



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del Uniportador de Calcio Mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: Maestra en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Emilia Refugio Gutiérrez Mireles

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Cesar Luis Cuevas Velázquez

Facultad de Química

Dra. Xóchitl Pérez Martínez

Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Diciembre, 2022.



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.

# ÍNDICE

1. Introducción .....	11
1.1 Los iones calcio y su importancia en la fisiología vegetal. ....	11
1.2 Estrés térmico en plantas.....	13
1.3 La metabolómica y su importancia para la comprensión de la fisiología vegetal .....	16
1.4 Las mitocondrias en plantas: estructura y funciones.....	17
1.5 El uniportador de calcio mitocondrial .....	20
2. Hipótesis .....	25
3. Objetivo general.....	25
3.1 Objetivos particulares.....	26
4. Materiales y métodos.....	26
4.1 Material vegetal.....	26
4.2 Pruebas de estratificación en frío .....	27
4.3 Tinción de hojas con JC-1.....	27
4.4 Aislamiento de mitocondrias. ....	28
4.5 Ensayos de transporte de Ca <sup>2+</sup> en mitocondrias.....	29
4.6 Pruebas de estrés térmico en plántulas. ....	29
4.7 Extracción de metabolitos de hojas.....	30
4.8 Análisis estructural bioinformático de MCU y MICU.....	30
4.9 Comparación de estructura secundaria por consenso. ....	31
4.10 Análisis estadístico.....	32
5. Resultados.....	32
5.1 Crecimiento de la cepa Col-0 y AtMICU.....	32
5.2 Determinación del $\Delta\Psi$ en mitocondrias de la cepa AtMICU.....	33

5.3 Evaluación del transporte de calcio en mitocondrias aisladas. ....	34
5.4 Crecimiento de <i>A. thaliana</i> en condiciones de estratificación y no estratificación. ....	35
5.5 Exposición a estrés por calor en plántulas de <i>A. thaliana</i> . ....	36
5.6 Diferencias en el metabolismo de hojas <i>A. thaliana</i> . ....	38
5.7 Modelo tridimensional de MCU ....	43
6. Análisis de resultados. ....	47
7. Conclusiones ....	59
8. Perspectivas ....	59
9. Referencias. ....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Forma y asociación mitocondrial.....	18
<b>Figura 2.</b> Arquitectura del holocomplejo MCU del escarabajo <i>Tribolium castaneum</i> . .....	22
<b>Figura 3.</b> Diferencias en el transporte de Ca <sup>2+</sup> en tubos polínicos permeabilizados de <i>Nicotiana tabacum</i> vs. mitocondrias aisladas de <i>Mus musculus</i> . ....	24
<b>Figura 4.</b> Comparación fenotípica entre las cepas Col-0 y AtMICU.....	32
<b>Figura 5.</b> Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en las cepas Col-0 y AtMICU.....	34
<b>Figura 6.</b> Transporte de Ca <sup>2+</sup> a mitocondrias aisladas de <i>A. thaliana</i> .....	35
<b>Figura 7.</b> Crecimiento de raíces de cepa Col-0 y carente de AtMICU sin estratificación (izquierda) y con un periodo de estratificación a 4°C durante 72 h (derecha) de <i>A. thaliana</i> . ....	35
<b>Figura 8.</b> Cuantificación del tamaño relativo de las raíces de ambas cepas de <i>A. thaliana</i> (Col-0 y AtMICUKO) en condiciones de estratificación y no estratificación. .....	36
<b>Figura 9.</b> Cuantificación del tamaño relativo de las raíces de ambas cepas de <i>A. thaliana</i> (Col-0 y ATMICU) en condiciones de estratificación y sometidas a tres distintas condiciones de temperatura. ....	38
<b>Figura 10.</b> Cambios en el perfil metabolómico de plantas de <i>A. thaliana</i> de la cepa Col-0 versus AtMICU.....	40
<b>Figura 11.</b> Metabolitos que presentan diferencias entre las cepas AtMICU y Col-0 de <i>A. thaliana</i> . ....	41
<b>Figura 12.</b> Modelo obtenido por el programa I-TASSER con los mejores parámetros de C-score y RMSD.....	44
<b>Figura 13.</b> Modelo de AtMICU final con la identificación del dominio DXXE.....	46
<b>Figura 14.</b> Representación gráfica de homotetrámero de AtMCU visualizado con PyMOL. ....	46
<b>Figura 15.</b> Filtro de selectividad o dominio DXXE en AtMCU.. ....	47
<b>Figura 16.</b> Propuesta de perfil metabolómico en hojas de <i>A. thaliana</i> AtMICU. ...	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Metabolitos que presentaron cambios significativos entre hojas de Col-0 y AtMICU.....	42
<b>Tabla 2.</b> Elección de modelo diseñado por I-TASSER y RAPTOR X para cada oligómero de MCU. ....	45

## ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico

ABRC: Arabidopsis Biological Resource Center

ANOVA: Análisis de varianza

AtMCU: Uniportador de calcio mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*

AtMICU: Regulador de uniportador de calcio mitocondrial

AtMICU-KO: Cepa de *A. thaliana* que carece de la subunidad reguladora MICU

CG - MS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

CG: Cromatografía de gases

CML30: Proteína similar a la calmodulina

Col-0: Columbia 0

DID: Dominio de interacción DIME

DIME: Motivo estructural con una secuencia de aminoácidos conservados entre especies

DREB2A: Proteína 2ª de unión a elementos responsables de la deshidratación

EMRE: Regulador esencial de MCU

ETH129: Transportador de ionóforo de calcio II

FC: Razón de cambio

FIA-MS: Espectrometría de masas de infusión directa

FIJI: Fiji Is Just ImageJ

GABA: ácido gamma-aminobutírico

h: horas

HMEC: Células epiteliales mamarias humanas

HPR1: hidroxipiruvato reductasa

HsfA1: Factor de transcripción por calor clase A1

HSF: Factores de transcripción de choque térmico

HSP: Proteínas de choque térmico

LC-MS: Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida

LETM1: Proteína transmembranal 1 que contiene “zipper” de leucina y dominio de mano EF

Mano EF: Dominio estructural de proteínas de tipo hélice-bucle-hélice que se unen a iones calcio

MCU: Uniportador de calcio mitocondrial

MeOH: Metanol

MICU1: Regulador de uniportador de calcio mitocondrial 1

MICU2: Regulador de uniportador de calcio mitocondrial 2

MS: Espectrometría de masas

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Protein Data Bank

PEP: Fosfoenolpiruvato

PFD: Perfluorodecalina

PLS-DA: Análisis Discriminante Mínimo Cuadrados Parciales

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PTP: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

RAI: Red de apoyo a la investigación

RAI: Red de apoyo a la investigación

RMN: Resonancia magnética nuclear

RMSD: Raíz de la desviación cuadrática media

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RuRed: Rojo de rutenio

SA: Ácido salicílico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA: Ciclo del ácido tricarbóxico

TM1: Dominio transmembranal 1

TM2: Dominio transmembranal 2

WT: Cepa silvestre

$\Delta\Psi$ : Potencial transmembranal

## AGRADECIMIENTOS

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 IA208121 “Caracterización del transporte de calcio mitocondrial en la fisiología de *Arabidopsis thaliana*”.

Al apoyo financiero y recursos otorgados para la realización del trabajo experimental por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y LANCAD-UNAM-DGTIC-418.

Al Dr. José Carlos Páez en la Red de apoyo a la Investigación (RAI) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su apoyo y desarrollo para la obtención de los resultados del perfil metabolómico mostrados en el presente proyecto.

Al Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz por su apoyo y orientación en el desarrollo de las técnicas computacionales,

Al M en C. Ulises Martínez Ortega por su orientación en el desarrollo de las técnicas computacionales.

A los miembros del jurado: Dr. José Pedraza Chaverri, Dr. Salvador Uribe Carvajal, Dr. Leonardo Peraza Reyes, Dra. Sobeida Sánchez Nieto y Dr. José de Jesús García Trejo por sus aportaciones y sugerencias al presente proyecto.

## Resumen

Los iones calcio funcionan como segundos mensajeros intracelulares de relevancia en procesos fisiológicos esenciales para las plantas. Este catión es capaz de acoplar estímulos extracelulares con respuestas intracelulares. Para el correcto funcionamiento de la señalización por este catión, es fundamental el control de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol y en los distintos compartimentos subcelulares. Un orgánulo donde comúnmente convergen señales mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  es la mitocondria. En la planta *Arabidopsis thaliana*, el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es mediado por el complejo Uniportador de Calcio Mitocondrial (AtMCU). El complejo AtMCU cuenta con una proteína reguladora llamada AtMICU, la cual se encarga de detectar iones calcio previos al transporte mediado por las subunidades transportadoras del AtMCU. Existen reportes donde las plantas carentes de AtMICU presentan alteraciones en la ultraestructura mitocondrial. Sin embargo, no presentan cambios en su fenotipo como planta madura. Los resultados del presente proyecto confirman que la proteína AtMICU es un modulador negativo del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y que su ausencia ocasiona cambios a nivel metabólico y en el desarrollo de plántulas, lo que podría relacionarse con la ausencia de fenotipo en la planta madura.

# 1. Introducción

## 1.1 Los iones calcio y su importancia en la fisiología vegetal.

En organismos eucariontes, la movilización intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre durante procesos de transducción de señales necesarios para el desarrollo, nutrición y para el control del metabolismo. Estos procesos de señalización también ocurren durante la activación del metabolismo oxidativo y en las diversas respuestas de las plantas ante estímulos de estrés (Boudsocq & Laurière, 2005; Sanders et al., 1999, 2002; Shao et al., 2008; Toyota et al., 2018).

Las plantas regulan constantemente la concentración citoplásmica de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al quelarlo con iones fosfato (Seufferheld & Curzi, 2010) y mediante su transporte a través de distintos compartimentos organelares como el retículo endoplásmico, vacuolas, cloroplastos y mitocondrias (He et al., 2015; Loro et al., 2016). En la naturaleza es común encontrar suelos calcáreos con una gran cantidad de calcio en su composición (White & Broadley, 2003). Este calcio es absorbido por las raíces embebidas en el suelo y llevado al brote a través del xilema mediante transportadores permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . Puede atravesar la raíz a través del citoplasma de las células unidas por pasmodemos (el simplasto) o través de los espacios entre las células (el apoplasto). El movimiento del calcio a través de estas vías debe estar finamente equilibrado para que las células de la raíz emitan señales usando la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ . La vía apoplástica permite que el calcio sea entregado al xilema sin alterar el uso del calcio citosólico para la señalización intracelular mediante la pared celular y el plasmodesmo. Esta vía depende de la transpiración, por lo que podría conducir a variaciones en la cantidad de calcio suministrada a la planta. Además, esta vía no es selectiva entre cationes divalentes y su presencia podría resultar en la acumulación de solutos tóxicos en el brote (White & Broadley, 2003).

La vía simplástica permite que la planta controle la tasa y selectividad del transporte de calcio al brote a través de las membranas celulares. El calcio ingresa al citoplasma de las células endodérmicas a través de canales permeables al calcio

como las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática o  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiportadores de la célula.

Las fluctuaciones en los niveles intracelulares de iones calcio pueden ocurrir en respuesta a estrés abiótico o al haber interacción con algún patógeno. En las plantas, las oscilaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular podrían estar relacionadas con la promoción del metabolismo aeróbico (Teardo et al., 2019; Wagner et al., 2015, 2016). En otras especies, la absorción y transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  intraorganelar permite un flujo constante de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico relevante para procesos fisiológicos clave, como la neurotransmisión y la secreción hormonal (Plovanich et al., 2013). Las plantas también presentan múltiples procesos fisiológicos y patológicos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, las estructuras apicales de los tubos polínicos requieren de un gradiente continuo en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  para su correcta elongación (Damineli et al., 2020). Las plantas también experimentan cambios en los niveles apoplásticos de  $\text{Ca}^{2+}$  posteriores a estímulos en su entorno (por ejemplo, la presencia de un herbívoro), lo cual permite desencadenar una rápida adaptación del organismo (Toyota et al., 2018). En plantas se están comenzando a entender los efectos que ocasionan los cambios en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . En tal sentido, es relativamente poco lo que se sabe de los efectos de estos iones a nivel metabólico y bioenergético (Logan, 2006; Wagner et al., 2015)

En las plantas existe un tránsito dinámico de iones  $\text{Ca}^{2+}$  entre los compartimentos subcelulares, manteniendo los niveles de este catión relativamente estables (Loro et al., 2012). En el lumen del retículo endoplásmico de *A. thaliana*, el aumento en la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  usualmente implica una posterior liberación hacia el citosol, lo que redundaría en la acumulación de este catión en otros compartimentos. Las vacuolas, los cloroplastos y las mitocondrias también pueden almacenar iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Hirschi, 2001). Sin embargo, las vacuolas y el RE son clásicamente reconocidos como los orgánulos con mayor potencial de almacenamiento de este catión.

En el presente proyecto se estudió a la planta *Arabidopsis thaliana*. Este organismo es originario de Europa, Asia y América del Norte, pertenece a la familia Brassicaceae. Al tener una gran versatilidad, su distribución se ha vuelto mundial (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002). Es posible conservar distintas cepas de esta planta en varios repositorios con la finalidad de recapitular estudios ya publicados o de estudiar aspectos de interés en las plantas mutantes disponibles (Tonsor et al., 2005).

## **1.2 Estrés térmico en plantas**

Las plantas están constantemente expuestas a diferentes tipos de estrés abiótico, uno de los cuales es el estrés térmico en condiciones no controladas. Es importante mencionar que las altas temperaturas son un factor de estrés importante que afecta negativamente el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos (Yoshida et al., 2011). Para poder superar el estrés térmico, los distintos organismos montan respuestas adaptativas. Por ejemplo, en las plantas existen vías de señalización para la expresión de proteínas de choque térmico (Charng et al., 2007). Éstas son chaperonas moleculares encargadas de una variedad de procesos intracelulares, tales como el plegamiento y la modulación de la actividad de proteínas, así como su degradación y la prevención de agregación para la protección de los organismos contra el estrés por calor (Charng et al., 2007; Hong & Vierling, 2000; Su & Li, 2008). Dichas proteínas de choque térmico se acumulan durante el calentamiento moderado, además, su aparición tiene relación con la supervivencia del organismo. Sin embargo, existen relativamente pocos informes sobre las probables vías de señalización involucradas en la respuesta al choque térmico, que podrían estar relacionadas en mantener la supervivencia de la planta (Larkindale & Knight, 2002).

El estrés abiótico por bajas temperaturas se clasifica como estrés por frío (temperaturas entre 0°C y 15°C) o estrés por congelación (temperaturas por debajo 0°C). Las plantas de climas templados han desarrollado un ajuste fisiológico llamado “aclimatación al frío” (Ponce-Pineda et al., 2021). En esta aclimatación por frío se adquiere una tolerancia al frío posterior a una exposición a temperaturas bajas, pero

sin congelamiento, para lograr la supervivencia en condiciones de congelamiento. Sin embargo, en el presente proyecto, nos interesa conocer la respuesta a estrés térmico por altas temperaturas (Ponce-Pineda et al., 2021; Thomashow, 1999).

Existen genes que se inducen por estrés por choque térmico y tienen relación en la termotolerancia de la planta. Cuando se acumulan las proteínas de choque térmico (HSP) se ve reflejado en un mecanismo de respuesta a este tipo de estrés abiótico. Los factores de transcripción de choque térmico (HSF) son los encargados de regular la expresión de genes inducibles por choque térmico, incluidas las HSP. Estos factores de transcripción reconocen secuencias consenso “nGAAnnTTCn” o “nTTCnnGAAn”. En las plantas, existen muchos HSF y se ha demostrado que forman redes complejas de regulación. En el caso de *Arabidopsis* existen descritos 21 HSF. Los HSF se dividen en tres clases dependiendo de las características estructurales de sus dominios de oligomerización. Por ejemplo: clase A que posee un motivo ácido en el extremo C-terminal y funciona como activador transcripcional. La clase B que tienen un dominio de represión y actúa como represor transcripcional (Yoshida et al., 2011). En *Arabidopsis*, Yoshida y colaboradores proponen a HsfA1a y HsfA1b como participantes en la expresión génica de respuesta inmediata en el choque térmico. Además, proponen a HsfA2 y a HsfA3 para prolongar la duración de la termotolerancia. El HsfA3 está regulado por la proteína de unión de elementos responsables de la deshidratación 2A (DREB2A), el cual es un factor de transcripción que activa la expresión de genes sensibles a sequía y a choque térmico (Yoshida et al., 2011).

A su vez, las plantas también pueden presentar una termotolerancia adquirida, la cual es la capacidad de hacer frente a altas temperaturas letales después de un periodo de aclimatación en condiciones de temperaturas subletales. Este fenómeno se presenta en forma adicional de su termotolerancia basal (Chen et al., 2006; Hong & Vierling, 2000; Song et al., 2012). Es importante destacar que ambos procesos son diferentes, pues la termotolerancia basal se puede definir como la capacidad innata para sobrevivir en presencia de temperaturas superiores a las óptimas (Silva-Correia et al., 2014). Lo anterior permite a las plantas adquirir termotolerancia y

mantener su crecimiento y desarrollo óptimo (Hong & Vierling, 2000). En el caso de las temperaturas bajas, las plantas también han desarrollado diferentes mecanismos para percibir los cambios de su entorno y activar respuestas de defensa/adaptación rápidas y a largo plazo.

La termotolerancia adquirida se adquiere por la exposición a temperaturas altas breves pero subletales o por aumentos graduales hasta niveles letales, como sucede en condiciones naturales (Silva-Correia et al., 2014; Song et al., 2012).

Para poder evaluar la tolerancia al calor, existen protocolos bien definidos o estandarizados que permiten monitorear cambios en tejidos vegetales posteriores a un estrés térmico. En otras palabras, diferentes laboratorios han desarrollado ensayos para evaluar la respuesta a diferentes temperaturas. Por ejemplo, es común encontrar mediciones de viabilidad, germinación, contenido de clorofila en los cotiledones. En estructuras como raíces, tallos, hipocótilos es posible medir la fuga de iones, acumulación de TBARS y diversas actividades enzimáticas (Silva-Correia et al., 2014; Song et al., 2012; Su & Li, 2008). Aunque existen muchos estudios con semillas, éstos se restringen a su germinación. Sin embargo, se pueden hacer evaluaciones tanto en plántulas tempranas (2.5 días a 10 días) como plántulas tardías (10-25 días) (Silva-Correia et al., 2014).

En condiciones de expresión de proteínas de choque térmico, se han descrito una gran cantidad de cambios en los niveles de segundos mensajeros, entre los cuales destacan:  $Ca^{2+}$ , el ácido salicílico (SA), el ácido abscísico (ABA) y el etileno, entre otros (Knight, 1999; Larkindale & Knight, 2002; Sanders et al., 1999). Existen estudios en los que se han descrito cambios transitorios de  $Ca^{2+}$  en plantas de tabaco al ser expuestas a tratamientos térmicos (Larkindale & Knight, 2002). Además, en plantas como el maíz (*Zea mays*) y *A. thaliana* se observó que en presencia de inhibidores de la calmodulina (proteína reguladora de la señalización de calcio) y de señalización de  $Ca^{2+}$  se limita la supervivencia y se aumenta la fuga de electrolitos de las membranas después de ser sometida al estrés térmico (Gong et al., 1997; Larkindale & Knight, 2002). Otro factor de estrés abiótico en plantas la deshidratación. Las plantas sufren deshidratación en condiciones de alta salinidad

y/o sequía, así como en presencia de temperaturas elevadas. Esto a su vez causa estrés hiperosmótico caracterizado por una disminución de la presión de turgencia y pérdida de agua. La deshidratación desencadena la biosíntesis de ABA, el cual es considerado una hormona que ocasiona cambios para contrarrestar las condiciones de estrés (Boudsocq & Laurière, 2005).

### **1.3 La metabolómica y su importancia para la comprensión de la fisiología vegetal**

Los análisis del perfil de metabolitos son diseñados para cuantificar en forma relativa una serie de moléculas relacionadas con procesos anabólicos y catabólicos a partir de muestras biológicas. Por lo general, las muestras estudiadas pertenecen a tejidos o células animales, vegetales o incluso de microorganismos bajo condiciones control o de estudio (Fiehn, 2006). Esto permite una mejor comprensión de las redes bioquímicas mediante un análisis sistemático y completo del metabolismo. (Fiehn, 2008; Martino et al., 2022).

La metabolómica representa una técnica avanzada que permite obtener datos sobre la concentración de cientos de metabolitos en células, tejidos o en organismos completos. Esta subdisciplina de la bioquímica se apoya en metodologías analíticas basadas en Resonancia Magnética Nuclear, cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS), espectrometría de masas (MS) de infusión directa (FIA-MS) o cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS). Cada una de estas técnicas tienen ventajas y desventajas, dependiendo del conjunto de metabolitos a evaluar, así como de la velocidad de análisis, selectividad, sensibilidad, robustez y repetibilidad (Grata et al., 2008).

La CG-MS es una alternativa poderosa, además de ser una de las herramientas más utilizadas para perfilar metabolitos primarios y secundarios en especies vegetales y no vegetales. Esto facilita la caracterización de funciones genéticas y/o la comprensión de los sistemas celulares en distintos organismos, como las plantas (Fiehn, 2008; Fukushima et al., 2011; Lytovchenko et al., 2009; Wang et al., 2015). Esta técnica es ideal para identificar y cuantificar metabolitos moleculares pequeños (<650 Daltones). Por ejemplo, ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos, azúcares,

ácidos grasos, esteroides, catecolaminas, fármacos y toxinas (Fiehn, 2016). La técnica de CG-MS facilita la identificación y cuantificación robusta de cientos de metabolitos en un extracto de plantas, dando un amplio panorama de las vías centrales del metabolismo primario (Lisec et al., 2006).

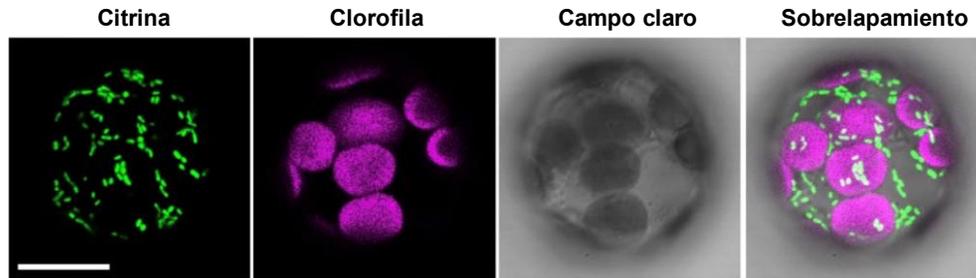
La metabolómica ha sido exitosamente acoplada a herramientas bioinformáticas que permiten agrupar metabolitos detectados en mayor o menor proporción con respecto a un control, en función de sus características químicas (carbohidratos, aminoácidos, alfa cetoácidos, etc.) e incluso permite trazar vías metabólicas utilizando metabolitos marcados con isótopos radioactivos o estables (Martino et al., 2022). Los cambios en el metaboloma son muy evidentes cuando existen fluctuaciones fisiopatológicas en las condiciones biológicas. Dichos cambios son los que nos dan información sobre el sistema estudiado. Por ejemplo, dos plantas en un mismo fondo genético, pero sometidas a distintas condiciones ambientales (Kusano et al., 2007).

Actualmente se han realizado muchas mejoras para la identificación del perfil de metabolitos de distintas plantas, con el fin de abordar problemas biológicos. En la agricultura se ha implementado esta herramienta con distintos fines. Por ejemplo, en el entendimiento del modo de acción de herbicidas en plántulas de cebada, el estudio de las etapas de maduración del fruto del tomate, así como en la identificación de genotipos de plantas modelo, como *A. thaliana* (Roessner-Tunali et al., 2003). Es importante destacar que el metabolismo es muy extenso y está orquestado por muchos componentes a su vez. Por ejemplo, hay procesos metabólicos de sistemas vegetales que dependen de la regulación y transporte de cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria (Larkindale & Knight, 2002; Lee et al., 2021).

#### **1.4 Las mitocondrias en plantas: estructura y funciones**

Las mitocondrias son orgánulos que han sido ampliamente estudiados en los distintos eucariontes. Sus orígenes son tema de múltiples estudios, pero el gran consenso indica que estos orgánulos se originaron a partir de un proceso de endosimbiosis entre una célula eucarionte ancestral y una alfa-proteo bacteria

(Raval et al., 2022; Sagan, 1967). En cada organismo perteneciente al dominio eucarionte, las mitocondrias presentan múltiples similitudes que facilitan su detección y estudio. En las plantas, las mitocondrias forman estructuras no reticuladas con morfología reminiscente de su probable pasado bacteriano. Miden entre 1 y 4  $\mu\text{m}$  de longitud y se asocian firmemente a los cloroplastos (Fig. 1) (Oikawa et al., 2021).



**Figura 1.** Forma y asociación mitocondrial. En plantas, las mitocondrias no forman estructuras reticuladas (verde) y asemejan bacterias intracelulares que interaccionan con los cloroplastos (morado). Imagen tomada de un protoplasto aislado de *A. thaliana* con sobreexpresión de la proteína citrine con localización mitocondrial. Imagen tomada de Oikawa et al., 2021.

Las mitocondrias están conformadas por una membrana externa y una membrana interna con un sistema de estructuras proteicas (de Bortoli et al., 2016; Frey & Mannella, 2000). La membrana externa envuelve por completo a estos organelos y funciona como frontera exterior. Esta membrana contiene proteínas transportadoras con múltiples funciones. Por ejemplo, proteínas integrales tipo barril  $\beta$  que forman canales poco selectivos -que permiten el transporte de moléculas menores a 5 kDa- con una ligera preferencia aniónica como el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC1). Entre las demás funciones de VDAC1 se encuentra el transporte de nucleótidos (ATP/ADP y NADH/NAD) y metabolitos (el piruvato, el malato y el succinato). Tiene la capacidad de transportar iones metálicos como el  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . (Shoshan-Barmatz et al., 2019). La membrana interna se sitúa en algunos puntos en forma paralela a la membrana externa. En otros presenta pliegues profundos o invaginaciones llamadas crestas mitocondriales que pueden estar ramificadas o fusionadas (Frey & Mannella, 2000; Plecítá-Hlavatá & Ježek, 2016). La ultramorfología de las crestas mitocondriales refleja varios estados metabólicos,

fisiológicos y patológicos (Plecitá-Hlavatá & Ježek, 2016). Embebidas en las crestas se encuentran las proteínas de la cadena respiratoria, la succinato deshidrogenasa del ciclo de Krebs, fosfolípidos como la cardiolipina y la ATP sintasa, entre otras proteínas. Esta membrana es altamente impermeable, por lo que requiere de transportadores y específicos para que ciertas moléculas y iones tengan acceso a la matriz mitocondrial (Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2013). Dicho lo anterior, es importante destacar que la composición y organización de la membrana interna es la clave para la actividad bioenergética mitocondrial.

Un aumento en el almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias se ha relacionado con el colapso en múltiples funciones de estos orgánulos, además de la posterior permeabilización de la membrana interna generando lesión celular y tisular (Nakagawa et al., 2005). Otro factor importante que puede ocasionar esta acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que hay evidencia de que existe una sinergia con el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Csordás et al., 2013a). En otras palabras, si la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico y mitocondrial aumentan repentinamente, se compromete la integridad de la función mitocondrial, la cual podría desencadenar en la muerte celular (Plovanich et al., 2013; Uribe-Carvajal et al., 2011). Existe evidencia que indica que, en condiciones de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial y otros factores como el estrés oxidante, se activa un poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (Bround et al., 2020). La apertura de este poro ocasiona un colapso en el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y un posterior hinchamiento de los organelos y la ruptura de la membrana externa (Baines y Gutiérrez-Aguilar, 2018; Csordás et al., 2013a; Nakagawa et al., 2005). El potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) se genera por las bombas de protones provenientes de los complejos I, III y IV de la cadena transportadora de electrones. El  $\Delta\Psi$  es un componente esencial en el almacenamiento de la energía. Los niveles de ATP y de  $\Delta\Psi_m$  mantienen estable a la célula aún con pequeñas fluctuaciones limitadas reflejado de la fisiología normal. Los cambios en el  $\Delta\Psi_m$  y niveles de ATP pueden ser perjudiciales, pues un desequilibrio ocasiona la pérdida de la viabilidad celular (Mitchell, 1966; Zorova et al., 2018).

Sin embargo, se conoce muy poco sobre cómo es que las plantas pueden tener una estructura de esta naturaleza y cómo es que el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a las mitocondrias de estos organismos (Gutiérrez-Aguilar, 2020). Al respecto, De Col y colegas han reportado que el transporte mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  es considerablemente lento en mitocondrias aisladas de *Pisum sativum* (de Col et al., 2018). Sin embargo, al adicionar el ionóforo de calcio ETH129 (transportador de ionóforo de calcio II), la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  presenta similitudes con la registrada en mitocondrias de mamíferos. En paralelo, se han descubierto proteínas de membrana interna mitocondrial que reconocen e interaccionan con iones  $\text{Ca}^{2+}$ , como la proteína EF-hand LETM1 (Proteína transmembranal 1 que contiene “zipper” de leucina y dominio de mano EF) (Zhang et al., 2012), la proteína similar a la calmodulina (CML30) (Chigri et al., 2012) y un receptor ionotrópico a (De Bortoli et al., 2016). Actualmente, con el desarrollo de nuevas tecnologías es posible mapear los sitios donde existe una probabilidad alta de encontrar dominios con capacidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Wagner et al., 2015; C. Wang, Baradaran, et al., 2020).

### **1.5 El uniportador de calcio mitocondrial**

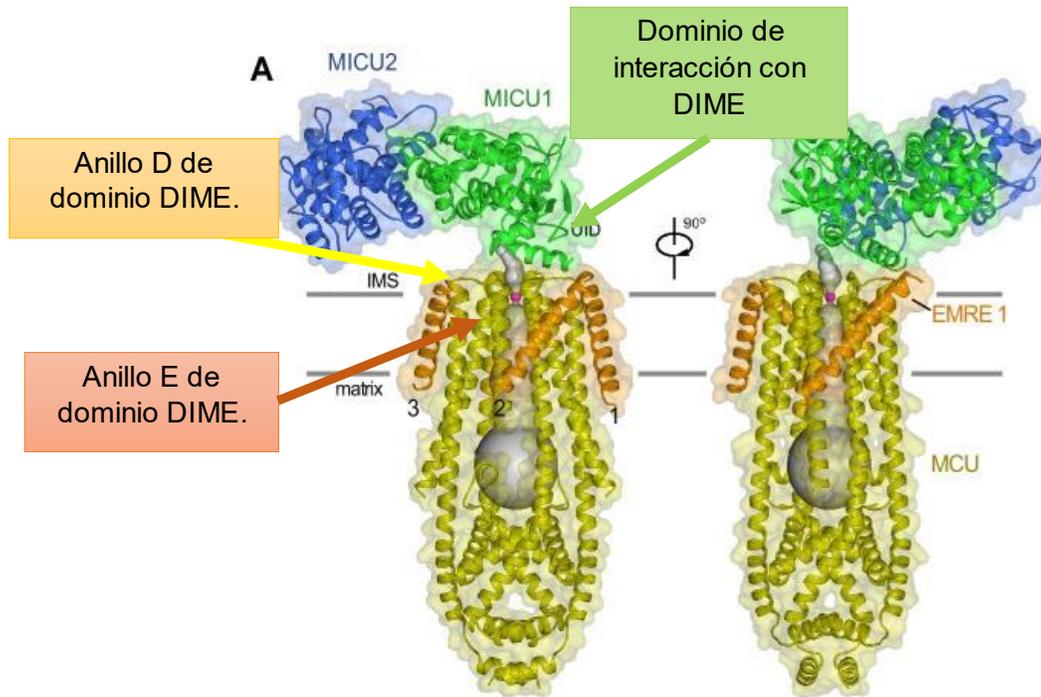
En diversas especies se ha documentado la existencia de un transportador selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  reportado como el complejo Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU) (Bick et al., 2012a; Feno et al., 2021). Algunas características del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial mediado por MCU en mamíferos son:

- 1) Mecanismo de transporte electroforético y selectivo.
- 2) Sensibilidad al rojo de rutenio y derivados.
- 3) Dependencia del potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ).

En los mamíferos, el complejo MCU es un canal altamente selectivo, ubicado en la membrana interna mitocondrial con la capacidad de controlar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la mitocondria, respondiendo a señales citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  y participando en la regulación del metabolismo celular (Feno et al., 2021). En mamíferos, MCU se activa cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico alcanza un umbral de 0.4 -3  $\mu\text{M}$ . Esta captación del ion por el MCU es también impulsada por el potencial eléctrico de la matriz mitocondrial ( $\sim -180$  mV) en relación con el citosol, establecido por el

gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La selectividad antes mencionada requiere una fina regulación para evitar la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, manteniendo así la fuerza protón-motriz utilizada para la generación de ATP (Wang, Baradaran, et al., 2020).

En mamíferos, las subunidades encargadas de codificar el poro de transporte mediado por MCUc son las subunidades “canal” MCU y MCUb. La primera subunidad forma oligómeros (tetrámeros) en la membrana mitocondrial interna, interactuando con las subunidades reguladoras MICU1, MICU2 y EMRE que residen dentro de un complejo de gran peso molecular y es un conocido activador del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2) (Baughman et al., 2011; Oxenoid et al., 2016; Paillard et al., 2018; Wagner et al., 2015). Tanto MCU, como MICU1 y MICU2 residen dentro del complejo multiprotéico, el cual es tejido-dependiente, y estabilizan de forma cruzada la expresión proteica de cada subunidad formadora del complejo (Paillard et al., 2018; Plovanich et al., 2013). El gen de MICU1 es parte de una familia de genes duplicados encontrados en metazoarios, plantas, protozoarios y algunos hongos (Bick et al., 2012a). La subunidad MICU se encuentra asociada a MCU del lado del espacio intermembranal mitocondrial y, debido a que contiene motivos de mano EF en su estructura, tiene la capacidad de detectar cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  -pues en condiciones de reposo- la concentración del catión es de aproximadamente 100 nM. Es decir, a esa concentración mantendrá bloqueado el transporte del catión a través del canal (Wang, Jacewicz, et al., 2020).



**Figura 2.** Arquitectura del holocomplejo MCU del escarabajo *Tribolium castaneum*. En color violeta se representa un ion  $\text{Ca}^{2+}$  entrando en la cavidad o poro formado por el anillo D. En la imagen se pueden apreciar las subunidades reguladoras MICU y EMRE, las cuales interactúan con MCU, además de la zona donde pasa el catión (gris). Imagen tomada de Wang et al, 2020.

Estructuralmente, MCU se compone de dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) donde los extremos N y C están expuestos a la matriz mitocondrial. Estos dominios transmembranales son candidatos a interactuar con proteínas en el espacio intermembranal, como por ejemplo con MICU1 (Wang, Jacewicz, et al., 2020). Con ayuda de estudios bioinformáticos y herramientas de interacción molecular se identificó que el dominio con la capacidad de interacción está formado por la secuencia de aminoácidos DIME (DXXE dependiendo de los aminoácidos en la secuencia variante entre especies, pero con D y E conservadas) localizada en las posiciones D261 y E264 en mamíferos y que funciona como filtro de selectividad iónica (Paillard et al., 2018; Wang, Baradaran, et al., 2020; Wang, Jacewicz, et al., 2020).

Los residuos D261 y E264 de este motivo forman dos anillos de aminoácidos ácidos que recubren el poro del canal y pueden coordinar  $\text{Ca}^{2+}$  a través del  $\text{H}_2\text{O}$  en el medio

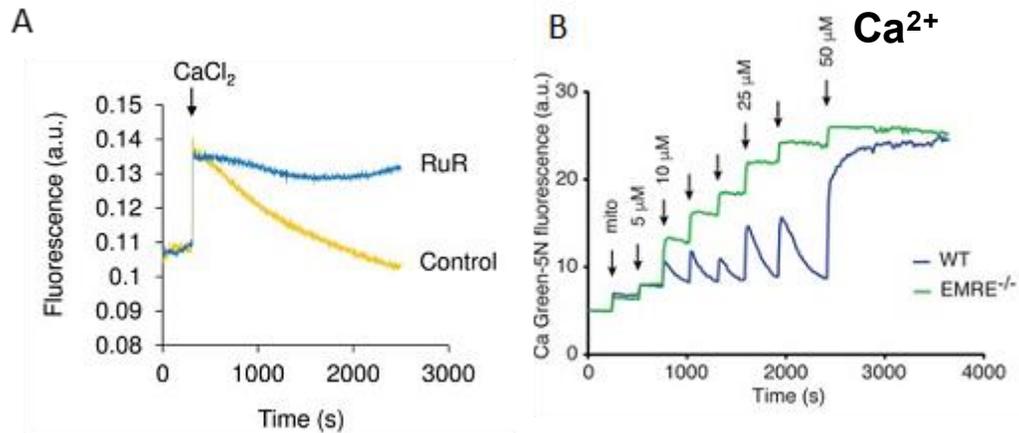
(anillo D) o por interacciones directas (anillo E) (Fig. 2) (Wang, Jacewicz, et al., 2020). La conformación del anillo E se estabiliza por residuos conservados en MCU: triptófano (W) y prolina (P) contiguos a DIME (WDXXEP). El anillo D está conformado de aminoácidos ácidos que comprende D261 de cada subunidad y se localiza por encima del anillo E en el extremo del espacio intermembranal de TM2 (Wang, Baradaran, et al., 2020).

Una vez que se estableció la necesidad de la interacción entre MICU1 y el dominio DIME de MCU, se identificó el dominio de interacción DIME (DID) en MICU1, conformado por las argininas R440 y R443, pues forman un puente salino con el anillo D de MCU. Estudios realizados por Paillard y colaboradores en el 2018 demostraron que el DID en MICU1 es necesario para controlar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  además de controlar la sensibilidad por Rojo de Rutenio (RuRed) al competir por la interacción con el dominio DIME de MCU (Paillard et al., 2018). Los experimentos de Paillard y colaboradores aportaron evidencia molecular que sugiere que el MCU es sensible a derivados de rutenio a nivel del anillo D del filtro de selectividad de MCU interaccionando con los aminoácidos DIME (Paillard et al., 2018).

Por lo tanto, en términos generales MICU1 interactúa con MCU de tres formas importantes: la dimerización con MICU2, la activación al interaccionar EMRE y con MCU a través del DID. Procesos importantes para el control del complejo MCU y a grandes rasgos, para la supervivencia celular (Paillard et al., 2018; C. Wang, Jacewicz, et al., 2020).

De acuerdo con algunos autores, al realizar un análisis filogenético se puede concluir que la presencia de MCU y MICU1 son características de las primeras mitocondrias, ya que es posible encontrar a estas subunidades en todos los taxones eucariotas principales, con pérdidas específicas entre linajes (Sancak et al., 2013), e incluso en algunas bacterias (Bick et al., 2012b). Actualmente hay diversos estudios sobre el papel de MCU y MICU1 en los mamíferos. Sin embargo, en las plantas solamente existe un estudio publicado sobre el impacto de MICU a nivel fisiológico (Wagner et al., 2015).

En plantas, el holocomplejo MCU cuenta con menos proteínas reguladoras encargadas de establecer el umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  al cual se activa el transporte. Un ejemplo de esto es la ausencia de la proteína EMRE en plantas (Gutiérrez-Aguilar, 2020). Esto podría explicar las diferencias sustanciales en términos de la cinética de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  entre plantas y mamíferos y la generación de un fenotipo similar al de plantas en ratones mutantes carentes de la proteína EMRE (Fig. 3).



**Figura 3.** Diferencias en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en tubos polínicos permeabilizados de *Nicotiana tabacum* vs. mitocondrias aisladas de *Mus musculus*. (A) El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en plantas presenta características cinéticas lentas y es sensible a RuRed. (B) En mitocondrias silvestres de ratón (WT), el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  es rápido y posteriormente el catión es liberado. En mitocondrias carentes de la proteína EMRE (EMRE<sup>-/-</sup>) el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  recapitula al observado en modelos vegetales en términos de su cinética. Imágenes tomadas de Ortíz-Jiménez et al., 2019 (A) y Liu y cols 2020 (B).

En *Arabidopsis thaliana* existen 6 isoformas de la proteína MCU las cuales se expresan diferencialmente. Por ejemplo, el grupo de Szabó ha estudiado dos isoformas de MCU en *A. thaliana*, de las cuales una se expresa predominantemente en raíces (AtMCU1) y otra en cloroplastos (AtMCU6) (Teardo et al., 2019). Selles y colaboradores, por otro lado, reportaron la importancia de AtMCU2 en la germinación de los tubos polínicos (Selles et al., 2018a). Recientemente, el grupo de Schwarzländer generó una cepa de *A. thaliana* mutante carente de las isoformas AtMCU1, 2 y 3 (Ruberti et al., 2022). Las plantas con esta triple mutación presentaron una disminución sustancial en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en raíces y mostraron alteraciones en vías de señalización mediadas por ácido

jasmónico y un fenotipo tigmomorfogénico (modificaciones en el desarrollo). De las isoformas restantes se desconoce su patrón de expresión y/o función ya que no existen estudios publicados al respecto.

En cuanto a las subunidades reguladoras de la proteína formadora del canal MCU en *A. thaliana*, sólo se tiene conocimiento de la interacción con la proteína reguladora AtMICU (Wagner et al., 2015). Las plantas carentes de esta proteína presentan distorsiones en la ultraestructura de sus mitocondrias y defectos en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a pesar de no presentar un fenotipo obvio en cuanto a la morfología macroscópica de las plantas mutantes (Flores-Herrera et al., 2019; Gutiérrez-Aguilar, 2020; Wagner et al., 2015). Experimentos de nuestro laboratorio indican que los protoplastos obtenidos de plantas carentes de AtMICU presentan una velocidad significativamente mayor en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  exógeno (López-Aquino, 2021). Adicionalmente se ha visto que las plantas mutantes son más sensibles a periodos de estrés biótico y por estas razones, en el presente trabajo de tesis se decidió estudiar más a fondo las plantas carentes de AtMICU.

## **2. Hipótesis**

Si la eliminación de la subunidad reguladora del complejo uniportador de calcio mitocondrial AtMICU altera la dinámica de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, entonces las plantas carentes de esta proteína presentarán cambios fenotípicos significativos en condiciones basales o en respuesta a estrés abiótico.

## **3. Objetivo general**

- Determinar los efectos de la manipulación genética de la subunidad reguladora AtMICU en la planta *A. thaliana* utilizando análisis fenotípicos, metabólicos y computacionales.

### 3.1 Objetivos particulares

- Evaluar diferencias fenotípicas entre el ecotipo silvestre y mutante carente de AtMICU de *A. thaliana*.
- Evaluar si las mitocondrias de la cepa silvestre y mutante de AtMICU (AtMICU-KO) mantienen un potencial de membrana estable.
- Determinar la velocidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias purificadas de ambas cepas.
- Evaluar la diferencia de crecimiento entre el ecotipo silvestre y mutante carente de AtMICU de *A. thaliana* en condiciones de estratificación en frío de semillas.
- Determinar probables diferencias en el metaboloma de hojas de la cepa Col-0 con respecto a la cepa AtMICU.
- Modelar con ayuda de herramientas bioinformáticas las subunidades que comprenden el holocomplejo de AtMCU1: monómero de AtMICU y oligómero de AtMCU1.
- Modelar con ayuda de herramientas bioinformáticas el holocomplejo MCU de *A. thaliana*.
- Obtener un modelo del holocomplejo de AtMCU que permita estudiar la dinámica de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia y ausencia de AtMICU.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* del ecotipo Col-0 proporcionada amablemente por la Dra. Sobeida Sánchez Nieto de la Facultad de Química, UNAM y la planta del mismo ecotipo, mutante isogénica carente del gen AT4G32060 que codifica para la proteína AtMICU (AtMICU) obtenida del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) de la Ohio State University con el código de germoplasma SALK\_064052C. Los genotipos de ambas cepas fueron confirmados por PCR usando

oligonucleótidos específicos y en condiciones descritas en la literatura (Wagner et al., 2015).

Las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % y Tween-20 al 0.1 % durante 10 minutos, se realizaron 3 lavados con agua estéril y se sembraron en placas Petri con medio MS, al 2 % de agar y suplementado con 2 % de sacarosa durante 3 a 4 semanas, transfiriendo a una cámara de crecimiento a  $22 \pm 0.5$  °C con fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad.

Las plántulas se cultivaron en una mezcla 3:1:1 en Sunshine mix #3, agrolita y vermiculita (Pedroza-García et al., 2014). Se realizó un seguimiento diario de los germinados para evitar la presencia de contaminantes.

#### **4.2 Pruebas de estratificación en frío**

Para determinar el efecto de la estratificación en frío en el crecimiento de raíces de ambas cepas, se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito para su siembra en medio MS. Posteriormente se colocaron las cajas en refrigeración (4°C) durante la noche. Al terminar el periodo en frío, se transfirieron a una cámara de crecimiento a  $22 \pm 0.5$  °C con fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad.

Las cajas fueron monitoreadas durante dos semanas para evitar la presencia de contaminantes y se tomaron muestreos fotográficos para poder evaluar la longitud de las raíces usando el software FIJI (“Fiji Is Just ImageJ”).

#### **4.3 Tinción de hojas con JC-1.**

Una vez que las hojas de *A. thaliana* de la cepa Col-0 y AtMICU contaban con 3 semanas de edad posterior a su trasplante en sustrato, agrolita y vermiculita, se tomó una hoja verdadera de aproximadamente 0.5 cm. Con ayuda de cinta adhesiva, se removió la epidermis con sumo cuidado. La cinta adhesiva que contiene el mesófilo (verde oscuro), se introdujo en un microtubo con 1 mL de amortiguador para tinción de hojas (330 mM Manitol, 0.1 Mm EDTA, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris pH 6.8), con la finalidad de mantenerla en solución. Posteriormente se adicionó el fluorocromo JC-1 hasta tener una concentración final de 20  $\mu\text{M}$ . Se colocaron los tubos abiertos en una cámara de vacío durante 1 minuto, para

después ser trasladados a agitación a 60 rpm durante 30 minutos, ambos periodos en ausencia de luz (Flores-Herrera et al., 2021).

Transcurrido ese tiempo y con cuidado de no dañar la hoja, se realizaron lavados sucesivos con el mismo amortiguador para tinción de hojas hasta remover lo más posible del fluorocromo. Una vez limpia la muestra, se adicionaron 100  $\mu$ L de perfluorodecalina (PFD) y se dejó en reposo durante 3 minutos. Con pinzas, se colocaron los mesófilos en portaobjetos y se recubrieron con PFD, se taparon con un cubreobjetos y sellaron con barniz de uñas, asegurando no dejar burbujas de aire en el interior.

Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal, usando una fuente de luz de excitación a 488 nm y registrando cambios en la emisión a 530nm para mitocondrias que no tienen un  $\Delta\Psi$  estable y 590 nm para mitocondrias con un  $\Delta\Psi$  estable (Flores-Herrera et al., 2021).

#### **4.4 Aislamiento de mitocondrias.**

Se utilizaron hojas de plantas de *A. thaliana* de la cepa Col-0 y AtMICU de 3 semanas de edad posterior a su traslado a sustrato, vermiculita y agrolita. Todo el procedimiento descrito a continuación se hizo a 4°C, tanto en los amortiguadores como el instrumental utilizado, evitando calentar el material vegetal.

Se cortaron 0.5 g de hojas verdaderas. Se trasladaron a un mortero y se adicionó 3 mL de amortiguador de homogeneización (0.3 M manitol, 60 mM tris, 10 mM EDTA, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM glicina, 50 mM ascorbato de sodio, pH-(KOH) 8.0 y 1 mM PMSF) y se trituraron hasta obtener una mezcla. El extracto se filtró con tela Miracloth y se centrifugó a 2500 g durante 5 minutos a 4°C, con la finalidad de remover los cloroplastos y los tilacoides. El sobrenadante fue transferido a nuevos microtubos y centrifugados a 15000 g por 15 minutos. El precipitado obtenido fue resuspendido en amortiguador de lavado A (0.3 M manitol, 20 mM Tris, 2mM EDTA, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH-(KOH) 7.5) y centrifugado a 15000 g durante 15 minutos. Posteriormente se removió el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con amortiguador de lavado B (0.3 M manitol, 20 mM Tris, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH-(KOH)

7.5) y concentrado en un solo tubo, se centrifugó a 15000 *g* por 15 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ L de amortiguador de lavado B. Se determinó su concentración en un equipo BioDrop® en A280 nm.

#### **4.5 Ensayos de transporte de Ca<sup>2+</sup> en mitocondrias.**

Para evaluar el transporte de Ca<sup>2+</sup> en mitocondrias, se utilizó un método cuantitativo utilizando la sonda Calcium Green-5N mediante la detección de cambios en la fluorescencia con un mini fluorómetro Go Direct® SpectroVis® Plus Spectrophotometer (Vernier Software & Technology) ajustado a 530 nm (Gutiérrez-Aguilar et al., 2014).

En una celda de plástico en agitación constante se adicionaron c. b. p. 1000  $\mu$ L de amortiguador de lavado B, 4 mM glutamato, 100  $\mu$ g de mitocondrias previamente aisladas, 2  $\mu$ M Calcium Green-5N y se corrió el ensayo. Una vez estabilizado, a los 200 segundos se adicionó 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>. Finalmente, a los 3000 segundos se detuvo el ensayo y se capturaron los datos obtenidos para su posterior tratamiento.

#### **4.6 Pruebas de estrés térmico en plántulas.**

Posterior al lavado y siembra de semillas en cajas de Petri con medio MS adicionado con sacarosa al 1 %, se sometieron 4 cajas divididas a la mitad, con *A. thaliana* Col-0 y AtMICU de una semana de edad a distintos retos de estrés térmico:

Grupo 1: Caja con plántulas Col-0 y AtMICU a 37°C durante 3 horas en ausencia de luz.

Grupo 2: Caja con plántulas Col-0 y AtMICU a 45°C durante 2 horas en ausencia de luz.

Grupo 3: Caja con plántulas Col-0 y AtMICU a 37°C durante 3 horas en ausencia de luz + 30 minutos a 22°C en presencia de luz + 45 °C por 2 horas en ausencia de luz.

Grupo 4: Caja control con plántulas Col-0 y AtMICU a 22°C.

Una vez sometidas a reto de estrés térmico, las plántulas fueron incubadas en condiciones normales ( $22 \pm 0.5$  °C) con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, para ser monitoreadas durante 7 días con muestreo fotográfico y evaluar la longitud de las raíces usando el software FIJI.

#### **4.7 Extracción de metabolitos de hojas.**

Se utilizaron hojas de plantas de *A. thaliana* estratificadas de la cepa Col-0 y AtMICU de 3 semanas de edad posterior a su traslado a sustrato con vermiculita y agrolita. Todo el procedimiento descrito a continuación se hizo en frío, cuidando mantener la mezcla de disolventes MeOH: H<sub>2</sub>O (4:1 v/v) y el instrumental a -20°C antes de ser utilizado.

Se cortaron 0.16 g de hojas de ambas cepas por ensayo y por separado, posteriormente se trituraron en un mortero, adicionando 2 mL de la mezcla MeOH: H<sub>2</sub>O, se trasladaron a microtubos y centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue trasladado a nuevos microtubos fríos y conservados a -70°C hasta su tratamiento. El tratamiento que corresponde a CG-MS fue realizado en colaboración con el Dr. José Carlos Páez en la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Páez-Franco et al., 2022).

#### **4.8 Análisis estructural bioinformático de MCU y MICU.**

Se obtuvo la secuencia correspondiente al gen *AtMCU* que codifica para MCU descrita en *A. thaliana*, con el código AT1G09575 o ID 837484. Con ayuda de distintos servidores para distintos fines, se construyó un modelo probable de la estructura terciaria para AtMCU, los cuales fueron:

- Modelado por homología: Servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)
- Modelo por enhebrado de proteínas: servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) de la Universidad de Michigan.

- Modelado *ab initio*: Servidor RaptorX  
<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/>
- Herramientas suplementarias para la construcción de las secciones de carboxilo terminal: Servidor GalaxyWEB/GalaxyHomomer  
<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=HOMOMER>
- Visualización de modelos: PyMOL Molecular Graphics System.

#### 4.9 Comparación de estructura secundaria por consenso.

Con ayuda de las siguientes plataformas se realizó un análisis de estructura secundaria, con la que se obtuvo un modelo consenso:

Jufo9D ([http://www.meilerlab.org/index.php/servers/show?s\\_id=5](http://www.meilerlab.org/index.php/servers/show?s_id=5)),

GOR (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/GOR/>),

Porter (<http://distillf.ucd.ie/porterpaleale/quickhelp.html>),

PredictPROTEIN (<https://predictprotein.org/>),

PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>),

Scratch (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>),

Scratch8 (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>),

MINNOU (<https://minnou.cchmc.org/>),

SABLE (<https://sable.cchmc.org/>),

CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>),

I-TASSER (<https://zhanglab.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>),

HNNC, SOPM, DSC, SIMPA96, MLRC, PHD, PREDATOR y DPM (Double Prediction Method) fueron obtenidos de la misma página ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_seccons.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html)).

#### 4.10 Análisis estadístico

Para comparar dos condiciones experimentales, se utilizaron pruebas t de Student. Para evaluar el efecto de variables físicas y genéticas, se utilizaron análisis de varianza (ANOVA). En este último caso, las probables diferencias estadísticas se obtuvieron por múltiples comparaciones utilizando el test de Tukey. Para los análisis tipo mapa de calor, de componentes principales y de cúmulos jerárquicos, los datos fueron normalizados. Éstos fueron procesados utilizando los programas Metaboanalyst 4.0 y Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Para todos los experimentos se consideró un valor de  $p < 0.05$  como indicativo de significancia.

### 5. Resultados

#### 5.1 Crecimiento de la cepa Col-0 y AtMICU.

Para corroborar estudios previos sobre el efecto de la ausencia de la proteína AtMICU en las plantas, se decidió crecer *A. thaliana*. Al cumplir 3 semanas de edad posteriores a su traslado a un sustrato con agrolita y vermiculita no se observaron diferencias morfológicas en el tamaño, color o forma de las hojas entre las cepas Col-0 y AtMICU (Fig. 4).



**Figura 4.** Comparación fenotípica entre las cepas Col-0 y AtMICU. Las plantas Col-0 y AtMICU-KO

presentan el mismo fenotipo a las 3 semanas de edad posterior a ser trasladadas a sustrato con agrolita y vermiculita.

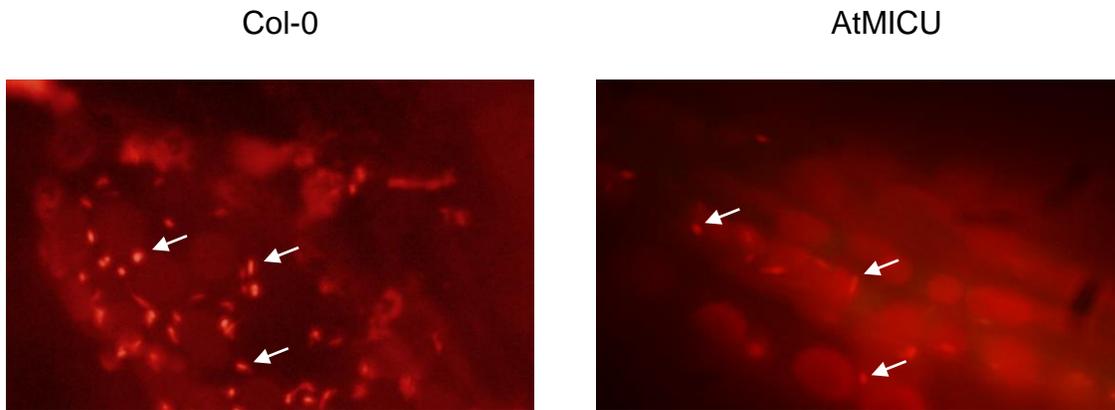
Los resultados de la Fig. 4 demuestran que las plantas Col-0 y AtMICU presentan características morfológicas similares a las reportadas por Wagner y cols., 2015.

## **5.2 Determinación del $\Delta\Psi$ en mitocondrias de la cepa AtMICU**

Para conocer si existían diferencias en el estado del potencial de la membrana mitocondrial *in situ*, entre las plantas silvestres y las mutantes que carecen de AtMICU, se utilizó una adaptación a metodologías existentes en las que se emplea un agente de infiltración llamado PFD. Esto con el objetivo de mejorar las imágenes del mesófilo al microscopio sin dañar el tejido, aunado a la mejora de la resolución de la imagen obtenida (Flores-Herrera et al., 2021; Littlejohn et al., 2010; Littlejohn & Love, 2012).

Además, se empleó la sonda catiónica JC-1, que actúa como indicador del grado de polarización de las mitocondrias. Cuando el JC-1 forma agregados emite a una longitud de 590 nm (color rojo), indicando que las mitocondrias cuentan con un  $\Delta\Psi$  estable. Por otro lado, si no se forman agregados, emite una señal a 527 nm (verde) indicando que las mitocondrias ya no tienen un  $\Delta\Psi$  estable.

Al observar el mesófilo de hojas de *A. thaliana* de la cepa Col-0 al microscopio de fluorescencia (Fig. 5), se ven corpúsculos que emiten a 590 nm adyacentes a los cloroplastos (de mayor tamaño), lo que indica que las mitocondrias de las plantas Col-0 tiene un potencial transmembranal. Por otro lado, al observar el mesófilo de hojas de *A. thaliana* de la cepa AtMICU fueron localizados los mismos corpúsculos, indicando que presentan un potencial de membrana elevado y estable (Fig. 5). Lo cual no había sido reportado por Wagner y colaboradores.

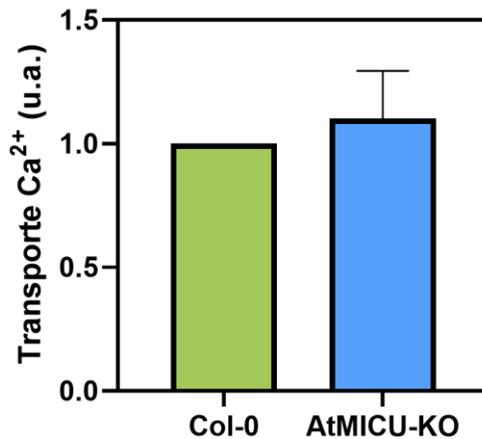


**Figura 5.** Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en las cepas Col-0 y AtMICU. La epidermis de las hojas Col-0 presenta corpúsculos rojos de dimensiones consistentes con las de mitocondrias al adicionar la sonda catiónica JC-1, adyacentes a los cloroplastos. N=2.

### 5.3 Evaluación del transporte de calcio en mitocondrias aisladas.

Para la comparación del transporte de calcio *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  usando la sonda Calcium Green-5N sobre las mitocondrias aisladas de las plantas control y las mutantes AtMICU (Flores-Herrera et al., 2019). El Calcium Green 5N incrementa su emisión al ser irradiado con luz a 500 nm en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Su constante de afinidad por el catión divalente es  $\sim 4.3 \mu\text{M}$  (Rajdev & Reynolds, 1993). En forma adicional, este compuesto no es permeable a través de membranas y por esta razón permite medir cambios en la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a su transporte a través de compartimentos subcelulares. Inicialmente se observó una línea basal en los primeros 300 s. Posteriormente se adicionó un pulso de  $100 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  y se observó un aumento en la señal de fluorescencia, indicando que el Calcium Green-5N se está uniendo a  $\text{Ca}^{2+}$ . Al seguir monitoreando el comportamiento de la preparación, se observó que la fluorescencia disminuyó con respecto al tiempo, lo que indicó que el catión se estaba internalizando en las mitocondrias.

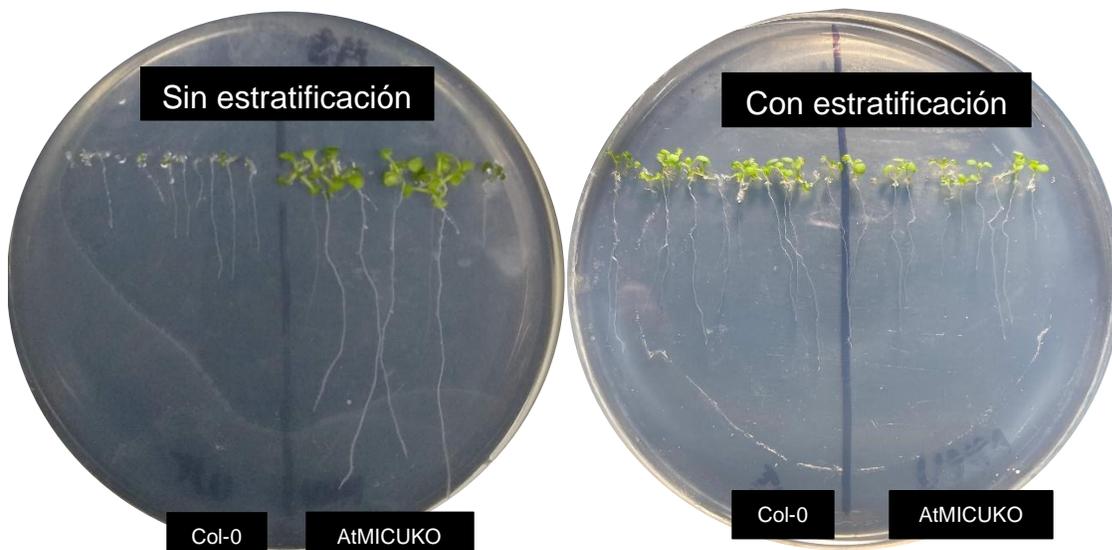
Al comparar las pendientes de ambos patrones de transporte con sus respectivos replicados (N=3), se observa que en la cepa AtMICU hay un aparente incremento en la velocidad de transporte del catión con respecto a la cepa Col-0, por lo que la carencia de AtMICU sí tiene un efecto en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6).



**Figura 6.** Transporte de Ca<sup>2+</sup> a mitocondrias aisladas de *A. thaliana*. El transporte de Ca<sup>2+</sup> a la mitocondria es mayor en la cepa AtMICU con respecto a la cepa Col-0. N=3.

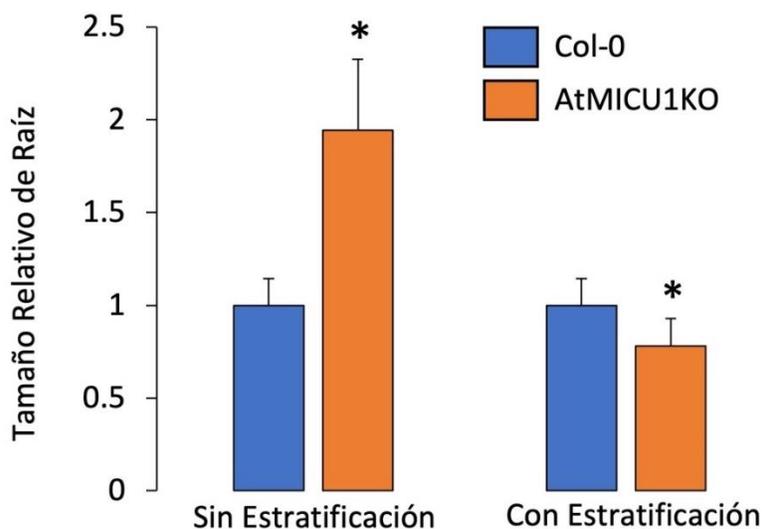
#### 5.4 Crecimiento de *A. thaliana* en condiciones de estratificación y no estratificación.

Para determinar si alguna condición estresante podría modificar el fenotipo de las plantas mutantes en AtMICU se evaluó el crecimiento de raíces en *A. thaliana* del ecotipo Col-0 y la cepa carente de AtMICU durante 14 días. Se observó que las plantas carentes de AtMICU germinaron y crecieron más rápido que su contraparte isogénica Col-0 sin estratificación (Fig. 7).



**Figura 7.** Crecimiento de raíces de cepa Col-0 y carente de AtMICU sin estratificación (izquierda) y con un periodo de estratificación a 4°C durante 72 h (derecha) de *A. thaliana*.

La posterior cuantificación de la longitud de la raíz principal de las plántulas de los dos genotipos crecidas bajo las dos condiciones detalladas anteriormente y usando el software FIJI, arrojó diferencias significativas en los tamaños de las raíces (Fig. 8). Específicamente se observó que las raíces de la cepa AtMICU tienen mayor longitud comparadas con las plántulas Col-0 cuando las semillas no son sometidas a estratificación (Fig. 7). Sin embargo, al estratificar las semillas (4°C) durante 72 h, se modificó el fenotipo observando que las raíces de la cepa AtMICU presentaron un crecimiento significativamente menor al de las raíces control (Fig. 8).



**Figura 8.** Cuantificación del tamaño relativo de las raíces de ambas cepas de *A. thaliana* (Col-0 y AtMICU1KO) en condiciones de estratificación y no estratificación. Los experimentos fueron llevados a cabo con entre 5 y 6 replicados biológicos midiendo entre 5 y 10 raíces por cada genotipo y condición. El \* denota un valor de significancia ( $p < 0.05$ ) con respecto al control Col-0 usando pruebas de t de Student.

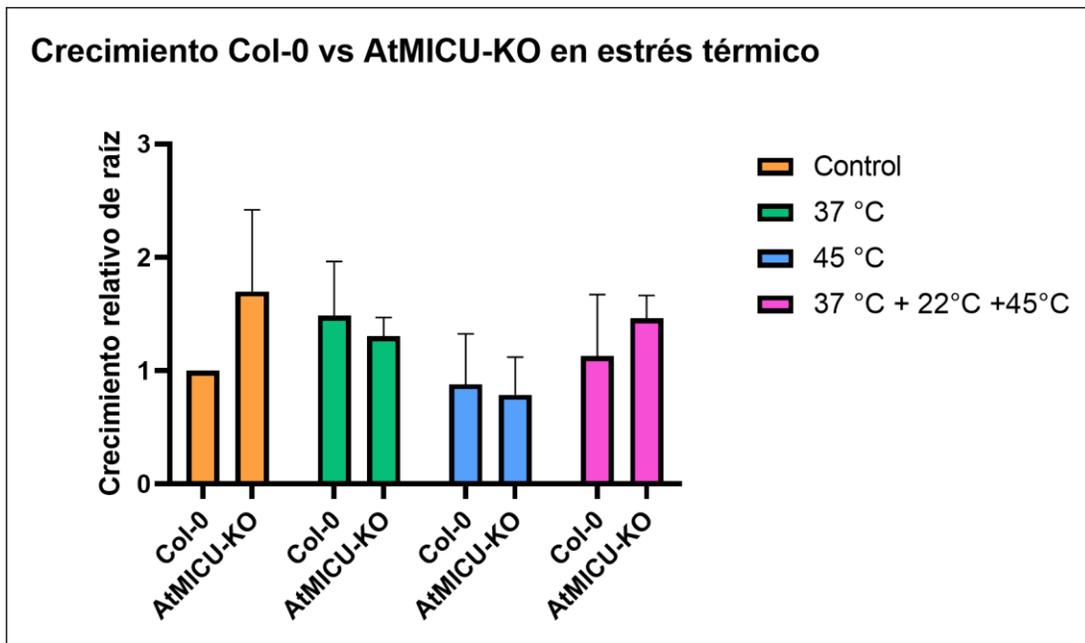
### 5.5 Exposición a estrés por calor en plántulas de *A. thaliana*.

Una vez detectadas las características fenotípicas en las raíces anteriormente descritas y registradas las marcadas diferencias en el desarrollo durante la estratificación, se propuso estudiar el desarrollo de las raíces primarias posterior al tratamiento con tres tipos de estímulos: Aclimatación, estrés térmico y la combinación de los dos anteriores. Para poder evaluar esto, se partió de plántulas

de semillas que fueron previamente sembradas en agar MS y estratificadas en las condiciones antes mencionadas.

En cada experimento se utilizaron 4 cajas de semillas correspondientes a las condiciones control (22°C), aclimatación (37°C/3h en oscuridad), estrés térmico (45°C/2h en oscuridad) y la combinación de ambas con un periodo de 30 minutos a condiciones normales entre ambas condiciones (37°C/3h oscuridad + 22°C/30 min + 45°C/2h oscuridad). Posterior a 7 días de observación, se compararon los crecimientos de raíces midiendo su longitud con el software FIJI, en el que pudimos observar que, aunque la cepa AtMICU presenta un mayor crecimiento en condiciones control, éste se ve afectado al ser sometido a temperaturas elevadas, ya sea la temperatura de aclimatación como la de reto a estrés térmico (Fig. 9).

Al comparar individualmente las condiciones a las que fueron sometidas las plántulas, se observó que cuando éstas se someten a un periodo de aclimatación y posteriormente a condiciones normales, el crecimiento de la cepa Col-0 es similar al de la cepa mutante. Por otro lado, cuando se someten directamente a periodos de estrés térmico (45°C) el crecimiento se ve afectado, disminuyendo en ambas cepas comparado con los controles. Sin embargo, si las plantas primero se aclimatan y después se exponen al reto de estrés son capaces de amortiguar el efecto anteriormente descrito y ambos tipos de plantas llegan a presentar mayor longitud de raíces. Además, cabe destacar que, en este mismo grupo, la cepa AtMICU logra un mayor crecimiento que la Col-0.

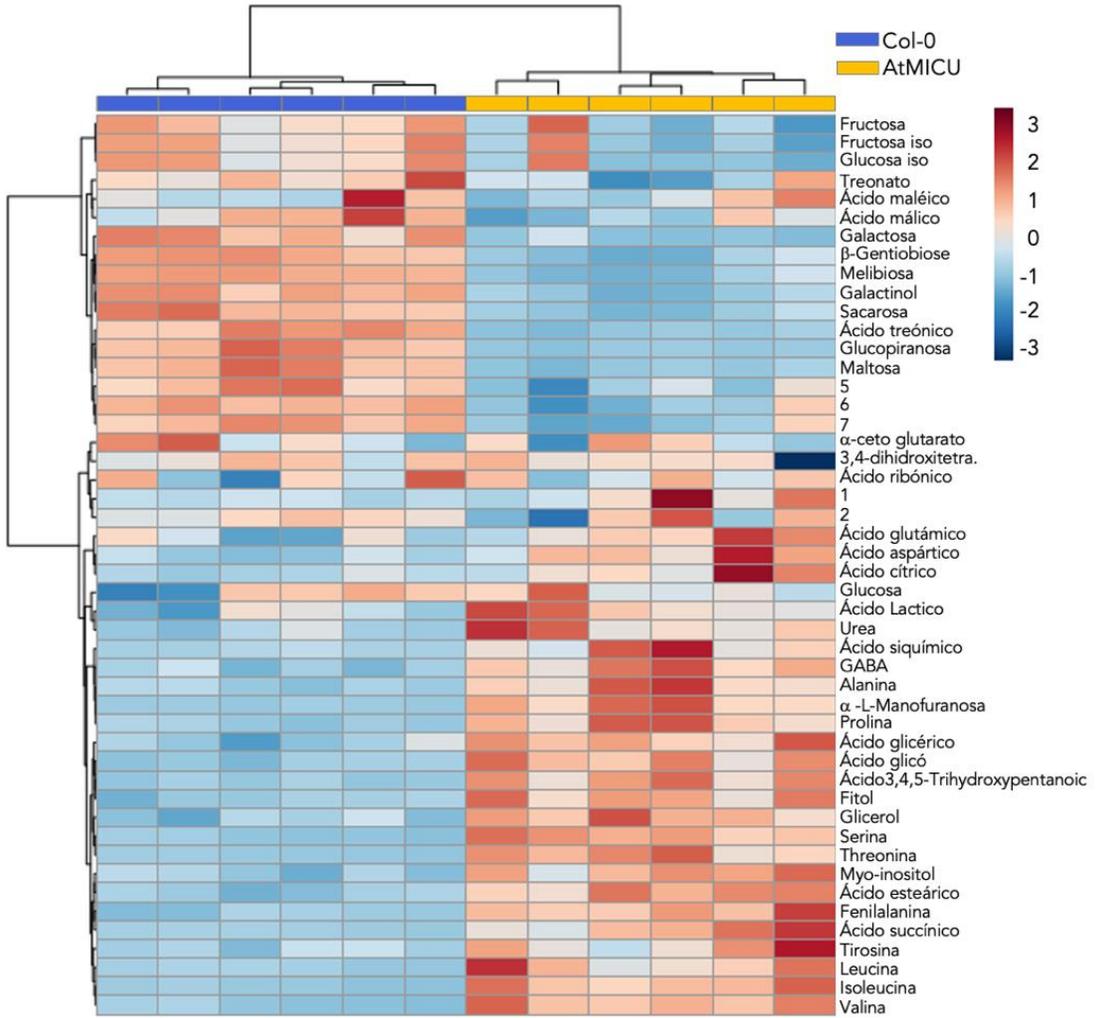


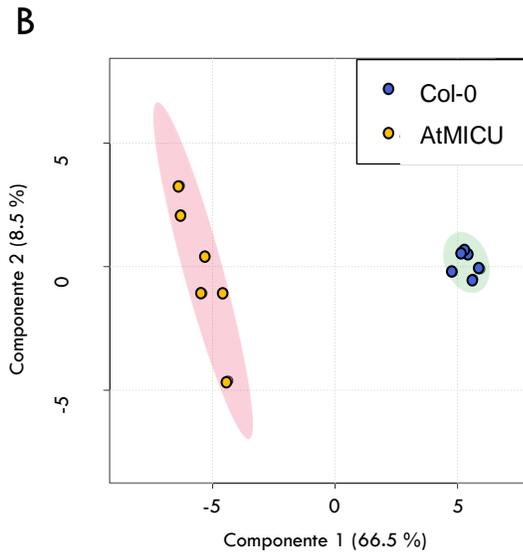
**Figura 9.** Cuantificación del tamaño relativo de las raíces de ambas cepas de *A. thaliana* (Col-0 y AtMICU) en condiciones de estratificación y sometidas a tres distintas condiciones de temperatura: Control a 22°C, grupo 1 a 37°C durante 3 horas, grupo 2 a 45 °C durante 2 horas y grupo 3 a 37°C durante 3 horas + 22°C durante 30 minutos + 45°C durante 2 horas. Se midieron entre 5 y 15 raíces por cada genotipo y condición.

## 5.6 Diferencias en el metabolismo de hojas *A. thaliana*.

Para determinar si la ausencia de MCU afectaba el metaboloma de las plantas se decidió estudiar el perfil metabólico de hojas de *A. thaliana* de la cepa Col-0 y AtMICU, pues probablemente un cambio en el metaboloma podría explicar la ausencia de fenotipo. Se realizó la extracción de metabolitos de las hojas de ambas cepas para evaluar sus niveles mediante CG acoplado a MS. De los compuestos detectados, fue posible cuantificar 48 metabolitos con certeza. Se realizó una comparación de los metabolitos obtenidos entre las cepas Col-0 y AtMICU y se normalizaron sus niveles en función de una mezcla de metabolitos obtenidos de ambas cepas. Los resultados fueron agrupados jerárquicamente con ayuda de la plataforma MetaboAnalyst 4.0, la cual nos permite comparar dos grupos de poblaciones o tratamientos. Se agruparon usando un mapa de calor o *Heatmap* y un PLS-DA (Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales) (Fig. 10).

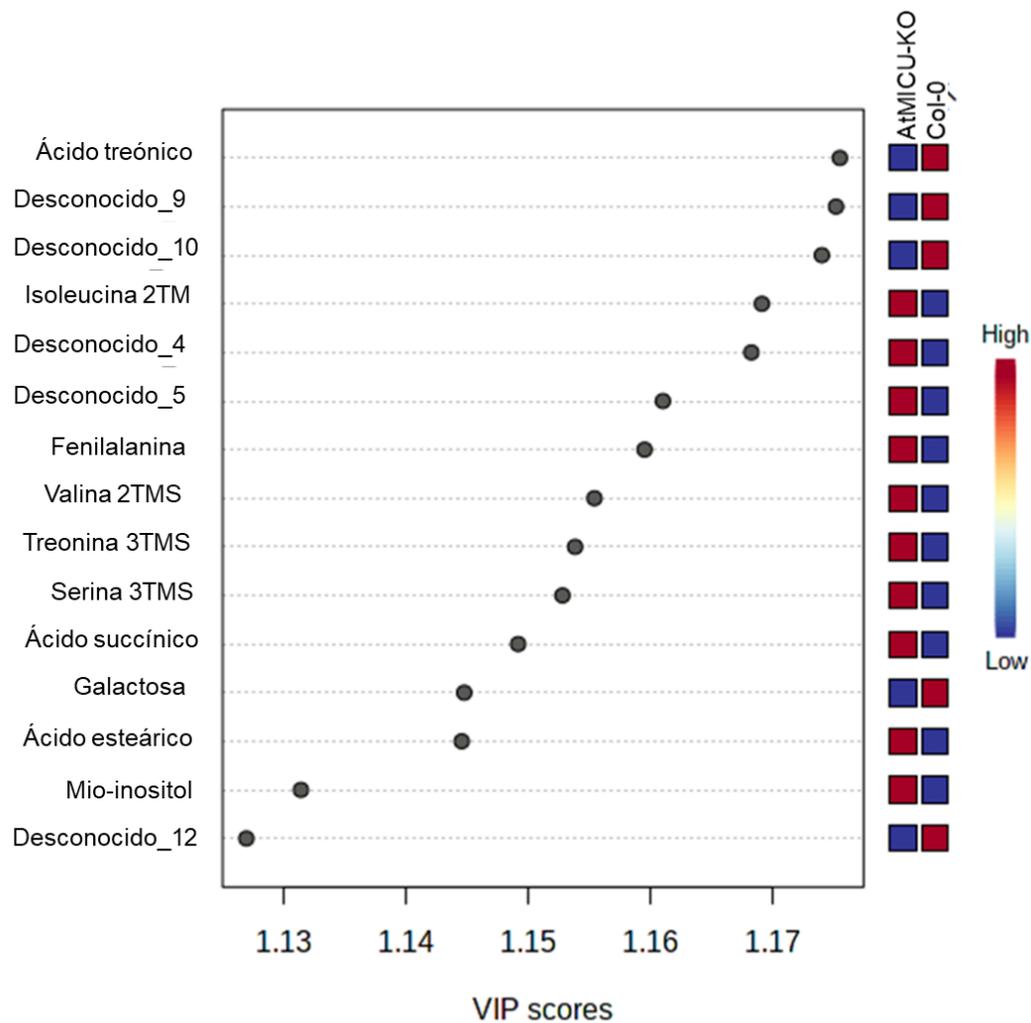
A





**Figura 10.** Cambios en el perfil metabolómico de plantas de *A. thaliana* de la cepa Col-0 versus AtMICU. A) *Mapa de calor* obtenido y agrupado de los metabolitos que presentan diferencias *significativas* en ambos extractos (Col-0 azul, AtMICU rojo y como control de calidad un pool de ambos extractos de color verde), se muestran los metabolitos con valores de  $p < 0.05$  evaluados por ANOVA). B) Gráfico de PLS-DA de los metabolitos de ambas cepas, en rojo el grupo de AtMICU y verde Col-0.

Los resultados muestran diferencias significativas en los niveles de aminoácidos y carbohidratos entre la cepa AtMICU y Col-0 (Fig. 11), así como de varios metabolitos sin identificar ya que el equipo no contaba con estándares para estas moléculas. Del total de metabolitos que presentaron cambios, fue posible identificar cambios significativos en 31 analitos (Tabla 1).



**Figura 11.** Metabolitos que presentan diferencias entre las cepas AtMICU y Col-0 de *A. thaliana*.

Al comparar los perfiles metabólicos en las plantas Col-0 y AtMICU, se observaron cambios en los niveles de aminoácidos como alanina, leucina, fenilalanina, glutamato, aspartato, valina, tirosina, prolina, isoleucina, treonina y serina. (Tabla 1). Esto es de primordial relevancia ya que la síntesis de estos aminoácidos requiere la coordinación entre el metabolismo mitocondrial y citosólico (Lee et al., 2021).

**Tabla 1.** Metabolitos que presentaron cambios significativos entre hojas de Col-0 y AtMICU.

Metabolito	HMDB ID	FC	log2(FC)	P ajustado	-log10p
8 (Glucopiranososa)	-	9.3648	3.2273	0.0033515	2.4748
Sacarosa	HMDB00258	5.7417	2.5215	0.0033515	2.4748
Galactosa	HMDB00143	4.974	2.3144	0.0033515	2.4748
9 (Maltosa)	-	4.3527	2.1219	0.0033515	2.4748
10 ( $\beta$ -Gentiobiosa)	-	4.1042	2.0371	0.0033515	2.4748
Galactinol	HMDB05826	3.9842	1.9943	0.0033515	2.4748
11 (Melibiosa)	-	3.656	1.8703	0.0033515	2.4748
Ácido treónico	HMDB00943	3.0843	1.625	0.0033515	2.4748
Leucina	HMDB00687	0.48138	-1.0548	0.0033515	2.4748
Ácido aspártico	HMDB00191	0.47858	-1.0632	0.0062967	2.2009
Ácido esteárico	HMDB00827	0.47065	-1.0873	0.0033515	2.4748
Urea	HMDB00294	0.4652	-1.1041	0.0033515	2.4748
Ácido glicólico	HMDB00115	0.44709	-1.1614	0.0033515	2.4748
Tirosina	HMDB00158	0.43681	-1.1949	0.012223	1.9128
Fenilalanina	HMDB00159	0.42438	-1.2366	0.0033515	2.4748
Ácido cítrico	HMDB00094	0.38924	-1.3613	0.0062967	2.2009
Fitol	HMDB02019	0.38789	-1.3663	0.0033515	2.4748
Ácido succínico	HMDB00254	0.36123	-1.469	0.0033515	2.4748
GABA	HMDB00112	0.34522	-1.5344	0.0033515	2.4748
Valina	HMDB00883	0.33431	-1.5808	0.0033515	2.4748
Isoleucina	HMDB00172	0.31429	-1.6698	0.0033515	2.4748
Prolina	HMDB00162	0.31321	-1.6748	0.0033515	2.4748
Ácido Siquímico	HMDB03070	0.28249	-1.8237	0.0033515	2.4748
4(3,4,5 ácido trihidroxipentanoico)	-	0.2503	-1.9983	0.0033515	2.4748
Serina	HMDB00187	0.23672	-2.0787	0.0033515	2.4748
Treonina	HMDB00167	0.17409	-2.5221	0.0033515	2.4748
3( $\alpha$ -L-Manofuranosa)	-	0.066687	-3.9065	0.0033515	2.4748

Se identificaron cambios en la concentración de otros metabolitos derivados de carbohidratos, como ácido treónico y la galactosa, además de otros compuestos relevantes en el metabolismo como el galactinol, fitol, ácido esteárico, ácido cítrico

y GABA (Figura 10, Tabla 1). Al igual, en la planta que carece del regulador de MCU se encuentra un aumento en metabolitos relacionados con la biosíntesis de valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, alanina, aspartato, glutamato y aminoacil-tRNA y en línea con esto, el precursor del aminoácido aromático, ácido siquímico se encuentra enriquecido (Figura 11, Tabla 1).

Cabe destacar que en la cepa AtMICU-KO se encontraron aumentados significativamente los niveles de intermediarios del ciclo de Krebs, como el ácido succínico y ácido cítrico (Figura 11, Tabla 1).

## 5.7 Modelo tridimensional de MCU

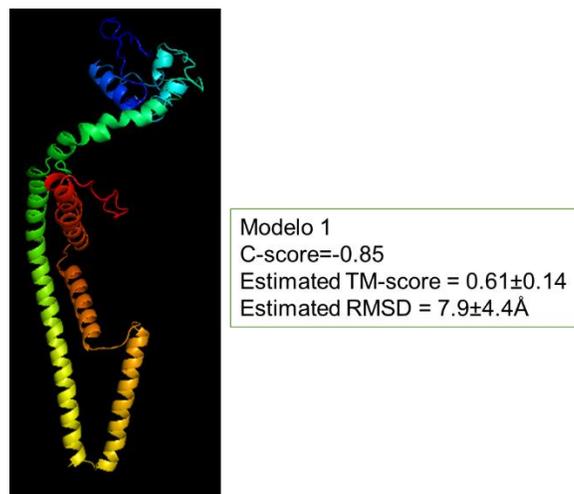
Una vez estudiadas algunas características fenotípicas de la cepa AtMICU se buscó obtener un modelo tridimensional del MCU en *A. thaliana*. En la literatura solamente fue posible encontrar los modelos obtenidos a partir de cristales de componentes del complejo por separado en otras especies. Por lo que en este estudio para proponer un modelo de la proteína se analizaron los modelos de *Homo sapiens* (MCU-EMRE, PDB: 605B; MICU1, PDB: 4SC; MICU2 6IIH, dímero MCU-EMRE, PDB: 6O58, complejo MCU con Ca<sup>2+</sup> PDB: 6XJV), *Tribolium castaneum* (MCU-EMRE, PDB: 6X4S), *Caenorhabditis elegans* (MCU, PDB: 5ID3), *Neurospora crassa* (MCU, PDB: 6DT10), *Cyphellophora europea* (MCU, PDB: 6DNF). Por lo que se propuso una construcción *ad hoc* del posible modelo de *A. thaliana*, pues el complejo proteico de organismos como este no parece contar con la presencia de los mismos componentes en el holocomplejo como EMRE y MICU2.

Inicialmente de la base de datos NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (gen AT1G09575 o ID 837484) y uniprot (F4111) se obtuvo la secuencia de la proteína MCU, correspondiente a 292 aminoácidos. Sin embargo, para generar el modelo se optó por eliminar el péptido señal a mitocondria (18 aminoácidos), por lo que se trabajó con 274 aminoácidos para generar el homotetrámero.

Para obtener un primer modelo de cada isoforma, la primera propuesta fue hacer un modelado por homología, cargando la secuencia de aminoácidos previamente

mencionada con ayuda de la plataforma SWISS-MODEL en la que se obtuvieron 4 modelos probables con un porcentaje de similitud menor al 30 % (Anexo S1). Los mayores porcentajes se obtuvieron utilizando como estructuras de referencias los cristales de *N. crassa* (PDB: 6DT0) y *T. castaneum* (PDB: 6XQN) (Anexo S2).

Al no obtener modelos similares a los disponibles para otras especies en el Protein Data Bank, se optó por realizar un modelado por enhebrado de proteínas con ayuda de la plataforma I-TASSER (Zheng et al., 2021). Con este servidor se obtuvieron 5 modelos probables de los oligómeros de MCU que posteriormente formarán el tetrámero del poro (Anexo Figura S5), donde se ejemplifica la de mejores parámetros, valuados por parámetros C-Score y RMSD (Fig. 12).



**Figura 12.** Modelo obtenido por el programa I-TASSER con los mejores parámetros de C-score y RMSD.

Al tener un porcentaje de similitud menor del 40 % en los modelos realizados por homología, se propuso un modelado *de novo*. Para ello se obtuvieron probables oligómeros usando la plataforma RAPTOR X. Con esta aproximación se obtuvieron 5 modelos probables (Anexo Figura S4).

A pesar de encontrar partes estructurales relevantes para su función en los modelos de ambas plataformas, se encontraban dominios no concordantes con su estabilidad. Por esta razón se optó por hacer un análisis de consenso de estructura secundaria (Anexo Tabla S1) con diferentes plataformas (mencionadas en la

sección de metodología correspondiente). Al obtener dicho consenso, fue posible evaluar qué modelos de los obtenidos en I-TASSER y RAPTOR X son más acertados para la construcción del complejo (Tabla 2).

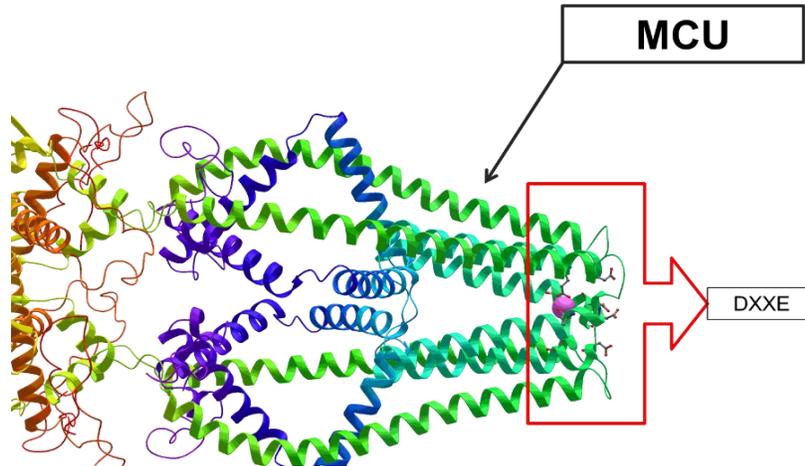
**Tabla 2.** Elección de modelo diseñado por I-TASSER y RAPTOR X para cada oligómero de MCU.

	<b>Modelo</b>	<b>% similitud</b>
<b>I-TASSER</b>	1	80.29
	2	82.48
	3	83.57
	4	83.94
	5	83.57
<b>RAPTOR X</b>	1	87.22
	2	86.87
	3	85.40
	4	86.86
	5	85.03

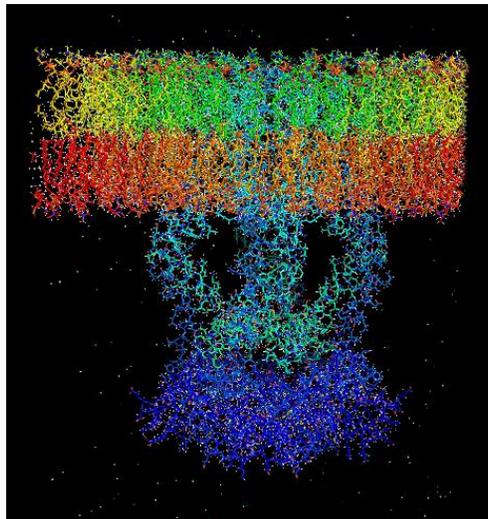
Al evaluar los resultados de los 10 modelos, se eligió el primer modelo generado por Raptor X con un porcentaje de similitud del 87.22 %. Con este modelo se llevó a cabo una comparación con otros organismos como el de *T. castaneum*, *H. sapiens* y *N. crassa* para modelar el posible AtMCU.

Sin embargo, una vez que se evaluaban visualmente los modelos, la región del carboxilo terminal que comprende del aminoácido 272 al 292 muestra poca estabilidad. Por esta razón se seleccionó este dominio y se modeló con ayuda de la plataforma GalaxyWEB, la cual permite modelar fragmentos cortos de aminoácidos (20 aminoácidos) tomando los modelos obtenidos de Raptor X. Se obtuvieron 5 modelos probables y se tomaron aquellos que denotaron mejor estabilidad.

Finalmente se obtuvo un probable modelo con los resultados de las plataformas anteriormente mencionadas. Se utilizó el modelo 1 obtenido por I-TASSER con el segundo fragmento de GalaxyWEB generado a partir del modelo 4 de Raptor X (Figura 13 y Figura 14).



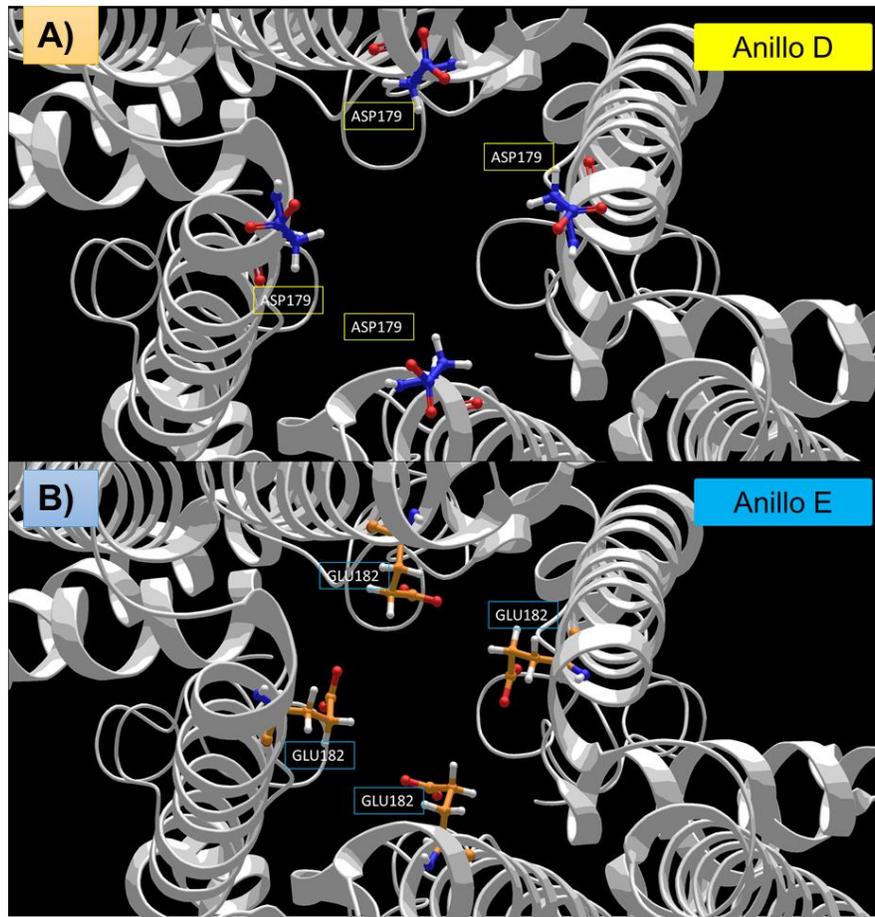
**Figura 13.** Modelo de AtMICU final con la identificación del dominio DXXE. Es posible observar los 4 oligómeros de MCU que van a formar el filtro de selectividad o dominio DXXE y en color rosa, el catión  $\text{Ca}^{2+}$  interaccionando con dicho dominio.



**Figura 14.** Representación gráfica de homotetrámero de AtMICU visualizado con PyMOL. Se puede observar que la región TM1 y TM2 de cada oligómero están dentro de la membrana modelo.

En el modelo del tetrámero de AtMICU se pueden identificar los cuatro oligómeros, así como la formación del dominio DXXE, importante para el reconocimiento y transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal (Fig. 13), de igual forma, la interacción del modelo AtMICU con la membrana interna mitocondrial (Fig. 14). Además, al realizar un acercamiento, este dominio es relacionado a los aminoácidos Asp179 de cada

oligómero para formar el anillo D (Figura 15a) y a los aminoácidos Glu182 de cada oligómero para formar el anillo E (Figura 15b).



**Figura 15.** Filtro de selectividad o dominio DXXE en AtMCU. A) Anillo D conformado por Asp179 de cada oligómero. B) Anillo E conformado por Glu182 de cada oligómero.

## 6. Análisis de resultados.

Para llevar a cabo la caracterización de la cepa AtMICU (crecimiento de raíces, transporte de calcio, función mitocondrial, respuesta a estrés y perfil metabólico) se empleó la misma mutante isogénica, carente del gen AT4G32060 con el código SALK\_064052C empleada por Wagner y colaboradores en el 2015 (Wagner et al., 2015). Inicialmente se realizó una comparación fenotípica en condiciones basales, es decir sin ningún tipo de estrés, con el fin de tener un punto de partida para estudiar las variaciones que ocurrieran posteriores a la exposición de las plantas a

estrés abiótico. Los resultados son similares a los reportados por Wagner y colaboradores en el 2015, pues en condiciones controladas, las hojas presentan un color y tamaño similar (Fig. 4).

Una vez que se estudió el desarrollo de la planta durante 3 a 4 semanas posterior a su trasplante, se buscó determinar si había cambios en el  $\Delta\Psi$  mitocondrial. Dicho potencial de membrana tiene relevancia en la fosforilación oxidativa y en el metabolismo de ácidos grasos, así como en la regulación de la apoptosis (Perelman et al., 2012). Por lo tanto, es importante verificar que las mitocondrias se encuentren funcionales y con un potencial de membrana estable.

Para estudiar el estado del  $\Delta\Psi$  mitocondrial, se decidió analizar mesófilos de hojas de 3 a 4 semanas de edad, pues en la literatura no se encuentran reportes previos de este. El mesófilo tiene un alto contenido de aire, ocasionando refracción de la luz al observarlo al microscopio. Esto genera interferencia y como resultado imágenes no tan claras. Por lo anterior, se han desarrollado técnicas donde se aísla el organelo en cuestión (por ejemplo, cloroplastos). Sin embargo, esto conlleva algunas desventajas ya que se pueden dañar los organelos al tener varios procesos de manipulación de la muestra vegetal, obteniendo resultados indeseados o no tan precisos. Anteriormente en el laboratorio se adaptaron metodologías existentes para lograr visualizar mesófilos vivos con agentes de infiltración como la PFD (Flores-Herrera et al., 2021; Littlejohn et al., 2010; Littlejohn & Love, 2012). El objetivo de utilizar la PFD es el de infiltrar los mesófilos para mejorar las imágenes del tejido foliar sin dañar el tejido y aumentando la resolución de la imagen (Littlejohn et al., 2010).

Adicionalmente se empleó una sonda catiónica llamada JC-1, la cual tiene la capacidad de determinar cualitativamente el grado de polarización de las mitocondrias. El JC-1 se excita a 490 nm, cuando se encuentra en su forma monomérica, emite una señal a 527 nm (color verde), indicando que las mitocondrias no tienen un  $\Delta\Psi$  estable. Por el contrario, cuando JC-1 forma agregados emite a 590 nm (color rojo), indicando que las mitocondrias cuentan con  $\Delta\Psi$  estable. Estos cambios en su agregación son dependientes del potencial de

membrana, permitiendo que el color cambie reversiblemente dependiendo de la carga de la membrana mitocondrial (Cossarizza et al., 1993; Sivandzade et al., 2019).

Al observar el mesófilo de hojas de *A. thaliana* de la cepa Col-0 bajo un microscopio de fluorescencia, se observaron corpúsculos que emiten a 590 nm adyacentes a los cloroplastos (Fig. 5), indicando que las mitocondrias de las plantas Col-0 tienen un  $\Delta\Psi$  estable. De igual forma, en mesófilos de la cepa AtMICU fueron identificados corpúsculos similares, lo que nos indica que ambas cepas presentan mitocondrias con un potencial de membrana elevado y estable (Fig. 5).

Para corroborar que el potencial de membrana fuera estable se obtuvieron las mitocondrias y se realizó un monitoreo del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  gracias a la adición de Calcium Green-5N, el cual es un compuesto fluorométrico que permite evaluar fluctuaciones en los niveles de calcio citoplasmático (Flores-Herrera et al., 2019). Se utilizaron protoplastos permeabilizados con digitonina. Este modelo permite llevar a cabo experimentos con un número fijo de células por ensayo y representa una forma relativamente sencilla de medir procesos intracelulares dependientes de calcio. Una vez que se adiciona el pulso de  $\text{CaCl}_2$  a los protoplastos aislados, se observó un aumento en la señal correspondiente a  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Esto correlaciona con lo anteriormente reportado en la literatura (Gutiérrez-Aguilar et al., 2014). Posteriormente, los valores de fluorescencia fueron disminuyendo con respecto al tiempo, lo que nos indica que el calcio está siendo transportado a un compartimento intracelular. Al hacer el tratamiento de datos, se observa que en los protoplastos permeabilizados de la cepa AtMICU hay un aparente incremento en la velocidad de transporte del catión con respecto a la cepa Col-0 (Fig. 6). En cambio, en mitocondrias aisladas, no se detectaron diferencias en el transporte de calcio. Esto sugiere que los cambios asociados a la eliminación de AtMICU podrían deberse al transporte de este catión en otro compartimento subcelular. Este compartimento probablemente son los cloroplastos, pues Teardo y colaboradores (2019) demostraron un complejo MCU en estos orgánulos.

Estos resultados sugieren que la ausencia del regulador de AtMCU altera la cinética de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pero no mitocondrial. Estos resultados recapitulan los reportados anteriormente en plantas AtMICU que sobreexpresan proteínas que perciben el  $\text{Ca}^{2+}$  (Wagner et al., 2015).

El pulso de calcio utilizado en este trabajo para activar el transporte por el MCU fue de 100  $\mu\text{M}$ . Esto difiere de lo reportado en células de mamífero, donde existen reportes que indican que el umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  para activar a MCU oscila desde 300 nM a 1.3  $\mu\text{M}$ . Éste a su vez depende directamente de la afinidad del catión con los dominios de mano EF de MICU (Kamer et al., 2017; Pallafacchina et al., 2018).

Es importante destacar que muchas funciones mitocondriales están ligadas a la concentración de calcio en los organelos (Rossi et al., 2019). En tal sentido, la regulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es de vital importancia para la fisiología celular. Se ha observado que las alteraciones en los niveles de calcio anteceden algunas patologías en mamíferos, así como la señalización por apoptosis o necrosis (Pallafacchina et al., 2018; Penna et al., 2018; Rizzuto et al., 2012). Además, con respecto a las unidades que conforman el MCU, existen reportes donde la supresión de MICU afecta la sensibilidad a la muerte celular en líneas celulares como HeLa, HMEC (células epiteliales) y MDA-MB-231 (cáncer de mama) (Hall et al., 2014). En ratones se observó que al suprimir al regulador MICU1 (*MICU1*<sup>-/-</sup>) hay un desarrollo y crecimiento embrionario normal. Sin embargo, estos ratones presentan un mayor grado de letalidad postnatal. Entre las probables causas de muerte se encuentra la insuficiencia respiratoria, defectos en el desarrollo de los centros de coordinación de la respiración (cerebelo y Centro de Purkinje). Al analizar a los ratones que sobrevivieron, éstos muestran deterioro muscular y ataxia. Además, al evaluar las mitocondrias se reveló un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, disminución en la producción de ATP, así como una mayor sensibilidad a la apertura del Poro de Transición la Permeabilidad mitocondrial (PTP) y muerte celular (Csordás et al., 2013; Logan et al., 2014; Mallilankaraman et al., 2012; Pallafacchina et al., 2018).

La subunidad MICU1 evita la sobrecarga de calcio en condiciones de reposo o bajas concentraciones del catión. De no ser por este regulador habría una captura masiva del catión en la matriz mitocondrial, ocasionando citotoxicidad (Csordás et al., 2013; Pallafacchina et al., 2018).

Además, cabe destacar que aunque la velocidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias de *A. thaliana* aumenta en la cepa AtMICU con respecto a la cepa Col-0, ésta sigue siendo una velocidad considerablemente más lenta comparando el transporte entre mamíferos y plantas, pues existen reportes donde los ensayos de calcio se hacen en periodos de no más de 1000 s, mientras que las evaluaciones realizadas en el laboratorio para mitocondrias o protoplastos de plantas, deben ser mayores a 2000 s (Csordás et al., 2013b; Flores-Herrera et al., 2019; Hall et al., 2014). Estudios recientes del grupo de Elizabeth Murphy han demostrado que los ratones carentes de la subunidad EMRE (*emre*<sup>-/-</sup>) presentan una actividad de transporte mitocondrial muy similar a la registrada en el presente trabajo de tesis (Liu et al., 2020). En tal sentido, sería interesante entender si es posible recapitular las propiedades de transporte de calcio observadas en mamíferos, en plantas con expresión transgénica de EMRE.

Por sugerencia del Dr. Cesar Cuevas se planteó la posibilidad de evaluar el efecto de la estratificación en la germinación de semillas Col-0 y AtMICU. Para nuestra sorpresa observamos diferencias en la longitud de las raíces asociadas a este tratamiento de rutina. Específicamente, el crecimiento de las raíces en la cepa carente de la subunidad reguladora AtMICU fue mayor cuando no se llevó a cabo un proceso de estratificación en frío. Una vez estratificadas, las semillas de esta misma cepa presentan un menor tamaño relativo con respecto a la cepa Col-0. Este crecimiento diferenciado puede deberse a procesos hormonales o estímulos ambientales, ya que el objetivo de la estratificación es inhibir la latencia después de la imbibición y comenzar con la germinación. Esto podría significar que AtMICU desempeña un papel en la regulación de la latencia de las semillas. Es importante recordar que el desarrollo de la raíz es una herramienta eficaz para el almacenamiento de nutrientes y  $\text{H}_2\text{O}$ , así como un sensor del medio a su alrededor.

Por lo tanto, es posible que al tener a AtMCU sin el regulador AtMICU, el mismo organismo busque la plasticidad radicular para la obtención de nutrientes en condiciones no estratificadas, mientras que, al estratificarse, es probable que aumente la dormancia por mecanismos de señalización mediados por hormonas, como el ABA. Actualmente no existe un mecanismo totalmente descrito sobre el efecto de la estratificación en frío de semillas dormantes (Malamy, 2005; Shao et al., 2008). En tal sentido resulta atractivo proponer que los iones calcio desempeñan un papel importante en el metabolismo de las raíces, el cual es predominantemente mitocondrial.

Posterior al estudio del fenotipo de las raíces de la cepa Col-0 y AtMICU, se optó por estudiar el comportamiento de éstas posterior a la exposición a estrés abiótico de tipo térmico, donde las plantas fueron sometidas a un periodo de aclimatación, estrés térmico y la combinación de estos dos. Para poder identificar algún fenotipo de respuesta, se optó trabajar con semillas crecidas en medio MS y estratificadas. A pesar de que la cepa que carece del regulador MICU presenta mayor crecimiento en condiciones control, éste se ve desfavorecido al ser sometido a algún cambio de temperatura, ya sea para aclimatarse o como reto de estrés térmico (Fig. 8).

Además, cuando las plantas se someten a periodos de aclimatación (37°C) y posteriormente a condiciones control, el crecimiento de la cepa Col-0 mejora a diferencia de la cepa AtMICU que se ve disminuido. Por otro lado, para las pruebas de termotolerancia basal donde las plántulas se someten directamente a periodos de estrés térmico (45°C), se observa que en ambas cepas el crecimiento de raíz es desfavorecido. Sin embargo, en las pruebas de termotolerancia adquirida, en el que las plantas son sometidas primero a un periodo de aclimatación a 37°C y después expuestas al reto de estrés térmico con un periodo de recuperación a condiciones normales entre ambos, éstas son capaces de amortiguar el fenotipo previamente descrito (45°C) y presentar raíces de mayor longitud.

En condiciones naturales, las plantas cuentan con mecanismos que permiten sobrellevar las fluctuaciones en la temperatura durante el día, el cual es un proceso adquirido llamado termotolerancia. Esta termotolerancia es adquirida cuando hay

una exposición breve a altas temperaturas, pero no letales (Song et al., 2012). Existen reportes donde se postula que una mayor expresión de familias de proteínas de choque térmico (HSP70), localizadas en citosol, retículo endoplásmico, plástidos y mitocondrias, está asociada a la adquisición de la termotolerancia (Su & Li, 2008).

Adicionalmente se ha confirmado el papel de  $\text{Ca}^{2+}$  en la adquisición de termotolerancia durante y posterior al tratamiento de exposición a la aclimatación o estrés no letal (Larkindale & Knight, 2002; Song et al., 2012). Estos ensayos de probable termotolerancia o termosensibilidad adquirida son muy útiles para poder identificar genes relacionados con mecanismos de respuesta a estrés térmico (Song et al., 2012). Anteriormente se ha utilizado este tipo de ensayos en guisante, trigo, girasol y sorgo (Howarth et al., 1997; Senthil-Kumar et al., 2003; Song et al., 2012; Srikanthbabu et al., 2002). La mutación de genes ha facilitado el estudio de mecanismos moleculares en procesos como termotolerancia adquirida y respuesta a estrés térmico (Dafny-Yelin et al., 2008; Lenne & Douce, 1994; Perez et al., 2009; Song et al., 2012). Estas condiciones son controladas en un laboratorio, pero en la naturaleza las plantas enfrentan distintos tipos de estrés tanto abióticos como bióticos. Entre los abióticos, se encuentra la sequía, elevaciones en las concentraciones de sal y aumento o descenso de la temperatura, por lo que las plantas están constantemente montando respuestas al estrés que las ayuda a adaptarse a su entorno. Entre estos mecanismos de respuesta se encuentra la expresión de proteínas de choque térmico (HSP). Estas proteínas se encuentran en el citoplasma, núcleo, retículo endoplásmico, mitocondrias o plástidos y se producen en diversos contextos como por ejemplo en respuesta a cambios de temperatura extremos, sequía, salinidad o durante procesos fisiológicos del desarrollo, como la embriogénesis, la germinación y el desarrollo de frutos (Burke et al., 2001; Dafny-Yelin et al., 2008; Song et al., 2012). Funcionan como chaperonas moleculares *in vitro* e *in vivo*, participando en el plegamiento de proteínas y manteniendo en un estado plegado funcional a las proteínas desnaturalizadas en condiciones de estrés por calor (Åhrman et al., 2007; Basha et al., 2006; Song et al., 2012).

Además de las HSP, existen otras moléculas de señalización involucradas en la termotolerancia adquirida, como el ABA, etileno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como Ca<sup>2+</sup> durante o después de la recuperación posterior a la exposición a temperaturas elevadas (Larkindale & Knight, 2002; Song et al., 2012).

Existen diversos estudios en los que se ha observado que la exposición a temperaturas no letales antes de un tratamiento más agresivo promueve la termotolerancia en varias especies. Larkindale y colaboradores (2002) demostraron que cuando las plántulas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 se someten a periodos de aclimatación a 30°C presentan niveles más bajos de daño oxidativo durante su recuperación posterior a ser sometidos a un reto de estrés térmico a 40°C, además de presentar mejor tasa de supervivencia. En forma adicional se observó que posterior a la adición de inhibidores de calcio/Calmodulina, se redujo la supervivencia después de someter coleóptilos de maíz y plántulas de *A. thaliana* a periodos de estrés térmico, sugiriendo que el calcio es necesario para desencadenar vías de señalización en *Arabidopsis* que conducen a mayor supervivencia (Gong et al., 1997; Larkindale & Knight, 2002). El mismo grupo de investigación menciona que es necesario el flujo de calcio para activar mecanismos que previenen o reparan el daño oxidativo causado por cambios de temperatura.

Una vez estudiada la respuesta a las distintas condiciones previamente mencionadas, fue de interés obtener el perfil metabolómico para entender con mayor detalle los fenotipos reportados en la presente tesis. El análisis comparativo entre los perfiles metabólicos de las plantas Col-0 y AtMICU arroja cambios en los niveles de carbohidratos y aminoácidos como alanina, leucina, fenilalanina, glutamato, aspartato, valina, tirosina, prolina, isoleucina, treonina y serina (Tabla 1, metabolitos). Además, integrando los resultados obtenidos por CG-MS y el crecimiento de raíces, se observó una mayor concentración de aminoácidos como GABA (ácido gamma-aminobutírico) en la cepa que carece de AtMICU. Esto es importante pues las fluctuaciones en la concentración de GABA en plantas están asociadas a una respuesta de señales ambientales como estrés por deshidratación, salinidad o estrés mecánico, entre otros (Ramesh et al., 2015a; Renault et al., 2013).

Dichos cambios en la concentración de GABA provocan defectos en el desarrollo de la raíz, hipocótilo, tubos polínicos y alteraciones en la composición de la pared celular (Ramesh et al., 2015a; Renault et al., 2013). Lo anterior concuerda con un crecimiento de raíz alterado en la cepa mutante al ser comparada con la Col-0 (Fig. 7). El metabolismo de GABA a su vez induce la producción de succinato en las raíces, jugando un papel importante para la regulación central de carbono durante periodos de estrés (Renault et al., 2013). Esto es de primordial relevancia, ya que la síntesis de estos aminoácidos requiere la coordinación entre el metabolismo mitocondrial y citosólico (Lee et al., 2021). Los resultados obtenidos proveen información útil para comprender probables mecanismos moleculares implicados en la regulación y transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en de plantas.

La concentración de diversos metabolitos derivados de carbohidratos disminuyó en la cepa mutante. Tales metabolitos son el ácido treónico, el galactinol (relacionado a la desecación) (Sengupta et al., 2015) y la galactosa. Además de otros compuestos relevantes en el metabolismo, como el fitol, ácido esteárico, ácido cítrico y GABA (Tabla 1).

Los cambios determinados a partir del análisis metabolómico en plantas Col-0 y AtMICU fueron integrados para proponer un esquema metabólico resultante de la eliminación genética de AtMICU (Fig. 16). De estos cambios se puede inferir que las plantas carentes de AtMICU presentan un fenotipo oxidativo incrementado. Este puede ser producto de una elevada disponibilidad de aminoácidos como la leucina, la valina y la isoleucina. La anterior inferencia se puede sostener con la disminución de la concentración de carbohidratos, resultando un flujo metabólico desplazado hacia un fenotipo oxidativo. En forma adicional, las plantas presentan elevados niveles de cetoácidos del ciclo de Krebs, como el succinato y citrato, lo que nos señala que los andamios de carbono de carbohidratos pueden funcionar como intermediarios mitocondriales o incluso otros esqueletos de carbono.

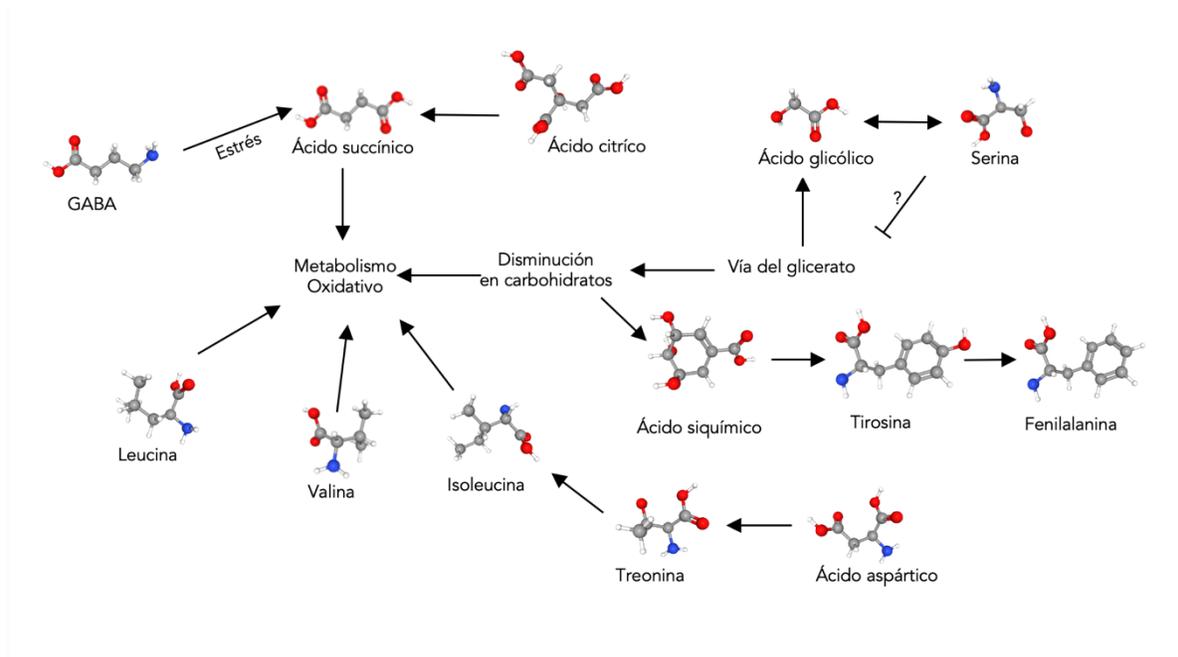
Los niveles de aminoácidos se encuentran elevados en la mutante que carece del regulador de MCU. Esto apunta que las reacciones de transaminación son relevantes al aumentar el flujo de calcio mitocondrial. Entre los aminoácidos con

concentraciones elevadas se encuentra la fenilalanina y la tirosina, ambos aromáticos. Estos aminoácidos se relacionan a su vez con el incremento de los niveles de siquimato, lo que nos hace suponer que la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  puede activar la vía del shiquimato de PEP, desencadenando la producción de dichos aminoácidos (Ruan et al., 2021; Tzin & Galili, 2010). Estos metabolitos pueden sugerir un aumento en la señalización de salicilato, que podría explicar los defectos leves pero significativos en el crecimiento de la raíz visto en la cepa AtMICU-KO (Lefevere et al., 2020; Zhao et al., 2015). Además, entre otros metabolitos con niveles aumentados, capta la atención GABA, pues existe evidencia de que se relaciona con la sobreexpresión de transportadores de aniones dejando como resultado cambios en el tubo polínico y en la raíz (Ramesh et al., 2015b; Selles et al., 2018b), lo que encaja con resultados previos y los presentados en el presente proyecto.

Analizando otros metabolitos, nos encontramos con el aumento de fitol en la planta mutante. El fitol es un terpeno intermediario del metabolismo de la clorofila y, aunado a esto, se relaciona con la senescencia de la hoja o una síntesis mejorada de tocoferoles (Dorp et al., 2015; Gutbrod et al., 2019). En este estudio no monitoreamos fenotipos indicadores de senescencia, lo que nos lleva a sugerir que al ser todo el metabolismo procesos orquestados unos por otros, tal vez hay un reordenamiento metabólico que evita fenotipos nocivos potenciales.

De los metabolitos evaluados, se observa que los niveles de serina se encuentran significativamente más altos en las hojas de la cepa mutante. En plantas C3 como *Arabidopsis*, la serina se biosintetiza a través de la fotorrespiración dependiente de HPR1 (hidroxipiruvato reductasa) por la vía del glicolato, glicerato y la vía fosforilada (Ros et al., 2014; Zimmermann et al., 2021). Esta última vía contribuye a la producción de serina, y cuando se suprime genéticamente, se detecta acumulación de aminoácidos y amonio (Zimmermann et al., 2021). De manera contrastante, Timm y colaboradores demostraron que cuando la fotorrespiración se inhibe mediante la eliminación de HPR1, las plantas acumulan serina (Timm et al., 2013). Otro mecanismo para la síntesis y aumento de niveles de serina es la vía del glicerato, la cual ocurre en citoplasma en paralelo con la glucólisis, donde requiere

como materia prima de glicerato y alanina (Ros et al., 2014). Es importante considerar que este análisis fue diseñado y empleado para evaluar cambios de metabolitos en respuesta a la eliminación de AtMICU1 en plantas cultivadas en periodos controlados de luz y oscuridad, por lo tanto, estos resultados muestran cambios a nivel global en metabolitos y no fueron diseñados para comprender las contribuciones circadianas para cada conjunto de metabolitos. En estas especificaciones, monitoreamos niveles aumentados de glicerato y alanina en paralelo con la disminución de los niveles de carbohidratos y el aumento de los aminoácidos en la planta que carece del regulador de MCU. Por lo anterior, es tentador especular que la señalización de calcio exacerbada podría activar la biosíntesis de serina a través de alguna o todas las vías de biosíntesis de serina. Las repercusiones metabólicas derivadas de la eliminación genética de AtMICU1 encontradas en el presente proyecto se pueden resumir en la Figura 16 y se pueden describir de la siguiente manera: en presencia de señalización de  $Ca^{2+}$  exacerbada debido a la ausencia del regulador de MCU en *A. thaliana*, el metabolismo oxidativo se incrementa produciendo niveles reducidos de carbohidratos, así como, intermediarios del ciclo TCA (ácido tricarbóxico) y otros productos finales, entre ellos aminoácidos. Cabe destacar que Wagner y colaboradores han detectado una mayor capacidad de las plantas AtMICU1-KO para oxidar piruvato/malato (Wagner et al., 2015). Además, la acumulación de aminoácidos de señalización como el GABA puede contribuir a un estado de estrés constitutivo, caracterizado por un crecimiento alterado probablemente a través de la regulación de los niveles de expresión de los transportadores de aniones, incluidos el malato (Xu, Long, et al., 2021; Xu, Sai, et al., 2021). También es probable que las alteraciones en los niveles de serina contribuyan a los cambios de fenotipo descritos en el presente proyecto. En conjunto, los resultados presentados en este escrito brindan información sobre el vínculo entre el transportador de calcio dependiente de MCU y su impacto a nivel metabólico. La caracterización adicional de tales cambios en diferentes niveles “ómicos” es un trabajo en el que nos encontramos muy entusiasmados y en constante progreso en nuestro laboratorio.



**Figura 16.** Propuesta de perfil metabólico en hojas de *A. thaliana* AtMICU. Las variaciones en los niveles de distintos aminoácidos y carbohidratos llevan a proponer que los cambios ocasionados por la eliminación genética de AtMICU incrementan el metabolismo oxidativo a expensas de una disminución en los niveles de carbohidratos y acumulación de precursores de estrés.

En forma interesante, Teardo y colegas (2017) demostraron que las plantas carentes de AtMICU presentan un aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial inducido por la adición de los sustratos piruvato y malato. El análisis metabólico implementado en el presente trabajo no contó con los controles necesarios para cuantificar estos ácidos orgánicos. Sin embargo, bajo otras condiciones la eliminación de AtMICU incrementó la oxidación de estos sustratos respiratorios. Estos resultados también presentan especial relevancia, ya que sugieren que los mecanismos de control respiratorio por  $\text{Ca}^{2+}$  descritos por Lehninger hace décadas bien, podrían estar conservados en otras especies (Carafoli & Lehninger, 1971).

De acuerdo al modelo computacional, este sigue en constante estudio, el presentado en el actual proyecto funge como base para poder seguir desarrollando un mejor modelo y poder evaluarlo más a fondo con los obtenido hasta ahora.

Considerado los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, se puede evidenciar la relevancia del control activo en la concentración mitocondrial de iones

calcio mediada por AtMICU en *A. thaliana* y ponen de manifiesto la relevancia de este transportador iónico en el control del metabolismo.

## 7. Conclusiones

- Se comprobó que las plantas Col-0 y AtMICU presentan una morfología de hojas similar en condiciones basales.
- Se observó que las mitocondrias en hojas de ambos genotipos cuentan con un  $\Delta\Psi$  estable.
- La eliminación genética de AtMICU resulta en raíces de mayor tamaño en semillas no estratificadas.
- La eliminación genética de AtMICU ocasiona raíces de menor longitud en semillas estratificadas.
- Se generó un modelo de homotetrámero de AtMCU con características similares a modelos de otras especies disponibles en repositorios.
- Las plantas carentes de AtMICU presentan cambios significativos en los niveles de aminoácidos y carbohidratos en comparación con su contraparte Col-0.

## 8. Perspectivas

- Continuar con la construcción del holocomplejo MCU, además del análisis de los datos obtenidos hasta ahora por dinámica molecular.
- Expresar heterológamente la subunidad EMRE de *Mus musculus* en *A. thaliana* y comprobar si se incrementa la velocidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Realizar un análisis metabolómico más profundo tratando de establecer los flujos metabólicos que están ocurriendo en la cepa silvestre y la cepa mutante que carece del regulador de MCU.
- Evaluar la respuesta de ambas cepas a otros tipos de estrés abiótico, así como el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 9. Referencias

- Åhrman, E., Lambert, W., Aquilina, J. A., Robinson, C. v., & Emanuelsson, C. S. (2007). Chemical cross-linking of the chloroplast localized small heat-shock protein, Hsp21, and the model substrate citrate synthase. *Protein Science*, 16(7), 1464–1478. <https://doi.org/10.1110/ps.072831607>
- Al-Shehbaz, I. A., & O’Kane, S. L. (2002). Taxonomy and Phylogeny of Arabidopsis (Brassicaceae). *The Arabidopsis Book*, 1(1821), e0001. <https://doi.org/10.1199/tab.0001>
- Baines, C. P., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2018). The still uncertain identity of the channel-forming unit(s) of the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Calcium*, 73(April), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.05.003>
- Basha, E., Friedrich, K. L., & Vierling, E. (2006). The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39943–39952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607677200>
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Kotliansky, V., & Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nature10234>
- Bick, A. G., Calvo, S. E., & Mootha, V. K. (2012a). Evolutionary diversity of the mitochondrial calcium uniporter. *Science*, 336(6083), 886. <https://doi.org/10.1126/science.1214977>
- Bick, A. G., Calvo, S. E., & Mootha, V. K. (2012b). Evolutionary diversity of the mitochondrial calcium uniporter. *Science*, 336(6083), 886. <https://doi.org/10.1126/science.1214977>

- Boudsocq, M., & Laurière, C. (2005). Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiology*, *138*(3), 1185–1194. <https://doi.org/10.1104/pp.105.061275>
- Bround, M. J., Bers, D. M., & Molkenin, J. D. (2020). A 20/20 view of ANT function in mitochondrial biology and necrotic cell death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *144*, A3–A13. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.012>
- Burke, J. J., O'mahony, P. J., Burke, J. J., & O'mahony, P. J. (2001). PHYSIOLOGY Protective Role in Acquired Thermotolerance of Developmentally Regulated Heat Shock Proteins in Cotton Seeds. In *The Journal of Cotton Science* (Vol. 5). <http://journal.cotton.org>,
- Carafoli, E., & Lehninger, A. L. (1971). A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. *Biochemical Journal*, *122*(5), 681–690. <https://doi.org/10.1042/bj1220681>
- Chang, Y., Liu, H., Liu, N., Chi, W., Wang, C., Chang, S., & Wang, T. (2007). A Heat-Inducible Transcription Factor, HsfA2, Is Required for Extension of Acquired Thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *143*(1), 251–262. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091322>
- Chen, J., Burke, J. J., Velten, J., & Xin, Z. (2006). FtsH11 protease plays a critical role in Arabidopsis thermotolerance. *Plant Journal*, *48*(1), 73–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02855.x>
- Chigri, F., Flosdorff, S., Pilz, S., Kölle, E., Dolze, E., Gietl, C., & Vothknecht, U. C. (2012). The Arabidopsis calmodulin-like proteins AtCML30 and AtCML3 are targeted to mitochondria and peroxisomes, respectively. *Plant Molecular Biology*, *78*(3), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9856-z>
- Csordás, G., Golenár, T., Seifert, E. L., Kamer, K. J., Sancak, Y., Perocchi, F., Moffat, C., Weaver, D., de la Fuente, S., Bogorad, R., Kotliansky, V., Adijanto, J., Mootha, V. K., & Hajnóczky, G. (2013a). MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter. *Cell Metabolism*, *17*(6), 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.020>

- Csordás, György., Golenár, Tünde., Seifert, E. L., Kamer, K. J., Sancak, Y., Perocchi, F., Moffat, C., Weaver, D., de la Fuente, S., Bogorad, R., Koteliansky, V., Adijanto, J., Mootha, V. K., & Hajnóczky, G. (2013b). MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter. *Cell Metabolism*, 17(6), 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.020>
- Dafny-Yelin, M., Tzfira, T., Vainstein, A., & Adam, Z. (2008). Non-redundant functions of sHSP-CIs in acquired thermotolerance and their role in early seed development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 67(4), 363–373. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9326-4>
- Damineli, D. S. , Portes, M. T. , & Feijó, J. A. (2020). Analyzing intracellular gradients in pollen tubes. In *Pollen and Pollen Tube Biology* (pp. 201-210). In *Pollen and Pollen Tube Biology* (pp. 201–210). <http://www.springer.com/series/7651>
- de Bortoli, S., Teardo, E., Szabò, I., Morosinotto, T., & Alboresi, A. (2016). Evolutionary insight into the ionotropic glutamate receptor superfamily of photosynthetic organisms. *Biophysical Chemistry*, 218, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.07.004>
- de Col, V., Petrusa, E., Casolo, V., Braidot, E., Lippe, G., Filippi, A., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., Giorgio, V., Checchetto, V., Vianello, A., Bernardi, P., & Zancani, M. (2018). Properties of the permeability transition of pea stem mitochondria. *Frontiers in Physiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01626>
- de Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabó, I., & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature10230>
- Dorp, K. Vom, Hölzl, G., Plohm, C., Eisenhut, M., Abraham, M., Weber, A. P. M., Hanson, A. D., & Dörmann, P. (2015). Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for Tocopherol synthesis and growth of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 27(10), 2846–2859. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00395>

- Feno, S., Rizzuto, R., Raffaello, A., & Vecellio Reane, D. (2021). The molecular complexity of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Cell Calcium*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102322>
- Fiehn, O. (2006). Metabolite Profiling in Arabidopsis. *Arabidopsis Protocols. Human Press*, 323, 439–447.
- Fiehn, O. (2008). Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.007>
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2016. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Flores-Herrera, C., Gutiérrez-Mireles, E. R., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2021). Leaf Mesophyll Mitochondrial Polarization Assessment in Arabidopsis thaliana. *Methods and Protocols*, 4(4), 84. <https://doi.org/10.3390/mps4040084>
- Flores-Herrera, C., Preciado-Linares, G., Gonzalez-Vizueth, I., Corona de la Peña, N., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2019). In situ assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes. *Protoplasma*, 256(2), 503–509. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1316-z>
- Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, 0004(July), 319–324. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1)
- Fukushima, A., Kusano, M., Redestig, H., Arita, M., & Saito, K. (2011). Metabolomic correlation-network modules in Arabidopsis based on a graph-clustering approach. *BMC Systems Biology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-1>
- Gong, M., Chen, S. N., Song, Y. Q., & Li, Z. G. (1997). Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, 24(3), 371–379. <https://doi.org/10.1071/PP96118>

- Grata, E., Boccard, J., Guillarme, D., Glauser, G., Carrupt, P. A., Farmer, E. E., Wolfender, J. L., & Rudaz, S. (2008). UPLC-TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *871*(2), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.021>
- Gutbrod, K., Romer, J., & Dörmann, P. (2019). Phytol metabolism in plants. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 74, pp. 1–17). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.002>
- Gutiérrez-Aguilar, M. (2020). Mitochondrial calcium transport and permeability transition as rational targets for plant protection. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1861*(12), 148288. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148288>
- Gutiérrez-Aguilar, M., & Baines, C. P. (2013). Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers. *Biochemical Journal*, *454*(3), 371–386. <https://doi.org/10.1042/BJ20121753>
- Gutiérrez-Aguilar, M., Douglas, D. L., Gibson, A. K., Domeier, T. L., Molkentin, 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. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.008>
- Hall, D. D., Wu, Y., Domann, F. E., Spitz, D. R., & Anderson, M. E. (2014). Mitochondrial calcium uniporter activity is dispensable for MDA-MB-231 breast carcinoma cell survival. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096866>
- He, L., Li, B., Lu, X., Yuan, L., Yang, Y., Yuan, Y., Du, J., & Guo, S. (2015). The effect of exogenous calcium on mitochondria, respiratory metabolism enzymes and ion transport in cucumber roots under hypoxia. *Scientific Reports*, *5*(August 2014), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep11391>

- Hirschi, K. (2001). Vacuolar H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> transport: who's directing the traffic? *Trends in Plant Science*, 6(3), 100–104. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01863-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01863-X)
- Hong, S.-W., & Vierling, E. (2000). Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 4392-4397. [www.stanford.edu/Arabidopsis](http://www.stanford.edu/Arabidopsis)
- Howarthi, C. J., Pollock, C. J., & Peacock, J. M. (1997). Development of laboratory-based methods for assessing seedling thermotolerance in pearl millet. In *New Phytol* (Vol. 137).
- Kamer, K. J., Grabarek, Z., & Mootha, V. K. (2017). High-affinity cooperative Ca<sup>2+</sup> binding by MICU 1–MICU 2 serves as an on–off switch for the uniporter. *EMBO Reports*, 18(8), 1397–1411. <https://doi.org/10.15252/embr.201643748>
- Knight, H. (1999). Calcium signaling during abiotic stress in plants. In *International Review of Cytology* (Vol. 195, pp. 269–324). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62707-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62707-2)
- Kusano, M., Fukushima, A., Arita, M., Jonsson, P., Moritz, T., Kobayashi, M., Hayashi, N., Tohge, T., & Saito, K. (2007). Unbiased characterization of genotype-dependent metabolic regulations by metabolomic approach in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Systems Biology*, 1. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-1-53>
- Larkindale, J., & Knight, M. R. (2002). Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology*, 128(2), 682–695. <https://doi.org/10.1104/pp.010320>
- Lee, C. P., Elsässer, M., Fuchs, P., Fenske, R., Schwarzländer, M., & Millar, A. H. (2021). The versatility of plant organic acid metabolism in leaves is underpinned by mitochondrial malate–citrate exchange. *The Plant Cell*. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab223>

- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Lenne, C., & Douce, R. (1994). A Low Molecular Mass Heat-Shock Protein 1s Localized to Higher Plant Mitochondria. In *Plant Physiol* (Vol. 105). <https://academic.oup.com/plphys/article/105/4/1255/6068245>
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1(1), 387–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>
- Littlejohn, G. R., Gouveia, J. D., Edner, C., Smirnoff, N., & Love, J. (2010). Perfluorodecalin enhances in vivo confocal microscopy resolution of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *New Phytologist*, 186(4), 1018–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03244.x>
- Littlejohn, G. R., & Love, J. (2012). A simple method for imaging arabidopsis leaves using perfluorodecalin as an infiltrative imaging medium. *Journal of Visualized Experiments*, 2(59), 1–4. <https://doi.org/10.3791/3394>
- Liu, J. C., Syder, N. C., Ghorashi, N. S., Willingham, T. B., Parks, R. J., Sun, J., Fergusson, M. M., Liu, J., Holmström, K. M., Menazza, S., Springer, D. A., Liu, C., Glancy, B., Finkel, T., & Murphy, E. (2020). EMRE is essential for mitochondrial calcium uniporter activity in a mouse model. *JCI Insight*, 5(4). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134063>
- Logan, D. C. (2006). The mitochondrial compartment. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), 1225–1243. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj151>
- 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., Bonthron, D. T., Pysden, K. A., Whyte, T., Munteanu, I., Foley, A. R., Wheway, G., Szymanska, K., Natarajan, S., Abdelhamed, Z. A., ... Sheridan, E. (2014). Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary

alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nature Genetics*, 46(2), 188–193.  
<https://doi.org/10.1038/ng.2851>

López-Aquino, M. C. (2021). *Caracterización del transporte de calcio intracelular en Arabidopsis thaliana*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Loro, G., Drago, I., Pozzan, T., Schiavo, F. L., Zottini, M., & Costa, A. (2012). Targeting of Cameleons to various subcellular compartments reveals a strict cytoplasmic/mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling relationship in plant cells. *The Plant Journal*, 71 (1), 1–13.

Loro, G., Wagner, S., Doccia, F. G., Behera, S., Weinl, S., Kudla, J., Schwarzländer, M., Costa, A., & Zottini, M. (2016). Chloroplast-specific in vivo Ca<sup>2+</sup> imaging using yellow Cameleon fluorescent protein sensors reveals organelle-autonomous Ca<sup>2+</sup> signatures in the stroma. *Plant Physiology*, 171(4), 2317–2330. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00652>

Lytovchenko, A., Beleggia, R., Schauer, N., Isaacson, T., Leuendorf, J. E., Hellmann, H., Rose, J. K., & Fernie, A. R. (2009). Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues. *Plant Methods*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-5-4>

Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*, 28(1), 67–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01306.x>

Mallilankaraman, K., Doonan, P., Cárdenas, C., Chandramoorthy, H. C., Müller, M., Miller, R., Hoffman, N. E., Gandhirajan, R. K., Molgó, J., Birnbaum, M. J., Rothberg, B. S., Mak, D. O. D., Foskett, J. K., & Madesh, M. (2012). MICU1 is an essential gatekeeper for mcu-mediated mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake that regulates cell survival. *Cell*, 151(3), 630–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.011>

Martino, M. R., Gutiérrez-Aguilar, M., Yiew, N. K. H., Lutkewitte, A. J., Singer, J. M., McCommis, K. S., Ferguson, D., Liss, K. H. H., Yoshino, J., Renkemeyer, M. K., Smith, G. I., Cho, K., Fletcher, J. A., Klein, S., Patti, G. J., Burgess, S. C., &

- Finck, B. N. (2022). Silencing alanine transaminase 2 in diabetic liver attenuates hyperglycemia by reducing gluconeogenesis from amino acids. *Cell Reports*, 39(4). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110733>
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. In *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* (Vol. 41, Issue 3, pp. 445–502). <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1966.tb01501.x>
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., & Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434(7033), 652–658. <https://doi.org/10.1038/nature03317>
- Oikawa, K., Imai, T., Thagun, C., Toyooka, K., Yoshizumi, T., Ishikawa, K., Kodama, Y., & Numata, K. (2021). Mitochondrial movement during its association with chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01833-8>
- Oxenoid, K., Dong, Y., Cao, C., Cui, T., Sancak, Y., Markhard, A. L., Grabarek, Z., Kong, L., Liu, Z., Ouyang, B., Cong, Y., Mootha, V. K., & Chou, J. J. (2016). Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 533(7602), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature17656>
- Páez-Franco, J. C., Maravillas-Montero, J. L., Mejía-Domínguez, N. R., Torres-Ruiz, J., Tamez-Torres, K. M., Pérez-Fragoso, A., Germán-Acacio, J. M., Ponce-De-León, A., Gómez-Martín, D., & Ulloa-Aguirre, A. (2022). Metabolomics analysis identifies glutamic acid and cystine imbalances in COVID-19 patients without comorbid conditions. Implications on redox homeostasis and COVID-19 pathophysiology. *PLoS ONE*, 17(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274910>
- 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<sup>2+</sup>

- Flux and Sensitivity to Ru360. *Molecular Cell*, 72(4), 778-785.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.008>
- Pallafacchina, G., Zanin, S., & Rizzuto, R. (2018). Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake [version 1; referees: 4 approved]. In *F1000Research* (Vol. 7). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15723.1>
- Pedroza-García, J. A., Nájera-Martínez, M., de la Paz Sanchez, M., & Plasencia, J. (2014). 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. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0277-7>
- Penna, E., Espino, J., de Stefani, D., & Rizzuto, R. (2018). The MCU complex in cell death. In *Cell Calcium* (Vol. 69, pp. 73–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.008>
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012). JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death and Disease*, 3(11). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.171>
- Perez, D. E., Steen Hoyer, J., Johnson, A. I., Moody, Z. R., Lopez, J., & Kaplinsky, N. J. (2009). BOBBER1 is a noncanonical Arabidopsis small heat shock protein required for both development and thermotolerance. *Plant Physiology*, 151(1), 241–252. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142125>
- Plecitá-Hlavatá, L., & Ježek, P. (2016). Integration of superoxide formation and cristae morphology for mitochondrial redox signaling. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 80, pp. 31–50). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.010>
- 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., Taneja, N., OShea, J., Koteliensky, V., & Mootha, V. K. (2013). MICU2, a Paralog of MICU1, Resides

within the Mitochondrial Uniporter Complex to Regulate Calcium Handling. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055785>

Ponce-Pineda, I. G., Carmona-Salazar, L., Saucedo-García, M., Cano-Ramírez, D., Morales-Cedillo, F., Peña-Moral, A., Guevara-García, Á. A., Sánchez-Nieto, S., & Gavilanes-Ruíz, M. (2021). Mpk6 kinase regulates plasma membrane h<sup>+</sup>-atpase activity in cold acclimation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126338>

Rajdev, S., & Reynolds, I. J. (1993). Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. *Neuroscience Letters*, 162(1–2), 149–152. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90582-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90582-6)

Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., Domingos, P., Ullah, S., Wege, S., Shabala, S., Feijó, J. A., Ryan, P. R., & Gillham, M. (2015a). GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8879>

Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., Domingos, P., Ullah, S., Wege, S., Shabala, S., Feijó, J. A., Ryan, P. R., & Gillham, M. (2015b). GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8879>

Raval, P. K., Garg, S. G., & Gould, S. B. (2022). Endosymbiotic selective pressure at the origin of eukaryotic cell biology. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/elife.81033>

Renault, H., el Amrani, A., Berger, A., Mouille, G., Soubigou-Taconnat, L., Bouchereau, A., & Deleu, C. (2013).  $\gamma$ -Aminobutyric acid transaminase deficiency impairs central carbon metabolism and leads to cell wall defects during salt stress in Arabidopsis roots. *Plant, Cell and Environment*, 36(5), 1009–1018. <https://doi.org/10.1111/pce.12033>

- Rizzuto, R., de Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Issue 9, pp. 566–578). <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Roessner-Tunali, U., Hegemann, B., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruedigam, C., Granot, D., & Fernie, A. R. (2003). Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiology*, 133(1), 84–99. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023572>
- Ros, R., Muñoz-Bertomeu, J., & Krueger, S. (2014). Serine in plants: Biosynthesis, metabolism, and functions. In *Trends in Plant Science* (Vol. 19, Issue 9, pp. 564–569). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.003>
- Rossi, A., Pizzo, P., & Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1866, Issue 7, pp. 1068–1078). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>
- Ruan, X., Ma, L., Zhang, Y., Wang, Q., & Gao, X. (2021). Dissection of the complex transcription and metabolism regulation networks associated with maize resistance to *Ustilago maydis*. *Genes*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/genes12111789>
- Ruberti, C., Feitosa-Araujo, E., Xu, Z., Wagner, S., Grenzi, M., Darwish, E., Lichtenauer, S., Fuchs, P., Parmagnani, A. S., Balcerowicz, D., Schoenaers, S., de la Torre, C., Mekkaoui, K., Nunes-Nesi, A., Wirtz, M., Vissenberg, K., van Aken, O., Hause, B., Costa, A., & Schwarzländer, M. (2022). MCU proteins dominate in vivo mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in Arabidopsis roots. *The Plant Cell*, 34(11), 4428–4452. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac242>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 225–236. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- 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., Calvo, S. E.,

- Goldberger, O., & Mootha, V. K. (2013). EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science*, *342*(6164), 1379–1382. <https://doi.org/10.1126/science.1242993>
- Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J. F. (1999). Communicating with Calcium. In *The Plant Cell* (Vol. 11). [www.plantcell.org](http://www.plantcell.org)
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, *14*(SUPPL.). <https://doi.org/10.1105/tpc.002899>
- Selles, B., Michaud, C., Xiong, T. C., Leblanc, O., & Ingouff, M. (2018a). Arabidopsis pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex. *New Phytologist*, *219*(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/nph.15189>
- Selles, B., Michaud, C., Xiong, T. C., Leblanc, O., & Ingouff, M. (2018b). Arabidopsis pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex. *New Phytologist*, *219*(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/nph.15189>
- Sengupta, S., Mukherjee, S., Basak, P., & Majumder, A. L. (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, Issue AUG). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00656>
- Senthil-Kumar, M., Srikanthbabu, V., Mohan Raju, B., Ganeshkumar, Shivaprakash, N., & Udayakumar, M. (2003). Screening of inbred lines to develop a thermotolerant sunflower hybrid using the temperature induction response (TIR) technique: A novel approach by exploiting residual variability. *Journal of Experimental Botany*, *54*(392), 2569–2578. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg278>
- Seufferheld, M. J., & Curzi, M. J. (2010). Recent discoveries on the roles of polyphosphates in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, *28*(4), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0187-z>

- Shao, H. B., Song, W. Y., & Chu, L. Y. (2008). Advances of calcium signals involved in plant anti-drought. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(8), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.03.012>
- Shoshan-Barmatz, V., Pittala, S., & Mizrachi, D. (2019). VDAC1 and the TSPO: Expression, interactions, and associated functions in health and disease states. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133348>
- Silva-Correia, J., Freitas, S., Tavares, R. M., Lino-Neto, T., & Azevedo, H. (2014). Phenotypic analysis of the Arabidopsis heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-7>
- Song, L., Jiang, Y., Zhao, H., & Hou, M. (2012). Acquired thermotolerance in plants. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Vol. 111, Issue 3, pp. 265–276). <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0198-6>
- Srikanthbabu, V., Krishnaprasad, B. T., Gopalakrishna, R., Savitha, M., & Udayakumar, M. (2002). Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response technique (TIR). In *J. Plant Physiol* (Vol. 159). <http://www.urbanfischer.de/journals/jpp>
- Su, P. H., & Li, H. M. (2008). Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology*, 146(3), 1231–1241. <https://doi.org/10.1104/pp.107.114496>
- Teardo, E., Carraretto, L., Moscatiello, R., Cortese, E., Vicario, M., Festa, M., Maso, L., de Bortoli, S., Cali, T., Vothknecht, U. C., Formentin, E., Cendron, L., Navazio, L., & Szabo, I. (2019). A chloroplast-localized mitochondrial calcium uniporter transduces osmotic stress in Arabidopsis. *Nature Plants*, 5(6), 581–588. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0434-8>

- Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 50, 571–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>
- Timm, S., Florian, A., Wittmiß, M., Jahnke, K., Hagemann, M., Fernie, A. R., & Bauwe, H. (2013). Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 162(1), 379–389. <https://doi.org/10.1104/pp.113.215970>
- Tonsor, S. J., Alonso-Blanco, C., & Koornneef, M. (2005). Gene function beyond the single trait: Natural variation, gene effects, and evolutionary ecology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 28(1), 2–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01264.x>
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-toyota, S., Jiaqi, W., & Zhang, T. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 6(September), 1112–1115.
- Tzin, V., & Galili, G. (2010). The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, 8, e0132. <https://doi.org/10.1199/tab.0132>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.02.004>
- Wagner, S., Behera, S., De Bortoli, S., Logan, D. C., Fuchs, P., Carraretto, L., Teardo, E., Cendron, L., Nietzel, T., Füll, M., Doccia, F. G., Navazio, L., Fricker, M. D., Van Aken, O., Finkemeier, I., Meyer, A. J., Szabò, I., Costa, A., & Schwarzländer, M. (2015). The EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding protein MICU choreographs mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 27(11), 3190–3212. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00509>

- Wagner, S., de Bortoli, S., Schwarzländer, M., & Szabò, I. (2016). Regulation of mitochondrial calcium in plants versus animals. *Journal of Experimental Botany*, 67(13), 3809–3829. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw100>
- Wang, C., Baradaran, R., & Long, S. B. (2020). Structure and Reconstitution of an MCU–EMRE Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter Complex. *Journal of Molecular Biology*, 432(20), 5632–5648. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.013>
- Wang, C., Jacewicz, A., Delgado, B. D., Baradaran, R., & Long, S. B. (2020). Structures reveal gatekeeping of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter by MICU1-MICU2. *ELife*, 9, 1–30. <https://doi.org/10.7554/eLife.59991>
- Wang, Y., Xu, L., Shen, H., Wang, J., Liu, W., Zhu, X., Wang, R., Sun, X., & Liu, L. (2015). Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & cd stress response of radish roots. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep18296>
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. In *Annals of Botany* (Vol. 92, Issue 4, pp. 487–511). <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>
- Xu, B., Long, Y., Feng, X., Zhu, X., Sai, N., Chirkova, L., Betts, A., Herrmann, J., Edwards, E. J., Okamoto, M., Hedrich, R., & Gilliam, M. (2021). GABA signalling modulates stomatal opening to enhance plant water use efficiency and drought resilience. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21694-3>
- Xu, B., Sai, N., & Gilliam, M. (2021). The emerging role of GABA as a transport regulator and physiological signal. *Plant Physiology*, 187(4), 2005–2016. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab347>
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J. M., Seki, M., Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., SchöZ, F., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics*, 286(5–6), 321–332. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0647-7>

- Zhang, B., Carrie, C., Ivanova, A., Narsai, R., Murcha, M. W., Duncan, O., Wang, Y., Law, S. R., Albrecht, V., Pogson, B., Giraud, E., van Aken, O., & Whelan, J. (2012). LETM proteins play a role in the accumulation of mitochondrially encoded proteins in *Arabidopsis thaliana* and AtLETM2 displays parent of origin effects. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(50), 41757–41773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.383836>
- Zhao, X., Wang, J., Yuan, J., Wang, X. L., Zhao, Q. P., Kong, P. T., & Zhang, X. (2015). NITRIC OXIDE-ASSOCIATED PROTEIN1 (AtNOA1) is essential for salicylic acid-induced root waving in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *207*(1), 211–224. <https://doi.org/10.1111/nph.13327>
- Zheng, W., Zhang, C., Li, Y., Pearce, R., Bell, E. W., & Zhang, Y. (2021). Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Reports Methods*, *1*(3), 100014. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>
- Zimmermann, S. E., Benstein, R. M., Flores-Tornero, M., Blau, S., Anoman, A. D., Rosa-Téllez, S., Gerlich, S. C., Salem, M. A., Alseekh, S., Kopriva, S., Wewer, V., Flügge, U. I., Jacoby, R. P., Fernie, A. R., Giavalisco, P., Ros, R., & Krueger, S. (2021). The phosphorylated pathway of serine biosynthesis links plant growth with nitrogen metabolism. *Plant Physiology*, *186*(3), 1487–1506. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAB167>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, *552*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>

**Anexo**

```

Model_01:ASSQRTWLGHGGLRSCVTVKTPSEDEEEKKK 30
Model_01:BSSQRTWLGHGGLRSCVTVKTPSEDEEEKKK 30
Model_01:CSSQRTWLGHGGLRSCVTVKTPSEDEEEKKK 30
Model_01:DSSQRTWLGHGGLRSCVTVKTPSEDEEEKKK 30
6dt0.1.A-----

Model_01:AEITIAEAKKLMRLVNVEDMKKKLVGVADRD 60
Model_01:BEITIAEAKKLMRLVNVEDMKKKLVGVADRD 60
Model_01:CEITIAEAKKLMRLVNVEDMKKKLVGVADRD 60
Model_01:DEITIAEAKKLMRLVNVEDMKKKLVGVADRD 60
6dt0.1.A-----

Model_01:AVVSYSTLLEASQGMGIARSPDEAHVFARVL 90
Model_01:BVVSYSTLLEASQGMGIARSPDEAHVFARVL 90
Model_01:CVVSYSTLLEASQGMGIARSPDEAHVFARVL 90
Model_01:DVVSYSTLLEASQGMGIARSPDEAHVFARVL 90
6dt0.1.A-----

Model_01:ADDAGVVLIFRDKVYLHPDKVVDLIRRAMPL 120
Model_01:BDDAGVVLIFRDKVYLHPDKVVDLIRRAMPL 120
Model_01:CDDAGVVLIFRDKVYLHPDKVVDLIRRAMPL 120
Model_01:DDAGVVLIFRDKVYLHPDKVVDLIRRAMPL 120
6dt0.1.A-----

Model_01:ADQNPEEDQIKKEEFNKLRLIMKEEIDVLAHRQ 150
Model_01:BDQNPEEDQIKKEEFNKLRLIMKEEIDVLAHRQ 150
Model_01:CDQNPEEDQIKKEEFNKLRLIMKEEIDVLAHRQ 150
Model_01:DDQNPEEDQIKKEEFNKLRLIMKEEIDVLAHRQ 150
6dt0.1.A----LRKMSSEIDGLAKIKHECDLLAHR 280

Model_01:AVRKILWCGLATSMVQIGLFFRLTFW-EFSW 179
Model_01:BRVKILWCGLATSMVQIGLFFRLTFW-EFSW 179
Model_01:CRVKILWCGLATSMVQIGLFFRLTFW-EFSW 179
Model_01:DRVKILWCGLATSMVQIGLFFRLTFW-EFSW 179
6dt0.1.AAHRLLAKGGFGLLAGWVGVVVVYTFHTFEFGW 310

Model_01:ADVMEPITFFATATGIIVGYAYFLMTRSDEPT 209
Model_01:BDVMEPITFFATATGIIVGYAYFLMTRSDEPT 209
Model_01:CDVMEPITFFATATGIIVGYAYFLMTRSDEPT 209
Model_01:DDVMEPITFFATATGIIVGYAYFLMTRSDEPT 209
6dt0.1.ADDEPVTYLAGLITTIMGGYLVFLYINKDLS 340

Model_01:AYQDFMKRFLFLSRQRKLLKSHKFD CERFKEL 239
Model_01:BYQDFMKRFLFLSRQRKLLKSHKFD CERFKEL 239
Model_01:CYQDFMKRFLFLSRQRKLLKSHKFD CERFKEL 239
Model_01:DYQDFMKRFLFLSRQRKLLKSHKFD CERFKEL 239
6dt0.1.AYKAAAMNVTVSRRQHALLYEMPSFD CERWEQL 370

Model_01:AERLFKMTSSCHAAAASIRNRYVGLIEDLEDAL 269
Model_01:BERLFKMTSSCHAAAASIRNRYVGLIEDLEDAL 269
Model_01:CEERLFKMTSSCHAAAASIRNRYVGLIEDLEDAL 269
Model_01:DERLFKMTSSCHAAAASIRNRYVGLIEDLEDAL 269
6dt0.1.AVQDANAL--RRRIRVIAVEYDVVDW----- 392

Model_01:AQSRRD 274
Model_01:BQSRRD 274
Model_01:CQSRRD 274
Model_01:DQSRRD 274
6dt0.1.A-----

```

**Figura S1.** Alineamiento del oligómero de MCU de *A. thaliana* con el oligómero de MCU de *N. crassa*.

**A** PDBe > 6dt0

**Cryo-EM structure of a mitochondrial calcium uniporter**

**Source organism:** *Neurospora crassa*

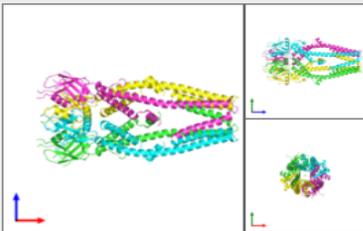
**Primary publication:**  
 [Cryo-EM structure of a mitochondrial calcium uniporter.](#)

Yoo J, Wu M, Yin Y, Herzik MA, Lander GC, Lee SY  
*Science* (2018)  
 PMID: 29954988

**Related structures:** [EMD-8911](#)

**Electron Microscopy**  
**3,7Å resolution**

**Released:** 11 Jul 2018  
**DOI:** [10.2210/pdb6dt0/pdb](#)



---

**B** PDBe > 6xqn

**Structure of a mitochondrial calcium uniporter holocomplex (MICU1, MICU2, MCU, EMRE) in low Ca<sup>2+</sup>**

**Source organisms:**

- *Tribolium castaneum*
- *Homo sapiens*

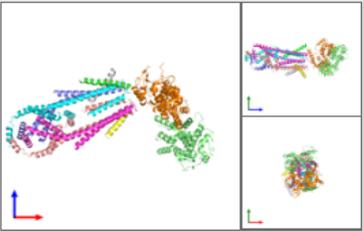
**Primary publication:**  
 [Structures reveal gatekeeping of the mitochondrial Ca<sub>2+</sub> uniporter by MICU1-MICU2.](#)

Wang C, Jacewicz A, Delgado BD, Baradaran R, Long SB  
*Elife* 9 (2020)  
 PMID: 32667285

**Related structures:** [EMD-22290](#)

**Electron Microscopy**  
**3,3Å resolution**

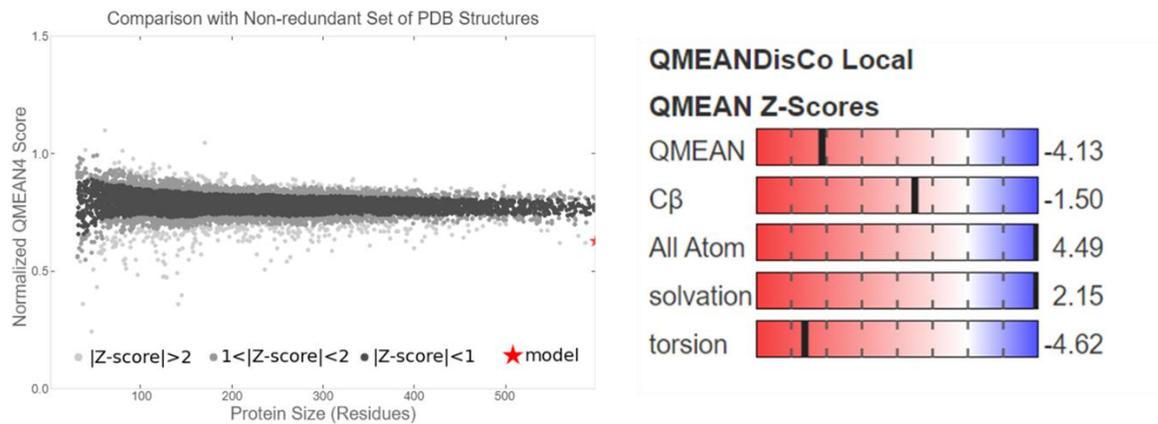
**Released:** 29 Jul 2020  
**DOI:** [10.2210/pdb6xqn/pdb](#)



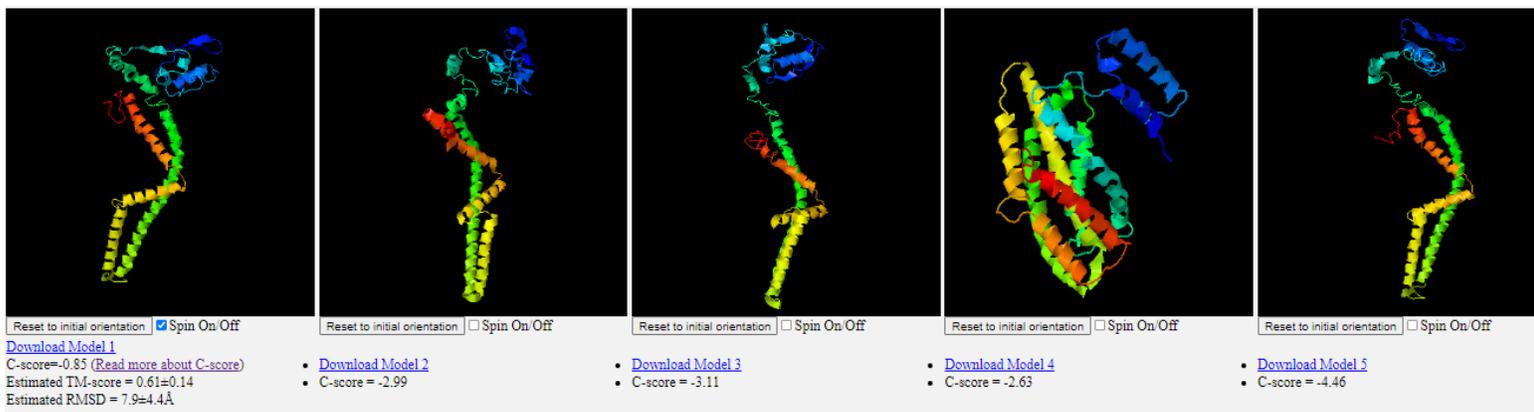
**Figura S2.** Identificación de estructuras de proteínas probables que cuentan con similitudes al tetrámero de MCU de *A. thaliana*. A) Tetrámero de MCU de *N. crassa*. B) Tetrámero de MCU de *T. castaneum*.

Template	Sequence Identity	Biounit Oligo State	Description
6dt0.1	28.68	homo-tetramer	Mitochondrial calcium uniporter Cryo-EM structure of a mitochondrial calcium uniporter
6xqn.1	26.01	hetero-9-mer	Calcium uniporter protein Structure of a mitochondrial calcium uniporter holocomplex (MICU1, MICU2, MCU, EMRE) in low Ca <sup>2+</sup>
6xqn.1	26.01	hetero-9-mer	Calcium uniporter protein Structure of a mitochondrial calcium uniporter holocomplex (MICU1, MICU2, MCU, EMRE) in low Ca <sup>2+</sup>
6x4s.1	26.16	homo-octamer	Calcium uniporter protein, Protein EMRE homolog, mitochondrial-like Protein fusion MCU-EMRE complex of a metazoan mitochondrial calcium uniporter
6o58.1	31.91	hetero-16-mer	Calcium uniporter protein, mitochondrial Human MCU-EMRE complex, dimer of channel

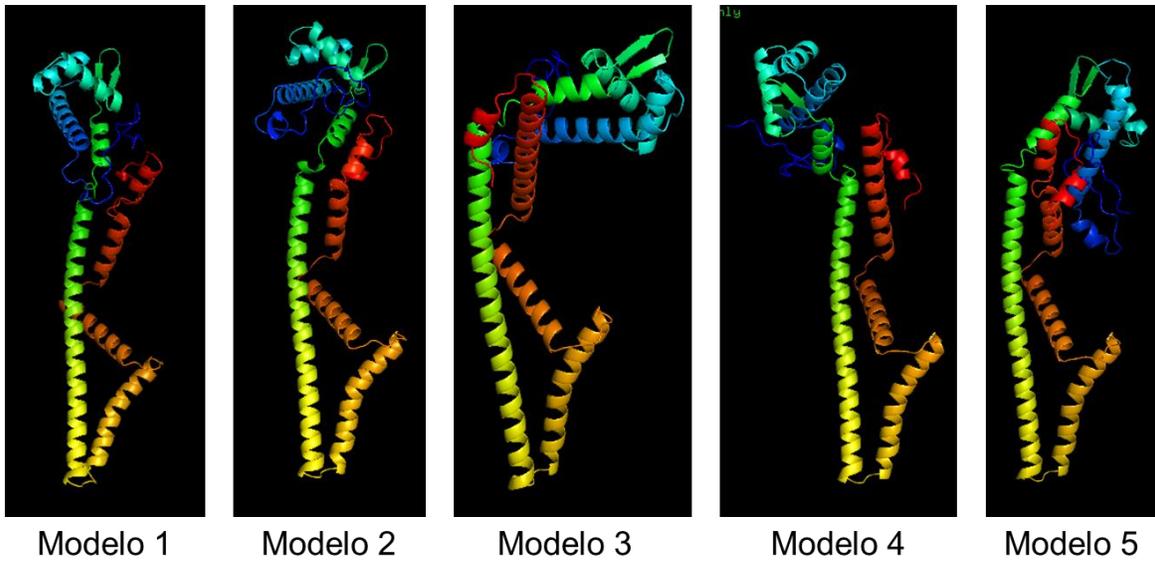
**Figura S3.** Porcentaje de Identidad de la secuencia de MCU de *N. crassa* a partir de MCU de *A. thaliana*.



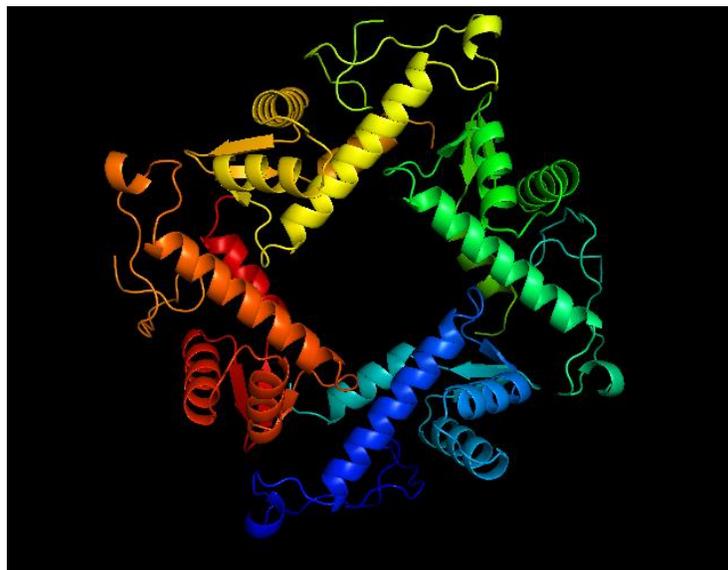
**Figura S4.** Parámetros estadísticos de validación al hacer modelado por homología de MCU de *A. thaliana*. QMEAN generado por SWISS-MODEL.



**Figura S5.** Modelos generados del oligómero de MCU de *A. thaliana* con los valores estadísticos de validación C-score y RMSD obtenidos por I-TASSER.



**Figura S6.** Modelos generados del oligómero de MCU de *A. thaliana* por RAPTOR-X.



**Figura S7.** Construcción de las secciones de los carboxilos terminales (aminoácidos de 272 a 292 de cada oligómero) en el tetrámero de MCU de *A. thaliana* obtenidos por GALAXYWEB/GalaxyHomomer.