



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización del transporte de calcio intracelular en
Arabidopsis thaliana.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

MARÍA CASANDRA LÓPEZ AQUINO



CDMX, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Profesora: Luz Del Carmen Castellanos Román

VOCAL: Profesor: José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Profesor: Manuel Gutiérrez Aguilar

1er. SUPLENTE: Profesor: Alfonso Rafael Salgado Aguayo

2do. SUPLENTE: Profesor: Javier Axosco Marín

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 115, Departamento de Bioquímica

Edificio E, Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México,

Coyoacán, CDMX. C.P. 04510

México

María Casandra López Aquino
(Sustentante)

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
(Asesor)

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por las instalaciones y recursos brindados que permitieron mi formación profesional y personal.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento para llevar a cabo la presente tesis mediante el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA203419 “Regulación genética de la transición de la permeabilidad mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*”.

Al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” por la beca otorgada.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por proporcionar materiales vegetales y reactivos necesarios.

A los miembros del honorable jurado: Dra. Luz del Carmen Castellanos Román, Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar por sus valiosas observaciones y sugerencias en la culminación de la presente tesis.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Los iones calcio en la fisiología vegetal	1
1.2 El transporte de calcio a través del xilema	2
1.3 El calcio y sus funciones en la célula	4
1.4 Transportadores de calcio en la célula vegetal	5
1.5 La mitocondria: estructura y actividad de transporte de calcio	6
1.6 El complejo Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU)	9
1.7 Rojo de rutenio: Características y actividad biológica	12
1.8 <i>Arabidopsis thaliana</i> como un modelo de estudio	13
2. Hipótesis	14
3. Objetivo general	15
3.1 Objetivos particulares	15
4. Metodología y procedimiento experimental	15
4.1 Material vegetal	15
4.2 Aislamiento de protoplastos	16
4.3 Medición del transporte de calcio intracelular por fluorimetría	17
4.4 Confirmación de la delección de <i>micu-1</i>	19

4.5 Reactivos, soluciones, materiales y equipos utilizados en el aislamiento, medición de transporte de calcio y PCR	20
4.5.1 Solución enzimática	20
4.5.2 Solución W5	21
4.5.3 Amortiguador de lavado de protoplastos	21
4.5.4 Amortiguador de reacción CRC	21
4.5.5 Reacción de PCR	22
4.5.6 Materiales	22
4.5.7 Equipos	23
5. Resultados	23
5.1 Caracterización fenotípica y genotípica entre cepas	23
5.2 Aislamiento y permeabilización de protoplastos	25
5.3 Medición del transporte de Ca ²⁺ en protoplastos permeabilizados	27
6. Discusión	28
7. Conclusiones	32
8. Perspectivas	32
9. Bibliografía	33
10. Anexos	42

Definiciones de abreviaturas del presente texto

$\Delta\Psi$: Potencial de membrana mitocondrial

μL : Microlitros

μM : Micromolar, unidad de concentración ($\mu\text{mol/L}$)

ADP: Adenosin difosfato

ATP: Trifosfato de adenosina

c.p.b: Cuanto baste para

Ca²⁺: Calcio libre

cADPR: ADP ribosa cíclica

CaM: Calmodulina

Col-0: Cepa silvestre (Columbia ecotipo)

CRC: Capacidad de retención de calcio

DIME: Dominio de interacción en el anillo D de MCU que involucra las argininas 440 y 443

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleico nucleótido trifosfato

EMRE: Proteína transmembranal que ancla a MICU1 al MCU mediante una cola de poliaspartato

GCaMP3: Proteína fluorescente sensora de Ca²⁺

IP₃: Inositol Trifosfato

IP₆: Inositol Hexafosfato

kDa: Unidad de masa molecular equivalente a 1.000 daltons

M: molar, unidad de concentración (mol/L)

MCU: Uniportador de calcio mitocondrial

Medio MS: Medio Murashige-Skoog para germinación de semillas

MES: Ácido morfolino etanosulfónico

MICU: Proteína para la captación de Ca^{2+} (Hay 3 isoformas reportadas, MICU1, MICU2 y MICU3)

***micu-1*:** Gen que codifica para la proteína MICU1

MICU1-KO: Cepa mutante carente de *micu-1*

mM: Milimolar, unidad de concentración (mmol/L)

Mn²⁺: Manganeseo libre

NAADP: Ácido nicotínico-adenina

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidruro

nm: Nanómetro

nM: Nanomolar, unidad de concentración (nanomol/L)

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pi: Fosfato

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

Ru360: Complejo de amonio de rutenio dinuclear

RuRed: Rojo de Rutenio

s: Segundos

Taq: Polimerasa termoestable producida por la bacteria *Thermus aquaticus*

WT: Wild Type

Índice de Figuras y Tablas

Figura	Contenido	Página
A	Esquema del transporte de solutos por la vía apoplástica y simplástica.	3
B	Transporte de Ca ²⁺ a través del xilema.	3
C	Modelo de red mediada por el complejo Ca ²⁺ -CaM en plantas.	5
D	Transportadores de Ca ²⁺ en la célula vegetal.	6
E	Cadena respiratoria y sus inhibidores.	8
F	Estructura del MCU.	10
G	Árbol filogenético de homólogos de especies vegetales representativas a proteínas MICU humanas.	11
H	Sitio de interacción del RuRed.	13
I	Niveles de transcrito del gen <i>micu-1</i> en <i>A. thaliana</i> .	14
J	Germinación de las dos diferentes cepas de <i>A. thaliana</i> .	16
K	Diagrama de aislamiento de protoplastos.	17
L	Espectro de fluorescencia de Calcium green-5N.	18
M	Medición del transporte de Ca ²⁺ intracelular.	19
Tabla 1	Condiciones de la PCR.	20
Tabla 2	Concentración de reactivos para la PCR.	22
1	Diferencias fenotípicas entre la cepa silvestre Col-0 y la cepa mutante MICU1-KO.	24
2	Genotipificación de las cepas WT (Col-0) y mutante carente de <i>micu-1</i> (MICU1-KO).	25

3	Protoplastos aislados por el método tradicional.	26
4	Tinción de protoplastos con Mitotracker.	26
5	Transporte de Ca ²⁺ intracelular en protoplastos permeabilizados.	28
6	El transporte de calcio intracelular no es sensible a concentraciones bajas del inhibidor RuRed.	31
ANEXOS		
7	Ensayos totales de transporte de Ca ²⁺ intracelular.	43
Artículo	A simple method for mitochondrial respiration and calcium uptake assessment in pollen tubes.	44

Resumen

Los iones calcio constituyen uno de los principales mensajeros intracelulares en plantas. En condiciones de homeostasis, los niveles citoplasmáticos son generalmente bajos y estables. Dentro de las células el calcio puede ser internalizado en organelos como el retículo endoplásmico, los cloroplastos y las mitocondrias. En estudios recientes se ha identificado a un uniportador de calcio mitocondrial (MCU) en la planta *Arabidopsis thaliana*. Se han descrito varias subunidades proteicas que conforman al MCU con funciones específicas en diferentes especies. Entre estas subunidades proteicas, hay tres isoformas de la proteína esencial para la captación de Ca^{2+} (MICU), las cuales tienen un papel importante en el transporte de Ca^{2+} . El ácido ribonucleico mensajero (RNA mensajero) de MCU se detecta predominantemente en raíces, flores y granos de polen de *A. thaliana*, mientras que en hojas la señal es menor; sin embargo, el RNA mensajero de *micu-1* es predominante en hojas. Actualmente se ha demostrado que los cloroplastos también presentan un MCU en protoplastos de mesófilo de *A. thaliana*. En la presente tesis se buscó caracterizar bioquímicamente el sistema de transporte intracelular de calcio en protoplastos de hojas de *A. thaliana*, para ello se utilizaron protoplastos permeabilizados de una cepa mutante carente de *micu-1* (MICU1-KO) y la cepa silvestre (Col-0) como control. Los resultados sugieren la existencia de un MCU sensible a rojo de rutenio en protoplastos permeabilizados de hojas de *A. thaliana*. En plantas carentes de *micu-1*, la velocidad de transporte de calcio aumentó, lo que sugiere que su función es similar a la de su ortólogo en mamíferos. Finalmente, la carencia de *micu-1* ocasiona cambios en la expresión

como posible mecanismo compensatorio. Con ésto se concluyó que el transporte Ca^{2+} intracelular efectivamente depende del MCU y; por lo tanto, la eliminación genética de la subunidad reguladora MICU1 altera la cinética del transporte de Ca^{2+} .

1. Introducción

1.1 Los iones calcio en la fisiología vegetal

Los iones calcio constituyen uno de los principales mensajeros intracelulares en plantas; regulan una gran cantidad de respuestas al estrés abiótico, así como la apertura estomática, la autoincompatibilidad durante la fertilización, las interacciones con microorganismos patógenos, simbióticos y se ha comprobado su participación en el ciclo circadiano [Dodd et al., 2010]. El calcio tiene un papel fundamental en el desarrollo de tubos polínicos de algunas plantas que producen flores (angiospermas) y pelos radiculares. El papel del calcio en el desarrollo de tubos polínicos se demostró experimentalmente adicionando el ionóforo de calcio A23187 a tubos polínicos en solución, este ionóforo cataliza el antiporte de calcio por dos protones [Reiss y Herth, 1979].

En plantas, la concentración de Ca^{2+} libre es de $0.2 \mu\text{M}$ [Buchanan, 2000], dicha concentración es esencial en todas las células para prevenir la precipitación de fosfatos y mantener un estado de homeostasis.

Las plantas obtienen calcio del suelo y pueden clasificarse en calcifugas y calcicoles, las primeras se encuentran en suelos ácidos con bajo contenido de Ca^{2+} y las calcicoles se encuentran en suelos calcáreos; a pesar del tipo de suelo en donde crezcan, existen mecanismos que permiten que las plantas mantengan la concentración óptima de Ca^{2+} citosólico [White y Broadley, 2003]. Un ejemplo claro es el de plantas que sobreexpresan transportadores de Ca^{2+} en el tonoplasto para regular los niveles de Ca^{2+} citoplasmático [Hirschi, 2001].

El Ca^{2+} juega un papel importante en el control de la estructura y función de la membrana. Una deficiencia de calcio provoca que la membrana celular sea más permeable y la célula pierda turgencia [Burstrom, 1968; Wyn Jones y Lunt, 1967]. A pesar de que la deficiencia de este ión es rara en la naturaleza, cuando ocurre se presentan defectos como: el desarrollo deficiente de la raíz, la necrosis y el rizado de las hojas, la pudrición del extremo de la flor, el hoyo amargo y las grietas en el fruto. Asimismo, el exceso de Ca^{2+} resulta en citotoxicidad y un ejemplo es el desarrollo de la “mancha dorada” en frutas [Simon, 1978; White y Broadley, 2003].

1.2 El transporte de calcio a través del xilema

El calcio es absorbido por las raíces en forma de ión Ca^{2+} para posteriormente ingresar a la célula mediante transportadores permeables a Ca^{2+} . Una vez dentro, es impulsado por corrientes xilemáticas a todas las células de la planta. El transporte de agua y solutos célula a célula, se da mediante el funcionamiento paralelo de las vías simplástica y apoplástica. La primera es a través de las membranas celulares, permite controlar la velocidad de transporte y selectividad del ión calcio al cuerpo de la planta [White, 2001]; la segunda es mediante la pared celular y el plasmodesmo, es menos selectiva a cationes divalentes por lo cual permite que el calcio se transporte al xilema sin un impacto en la concentración del calcio citosólico [White, 1998; White, 2001] (*Figura A*).

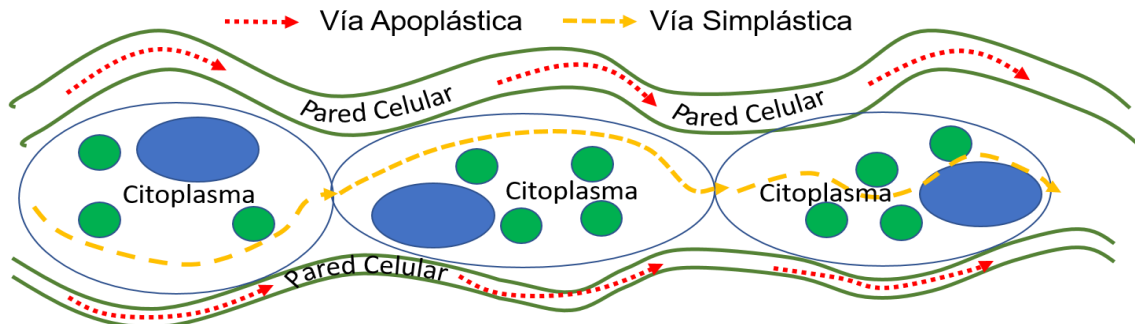


Figura A. Esquema del transporte de solutos por la vía apoplástica y simplástica [Gonzalez-Vizueth, 2019].

Un claro ejemplo del transporte de Ca^{2+} a través de estas vías es el recientemente descrito por el grupo de Gilroy [Toyota et al., 2018]. En este estudio, los autores generaron plantas transgénicas que sobreexpresan la proteína fluorescente sensora de calcio GCaMP3 en hojas de *A. thaliana*. Los autores observaron cambios sustanciales en la concentración citosólica de Ca^{2+} en respuesta al daño celular activado por la señalización de los receptores de glutamato (*Figura B*).

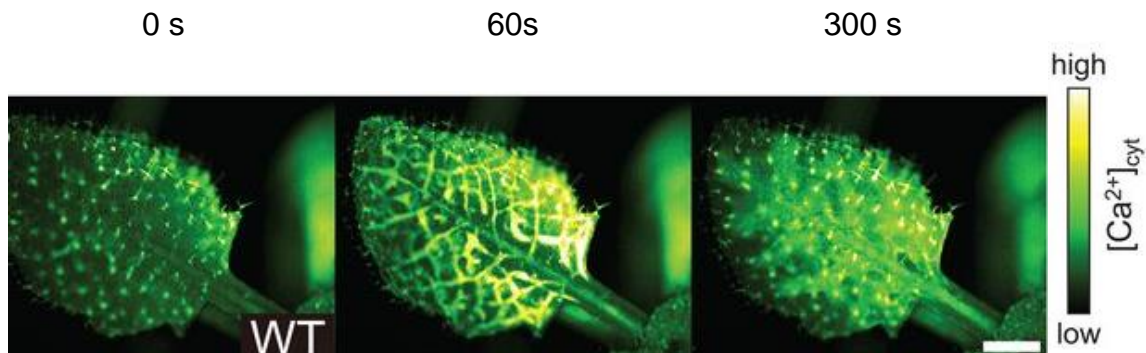


Figura B: Transporte de Ca^{2+} a través del xilema. La fluorescencia indica un aumento del Ca^{2+} citosólico en la vasculatura de la hoja no dañada después de un corte en una hoja adyacente [Toyota et al., 2018].

Estos resultados sugieren que el calcio es un potente activador de señales en respuesta a estrés con probables efectos en la remodelación metabólica de *A. thaliana* y de plantas en general. Sin embargo, el papel del calcio intracelular se ha

estudiado relativamente poco y sus efectos en la célula recientemente se han comenzado a comprender.

1.3 El calcio y sus funciones en la célula

Muchas funciones en la célula dependen de cambios transitorios en la concentración de calcio citosólico libre. El calcio participa en la división y extensión celular, influye en la compartimentalización y el equilibrio iónico de la célula, modula la acción de las hormonas, estabiliza la pared y la membrana celular [Marschner, 1986].

En los vertebrados, el calcio se encuentra asociado a procesos de contracción muscular, división celular, secreción, fecundación, metabolismo, transcripción y muerte celular [Karp, 2011; Somlyo, 1984].

Dentro de las células, el calcio puede ser internalizado en organelos como el retículo endoplásmico, los cloroplastos y las mitocondrias. A bajas concentraciones, el calcio puede activar enzimas del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones [He et al., 2015; Loro et al., 2016]. Pero cuando los niveles de calcio aumentan considerablemente, éstos pueden comprometer la función celular y desencadenar la apoptosis [Uribe et al., 2011].

La calmodulina es generalmente reconocida como el mediador universal de calcio que actúa como segundo mensajero [Klee et al., 1986]. Es una de las proteínas de unión a Ca^{2+} más conservada en eucariontes y sin actividad catalítica [Yang y Poovaiah, 2003]. Las secuencias de calmodulina en plantas y animales difieren de 12 a 13 aminoácidos y cuentan con 4 sitios de unión a calcio [Buchanan, 2000]. El complejo Ca^{2+} -CaM activado modula la actividad de muchas proteínas

que finalmente generan respuestas fisiológicas, como crecimiento o diferenciación celular, tolerancia al estrés o detención del crecimiento y muerte celular (*Figura C*).

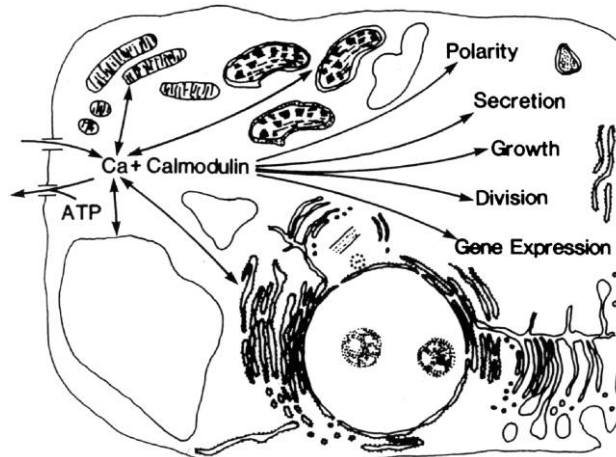


Figura C: Modelo de red mediada por el complejo Ca^{2+} -CaM en plantas. Las proteínas moduladas por el complejo activado Ca^{2+} -CaM incluyen factores de transcripción, proteínas cinasas, enzimas metabólicas, canales iónicos, transportadores y proteínas del citoesqueleto que generan finalmente respuestas fisiológicas [Trewavas, 1986; Yang y Poovaiah, 2003].

1.4 Transportadores de calcio en la célula vegetal

Los canales embebidos en las biomembranas vegetales, son las estructuras más importantes que controlan el movimiento de los iones de calcio a través de la membrana plasmática. Estos canales forman poros diminutos a través de los cuales los iones como el Ca^{2+} , pueden ser transportados en condiciones apropiadas. La estructura molecular de estos canales no sólo determina qué iones pueden pasar, es decir, su "selectividad iónica", sino también la cinética de apertura y cierre de los canales dependientes del potencial de membrana y de su activación con ATP y otros moduladores [Klee et al.,1986]. Su función es mantener reguladas las concentraciones de calcio en el citosol y los diferentes comportamientos

subcelulares. Dentro de los transportadores de Ca^{2+} en la célula, se encuentran bombas, intercambiadores o canales específicos a este catión (*Figura D*).

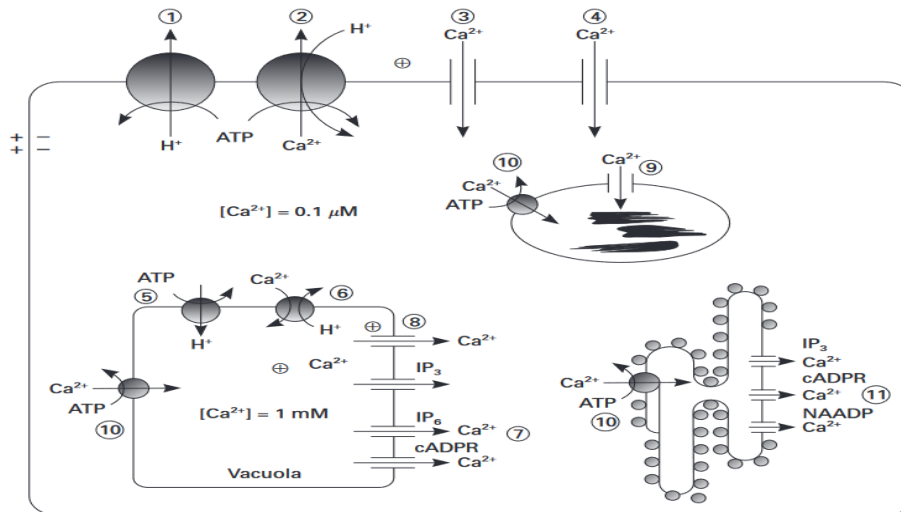


Figura D: Transportadores de Ca^{2+} en la célula vegetal. 1) H^+ -ATPasa; 2) Ca^{2+} - H^+ ATPasa del plasmalema; 3) y 4) Distintos tipos de canales de Ca^{2+} del plasmalema; 5) H^+ -ATPasa de la vacuola. 6) Antiporte Ca^{2+} - H^+ del tonoplasto; 7) y 8) Canales de Ca^{2+} del tonoplasto activados por voltaje, IP_3 , IP_6 y cADPR respectivamente; 9) Canal de Ca^{2+} en el cloroplasto; 10) Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplasmático, vacuola y cloroplasto; 11) Canales de Ca^{2+} del retículo endoplasmático activados por IP_3 , cADPR y NAADP respectivamente [Azcón, 2000].

1.5 La mitocondria: estructura y actividad de transporte de calcio

Las mitocondrias son organelos que cuentan con su propio material genético. Están constituidas por una membrana interna que contiene las denominadas crestas mitocondriales y una membrana externa con porinas y canales aniónicos dependientes de voltaje que permiten el constante flujo de moléculas menores a 5 kDa [Choudhary et al., 2010]. Las mitocondrias pueden presentarse en formas alargadas, ovas o cilíndricas con tamaños que oscilan entre 1 y 4 μm [Karp, 2011]. Se ha detectado que la forma y posición de las mitocondrias pueden modificarse

mediante procesos de fusión, fisión e interacciones con el citoesqueleto [Frey y Mannella, 2000]. En plantas, las mitocondrias se asocian a los cloroplastos probablemente mediante interacciones fisicoquímicas dependientes del potencial de membrana, el cual es negativo en la matriz de mitocondrias energizadas y positivo en el lumen de los tilacoides [observaciones no reportadas]. Esto bien podría ser beneficioso para ambos organelos tanto en condiciones de luz, donde los cloroplastos podrían abastecer a las mitocondrias de esqueletos de carbono necesarios para procesos de biosíntesis, mientras que en condiciones de obscuridad las mitocondrias podrían constituir las fuentes energéticas para procesos de biogénesis no dependiente de luz en cloroplastos.

En la matriz mitocondrial se pueden encontrar a un gran número de enzimas e intermediarios implicados en el metabolismo energético, cuya finalidad principal es proveer energía a la célula. En la matriz y en la membrana interna de las mitocondrias hay complejos de la cadena respiratoria y enzimas que catalizan la oxidación de nutrientes (fosforilación oxidativa) y utilizan el O_2 como aceptor final de electrones para generar ATP [Nicholls y Ferguson, 2013] (*Figura E*). Como anteriormente se mencionó, las concentraciones bajas de Ca^{2+} pueden activar enzimas del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones.

La correcta función mitocondrial es importante en la regulación del calcio citosólico. Debido a la enorme diferencia entre la concentración de Ca^{2+} citosólico ($0.1 \mu\text{M}$) y el del medio exterior o compartimentos de almacenamiento (0.1 a 10 mM), la célula debe regular el flujo de este ión. Algunos estudios revelaron que ciertos orgánulos como las mitocondrias, tienen la capacidad de transportar grandes cantidades de Ca^{2+} para mantener el estado de homeostasis celular. Recientemente investigadores han identificado a la proteína denominada MCU como responsable del transporte de calcio mitocondrial [Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011; Teardo et al., 2019].

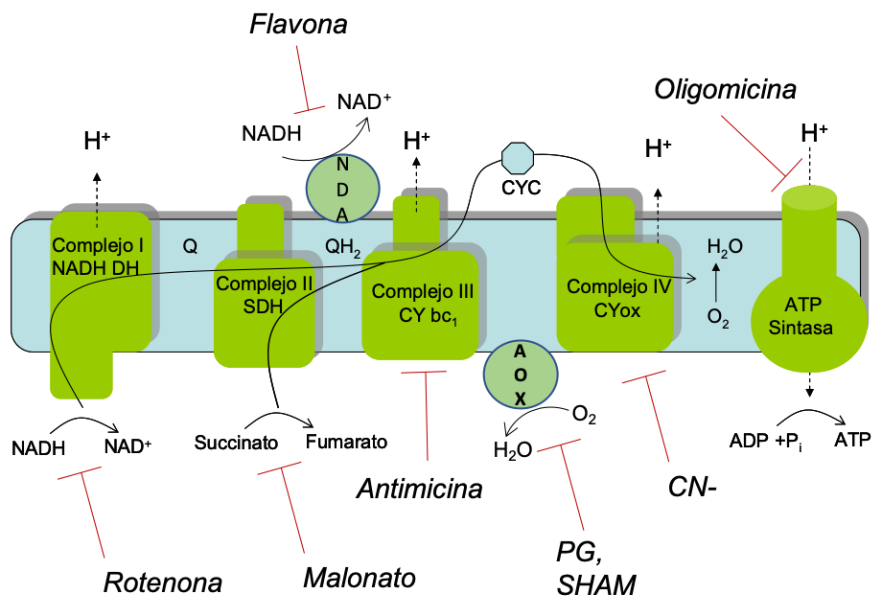


Figura E: Cadena respiratoria y sus inhibidores. La cadena respiratoria está formada por 4 complejos proteicos: los Complejos I, II, III y IV, embebidos en la membrana mitocondrial interna; 2 complejos accesorios: NADH deshidrogenasas y oxidasas alternas; 2 moléculas acarreadoras móviles: la Coenzima Q o Ubiquinona y el citocromo C que es una proteína periférica y la ATP sintasa que es el complejo V, cuya función es fosforilar al ADP para generar ATP [Ortiz-Jiménez, 2019].

1.6 El complejo Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU)

El MCU es un complejo de varias subunidades encargado del uniporte de Ca^{2+} encontrado en la membrana interna mitocondrial de mamíferos y plantas. Recientemente en el laboratorio se ha identificado y descrito la presencia de un probable uniportador de calcio mitocondrial sensible a rojo de rutenio en tubos polínicos de *Nicotiana tabacum* [Ortiz-Jiménez et al., 2019] **(Anexo)**. Tanto en células de mamíferos como vegetales, la actividad de este complejo está regulada por subunidades proteicas que participan en la regulación del Ca^{2+} .

Actualmente el estudio de las subunidades se ha centrado en MICU1 y MICU2, las cuales funcionan como sensores específicos para Ca^{2+} y activan al MCU en diversas especies. En humanos la subunidad proteica MICU1 se ha relacionado con enfermedades neurológicas, musculares, cáncer de ovario, cardiopatía diabética y lesión por isquemia, también se ha visto implicada en la regeneración del hígado [Antony et al., 2016; Chakraborty et al., 2017; Ji et al., 2017; Lewis-Smith et al., 2016; Logan et al., 2014; Xue et al., 2017]. Otras subunidades que pueden formar el complejo MCU es MICU3, MCUb en mamíferos [Plovanich et al., 2013; Raffaello et al., 2013] y EMRE, una proteína transmembranal [Sancak et al., 2013] *(Figura F)*. La función, presencia y ensamblaje de las subunidades puede diferir entre especies; por ejemplo, los tripanosomas poseen adicionalmente dos parálogos de MCU (MCUc y MCUd), pero carecen de EMRE y MICU3. Además, en contraste con células animales, MCUb no es una subunidad dominante negativa sino una proteína

conductora de Ca^{2+} [Bertolini et al., 2019]. En *A. thaliana* sólo existe una subunidad de MICU la cual es conocida como AtMICU1 [Wagner et al., 2015] (Figuras F y G).

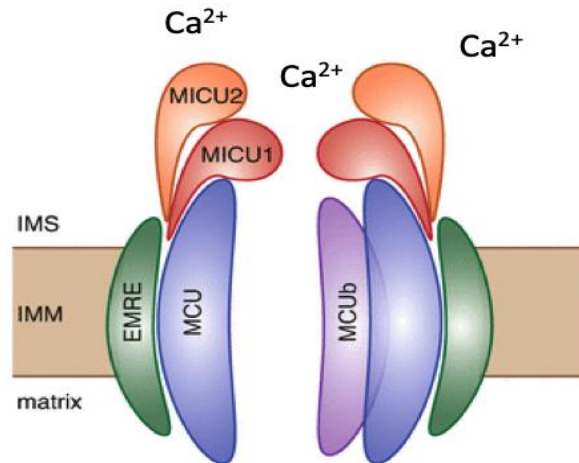


Figura F: Estructura del MCU. El MCU está compuesto por los ortólogos y parálogos de las proteínas MICU, MCUB y la proteína EMRE. Ésta es una representación de la posible conformación del MCU en mamíferos. [Adaptado de Paillard et al., 2018].

En hongos y en el pez cebra (*Danio rerio*) el MCU forma tetrámeros [Baradaran et al., 2018; Nguyen et al., 2018; Yoo et al., 2018], mientras que en *Caenorhabditis elegans* forma un pentámero [Oxenoid et al., 2016] aunque en estudios recientes se ha cuestionado esa estructura oligomérica proponiendo -mediante análisis de criomicroscopía electrónica- que MCU forma homotetrámeros [Nguyen et al., 2018]. Adicionalmente, el grupo de Mootha ha descrito un fenotipo de acumulación de Mn^{2+} en células de mamíferos carentes de la subunidad MICU1 y ha propuesto que esta subunidad constituye el filtro de selectividad para Ca^{2+} [Kamer et al., 2018]. En forma adicional se ha propuesto que la disfunción de MICU puede estar relacionada con patologías neurodegenerativas; sin embargo, los efectos de la delección de MICU sobre el transporte de Mn^{2+} en plantas no han sido estudiados.

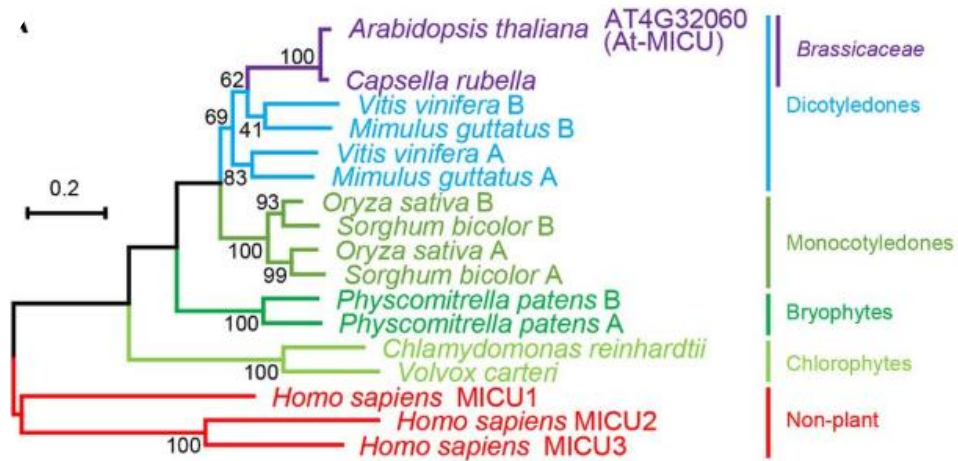


Figura G: Árbol filogenético de homólogos de especies vegetales representativas a proteínas MICU humanas. MICU puede conservarse a través de linajes evolutivos [Wagner et al., 2015].

Recientemente, el grupo de Elrod ha descrito cambios a nivel epigenómico dependientes de MCU y MICU y como es que ambas proteínas son capaces de regular el metabolismo mitocondrial, y el estado de acetilación de histonas dependiente de α cetoglutarato demetilinas, las cuales a su vez regulan la transición en la diferenciación celular de fibroblastos a miofibroblastos [Lombardi et al., 2019]. Recientemente, en estudios depositados en el servidor BioRxiv se ha propuesto que la proteína MICU juega un papel importante en la morfología de las crestas mitocondriales y en la regulación del metabolismo oxidativo [Tomar et al., 2019]. Esto sugiere que, en plantas MICU bien podría estar involucrada en papeles más allá del transporte de calcio y probablemente en la biogénesis mitocondrial.

Al igual que la mitocondria, los cloroplastos presentan transportadores de calcio los cuales se han estudiado previamente [Loro et al., 2016]. En estudios recientes se ha comentado que MCU puede estar presente en cloroplastos [Teardo et al., 2019]; a esta isoforma de MCU se la ha llamado cMCU y su eliminación genética conlleva

a plantas con mayor resistencia a condiciones climatológicas adversas [Teardo et al., 2019].

1.7 Rojo de rutenio: Características y actividad biológica

El rojo de rutenio (RuRed) es un colorante inorgánico que se usa para hacer tinciones. El RuRed y Ru360 son los inhibidores más potentes del complejo MCU [Baughman et al., 2011]. En concentraciones del orden nanomolar, RuRed puede inhibir completamente la entrada de calcio a la mitocondria [DeLuca, 1961].

En un estudio reciente se ha demostrado que el Ca^{2+} y el RuRed tienen el mismo sitio de interacción en el anillo D del MCU. En el ensamblaje de las subunidades proteicas que conforman al MCU hay una región denominada sitio DIME, en donde se involucran las argininas 440 y 443 para ensamblar al MCU y la proteína MICU1; se ha visto que este sitio está relacionado con el control del flujo del Ca^{2+} y la sensibilidad al RuRed. (*Figura H*).

También en otro experimento se demostró que la serina 259 es necesaria para que el Ru360 pueda inhibir la entrada del Ca^{2+} a la célula [Baughman et al., 2011; Paillard et al., 2018], mutaciones en esta serina conservada ocasionan una pérdida del efecto de RuRed y han sido ubicadas en la “boca” del poro conductor de Ca^{2+} formada por la organización oligomérica de la subunidad MCU [Oxenoid et al., 2016]. Estos resultados sugieren que la regulación del complejo MCU por RuRed requiere niveles relativamente bajos de expresión de la subunidad “tapón” MICU y que en ausencia de ésta, el transporte mediado por la subunidad MCU necesitaría concentraciones menores de RuRed para ser bloqueado [Paillard et al., 2018].

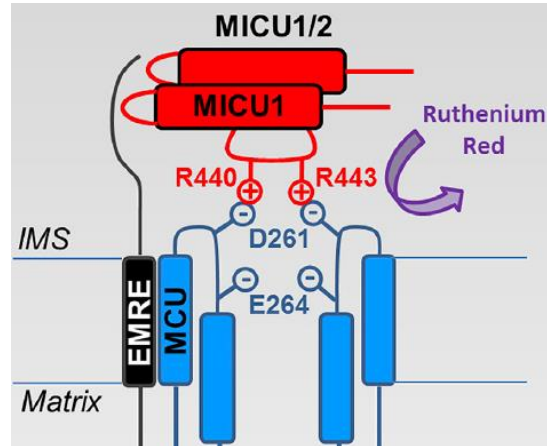


Figura H: Sitio de interacción del RuRed. La sensibilidad al RuRed es conferida mediante una interacción potencial con el dominio DIME del complejo MCU [Paillard et al., 2018].

1.8 *Arabidopsis thaliana* como un modelo de estudio

La planta *Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia Brassicaceae (plantas calcícolas), se ha usado ampliamente en estudios de genética molecular y bioquímica por su rápido crecimiento y por ser de fácil manipulación genética [Koncz et al., 1992]; también porque está secuenciado todo su genoma y existe una gran variedad de líneas mutantes carentes o con sobreexpresión de diversos genes.

En el presente trabajo se buscó caracterizar bioquímicamente, el sistema de transporte intracelular de calcio en protoplastos permeabilizados de hojas de *A. thaliana* Col-0 (silvestre) y una cepa mutante carente del gen *micu-1* codificante para la proteína MICU1. Los resultados proponen la existencia de un MCU sensible a RuRed en protoplastos permeabilizados de hojas de *A. thaliana*. Se sugiere que la función de MICU1 es similar a la de su ortólogo en mamíferos y la carencia de *micu-1* ocasiona probables cambios funcionales en el transporte de calcio como posible mecanismo compensatorio. A pesar de que el RNA mensajero de *micu-1* es predominante en hojas (Figura I), actualmente se ha demostrado que los

cloroplastos también presentan un MCU en protoplastos de mesófilo de *A. thaliana* [Teardo et al., 2019].

Por lo anterior, el presente trabajo de tesis pretende determinar la contribución de MICU1 al transporte de calcio mitocondrial utilizando plantas silvestres y mutantes carentes de esta proteína mitocondrial.

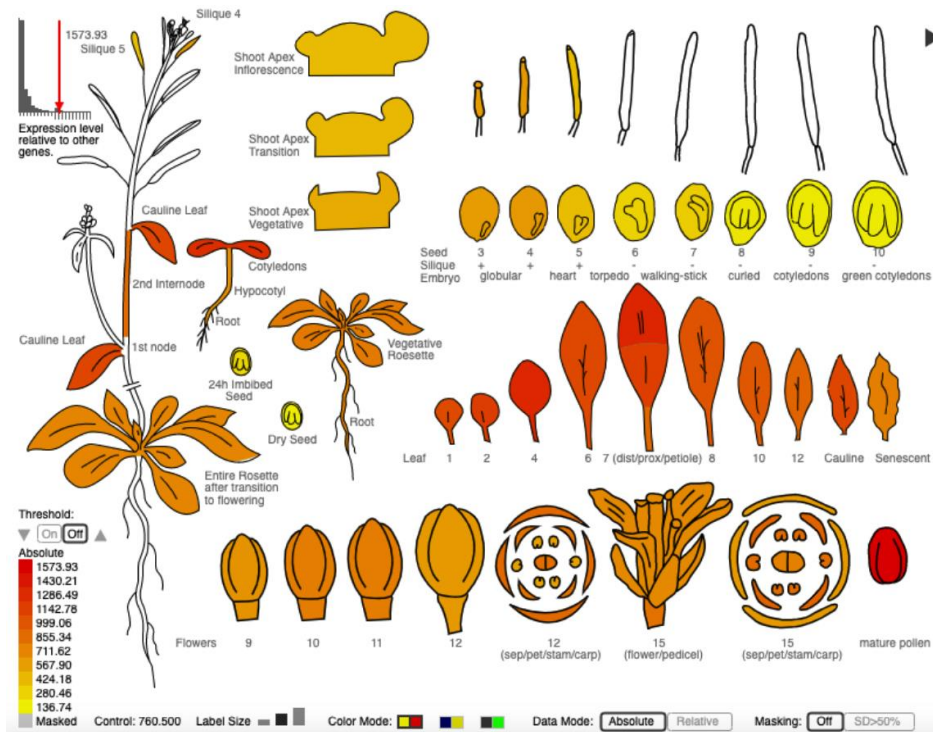


Figura 1: Niveles de transcrito del gen *micu-1* en *A. thaliana*. Los niveles del transcrito del gen At4g32060 fueron evaluados con aplicación Arabidopsis eFP Browser v 2.0. [Winter et al., 2007]. Los transcritos de *micu-1* pueden ser detectados predominantemente en hojas y granos de polen.

2. Hipótesis

Si el transporte de calcio intracelular en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* es dependiente del uniportador de calcio mitocondrial, entonces la eliminación genética

de la subunidad reguladora AtMICU1 deberá alterar la cinética de transporte de este catión divalente.

3. Objetivo general

- Determinar la contribución de MICU1 en el transporte de calcio intracelular en *A. thaliana*.

3.1 Objetivos particulares

- Aislar protoplastos de las cepas Col-0 y MICU1-KO.
- Permeabilizar la membrana plasmática utilizando digitonina.
- Determinar las propiedades del transporte de calcio en ambas cepas.
- Medir el efecto de concentraciones moderadas del inhibidor de MCU (RuRed) en ambas cepas.

4. Metodología y procedimiento experimental

4.1 Material vegetal

Se germinaron semillas de *A. thaliana* de los ecotipos Col-0 y MICU1-KO en cajas Petri con medio MS y 2% de sacarosa. El ecotipo de *A. thaliana* utilizada como control es la Col-0 y ésta fue proporcionada amablemente por la Dra. Sobeida Sánchez Nieto de la Facultad de Química, UNAM. La cepa MICU1-KO fue obtenida del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) de la Ohio State University. Los genotipos de ambas cepas fueron confirmados por PCR usando oligonucleótidos específicos y en condiciones detalladas en la *Sección 4.4* de la presente tesis.

En la segunda semana de crecimiento, las plántulas se trasladaron a macetas con sustrato Sunshine Mix #3, vermiculita y agrolita en proporción 3:1:1 respectivamente [Pedroza-García et al., 2015] (Figura J).

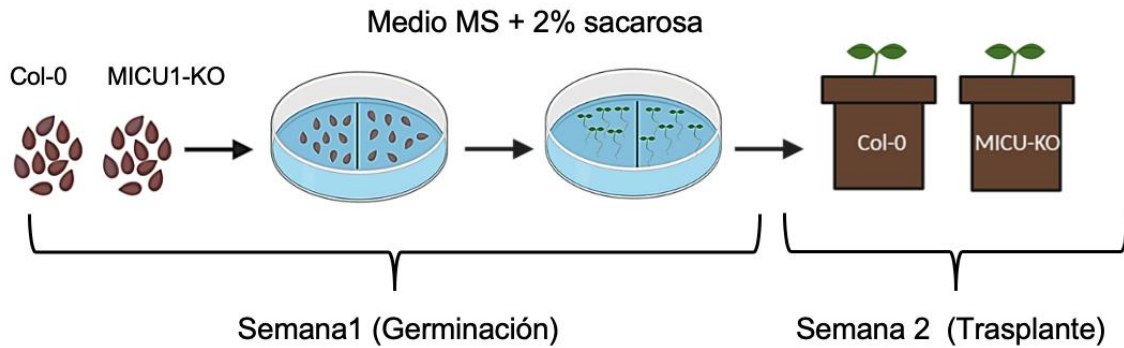


Figura J: Germinación de las dos diferentes cepas de *A. thaliana*.

4.2 Aislamiento de protoplastos

Como se observa en la Figura K, los protoplastos se obtuvieron utilizando el método tradicional [Yoo et al., 2007] de digestión de pared celular con celulasa y macerozima [Scott, 2008; Weir, 2003]. Para ello, se recolectaron por separado de 25 a 30 hojas verdaderas de *A. thaliana* Col-0 y MICU1-KO y se cortaron en tiras de 0.5 mm a 1 mm sumergiéndolas inmediatamente en la solución enzimática contenida en una caja Petri; luego en un desecador se colocó la caja sin tapa, cubierta con papel aluminio y se sometió a condiciones de vacío a 25°C por 30 min. Posteriormente se tapó la caja Petri y nuevamente en condiciones de oscuridad se continuó la digestión de la pared en un agitador a 40 rpm por 90 min. Al terminar, se agregaron 20 mL de W5 y se filtró con Miracloth. El filtrado se centrifugó a 1130 rpm por 2 min a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y el botón se

resuspendió con movimientos circulares. Se determinó la cantidad y la integridad de los protoplastos por inspección visual utilizando un hematocitómetro de Neubauer y observando al microscopio a 40X.

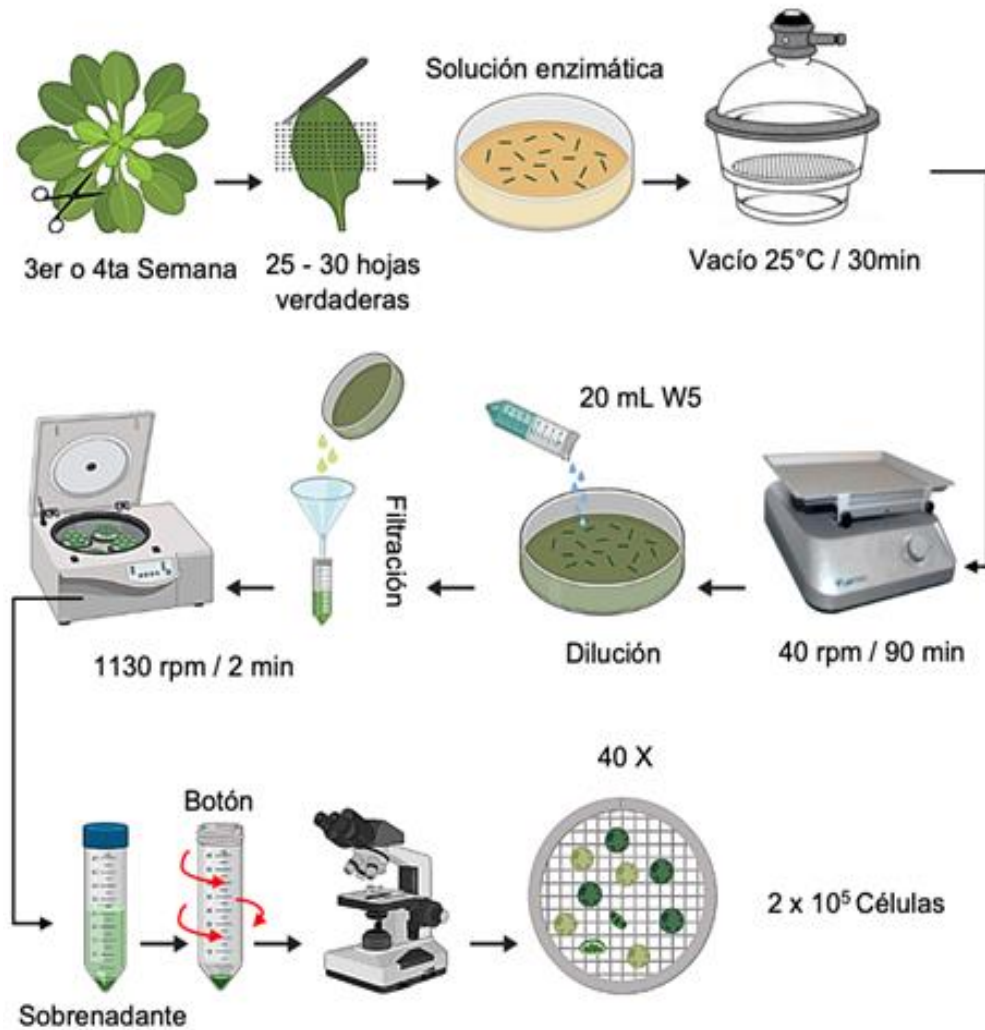


Figura K: Diagrama de aislamiento de protoplastos.

4.3 Medición del transporte de calcio intracelular por fluorimetría

Para la medición del transporte de calcio intracelular se utilizó un método cuantitativo de detección de los cambios en la concentración de calcio utilizando el

indicador Calcium Green-5N [Gutiérrez-Aguilar et al., 2014]. El transporte de calcio intracelular fue medido en un mini fluorómetro Go Direct® SpectroVis® Plus Spectrophotometer (Vernier Software & Technology) en condiciones estándar y en presencia del inhibidor RuRed. Para ello, los protoplastos recién obtenidos fueron contados y 200,000 células se permeabilizaron con 0.01% de digitonina. Anteriormente en el laboratorio fue verificada la eficiencia de la permeabilización mediante un ensayo de tinción con 1% de Azul de Evans [Gonzalez-Vizueth, 2019]. El fluorómetro se ajustó a una fluorescencia de 530 nm ya que la sonda utilizada Calcium Green-5N cuenta con una longitud de onda máxima de excitación de 506 nm y una máxima de emisión de 532 nm (*Figura L*).

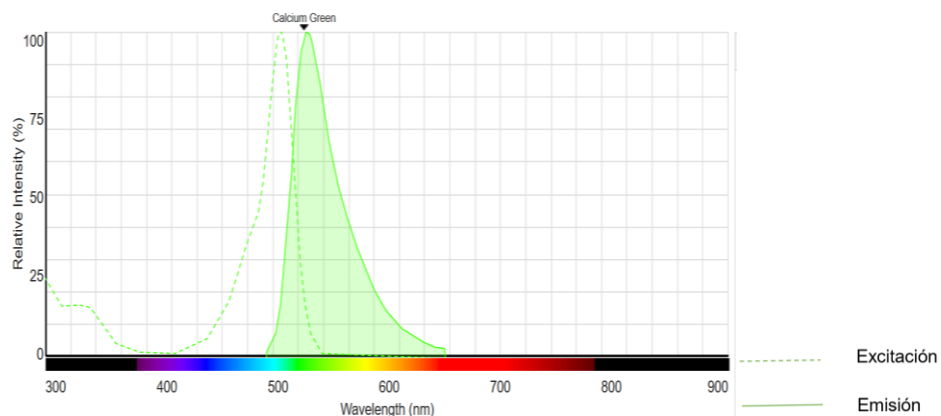


Figura L: Espectro de fluorescencia de Calcium green-5N. Imagen modificada de la hoja del reactivo obtenido de ThermoFisher Scientific.

El ensayo se llevó a cabo en un tiempo de 3000 s. En una celda de plástico se adicionaron los reactivos en orden (*Figura M*) en agitación constante; los protoplastos deben ser lavados con solución amortiguadora CRC antes de iniciar el ensayo de transporte.

Se corrió el ensayo y a los 300 s se agregó Ca^{2+} . Finalmente, a los 3000 s se detuvo el ensayo y se guardó el registro de resultados para su tratamiento estadístico.

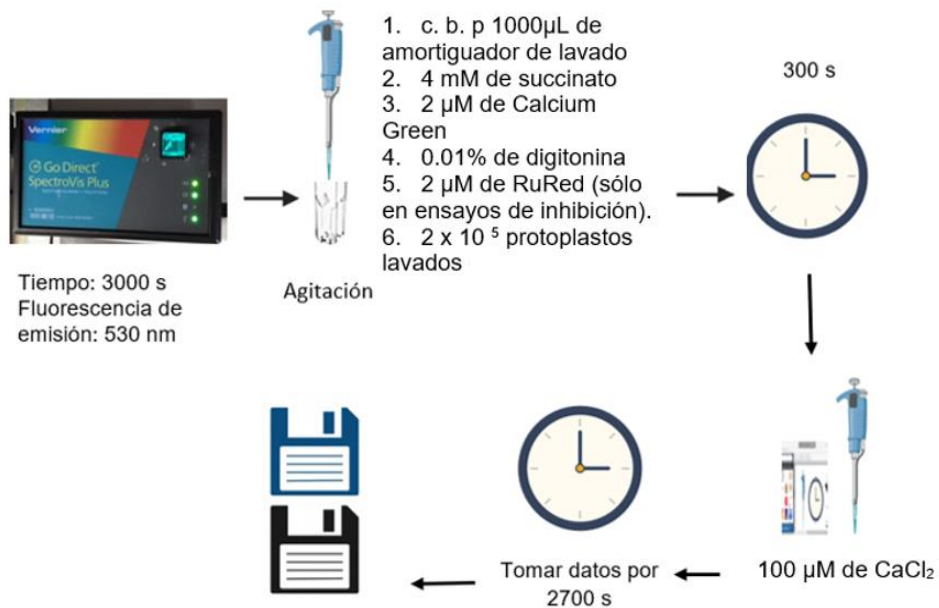


Figura M: Medición del transporte de Ca²⁺ intracelular.

4.4 Confirmación de la delección de *micu-1*

Se realizó una PCR para confirmar la mutación en la cepa AtMICU1-KO utilizando un mini8 (miniPCR™) y los siguientes oligonucleótidos específicos para *micu1*:

- 1) LBb1.3 (TDNA pROK2): ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
- 2) MICU RP1: TAGACAAGGAGTTGGCCACAG
- 3) MICU LP2: TTACATGCGTCAGCTGAGTTG

Las condiciones del PCR aparecen en la siguiente tabla:

Tabla 1: Condiciones de la PCR

	Reacción A			Reacción B		
	Temp. (°C)	Tiempo (s)	Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	120	36	94	120	36
Desnaturalización	94	30		94	30	
Alineación	63.3	30		63.6	60	
Extensión	72	60		72	60	
Extensión final	72	600		72	600	

*Primers: Reacción A= Primers LBb1.3, MICU RP1 y MICU LP2; Reacción B= Primers LBb1.3 y MICU RP1.

4.5 Reactivos, soluciones, materiales y equipos utilizados en el aislamiento, medición de transporte de calcio y PCR

4.5.1 Solución enzimática (20 mL para 20-30 hojas)

- Celulasa C0615-1G-SIGMA al 1.5% (0.15 g/10 mL)
- Macerozima P2401-1KU-SIGMA al 0.4% (0.04 g/10 mL)
- Manitol 0.4 M (stock 0.8 M), precalentar a 55°C
- KCl 20 mM (stock 2 M)
- MES 20 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M), precalentar a 55°C
- CaCl₂ 10 mM (Stock 1 M)

La solución enzimática se prepara el día a utilizar y se filtra con ayuda de una jeringa y un filtro estéril (CORNING) de 0.45 μm antes de verter a la caja Petri.

4.5.2 Solución W5

- NaCl 154 mM (stock 4M)
- CaCl_2 125 mM (stock 1 M)
- KCl 5 mM (stock 2 M)
- MES 2 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M)

4.5.3 Amortiguador de lavado de protoplastos

- EDTA 0.1 mM (stock 100 mM)
- Manitol 0.4 M (stock 0.8 M)
- Pi 1 mM (stock 1M)
- MES 10 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M)

4.5.4 Amortiguador de reacción CRC

- Digitonina 0.01% (stock 20 mg/mL)
- Calcium Green 5-N 2 μM (stock 1 mM)
- Succinato de Sodio 4 mM (stock 0.2 M)
- CaCl_2 100 μM (stock 10 mM)
- Rojo de Rutenio (RuRed) 2 μM (stock 1 mM)
- c.b.p. 1000 μL de amortiguador de lavado de protoplastos

Se recomienda que las soluciones del inhibidor RuRed y el CaCl_2 sean preparadas el mismo día que se usan.

4.5.5 Reacción de PCR

Tabla 2: Concentración de reactivos para la PCR

Para 1 reacción		Concentración final
Amortiguador 10 x	2.5 µL	1 x
dNTPs	2.5 µL	0.2 mM
Primer*	1.25 µL	0.5 µM
Taq	0.26 µL	0.75-1.25 U/ µL
DNA**	1 µL	
H ₂ O	c.b.p 25 µL	

*Primers: Reacción A= Primers LBb1.3, MICU RP1 y MICU LP2; Reacción B= Primers LBb1.3 y MICU RP1.

4.5.6 Materiales

- Hojas verdaderas de *A. thaliana* ecotipos Col-0 y MICU1-KO (2-3 semanas de crecimiento)
- Filtro de jeringuilla estéril de 0.45 µm
- Caja Petri
- Pinzas de disección
- Tijeras.
- Cuchillas de afeitar

- Papel aluminio
- Tubos de microfuga
- Dos agitadores magnéticos (uno para los ensayos sin RuRed y otro para los ensayos con RuRed)
- Jeringa de 20 mL

4.5.7 Equipos

- Fluorómetro Spectrovis PlusVernier
- Centrífuga para tubos de microfuga
- Agitador orbital
- Mini PCR
- Hematocitómetro (Cámara de Neubauer)
- Microscopio óptico
- Cámara de electroforesis

5. Resultados

5.1 Caracterización fenotípica y genotípica entre cepas

Después de tres semanas de crecimiento posteriores a la estratificación, se observaron diferencias morfológicas en el tamaño y forma de las hojas entre las cepas Col-0 y MICU1-KO (*Figura 1*). Específicamente se observaron hojas alargadas en la cepa carente del gen *micu-1* y resultados preliminares del laboratorio sugirieron que éstas son más sensibles a infecciones.



Figura 1: Diferencias fenotípicas entre la cepa silvestre Col-0 y la cepa mutante MICU1-KO. Las hojas de MICU1-KO se desarrollaron en formas alargadas, mientras que las hojas de Col-0 crecieron con una forma ovalada de menor tamaño. Experimento representativo n=4.

Con la finalidad de determinar el genotipo de las plantas y de confirmar si éstas son las mismas descritas por Wagner y colaboradores, se decidió utilizar las mismas condiciones de PCR [Wagner et al. 2015] y como control se llevó a cabo una reacción de PCR usando oligonucleótidos específicos para la planta mutante. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0.5% y se utilizó 4 μ L del reactivo con marcadores de peso molecular Jena Bioscience M-223S (*Figura 2*). Los resultados sugieren la confirmación del genotipo de las cepas. En la imagen A) de la *Figura 2*, se observan las bandas que confirman la mutación de MICU1-KO. El DNA extraído de la cepa WT da un amplicón de 1000 pb, mientras que la MICU1-KO uno menor (700 pb). En la imagen B) de la *Figura 2* se confirma

que la cepa MICU1-KO es homocigota nula, ya que se observó el mismo amplicón de 700 pb mientras que con el DNA de la cepa WT no se detectó un amplicón.

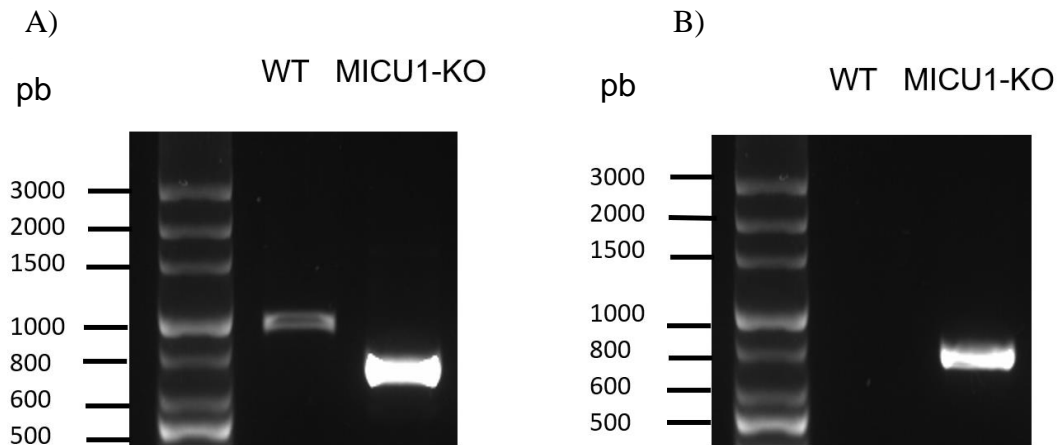


Figura 2: Genotipificación de las cepas WT (Col-0) y mutante carente de *micu-1* (MICU1-KO). Al igual que en el estudio de Wagner y colaboradores, al usar un juego de los primers LBb1.3, MICU RP1 y MICU LP2, la cepa WT da un amplicón de 1000bp. Por otro lado, la cepa carente de *micu-1* presenta un amplicón de 700bp al usar los primers LBb1.3 y MICU RP1 y no se detectó amplicón en la cepa WT.

5.2 Aislamiento y permeabilización de protoplastos

Una vez confirmado el genotipo de las plantas, se aislaron protoplastos por el método tradicional para llevar a cabo los experimentos de transporte de calcio [Wu, 2009]. En estas condiciones, más del 90% de las células presentaron la morfología característica de protoplastos viables. No se observaron diferencias morfológicas entre los protoplastos de las cepas Col-0 y MICU1-KO (*Figura 3*).

Los protoplastos de ambos genotipos fueron posteriormente tratados con 0.01% de digitonina [Gonzalez-Vizueth, 2019] y teñidos con el indicador mitotracker (1 μ M) con la finalidad de verificar la integridad de los organelos posterior al procedimiento de permeabilización (*Figura 4*).

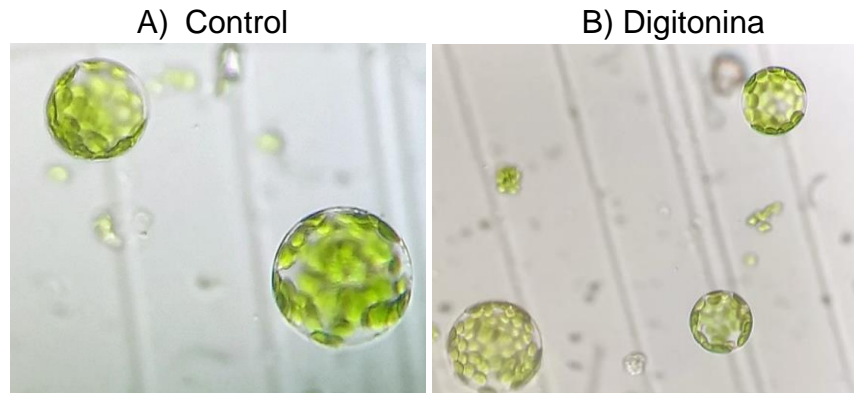


Figura 3: Protoplastos aislados por el método tradicional. A) Protoplastos de la cepa Col-0. **B)** Protoplastos de cepa MICU1-KO permeabilizados. Se observaron protoplastos de diferentes diámetros con morfologías esféricas delimitadas por una delgada membrana translúcida. Micrografía a 40X. Experimento representativo n=4.

Los protoplastos no se afectaron morfológicamente. Esto sugiere que su integridad no se afectó y que por lo tanto se preservan las estructuras subcelulares durante los ensayos de transporte. Las mitocondrias se observan de color verde, cercanamente asociadas a los cloroplastos, mientras que éstos se observan de color rojo (*Figura 4*).

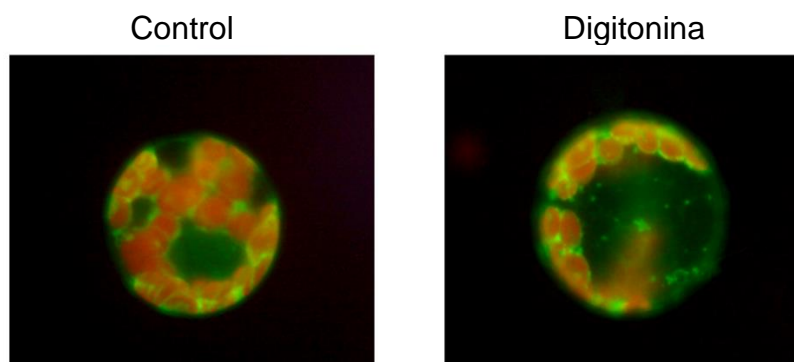


Figura 4: Tinción de protoplastos con Mitotracker. Después de permeabilizar mantienen la morfología de protoplastos viables, se observan las mitocondrias en color verde y los cloroplastos en rojo. Micrografía a 40X. Experimento representativo n=4.

5.3 Medición del transporte de Ca^{2+} en protoplastos permeabilizados

El ensayo de transporte de Ca^{2+} se realizó mediante un método fluorométrico *in situ* anteriormente estandarizado en el laboratorio [Gonzalez-Vizueth, 2019; Ortiz-Jiménez et al., 2019], con la finalidad de medir el flujo de calcio intraorganelar en protoplastos de *A. thaliana*. En las condiciones experimentales control, la adición de 100 μM de CaCl_2 ocasionó un aumento en la fluorescencia del medio con protoplastos permeabilizados. Los valores de fluorescencia fueron disminuyendo conforme transcurrió el tiempo (*Figura 5*). Ésto es consistente con la entrada del calcio a un compartimento subcelular [Gonzalez-Vizueth, 2019]. En presencia de 2 μM de RuRed, se observó una velocidad de transporte estadísticamente menor, consistente con la presencia de un MCU conservado en *A. thaliana* (*Figura 5*).

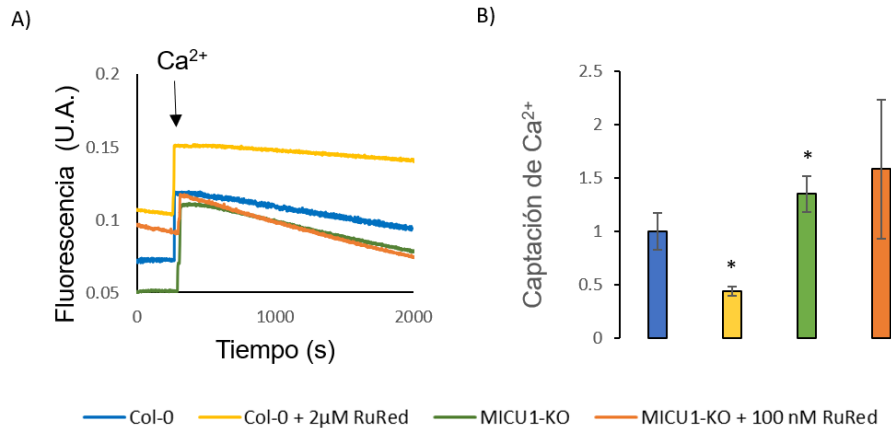


Figura 5: Transporte de Ca²⁺ intracelular en protoplastos permeabilizados.

A) Al agregar 100 µM de CaCl₂ se observa en todos los ensayos una disminución de la fluorescencia. Sin embargo, al agregar 2 µM del inhibidor RuRed la disminución de la fluorescencia es significativamente menor con respecto a Col-0. Por el contrario, se observa una disminución significativamente más rápida en el ensayo con MICU1-KO. Las fluorescencias de los ensayos MICU1-KO y MICU1-KO + 100 nM de RuRed se mantienen iguales. **B)** La internalización de Ca²⁺ en los protoplastos es significativamente menor al agregar 2 µM del inhibidor RuRed (p=0.00078) y significativamente mayor en la cepa MICU1-KO (p=0.02621). El transporte de Ca²⁺ intracelular no es diferente entre las cepas MICU1-KO y MICU1-KO + 100 nM de RuRed.

6. Discusión

Los canales ión-selectivo son estructuras importantes que modulan el transporte de iones a través de la membrana para activar procesos metabólicos de transporte secundario o para evitar la muerte celular por sobrecarga o escasez de éstos [Klee et al.,1986]. Muchas de las funciones celulares importantes dependen de cambios transitorios en la concentración citosólica de Ca²⁺.

Un estudio reciente en *A. thaliana* indica que los cambios en la concentración citosólica de Ca²⁺ inducida por segregación del aminoácido glutamato (indicador de

patogénesis o daño celular), puede formar redes de señalización asociadas a las respuestas de defensa local y sistémica en plantas [Toyota et al., 2018].

Para mantener la homeostasis celular, es necesaria la modulación de este ión divalente en el citosol y diferentes compartimentos subcelulares. Como anteriormente se mencionó, existen múltiples transportadores de Ca^{2+} en la célula vegetal; sin embargo, en la presente tesis nos enfocamos a determinar el papel del complejo MCU en el transporte de calcio mitocondrial al evaluar el papel de la subunidad mitocondrial MICU en *A. thaliana*.

Estudios recientes proponen que el complejo MCU es necesario para el crecimiento de tubos polínicos y raíces de *A. thaliana* [Selles et al., 2018; Teardo et al., 2018]. El crecimiento de la planta siempre requiere de un gasto energético, y la mitocondria es un importante organelo generador de energía en forma de ATP. Ésto es posible mediante la activación del ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones en donde se ve implicado el ión Ca^{2+} .

El transporte de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial es mediado por el complejo MCU desde el citoplasma, impulsado por un gradiente de concentración electroquímico [Paillard et al., 2018]. En tales condiciones, el calcio entra a la matriz dependiendo del potencial de membrana mitocondrial descrito por la ecuación de Nernst:

$$\Delta\Psi = 2.3 \frac{RT}{mF} \log_{10} \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}_{\text{matriz}}]}{[\text{Ca}^{2+}_{\text{citoplasma}}]} \right)$$

Considerando que el calcio en solución es un catión divalente y si asumimos un valor de $\Delta\Psi = 180\text{mV}$, entonces la relación de iones calcio matriz / citoplasma sería cercana a 10^6 . Ésto significa que el calcio tiene una gran afinidad por las mitocondrias. Sin embargo, este fenómeno no fue tan evidente en las preparaciones

de protoplastos permeabilizados de *A. thaliana*. Ésto puede deberse primordialmente a la presencia de cloroplastos en la célula, los cuales presentan un $\Delta\Psi$ con valores positivos. Ésto bien podría contrarrestar la capacidad de las mitocondrias por capturar al calcio.

El MCU es un complejo formado por varias subunidades proteicas que participan en la regulación y activación del importador. Una de las subunidades más estudiadas en mamíferos es MICU1, la cual se ha visto implicada en diferentes patologías.

En plantas está poco estudiado el papel de MICU. Sin embargo, se sabe que está altamente conservada a nivel proteína en plantas terrestres [Wang & Teng, 2018]. En el modelo *A. thaliana* sólo se ha descrito una subunidad de MICU1 (AtMICU1) [Wagner et al., 2015].

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la eliminación genética de la subunidad regulatoria MICU1 no sólo altera la cinética de transporte del Ca^{2+} , sino que también se refleja en el fenotipo de la planta. En la Figura 1 se pueden observar diferencias fenotípicas entre la cepa silvestre Col-0 y la mutante MICU1-KO; mientras que la primera desarrolla hojas ovaladas, la mutante desarrolla hojas alargadas, ésto es posible porque como ya se ha mencionado, el Ca^{2+} está implicado en el crecimiento, la diferenciación celular, la tolerancia al estrés y la muerte celular. Por lo tanto, al no estar presente el gen *micu-1* que codifica a la subunidad sensora de MCU, es probable que los mecanismos dependientes de calcio para mantener la homeostasis de la planta se alteren. También se observó que las plantas mutantes eran más susceptibles y su desarrollo era más lento

cuando tenían plaga en comparación con la cepa silvestre [observaciones preliminares].

La diferencia fenotípica es consistente con un estudio en donde se observó que plantas mutantes carentes de MICU tenían raíces más largas que las cepas silvestres [Wang y Teng, 2018], tal diferencia sea probablemente el resultado de la activación de algún mecanismo para mantener las concentraciones de Ca^{2+} citoplásmico óptimas.

Anteriormente se mencionó que el RuRed es un inhibidor selectivo para el complejo MCU y que se requieren bajas concentraciones (nM) para inhibirlo. Ésto es consistente con los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación en tubos polínicos de la planta *N. tabacum* [Flores-Herrera et al., 2019]. Pero en protoplastos permeabilizados en hojas de *A. thaliana* no se observó una inhibición al agregar 100 nM de RuRed [Gonzalez-Vizueth, 2019] (*Figura 6*).

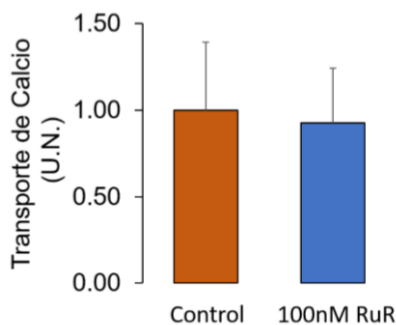


Figura 6: El transporte de calcio intracelular no es sensible a concentraciones bajas del inhibidor RuRed. No hubo diferencia significativa en la velocidad del transporte de calcio al agregar 100 nM del inhibidor RuRed. Prueba t. $p=0.864$ [Gonzalez-Vizueth, 2019].

Sin embargo, al agregar 2 μM del inhibidor se observó una inhibición parcial del transporte de Ca^{2+} (*Figura 5*) lo cual es consistente con la presencia de un MCU en *A. thaliana*.

La eliminación del gen *micu-1* provocó un aumento estadísticamente significativo en la velocidad de la entrada de Ca^{2+} a la célula (*Figura 5*). Sin embargo, al agregar 100 nM de RuRed no hubo diferencias en la velocidad del transporte. Los resultados presentados en la presente tesis sugieren que la proteína AtMICU1 tiene una función similar al MICU1 en mamíferos [Paillard et al, 2018] durante la modulación del Ca^{2+} .

7. Conclusiones

- El transporte de Ca^{2+} intracelular en protoplastos de *A. thaliana* es dependiente del MCU; por lo tanto, la eliminación genética de la subunidad reguladora MICU1 altera la cinética del transporte de Ca^{2+} , aumentando la captación de este catión.

8. Perspectivas

- Hacer un análisis proteómico y metabólico de las plantas Col-0 y MICU1-KO.
- Realizar experimentos de transporte de calcio intracelular usando diferentes concentraciones del inhibidor RuRed para poder determinar la concentración mínima inhibitoria del ligando de MCU.

9. Bibliografía

- Antony, A.N., Paillard, M., Moffat, C., Juskeviciute, E., Correnti, J., Bolon, B., Rubin, E., Csorda's, G., Seifert, E.L., Hoek, J.B., and Hajno'czky, G. (2016). MICU1 regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake dictates survival and tissue regeneration. *Nat. Commun.* 7, 10955.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal* (No. 581.1) McGraw-Hill Interamericana.
- Baradaran, R., Wang, C., Siliciano, A. F., & Long, S. B. (2018). Cryo-EM structures of fungal and metazoan mitochondrial calcium uniporters. *Nature*, 559 (7715), 580-584.
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., ... & Kotliansky, V. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 341-345.
- Bertolini, M. S., Chiurillo, M. A., Lander, N., Vercesi, A. E., & Docampo, R. (2019). MICU1 and MICU2 play an essential role in mitochondrial Ca^{2+} uptake, growth, and infectivity of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *mBio*, 10(3), e00348-19.
- Buchanan, B.B., Grisse, W., & Jones, R.L. (Eds). (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Burstrom, H.G. (1968). Calcium and plant growth. *Biol. Rev. (Camb.)* 43 287–316.

- Chakraborty, P.K., Mustafi, S.B., Xiong, X., Dwivedi, S.K.D., Nesin, V., Saha, S., Zhang, M., Dhanasekaran, D., Jayaraman, M., Mannel, R., et al. (2017). MICU1 drives glycolysis and chemoresistance in ovarian cancer. *Nat. Commun.* 8, 14634.
- Choudhary, O. P., Ujwal, R., Kowallis, W., Coalson, R., Abramson, J., & Grabe, M. (2010). The electrostatics of VDAC: implications for selectivity and gating. *Journal of molecular biology*, 396(3), 580-592.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 336-340.
- Deluca, H.F., & Engstrom, G. W. (1961). Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 47(11), 1744.
- Dodd, A. N., Kudla, J., & Sanders, D. (2010). The Language of Calcium Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 593–620. doi:10.1146/annurev-arplant-070109-104628.
- Flores-Herrera, C., Preciado-Linares, G., Gonzalez-Vizueth, I., de la Peña, N. C., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2019). In situ assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes. *Protoplasma*, 256(2), 503-509.
- Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 25(7), 319-324.

- Gonzalez-Vizueth., I. (2019) Desarrollo de un método fluorométrico para medir el transporte de calcio intraorganelar en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gutiérrez-Aguilar, M., Douglas, D. L., Gibson, A. K., Domeier, T. L., Molkenin, J. D., & Baines, C. P. (2014). Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 72, 316-325.
- He, L., Li, B., Lu, X., Yuan, L., Yang, Y., Yuan, Y., ... & Guo, S. (2015). The effect of exogenous calcium on mitochondria, respiratory metabolism enzymes and ion transport in cucumber roots under hypoxia. *Scientific reports*, 5, 11391.
- Hirschi, K. (2001). Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: who's directing the traffic?. *Trends in plant science*, 6(3), 100-104.
- Ji, L., Liu, F., Jing, Z., Huang, Q., Zhao, Y., Cao, H., Li, J., Yin, C., Xing, J., and Li, F. (2017). MICU1 Alleviates Diabetic Cardiomyopathy Through Mitochondrial Ca²⁺-Dependent Antioxidant Response. *Diabetes* 66, 1586–1600.
- Kamer, K. J., Sancak, Y., Fomina, Y., Meisel, J. D., Chaudhuri, D., Grabarek, Z., & Mootha, V. K. (2018). MICU1 imparts the mitochondrial uniporter with the ability to discriminate between Ca²⁺ and Mn²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(34), E7960-E7969.

- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos* (6a). McGraw Hill México.
- Klee, C. B., Newton, D. L., Ni, W. C., & Haiech, J. (1986). Regulation of the calcium signal by calmodulin. In *Calcium and the Cell* (pp. 162-182). John Wiley & Sons Chichester, New York, Brisbane.
- Koncz, C.; Chua, N. H.; Schell, J. ; (1992) World Scientific Publishing Co. Pte Ltd., Singapore , *Methods in Arabidopsis research*, 482 pp.
- Lewis-Smith, D., Kamer, K.J., Griffin, H., Childs, A.M., Pysden, K., Titov, D., Duff, J., Pyle, A., Taylor, R.W., Yu-Wai-Man, P., et al. (2016). Homozygous deletion in MICU1 presenting with fatigue and lethargy in childhood. *Neurol Genet* 2, e59.
- Logan, C.V., Szabadkai, G., Sharpe, J.A., Parry, D.A., Torelli, S., Childs, A.M., Kriek, M., Phadke, R., Johnson, C.A., Roberts, N.Y., et al.; UK10K Consortium (2014). Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat. Genet.* 46, 188–193.
- Lombardi, A. A., Gibb, A. A., Arif, E., Kolmetzky, D. W., Tomar, D., Luongo, T. S., ... & Murphy, E. (2019). Mitochondrial calcium exchange links metabolism with the epigenome to control cellular differentiation. *Nature communications*, 10(1), 1-17.
- Loro, G., Wagner, S., Doccula, F. G., Behera, S., Weinl, S., Kudla, J., ... & Zottini, M. (2016). Chloroplast-specific in vivo Ca²⁺ imaging using Yellow

Cameleon fluorescent protein sensors reveals organelle-autonomous Ca^{2+} signatures in the stroma. *Plant Physiology*, 171(4), 2317-2330.

- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press. Inc., San Diego.
- Nguyen, N. X., Armache, J. P., Lee, C., Yang, Y., Zeng, W., Mootha, V. K., ... & Jiang, Y. (2018). Cryo-EM structure of a fungal mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 559(7715), 570-574.
- Nicholls DG, Ferguson SJ. (2013) *Bioenergetics*, Academic Press. Cuarta edición.
- Ortiz-Jiménez, D. J., López-Aquino, C. M., Flores-Herrera, C., Preciado-Linares, G., Gonzalez-Vizueth, I., García-Arrazola, R., ... & Gutiérrez-Aguilar, M. (2019). A simple method for mitochondrial respiration and calcium uptake assessment in pollen tubes. *MethodsX*, 6, 1741-1746.
- Oxenoid, K., Dong, Y., Cao, C., Cui, T., Sancak, Y., Markhard, A. L., ... & Cong, Y. (2016). Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 533 (7602), 269-273.
- Paillard, M., Csordás, G., Huang, K. T., Várnai, P., Joseph, S. K., & Hajnóczky, G. (2018). MICU1 interacts with the D-ring of the MCU pore to control its Ca^{2+} flux and sensitivity to Ru360. *Molecular cell*, 72(4), 778-785.
- Pedroza-García, J. A., Nájera-Martínez, M., de la Paz Sánchez, M., & Plasencia, J. (2015). *Arabidopsis thaliana* thymidine kinase 1a is

ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant molecular biology*, 87(3), 303-315.

- Plovanich, M., Bogorad, R.L., Sancak, Y., Kamer, K.J., Strittmatter, L., Li, A.A., Girgis, H.S., Kuchimanchi, S., De Groot, J., Speciner, L., et al. (2013). MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS ONE* 8, e55785.
- Raffaello, A., De Stefani, D., Sabbadin, D., Teardo, E., Merli, G., Picard, A., Checchetto, V., Moro, S., Szabo, I., and Rizzuto, R. (2013). The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative poreforming subunit. *EMBO J.* 32, 2362–2376.
- Reiss, H. D., & Herth, W. (1979). Calcium ionophore A 23187 affects localized wall secretion in the tip region of pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Planta*, 145 (3), 225-232.
- Sancak, Y., Markhard, A.L., Kitami, T., Kovács-Bogdán, E., Kamer, K.J., Udeshi, N.D., Carr, S.A., Chaudhuri, D., Clapham, D.E., Li, A.A., et al. (2013). EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science* 342, 1379–1382.
- Scott, I., & Logan, D. C. (2008). Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 177 (1), 90-101.
- Selles, B., Michaud, C., Xiong, T. C., Leblanc, O., & Ingouff, M. (2018). *Arabidopsis* pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex. *New Phytologist*, 219 (1), 58-65.

- Simon, E. W. (1978). The symptoms of calcium deficiency in plants. *New phytologist*, 80 (1), 1-15.
- Somlyo, A. P. (1984). Cell physiology: cellular site of calcium regulation. *Nature*, 309 (5968), 516-517.
- Teardo, E., Carraretto, L., Moscatiello, R., Cortese, E., Vicario, M., Festa, M., Szabo, I. (2019). A chloroplast-localized mitochondrial calcium uniporter transduces osmotic stress in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 5(6), 581–588. doi:10.1038/s41477-019-0434-8.
- Tomar, D., Thomas, M., Garbincius, J. F., Kolmetzky, D. W., Salik, O., Jadiya, P., ... & Elrod, J. W. (2019). MICU1 regulates mitochondrial cristae structure and function independent of the mitochondrial calcium uniporter channel. *bioRxiv*, 803213.
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., ... & Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 361 (6407), 1112-1115.
- Trewavas, A.J. (1986). *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*. (New York: Plenum Press).
- Uribe-Carvajal, S., Luévano-Martínez, L. A., Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Corona-de-la-Peña, N. A., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2011). Mitochondrial unselective channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion*, 11 (3), 382-390.
- Wagner, S., Behera, S., De Bortoli, S., Logan, D. C., Fuchs, P., Carraretto, L., ... & Doccula, F. G. (2015). The EF-hand Ca²⁺ binding protein MICU

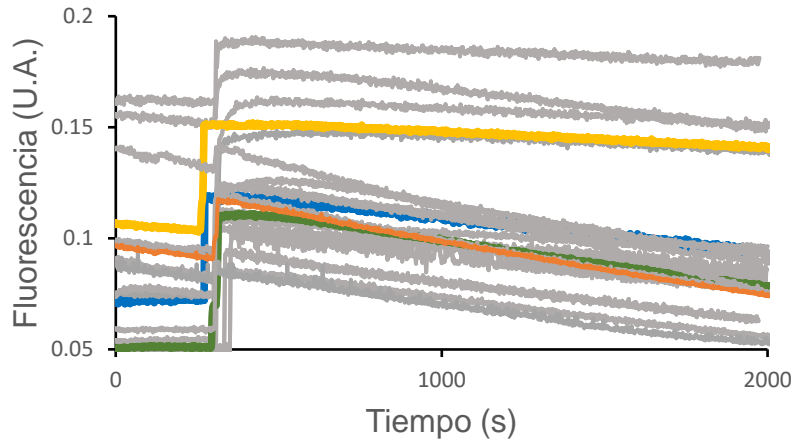
choreographs mitochondrial Ca^{2+} dynamics in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27 (11), 3190-3212.

- Wang, M., & Teng, Y. (2018). Genome-wide identification and analysis of MICU genes in land plants and their potential role in calcium stress. *Gene*, 670, 174-181.
- Weir, I. E., Pham, N. A., & Hedley, D. W. (2003). Oxidative stress is generated via the mitochondrial respiratory chain during plant cell apoptosis. *Cytometry Part A*, 54 (2), 109-117.
- White, P. J. (1998). Calcium channels in the plasma membrane of root cells. *Annals of Botany*, 81 (2), 173-183.
- White, P. J. (2001). The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany*, 52 (358), 891-899.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of botany*, 92(4), 487–511. doi:10.1093/aob/mcg164.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one*, 2 (8).
- Wu, F. H., Shen, S. C., Lee, L. Y., Lee, S. H., Chan, M. T., & Lin, C. S. (2009). Tape-Arabidopsis Sandwich—a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant methods*, 5 (1), 16.
- Wyn Jones, R.G., and Lunt, O.R. (1967). The function of calcium in plants. *Bot. Rev.* 33 407–426.

- Xue, Q., Pei, H., Liu, Q., Zhao, M., Sun, J., Gao, E., Ma, X., and Tao, L. (2017). MICU1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury and its control by the importer receptor Tom70. *Cell Death Dis.* 8, e2923.
- Yang, T., & Poovaiah, B. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*, 8 (10), 505–512. doi:10.1016/j.tplants.2003.09.004.
- Yoo, S. D., Cho, Y. H., & Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, 2 (7), 1565.
- Yoo, J., Wu, M., Yin, Y., Herzik, M. A., Lander, G. C., & Lee, S. Y. (2018). Cryo-EM structure of a mitochondrial calcium uniporter. *Science*, 361 (6401), 506-511.

10.Anexos

- a.** *Figura 7: Ensayos de transporte de Ca^{2+} en protoplastos permeabilizados*
- b.** *Artículo “A simple method for mitochondrial respiration and calcium uptake assessment in pollen tubes.”*



— Col-0 — Col-0 + 2µM RuRed — MICU1-KO — MICU1-KO + 100 nM RuRed

Figura 7: Ensayos totales de transporte de Ca^{2+} intracelular. Cada uno de los ensayos de transporte de calcio fueron efectuados por cuadruplicado (trazos grises). Las velocidades relativas de transporte fueron promediadas, normalizadas y comparadas utilizando una prueba de t-Student (líneas de color).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

MethodsX

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mex

Method Article

A simple method for mitochondrial respiration and calcium uptake assessment in pollen tubes



Diana J. Ortiz-Jiménez^a, Casandra M. López-Aquino^a,
Cesar Flores-Herrera^a, Gisela Preciado-Linares^a,
Israel Gonzalez-Vizueth^a, Roeb García-Arrazola^b,
Daniela Araiza-Olivera^c, Manuel Gutiérrez-Aguilar^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México City, Mexico

^bDepartamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria 04510, México City, Mexico

^cInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria 04510, México City, Mexico

A B S T R A C T

Key mitochondrial processes are known to be widely conserved throughout the eukaryotic domain. However, the scarce availability of working materials may restrict the assessment of such mitochondrial activities in several working models. Pollen tube mitochondrial studies represent one example of this, where tests have been often restricted due the physical impossibility of performing experiments with isolated mitochondria in enough quantities. Here we detail a method to measure *in situ* mitochondrial respiratory chain activity and calcium transport in tobacco pollen tubes.

- Digitonin-mediated plasmalemma permeabilization allows efficient assessment of mitochondrial respiration and calcium uptake.
- This method allows quick, reliable and portable measurements from low to high cellular densities, versus methods requiring intracellular calcium reporters.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

A R T I C L E I N F O

Method name: Pollen tube mitochondrial respiration and calcium transport

Keywords: Pollen tube mitochondria, Mitochondrial calcium uptake, Mitochondrial respiration

Article history: Received 7 February 2019; Accepted 19 July 2019; Available online 25 July 2019

* Corresponding author.

E-mail address: manu@unam.mx (M. Gutiérrez-Aguilar).

Specifications Table

Subject area:	Biochemistry, Genetics and Molecular Biology
More specific subject area:	Plant mitochondrial physiology
Method name:	Pollen tube mitochondrial respiration and calcium transport
Name and reference of original method:	C. Flores-Herrera, G. Preciado-Linares, I. Gonzalez-Vizueth, N. Corona de la Peña, M. Gutiérrez-Aguilar. <i>In situ</i> assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes. <i>Protoplasma</i> . 2019 Mar;256(2):503-509. doi: 10.1007/s00709-018-1316-z.
Resource availability:	NA

Method details

Background

Pollen tubes require active mitochondrial respiration and copious amounts of calcium to achieve efficient growth [1]. However, the role of substrate-specific mitochondrial respiration and calcium transport for plant and pollen tube metabolism has remained less studied. Recent reports have successfully measured Mitochondrial Calcium Uniporter-dependent calcium uptake activity either using electrophysiology of reconstituted MCU or through heterologous expression of MCU in yeast [2,3]. Here we present methodological details to assess *in situ* mitochondrial respiration and calcium uptake in permeabilized pollen tubes [4]. This method could be applied -in principle- to pollen tubes from any plant provided adequate germination and assay buffers are used throughout the process.

Materials and reagents

Nicotiana tabacum 'Praecox' plants at floration stage.

MilliQ water

20 mg/mL Digitonin (Promega).

Dimethyl sulfoxide (Sigma)

1% Evans Blue stock (Sigma)

100 μ M Ruthenium Red (RuR) stock (Sigma)

2 mM Calcium Green-5N stock (Molecular Probes)

10 mM Calcium Chloride stock (Sigma)

0.5 M Sodium Succinate stock (Sigma)

mM Adenosine Diphosphate stock (Sigma)

1 mg/mL Oligomycin stock (Sigma)

200 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid stock pH = 5.7

100mM KCN (Sigma)

500 mM Salicylhydroxamic Acid [SHAM] (Sigma)

Pollen Germination (PG) Buffer:

10% sucrose

200 μ M CaCl₂

100 μ M Ca(NO₃)₂

1.6 mM H₃BO₃

15 mM MES pH = 5.7

Pollen Tube Assay (PTA) Buffer:

330mM Mannitol

1 mM KH₂PO₄

0.1 mM EDTA

10 mM MES pH 5.7

Important: Filter sterilize both buffers and store at room temperature.

Equipment

Optical Microscope
Centrifuge for Eppendorf tubes
SpectroVis Plus Bluetooth® enabled mini fluorimeter
Magnetic stirrer at 60 Hz
Micro magnet for cuvette
Hemocytometer (Neubauer chamber)
Micropipettors
1.5 mL Eppendorf tubes
Liquid-Phase Hansatech Oxygraph Plus System (Hansatech Instruments)
Orbital shaker
Temperature-controlled incubator

Assay procedure

Pollen harvest

- 1 Fill an Eppendorf tube with 1.0 mL PG buffer.
- 2 Select recently flourished flowers and peel of petals with the aid of scissors and tweezers.
- 3 Dip anthers into the Eppendorf tube containing PG buffer.
- 4 Release pollen grains into PG buffer by mildly shaking the anthers.

Pollen tube germination

- 5 Close the Eppendorf tube and gently stir at 60 rpm in an orbital shaker at 28 °C for 2 h.
- 6 Place 20 µL of the suspension into the hemacytometer sample port and determine cell count by multiplying by the chamber predetermined factor.

- 7 Wash pollen tubes twice in 1 mL PTA buffer by spinning at 3000 rpm for 20 s.

Oxygen consumption assay

- 9 Calibrate the Liquid-Phase Hansatech Oxygraph Plus System according to the manufacturer instructions.

- 10 Resuspend pollen tubes in a final volume of 0.5 mL containing 1×10^6 pollen tubes into the Oxygraphs water-jacketed chamber containing PTA buffer with 10 mM sodium succinate, 0.01% digitonin and 200 µM ADP.

- 11 Close the chamber with the included plug and make sure no air bubbles remain inside.

- 12 Allow five minutes for efficient pollen tube permeabilization and baseline obtention.

- 13 Measure oxygen consumption rate for 1–2 min (state 3).

- 14 Inject 2 µg oligomycin and measure oxygen consumption rate for 1–2 min (state 4).

- 15 Calculate the Respiratory Control Ratio (RCR) by dividing State 3 by State 4.

- 16 Add 100 µM KCN plus 500 µM SHAM to inhibit mitochondrial respiration.

Calcium transport assay

- 17 Resuspend pollen tubes in PTA buffer containing 10 mM sodium succinate, 0.01% digitonin, 20 µM EDTA and 2 µM Calcium Green-5N.

- 18 Place pollen tube suspension in a cuvette inside the fluorimeter with mild stirring at 60 rpm. IMPORTANT: Make sure the cuvette port is located at the center of the magnetic stirrer to ensure constant and laminar (non-turbulent) stirring.

- 19 Turn on and connect the mini fluorimeter either through Bluetooth® or with a USB cable.

- 20 Open Logger Pro and select '500 nm fluorescence mode' under the sensor SpectroVis plus configuration icon.

- 21 Select the 530 nm acquisition box and 'Absorbance versus time' under the spectrophotometer configuration icon. IMPORTANT: Make sure data collection is set to 1 sample/second and select the appropriate acquisition time intervals for each experiment. A value of 2000s is a good start.

- 22 Start recording baseline fluorescence for 500 s.

- 23 Add desired amount of calcium (a pulse around 50 µM is usually a good starting point).

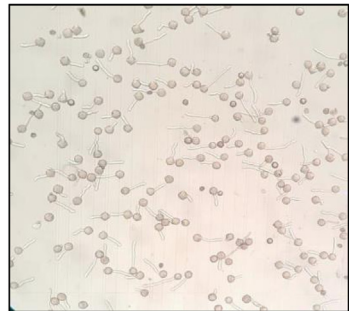
- 24 Measure calcium transport for at least 2000s and save data.

- 25 Start a new trace and measure calcium transport in the presence of freshly made 100 nM ruthenium red (RuR) as negative control. Important: A 100 µM RuR stock solution must be freshly made.

26 Perform required biological replicates and quantify calcium transport rates (fold changes) in arbitrary units. This can be easily done under Vernier's Logger Pro[®] or Excel[®].

Method validation

In order to test the method, pollen grains were isolated from mature flowers (Fig. 1A) hydrated in PG buffer and incubated for 2 h. As expected, pollen tubes emerged and were counted in the Neubauer chamber (Fig. 1B). Cell number was determined and adjusted either for oxygen consumption experiments or calcium transport assessment. Samples were then washed twice in PTA buffer in order to remove excess calcium. Pollen tubes were then permeabilized with 0.01% digitonin or 0.5% DMSO (control) for 5 min and stained with 0.1% Evans Blue solution. As expected, permeabilized pollen tubes were stained with Evans Blue (Fig. 1C). In parallel, a separate batch of pollen tubes were treated with

A**B****C**

Control



Digitonin



Fig. 1. Pollen tube germination (A,B) and plasmalemma permeabilization assessment (C). Pollen tubes were allowed to grow for 2 h, the cells were counted and permeabilized with 0.01% digitonin or 0.5% DMSO. Plasma membrane permeabilization was then assessed by staining with 0.1% Evans Blue. Representative experiments n = 4.

0.01% digitonin for five minutes inside the oxygraph's chamber and ADP was added to obtain state 3 respiration (Fig. 2). Oligomycin addition resulted in a transient decrease in respiration typically associated with ADP phosphorylation blockade (Fig. 2A). Furthermore, addition of 100 μM KCN significantly decreased state 3 respiration whereas subsequent addition of 500 μM SHAM resulted in no significant changes when compared with respiration in the presence of cyanide (Fig. 2B).

Once mitochondrial coupling was determined, mitochondrial calcium uptake was assessed by placing pollen tubes in a mini fluorimeter with constant stirring in the presence of 10 mM succinate and 2 μM calcium green. A single pulse of 100 μM CaCl_2 was then added and fluorescence spiked to a maximum value followed by a constant fluorescence decrease indicating calcium transport (Fig. 2C). Under the same conditions, preincubation with 100 nM RuR significantly inhibited such fluorescence

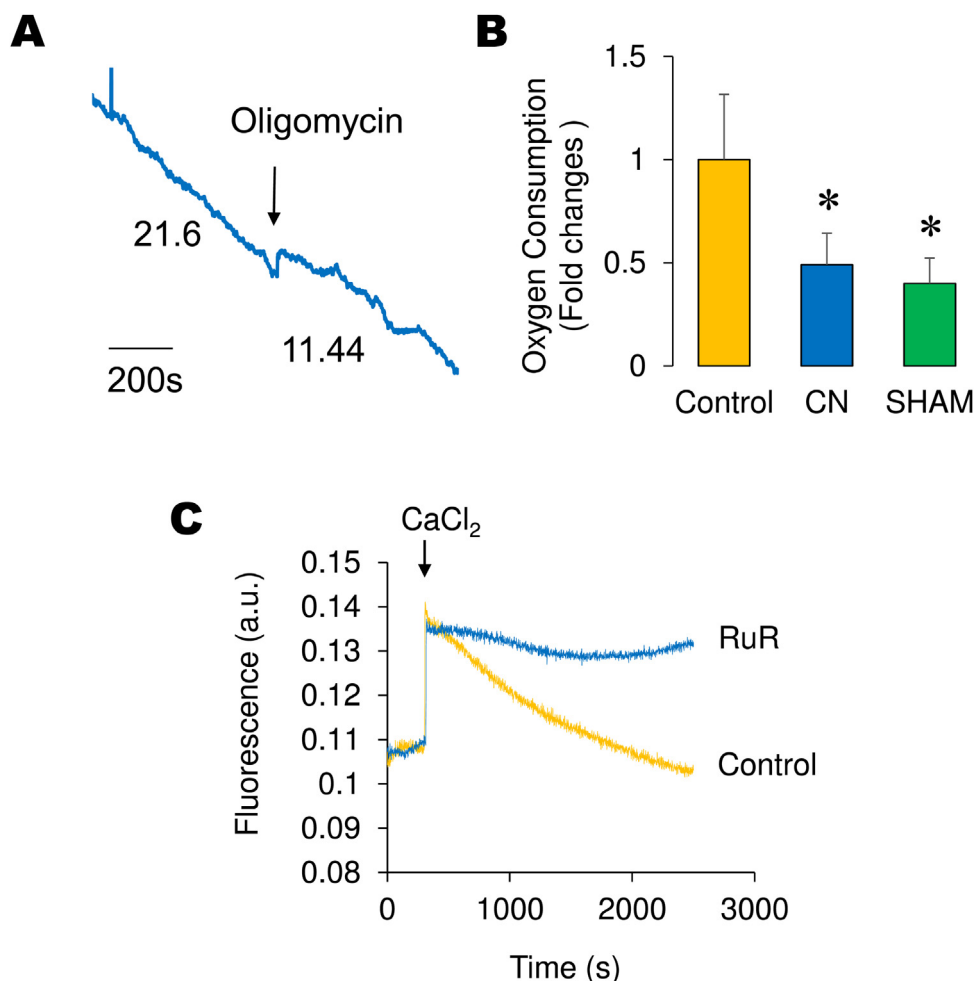


Fig. 2. *In situ* monitoring of oligomycin-sensitive respiration (A), CN- and SHAM-sensitive respiration (B) and RuR-sensitive calcium transport activity in permeabilized pollen tubes (C). Permeabilized pollen tubes were resuspended inside the oxygraph's reaction chamber and state 3 respiration was measured. State 4 respiration was then assessed by adding 2 μg oligomycin (A). Respiration in the absence or presence of cytochrome oxidase inhibitor (cyanide) or alternative oxidase inhibitor (SHAM) was then assessed (B). Data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical evaluation between groups was performed by unpaired t-tests and a P value < 0.05 was considered as criteria of statistical significance against control conditions, as denoted with an asterisk. In (C) calcium transport was assessed either in the absence (control) or presence of 100 nM freshly made RuR. Representative experiments $n = 4$.

decrease, indicating calcium transport blockade. These results indicate the in-situ method is also suitable for assessing mitochondrial respiration and calcium transport in permeabilized pollen tubes.

Funding

This work was supported by a grant from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)IA203419 and UNAM-FQ-PAIP 5000-9171 (to M.G-A.).

References

- [1] P.K. Hepler, J.G. Kunkel, C.M. Rounds, L.J. Winship, Calcium entry into pollen tubes, *Trends Plant Sci.* 17 (2012) 32–38.
- [2] B. Selles, C. Michaud, T.C. Xiong, O. Leblanc, M. Ingouff, Arabidopsis pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex, *New Phytol.* 219 (2018) 58–65.
- [3] E. Teardo, L. Carraretto, S. Wagner, E. Formentin, S. Behera, S. De Bortoli, V. Larosa, P. Fuchs, F. Lo Schiavo, A. Raffaello, R. Rizzuto, A. Costa, M. Schwarzlander, I. Szabo, Physiological characterization of a plant mitochondrial calcium uniporter in vitro and in vivo, *Plant Physiol.* 173 (2017) 1355–1370.
- [4] C. Flores-Herrera, G. Preciado-Linares, I. Gonzalez-Vizueth, N. Corona de la Peña, M. Gutiérrez-Aguilar, In situ assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes, *Protoplasma* 256 (March (2)) (2019) 503–509.