may be the result of different isoform expressions or conformational changes of SERCA1 (Luckin et al. 1991; Briggs et al. 1990; Heilmann and Pette 1979). In this study we provide new information on the potential mechanism by which SERCA1 is regulated through the redox state by modifying the VT groups within the SERCA1. The present results of thermal analysis of SERCA1 activity and DSC of LSR isolated from fatigued muscle showed the emergence of an additional transition at a lower temperature. This transition labeled UD in the DSC profile of SERCA1 from SR vesicles obtained from fatigued muscles is also evident after thermal inactivation of SERCA1, when SERCA1 VT groups formed dithioarsines with PAO (results not shown). The fact that, in the absence of PAO, transition UD is present only in fatigued muscles but not in muscles at rest, suggest a SERCA1 conformation change similar to the one formed by SERCA1-PAO.

The transition UD observed in the denaturation profile of SERCA1 from fatigued muscle disappears in the presence of BAL. This fact led us to conclude that oxidation of VT groups during fatigue are involved in SERCA1 conformational changes and, therefore, in the regulation of SERCA1 activity. The reduction of SERCA1 free thiols or disulfide bonds by DTT even at high concentrations is not fully achieved unless Ca^{2+} and ATP are present (Daiho et al. 2001), this means that an important conformational change has been achieved (Lepock et al. 1990; Toyoshima et al. 2000; Ortega et al. 2000). This result may be explained by the reduction of monothiols by DTT rather

than the competence for one of the two thiols that conform the VT group (Essig and Nosek 1997; Gitler et al. 1994, 1997). Therefore, the SERCA1 conformation change observed after fatigue that is reversible with BAL indicates an involvement of SERCA1 VT-groups during fatigue.

During increased muscle activity there is an increase in O_2 consumption, suggesting that redox regulation is a probable mechanism that is modified during muscle activation like in fatigue (Essig and Nosek 1997). We propose that the oxidative stress caused by prolonged muscle activation during the fatigue process may led to an inhibitory effect on SERCA1 Ca^{2+} transport caused by SH oxidation in VT groups forming intraprotein disulfides. Formation of intraprotein disulfides within VT groups positioned in proximity to the phosphorylation site and the nucleotidebinding site of SERCA1 might lead to conformational changes involved in skeletal muscle contractility regulation.

The conformational changes observed by thermal analysis and differential scanning calorimetry described in this study are associated with selective oxidation of VT groups by PAO in an in vitro model of the selective oxidation of SERCA1 VT groups, as is the case of muscle fatigue. We hypothesize that an important mechanism responsible for SERCA1 function during muscle activity is a redox thiol-disulfide interchange. We demonstrate that SERCA1 VT groups are capable of acting as an on-off redox switch, by which SERCA1 enzymatic activity is turned on and off according to the redox potential of the medium.

It is difficult to compare the time course of fatigue development reported here with the ones published by other authors that have used different stimulation protocols, muscle types and species to produce fatigue, (Allen et al. 2008; Perreault et al. 1993; Matsunaga et al. 2003, 2007; Duhamel et al. 2007). Similar studies, as the ones described here, have been done after exercising the subjects to exhaustion (Matsunaga et al. 2003, 2007 and Duhamel et al. 2007). They have also reported that oxidative changes that do not involve cystein residues appear when the subjects have been exercised to exhaustion, which also implies the development of extreme and prolonged fatigue. However, Matsunaga et al. (2003, 2007) did not find changes in Vicinal-thiol groups as reported here. The difference in results may be due to the fact that their experiments were done on different types of muscles other than the ones we used, which were gatsrocnemius and vastus lateralis (mainly slow type) against tibiales anterior (mainly fast type). They also did the experiments with microsomes, without further light SR membrane isolation. Microsomes from slow skeletal muscle often have myoglobin contamination and therefore, transition metals, that are needed to initiate the formation of O_2 radicals and protein carbonylation. In the case of highly enriched light SR, where more

than 85% of membrane proteins is SERCA1, as we used here, there are no transition metals that could initiate protein carbonylation. Although Matsunaga et al. (2003, 2007) showed no evidence of Cys involvement in muscle fatigue through the reduction by DTT dithiol that reduced monothiois but not vicinal thiois (Gitler et al. 1997). The authors did not explore the redox state of vicinal- thiol groups as was done in the present study.

Our studies probably triggered production of reactive oxygen species in excess of that occurring in normal exercise due to the type of stimulus procedures used. However, the Ca^{2+} pump changes that we describe here are relevant since: a) other authors have also observed this occurrence of SR Ca^{2+} pump alterations and oxidation of in exercising animals (Luckin et al. 1991) and humans (Duhamel et al. 2007) and b) our findings may be of high and relevant importance in pathological conditions or extreme exercise where there probably is an excessive production of oxidants.

Acknowledgments We thank Dr. Clara Franzini-Amstrong from the University of Pennsylvania for her suggestions to this paper and Anne O. Nourse from the University of Maryland for valuable and helpful suggestions in the editing and preparation of the manuscript. This work was supported by grant DGAPA-IN227106, Dirección General del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México and CONACYT-24792 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología to (A.O).

References

- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H (2008) Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* 88:237–332
- Banhegyi G, Lusini L, Puskas F, Rossi R, Fulceri R, Braun L, Mile V, Di Simplicio P, Mandl J, Benedetti A (1999) Preferential transport of glutathione versus glutathione disulfide in rat liver microsomal vesicles. *J Biol Chem* 274(18):12213–12216
- Becker V, González-Serratos H, Álvarez R, Bärenmann M, Irles C, Ortega A (2004) Effect of endurance exercise on the Ca^{2+} pumps from transverse tubule and sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J Appl Physiol* 97(2):467–474
- Belia S, Pietrangelo T, Fulle S, Menchetti G, Cecchini E, Felaco M, Vecchiet J, Fano G (1998) Sodium nitroprusside, a NO donor, modifies Ca^{2+} transport and mechanical properties in frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 19(8):865–876
- Briggs FN, Lee KF, Feher JJ, Wechsler AS, Ohlendieck K, Campbell K (1990) Ca-ATPase isozyme expression in sarcoplasmic reticulum is altered by chronic stimulation of skeletal muscle. *FEBS Lett* 259(2):269–272
- Brown H, Gonzalez-Serratos H, Huxley AF (1984) Sarcomere and filament lengths in passive muscle fibres with wavy myofibrils. *J Musc Res Cell Motil* 5:293–314
- Cumming RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH, Schubert D (2004) Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* 279(21):21749–21758
- Daiho T, Yamasaki K, Saino T, Kanidochi M, Satoh K, Iizuka H, Suzuki H (2001) Mutations of either or both Cys876 and Cys888 residues of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase result in a complete loss of Ca^{2+} transport activity without a loss of Ca^{2+} -dependent ATPase activity. Role of the CYS876–CYS888 disulfide bond. *J Biol Chem* 276(35):32771–32778
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47–95
- Duhamel TA, Stewart RD, Tupling AR, Ouyang J, Green HJ (2007) Muscle sarcoplasmic reticulum calcium regulation in humans during consecutive days of exercise recovery. *J Appl Physiol* 103(40):1212–1220
- Essig DA, Nosek TM (1997) Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol* 22(5):409–428
- Eu JP, Hare JM, Hess DT, Skaf M, Sun J, Cardenas-Navina I, Sun QA, Dewhirst M, Meissner G, Stamler JS (2003) Concerted regulation of skeletal muscle contractility by oxygen tension and endogenous nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25):15229–15234
- Gitler C, Mogyoros M, Kalef E (1994) Labeling of protein vicinal dithiols: role of protein-S2 to protein-(SH)₂ conversion in metabolic regulation and oxidative stress. *Methods Enzymol* 233:403–415
- Gitler C, Zarmi B, Kalef E (1997) General method to identify and enrich vicinal thiol proteins present in intact cells in the oxidized, disulfide state. *Anal Biochem* 252:48–55
- Heilmann C, Pette D (1979) Molecular transformations in sarcoplasmic reticulum of fast-twitch muscle by electro-stimulation. *Eur J Biochem* 93(3):437–446
- Hua S, Inesi G (1997) Lys515–Lys492 cross-linking by DIDS interferes with substrate utilization by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biophys J* 73(4):2149–2155
- Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257:1496–1502
- Kalia J, Raines RT (2006) Reactivity of intein thioesters: appending a functional group to a protein. *Chem Bio Chem* 7:1375–1383
- Lamb GD, Posterino GS (2003) Effects of oxidation and reduction on contractile function in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 546:149–163
- Lanzetta PA, Alvarez LJ, Einach PS, Candia OA (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100(1):95–97
- Lepock JR, Rodahl AM, Zhang C, Heynen ML, Waters B, Cheng KH (1990) Thermal denaturation of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 29(3):681–689
- Luckin KA, Favero TG, Klug GA (1991) Prolonged exercise induces structural changes in SR Ca^{2+} -ATPase of rat muscle. *Biochem Med Metab Biol* 46(3):391–405
- Mac Lennan DH, Rice WJ, Green NM (1997) The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem* 272:28815–28818
- Matsunaga S, Inashima S, Yamada T, Watanabe H, Hazama T, Wada M (2003) Oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflüger Arch-Eur J Physiol* 446:394–399
- Matsunaga S, Mihima T, Yamada T, Inashima S, Wada M (2007) Alterations in in vitro function and protein oxidation of rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase during recovery from high-intensity exercise. *Exp Physiol* 93:426–433
- Mcintosh DB, Woolley DG, MacLennan DH, Vilsen B, Andersen JP (1999) Interaction of nucleotides with Asp (351) and the conserved phosphorylation loop of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* 274:25227–25236
- O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst JC (1996) Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol* 81(3):1197–1206

- Ortega A, Lepock JR (1995) Use of thermal analysis to distinguish magnesium and calcium stimulated ATPase activity in isolated transverse tubules from skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta* 1233(1):7–13
- Ortega A, Gonzalez-Serratos H, Lepock JR (1997) Effect of organic Ca^{2+} channel blocker D-600 on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in skeletal muscle. *Am J Physiol* 272(Cell Physiol):C310–C317
- Ortega A, Becker VM, Alvarez R, Lepock JR, González-Serratos H (2000) Interaction of D-600 with the transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Am J Physiol* 279:C166–C172
- Ortega A, Alvarez R, Perez F, Jimenez A, Gutierrez J, Vazquez P (2004) Redox regulation of vicinal thiol groups of the SERCA1 participates in muscle fatigue. *J Mus Res Cell Motil* 25:597–598
- Perreault C, Gonzalez-Seratos H, Letwin E, Sun X, Franzini-Armstrong C, Morgan P (1993) Alterations in contractility and intracellular Ca^{2+} transients in isolated bundles of skeletal muscle fibers from rats with chronic heart failure. *Circulation Res* 73(2):405–412
- Pessah IN, Feng W (2000) Functional role of hyperreactive sulfhydryl moieties within the ryanodine receptor complex. *Antioxid Redox Signal* 2(1):17–25
- Reid MB (2001) Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc* 33(3):371–376
- Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Rev* 81(1):209–237
- Sun J, Xin C, Eu JP, Stamler JS, Meissner G (2001) Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11158–11162
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405:647–655
- Viner RI, Huhmer AF, Bigelow DJ, Schoneich C (1996) The oxidative inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by peroxynitrite. *Free Radic Res* 24:243–259
- Voss AA, Lango J, Ernst-Russel M, Morin D, Pessah IN (2004) Identification of hyperreactive cysteines within ryanodine receptor type 1 by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279:34514–34520
- Winterbourn CC (2003) Radical scavaging by thiols: implications for redox signaling and antioxidant effect. In: Gitler C, Danon A (eds) *Cellular implications of redox signalling*. Imperial College Press, London
- Xia R, Stangler T, Abramson JJ (2000) Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *J Biol Chem* 275(47):36556–36561
- Xu KY, Zweier JL, Becker LC (1997) Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res* 80(1):76–81
- Zhang JS, Kraus WE, Truskey GA (2004) Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(2):C292–C299