

Propuesta de práctica para estudiantes de Biología Celular en grados de Ciencias de la Salud

Medida de Ca^{2+} mitocondrial mediante bioluminiscencia con aequorina recombinante (mitAEQ)

1 Fundamento celular y molecular

La mitocondria es un orgánulo celular que participa en diferentes procesos fisiológicos tales como la apoptosis. En particular, durante la apoptosis tiene lugar una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$), fenómeno que actúa como una señal clave en la activación de rutas de muerte celular programada. Este incremento en la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial puede desencadenar la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), la pérdida del potencial de membrana y la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c.

Más allá de la apoptosis, el Ca^{2+} mitocondrial desempeña un papel central en la regulación del metabolismo celular, ya que modula la actividad de diversas enzimas del ciclo de Krebs y, por tanto, la producción de ATP. La captación de Ca^{2+} por la mitocondria depende fundamentalmente del uniportador mitocondrial de calcio (MCU) y está estrechamente acoplada a la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico, lo que genera microdominios de alta concentración de Ca^{2+} en regiones de contacto entre ambos orgánulos.

Debido a la importancia de estos procesos, la medición precisa de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en células vivas constituye una herramienta fundamental en biología celular. Sin embargo, las elevadas concentraciones de Ca^{2+} que se alcanzan en la mitocondria (en el rango micromolar a milimolar) requieren el uso de sensores específicos con baja afinidad y alta selectividad subcelular. En este sentido, cobra una gran relevancia la Aequorina (AEQ).

La AEQ es una fotoproteína procedente de la medusa *Aequorea victoria* la cual emite luz azul en presencia de Ca^{2+} sin necesidad de ser iluminada. En concreto, esto es posible debido a que esta proteína presenta tres dominios de unión a Ca^{2+} , EF-hand, lo que le confiere su alta sensibilidad por este catión. Además, gracias a diferentes técnicas de ingeniería genética, ha sido posible el desarrollo de AEQ recombinante con secuencias de localización. Como resultado, se tiene una sonda sensible a calcio que puede ser dirigida a un compartimento celular de interés.

En este contexto, la aequorina recombinante dirigida a la mitocondria (mitAEQ) representa una herramienta altamente adecuada, ya que permite la cuantificación de Ca^{2+} mediante bioluminiscencia sin necesidad de excitación externa, lo que evita problemas de fototoxicidad y autofluorescencia.

En cuanto a la emisión de luz por parte de esta sonda, tiene lugar cuando el Ca^{2+} se une a esta proteína una vez ha sido reconstituida a su forma activa. Durante la reconstitución, la apoaequorina expresada en las células se une por ataque peroxidativo a su cofactor, la celenterazina. Puesto que este cofactor es muy lipofílico, es capaz de atravesar las membranas celulares con facilidad. Por lo tanto, esta proteína, al unir calcio, oxida la celenteracina a celenteramida, de tal forma que en dicha reacción se libera un fotón de longitud de onda 460 nm, lo que se conoce como bioluminiscencia. Además, puesto que la AEQ tiene 3 dominios de unión a calcio, y que esta proteína ejerce su función cuando une calcio, la intensidad o cantidad de fotones emitidos será proporcional a la concentración de Ca^{2+} . Una vez ha tenido lugar la reacción, la unión de la celenteracina a la AEQ tiene una cinética muy baja, por lo que, en cierto modo, la AEQ útil se "consume", hecho que permite cuantificar la concentración de Ca^{2+} en el compartimento hacia el que haya sido dirigida mediante su secuencia de localización.

Por lo tanto, resulta evidente que el uso de AEQ dirigidas a orgánulos como la mitocondria facilita el análisis de microdominios de Ca^{2+} y su papel en procesos clave como la bioenergética, la apoptosis, la proliferación celular y la fisiopatología de enfermedades como el cáncer o las patologías neurodegenerativas.

2 Protocolo de medida de Ca^{2+} mitocondrial

Mediante la realización del siguiente protocolo, se espera que el alumno sea capaz de cuantificar la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$). Dado que la mitocondria presenta concentraciones elevadas de Ca^{2+} , se emplea una variante de baja afinidad (mutAEQ).

A continuación, en el presente protocolo se describe el procedimiento para la medición de Ca^{2+} mitocondrial en células vivas utilizando AEQ recombinante, así como los fundamentos experimentales y analíticos necesarios para la correcta interpretación de los resultados.

2.1 Materiales

- Células en cultivo
- Plásmido mitAEQmut (\pm GFP)
- Coelenterazina
- Digitonina
- Soluciones tampón Ca^{2+} /EGTA
- Microscopio invertido con sistema de bioluminiscencia
- Cámara de fotones (Hamamatsu)
- Sistema de perfusión

2.2 Procedimiento

1. Transfectar las células con mitAEQmut \pm GFP mediante nucleofección y cultivar durante 24–48 h.
2. Reconstituir la AEQ. Para ello, las células se incuban en MEX suplementado con 1 μM de celenteracina nativa, durante 3 h en oscuridad a 37 °C.
3. Colocar las células en la cámara de perfusión de un microscopio invertido termostatizada a 37 °C.
4. Perfundir las células (localizadas en la cámara de perfusión) con MEC a razón de 5 mL/min, precalentado a 37 °C en presencia de los estímulos de interés.
5. Registrar la emisión lumínica basal y tras estímulo (L) en cuentas por segundo (cps).
6. Tras cada experimento, se perfundir digitonina (100 μM) en MEC con Ca^{2+} (10 mM) para liberar los fotones restantes (luz total que puede emitir, L_{max}).

2.3 Análisis de datos

Las imágenes de bioluminiscencia se capturan con una cámara contadora de fotones, como la Hamamatsu VIM, acoplada a un procesador de imagen, como Argus-20. Estos fotones se han de integrar en un periodo de tiempo (suele usarse 10 segundos). En cuanto a los fotones emitidos por cada célula en cada imagen, estos se cuantifican mediante un *software* especializado, como Aquacosmos 2.6. de Hamamatsu.

Para la cuantificación, esta se hace como el porcentaje de emisión de fotoluminiscencia entre las cuentas por segundos totales y se dividieron por el periodo de integración (L/L_{TOTAL} en s^{-1}). Los valores de emisión menores de 4 c.p.s. se eliminan por considerarse ruido.

Finalmente, los datos se expresan como la relación L/L_{max} . Cabe destacar que esta señal es no lineal y depende de parámetros como la afinidad y la cooperatividad.

Además, aunque está fuera del objetivo de esta práctica, cabe destacar que este cociente puede transformarse en concentración de Ca^{2+} mediante modelos matemáticos basados en la cinética de unión Ca^{2+} -aequorina.

2.4 Interpretación

Los resultados reflejan la dinámica de Ca^{2+} mitocondrial, incluyendo la captación, liberación y regulación intracelular. Parámetros como el pico máximo, el área bajo la curva y la cinética permiten caracterizar la función mitocondrial.

3 Propósito de la práctica en el campo de la biología celular

En esta práctica hemos aplicado los siguientes conceptos relacionados con la biología celular:

- Mitocondria como orgánulo tampón de calcio y papel fundamental en diferentes procesos como la apoptosis.
- Importancia de las secuencias de localización subcelular de proteínas.