

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN
A CALMODULINA EN Ca^{2+} - ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y
DE ORGANELOS”**

Realizado por:

GÉNESIS GIANELLA MANTILLA BEDOYA

Director del proyecto:

Dr. José Rubén Ramírez Iglesias, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 15 de marzo de 2022

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A
CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE
ORGANELOS**

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, GÉNESIS GIANELLA MANTILLA BEDOYA, con cédula de identidad #172583858-3, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Génesis Gianella Mantilla Bedoya

C.I. 1725838583

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A
CALMODULINA EN Ca^{2+} - ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE
ORGANELOS**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A
CALMODULINA EN Ca^{2+} - ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE
ORGANELOS”**

Realizado por:

Génesis Gianella Mantilla Bedoya

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A
CALMODULINA EN Ca^{2+} - ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE
ORGANELOS**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

Después de revisar el trabajo presentado, lo
han calificado como apto para su defensa oral
ante el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 15 de marzo de 2022

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A
CALMODULINA EN Ca^{2+} - ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE
ORGANELOS**

Para someter a:

To be submitted:

Génesis Mantilla¹, Juan Carlos Navarro²,

José Rubén Ramírez Iglesias²,

**“ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A
CALMODULINA EN Ca^{2+} - ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE
ORGANELOS”**

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

² Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud

Quito, Ecuador.

15 de marzo de 2022

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD. José Rubén Ramírez Iglesias,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-986391273; Email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Resumen

La señalización celular mediada por el Ca^{2+} es uno de los procesos presentes en diferentes grupos del árbol de la vida, siendo la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) uno de los mecanismos más relevantes al movilizar Ca^{2+} intracelular al exterior gracias al dominio de unión a calmodulina (CaMBD) que, posee una alta afinidad por la calmodulina (CaM) y cuando interactúan se estimula la actividad enzimática de las PMCA. Aún con el alto nivel de conservación de CaM, los CaMBD en PMCA carecen de secuencias consenso por lo que, el objetivo de este trabajo es realizar un análisis *in-silico* de la estructura primaria de CaMBD en Ca^{2+} -ATPasas de membrana plasmática e intracelulares, para determinar sus características y posibles motivos específicos.

Para lo cual, se identificaron patrones en MEME a partir de 22 secuencias con CaMBD comprobados experimentalmente o putativas, obteniendo CaMBD1-4 a partir de los cuales, se obtuvieron 98 secuencias de diferentes organismos. El total de secuencias fue analizado mediante programas bioinformáticos obteniendo que, CaMBD-1 y CaMBD-4 son característicos del reino Animalia y están localizados en el C-terminal, mientras que CaMBD-3 está presente en el reino Plantae en el N-terminal y, CaMBD-2 se encuentra en ambos reinos tanto en organismos unicelulares como pluricelulares. Se determinaron 9 grupos para la evaluación de parámetros fisicoquímicos de CaMBD, teniendo de 1 a 2 residuos hidrofóbicos en su estructura primaria, una carga neta positiva y una longitud entre 8 y 15 residuos. Dando como resultado que, CaMBD-1 es similar a los motivos de unión a calmodulina Ca^{2+} dependientes, mientras que CaMBD2-4 podrían ser considerados motivos no canónicos.

Palabras clave: Ca^{2+} -ATPasas de membrana plasmática, Motivos de unión a calmodulina, Calmodulina

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Abstract

Ca^{2+} -mediated cell signaling is a process widely spread in the tree of life, being the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) one of the most relevant mechanisms in charge of the mobilization of intracellular Ca^{2+} to the outside, thanks to the calmodulin-binding domain (CaMBD), which has a high affinity for calmodulin (CaM) and their interaction stimulates the enzymatic activity of PMCAs. Even with the high level of CaM conservation, CaMBDs in PMCAs lack consensus sequences; therefore, the aim of this work is to perform an in-silico analysis of the primary structure of CaMBDs in plasma membrane and intracellular Ca^{2+} -ATPasas, to determine their characteristics and possible motifs.

For this purpose, patterns were identified in MEME from 22 sequences with experimentally proven or putative CaMBD, obtaining CaMBD1-4 from which 98 sequences of different organisms were obtained. The total sequences were analyzed by bioinformatics programs obtaining that CaMBD-1 and CaMBD-4 are characteristic of the Animalia kingdom and are located at the C-terminus, while CaMBD-3 is present in the Plantae kingdom at the N-terminus and CaMBD-2 is found in both kingdoms in unicellular and multicellular organisms. Nine groups were determined for the evaluation of physicochemical parameters of CaMBD, having 1 to 2 hydrophobic residues in its primary structure, a net positive charge and a length between 8 and 15 residues. As a result, CaMBD-1 is similar to the Ca^{2+} dependent motif while CaMBD2-4 could be considered non-canonical motifs.

Keywords: Plasma membrane Ca^{2+} -ATPasas, Calmodulin-binding motifs, Calmodulin.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Introducción

Las células se encuentran en un proceso de regulación constante gracias a diversos estímulos que desencadenan una respuesta a través de la transducción de señales, las cuales necesitan de moléculas o iones cuya concentración varíe en el tiempo y así sirvan de mensajeros en la transmisión de señales. Uno de los mensajeros más versátil y ampliamente encontrado en diferentes vías de transducción de señales es el ion calcio (Ca^{2+}), también conocido como un segundo mensajero universal (Clapham, 2007).

Esta cualidad le ha sido otorgada al Ca^{2+} debido a que, al ser un ligando con una polaridad capaz de alterar la carga y por ende la conformación estructural de las proteínas, participa en varios mecanismos de transducción involucrados en la fosforilación y desfosforilación de proteínas, proliferación y diferenciación celular, transcripción de genes, contracción y excitación de músculos, neurotransmisión y muerte celular programada. Debido a esto la señalización celular mediada por el Ca^{2+} es uno de los procesos presentes en diferentes grupos del árbol de la vida, desde bacterias hasta organismos eucariotas con diversos niveles de complejidad (Cai et al., 2015; Krebs, 2017).

El proceso de la señalización por Ca^{2+} se basa en un cambio en la concentración intracelular del catión que provoca la activación de respuestas celulares. La concentración citosólica del Ca^{2+} se encuentra entre 100 y 200 nM, también conocida como la concentración de Ca^{2+} basal de la célula (Bootman & Bultynck, 2020), mientras que su concentración extracelular es 10000 a 20000 veces mayor, es decir en el rango de mM. Esta variación muestra un gradiente de concentración mantenido a través de la membrana plasmática (Cai et al., 2015).

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Para mantener este gradiente se necesitan de varios mecanismos como canales de Ca^{2+} , intercambiadores iónicos, uniporters, proteínas con sitios de unión al Ca^{2+} y bombas o ATPasas localizadas en organelos, membrana plasmática y citosol. Entre estos mecanismos destaca la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) que es la responsable de las señalizaciones desencadenadas por el Ca^{2+} en los microdominios de la membrana plasmática (Brini & Carafoli, 2009; Calì et al., 2017). Además, en conjunto con la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA), la PMCA posee un papel crítico en la homeostasis del Ca^{2+} , expulsando el catión hacia el ambiente extracelular, mientras que SERCA lo moviliza hacia el interior del retículo endoplásmico (Krebs et al., 2015; Skupin & Thurley, 2012).

Las PMCA y las bombas tipo PMCA pertenecen a la subfamilia PII (subtipo IIB) de las ATPasas tipo P (Wu et al., 2018) que se caracterizan por sufrir cambios conformacionales durante el ciclo catalítico, gracias a la energía producida por la formación de acil fosfato (intermediario fosforilado) a partir de ATP. Esto permite la movilización de un Ca^{2+} a través de la membrana, en contra del gradiente, por cada molécula de ATP hidrolizada. Otra característica de este tipo de bombas es la inhibición de la actividad enzimática por orto vanadato ($\text{VO}_3(\text{OH})^2$) y La^{3+} (di Leva et al., 2008; Krebs, 2017).

Además, la estructura de las PMCA está conformada por diez dominios transmembrana (M1-10) y una región autoinhibitoria que contiene el dominio de unión a calmodulina (CaMBD), el cual se localiza en el dominio C terminal en ATPasas IIB de animales, mientras que en plantas se sitúa en el dominio N terminal. El CaMBD posee una alta afinidad por la calmodulina (CaM) y cuando interactúan se estimula la actividad enzimática de las PMCA, al incrementar su afinidad por el Ca^{2+} (Pedersen et al., 2012; Wu et al., 2018).

La CaM es una proteína intracelular capaz de unirse al Ca^{2+} , actuando como un segundo mensajero en la transducción de señales en las células eucariotas de animales, plantas, hongos y protozoos. La secuencia de CaM es altamente conservada en los sistemas eucariotas, en

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} - ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

especial en los mamíferos (Elíes et al., 2020; la Verde et al., 2018; Pittman, 2011; Plattner & Verkhatsky, 2015).

La estructura de CaM está constituida por dos lóbulos que son los dominios N y C terminal. Cada lóbulo posee dos motivos de unión a Ca^{2+} , llamados “mano EF”, con una estructura hélice-bucle-hélice y que están conectados entre sí por una hélice extendida, la cual le otorga la flexibilidad necesaria a la proteína para cambiar su estado conformacional cuando interacciona con diferentes péptidos (Andrews et al., 2020; Dürvanger & Harmat, 2019).

En ausencia de interacción con Ca^{2+} los lóbulos de CaM adoptan una conformación llamada apo, en la que sus residuos hidrofóbicos no interaccionan con el medio; sin embargo, cuando el Ca^{2+} se encuentra unido a los cuatro motivos EF de CaM, la proteína sufre cambios conformacionales que le permite la exposición de porciones hidrofóbicas que facilitan su unión los ligandos o proteínas diana, formando un núcleo hidrofóbico (Hoeflich & Ikura, 2002; Vetter & Leclerc, 2003; Villalobo et al., 2018; Yamniuk & Vogel, 2004). Aún con el alto nivel de conservación de la CaM, no existe una secuencia consenso para su sitio de unión en las moléculas blanco (Mruk et al., 2014). A pesar de esto, los CaMBD poseen varias características fisicoquímicas similares entre las cuales podemos mencionar una carga neta positiva, una propensión a formar estructuras anfipáticas, una conformación tipo hélice alfa y una hidrofobicidad moderada; mientras que su estructura se basa en una longitud del dominio entre 15 y 30 residuos, con patrones específicos de aminoácidos (Hoeflich & Ikura, 2002; Ishida & Vogel, 2006; Yamniuk & Vogel, 2004).

Por lo general, esos patrones de residuos son catalogados en dos grandes grupos: Los motivos de unión a CaM - Ca^{2+} independientes, que contienen una secuencia consenso denominada motivo IQ (IQXXXRGXXR), y los motivos de unión a CaM - Ca^{2+} dependientes (Rhoads & Friedberg, 1997). Estos últimos motivos están conformados por residuos hidrofóbicos que actúan como los principales sitios de anclaje para los lóbulos de la CaM y

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

pueden ir de 1-10 a 1-18, dependiendo de la posición de residuos alifáticos y aromáticos en la secuencia (Rhoads & Friedberg, 1997; Tidow & Nissen, 2013). Además, pueden existir varios sitios de anclaje, los cuales pueden estar separados por máximo 6 residuos cuando son cercanos entre sí o, estar alejados por 16 a 17 residuos (V. Kumar et al., 2013; Mruk et al., 2014).

La principal interacción entre la CaM y sus sitios de unión en las PMCA y bombas tipo PMCA ocurre gracias a residuos de triptófano (W) y fenilalanina (F) en las posiciones 1 y 18 respectivamente, en los motivos específicos (1-18) que actúan como sitios de anclaje para los dominios N y C terminal de la CaM (Ishida & Vogel, 2010; Penheiter et al., 2005; Ramírez-Iglesias et al., 2018). Esta interacción desencadena la pérdida del efecto autoinhibitorio de los dominios N y C terminal sobre la bomba, provocando un incremento en la actividad enzimática y la modificación de parámetros cinéticos como la K_m y V_{max} (Brini & Carafoli, 2009; di Leva et al., 2008).

Comúnmente, las características anteriormente mencionadas han sido utilizadas para diseñar programas y algoritmos que sirven en la predicción de las estructuras primarias y secundarias de los CaMBD de diversas proteínas diana y/o interés, siendo la determinación de estas secuencias putativas el paso previo a la experimentación, con el fin comprobar su funcionalidad (Mruk et al., 2014; Yap et al., 2000).

A pesar de que los CaMBD en las PMCA y bombas tipo PMCA carecen de secuencias consenso, diversos estudios demuestran cierto nivel de conservación en secuencias identificadas y caracterizadas en varios grupos de especies (Chen et al., 2013; Ip et al., 2017; Kraev et al., 1999; Pérez-Gordones et al., 2017; Zoccola et al., 2004). Por lo que, el estudio de patrones específicos de aminoácidos en CaMBD presentes a lo largo de la evolución, específicamente en organismos eucariotas, podría ayudar a detectar propiedades físico químicas y motivos específicos que mejoren el proceso de identificación de este tipo de dominios. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis *in-silico* de la estructura primaria de

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

CaMBD en Ca^{2+} -ATPasas de membrana plasmática e intracelulares, con el fin de determinar sus características, motivos específicos y sus posibles relaciones evolutivas, en organismos de diferentes niveles de complejidad biológica.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Materiales y Métodos

Búsqueda de secuencias aminoacídicas de CaMBD en bases de datos y literatura

La búsqueda sistemática de secuencias de CaMBD de Ca^{2+} -ATPasas identificadas y caracterizadas en diferentes organismos, se realizó en dos bases de datos, PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) y ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), usando varias palabras clave y términos de búsqueda tales como “Calmodulin”, “Calmodulin Binding Domain”, “Calmodulin Binding Motif”, “Calmodulin Binding Site”, “ Ca^{2+} -ATPase”, “PMCA”, “Calcium Pumps”, “Vacuolar Pumps” y “Calcium Signaling”. Los mismos fueron combinados entre sí o utilizados individualmente en los motores de búsqueda de las bases de datos anteriormente mencionadas.

Se consideró al menos uno de los siguientes criterios de inclusión, para incorporar una secuencia al análisis: 1) Ca^{2+} -ATPasas estimuladas por CaM, con una secuencia aminoacídica de CaMBD comprobada experimentalmente, 2) Ca^{2+} -ATPasas con una secuencia de CaMBD putativa localizada en el dominio N o C terminal de la bomba. En ambos casos, las secuencias deben estar detalladas y delimitadas en el texto de los estudios seleccionados, además de presentar su número de acceso asociado, en el repositorio GenBank.

Análisis de las secuencias aminoacídicas e identificación de dominios

Todas las secuencias aminoacídicas utilizadas en este estudio fueron alineadas utilizando el programa MUSCLE en MEGA X (S. Kumar et al., 2018), con los parámetros predeterminados para las penalidades en la apertura (-2.90) y extensión (0.00) de gaps.

De los alineamientos obtenidos, fueron seleccionadas las secciones correspondientes a los CaMBD ubicados hacia el dominio N o C terminal. Estos alineamientos se utilizaron en la

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

detección de motivos, basándose en la ocurrencia, con el servidor Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) (<http://meme-suite.org/tools/meme>) (Bailey et al., 2009). Los parámetros establecidos para el análisis fueron: detección de 4 motivos que posean de 0 a 1 ocurrencia por secuencia, con una longitud entre 6 y 15 aminoácidos (aa). Además, el orden de detección fue establecido de menor a mayor, con base en el valor *E*, el mismo que debe ser menor a 1. Los motivos identificados por el servidor MEME fueron definidos como motivos de CaMBD (1-4 conforme el orden de detección) en esta investigación.

Ocurrencia de motivos de CaMBD y análisis filogenético

Se realizó el BLAST de proteína (blastp) y PSI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Boratyn et al., 2013) empleando los CaMBD 1-4 obtenidos en el MEME, contra diversos grupos taxonómicos y usando los parámetros predeterminados del servidor. La búsqueda se enfocó en el Dominio Eukarya, con la exclusión del reino Fungi. Cabe recalcar que se usaron los CaMBD 1-4 individualmente y en combinaciones.

Únicamente fueron seleccionadas aquellas secuencias pertenecientes a PMCA, Ca²⁺-ATPasas o ATPasas P-tipo, además de poseer un “query coverage” de 100.00% y un porcentaje de identidad mayor al 80.00%. Por otro lado, se verificó la existencia de los motivos identificados por MEME, mediante la herramienta Motif Alignment and Search Tool (<https://meme-suite.org/meme/tools/mast>) (MAST) (Bailey & Gribskov, 2000) donde se analizaron las secuencias completas de las bombas para identificar la existencia y posición de los motivos de CaMBD con un valor *E* máximo de 1.

Adicionalmente, en MEGA 11 (Tamura et al., 2021) se realizaron las matrices p-distance intra e inter grupos utilizando delección pairwise y un bootstrap de 1000, según las clases taxonómicas indicadas en el NCBI Taxonomy Browser

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} - ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>) (Schoch et al., 2020) y, los análisis filogenéticos correspondientes a Neighbor Joining, con un bootstrap de 1000 y delección pairwise, siendo el modelo de sustitución el p-distance y utilizando todos los gaps. Por otra parte, para el análisis de Máxima Parsimonia, se utilizaron los parámetros de bootstrap de 1000, se tomaron en cuenta todos los gaps y el método fue el de Tree-Bisection-Regrafting (TBR). Para ambos análisis, el outgroup seleccionado fueron las secuencias cuyo CaMBD se localizó en el dominio N terminal de las proteínas.

La determinación del modelo de sustitución para Máxima Similitud (Maximum Likelihood) se realizó en el servidor de IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (Miller et al., 2010) con parámetros de default y un bootstrap de 1000. Una vez obtenido el modelo, se procedió a la construcción del árbol en el servidor Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) (<https://www.phylo.org/index.php>) (Miller et al., 2010) escogiendo la opción de RAxML-HPC2 on XSEDE y bootstrap de 1000, con el modelo de sustitución respectivo y, definiendo el outgroup como aquellas secuencias con el CaMBD en el dominio N terminal.

Análisis de la estructura primaria de los motivos de CaMBD en los taxones evaluados

La selección de los grupos taxonómicos a evaluar se realizó tomando como base el árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima Similitud. Para formar un grupo taxonómico (**G1-G9**) se consideró un bootstrap (**BS**) mayor a 95.

Los porcentajes de ocurrencia para cada aminoácido en los CaMBD fueron determinados por el análisis de secuencia de cada grupo taxonómico en MEGA 11 (Tamura et al., 2021), mientras que, los parámetros fisicoquímicos se evaluaron en diferentes servidores. El índice de Grand Average of Hydropathicity (GRAVY) (https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_gravy.html) y el Punto Isoeléctrico (IEP)

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

(https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_iep.html) se determinaron con ayuda del servidor Sequence Manipulation Site (SMS) (Stothard, 2000), mientras que el Índice Alifático (<https://web.expasy.org/protparam/>) se analizó con el servidor de Expasy del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) (Gasteiger et al., 2003). Por otra parte, la Carga Neta a pH 7.0 de los motivos de CaMBD se determinó con el servidor PepCalc (<https://pepcalc.com/>) de Innovagen (Lear & Cobb, 2016).

Las diferencias estadísticas fueron establecidas con valor de p menor a 0.05, usando el test de Kruskal Wallis, para todas las características fisicoquímicas analizadas según los grupos taxonómicos (G1-G9) previamente establecidos. Además, se realizó un mapa de calor en el que participaron las secuencias con nodos internos mayores a 90 de bootstrap. Todos los gráficos y análisis estadísticos fueron generados mediante el paquete de software Statgraphics18 Ver 18.1.12.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Resultados

Análisis de secuencias de Ca^{2+} -ATPasas presentes en bases de datos con CaMBD putativos y comprobados experimentalmente

La búsqueda de secuencias de bombas Ca^{2+} -ATPasas que tengan identificadas y caracterizadas sus CaMBD con los criterios propuestos para esta investigación, logró recopilar un total de 22 secuencias de la literatura, de las cuales 17 secuencias son de organismos pluricelulares. Dentro de las mismas, 11 pertenecen a animales (Metazoa) y 6 a plantas terrestres, mientras que las 5 secuencias restantes pertenecen a parásitos unicelulares (**Tabla 1**).

La mayoría de secuencias de CaMBD recopiladas son de carácter putativo, basadas en alineamientos de aminoácidos con otros CaMBD o usando herramientas bioinformáticas como el servidor Calmodulin Target Data Base (Yap et al., 2000), mientras que 8 secuencias fueron comprobadas experimentalmente a través de diversos ensayos, confirmando su interacción con CaM.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺-ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Tabla 1. Secuencias de CaMBD de Ca²⁺-ATPasas de diferentes especies.

Clase	Especie	Número de acceso	Tipo	Secuencia aminoacídica	Referencia
Mammalia	<i>Homo sapiens</i>	NP_001675.3	PMCA4b	I(1091)LWFRGLNRIQTQIKVVKAF(1110) *	(Enyedi et al., 1989; Penheiter et al., 2005)
Mammalia	<i>Rattus norvegicus</i>	AAA81006.1	PMCA4b	L(1086)RRGQILWVRGLNRIQTQIRVVKV FHSF(1113)	(Keeton & Shull, 1995)
Arachnida	<i>Tetranychus urticae</i>	XP_025018446.1	PMCA	Q(1119)ILWIRGLTRLQTQ(1132)	(Hou et al., 2017)
Malacostraca	<i>Callinectes sapidus</i>	AFE19188.1	PMCA	D(1008)GKDSKRTGQILWIRGLTRLQTQ(1030)	(Chen et al., 2013)
Malacostraca	<i>Procambarus clarkii</i>	AAR28532.1	PMCA3	H(1121)AERELRRGQILWFRGLNRIQTQ (1141)	(Gao & Wheatly, 2004)
Anthozoa	<i>Stylophora pistillata</i>	AAR13013.1	PMCA	R(1079)LLWIRGLTRLQHQRVVNAF(109 9)	(Zoccola et al., 2004)
Echinoidea	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	NP_001028822.1	PMCA	K(1075)RAQILWMRGLTRLQQQIRVVHA F(1098)	(Gunaratne et al., 2006)
Bivalvia	<i>Tridacna squamosa</i>	AML22898.1	PMCA	Q(1109)ILWVRGLTRLQQQIRVVNAF(112 9)	(Ip et al., 2017)
Trematoda	<i>Fasciola hepatica</i>	AFM84633.1	PMCA	G(1103)KILWVRGVNRIQTQMKVVDAFR M(1126)*	(Moore et al., 2012)
Secernentea	<i>Caenorhabditis elegans</i>	CAA09308.1	ARNm de Ca ²⁺ ATPasa (mca2)	R(1071)AGQSLWLLGLTRLQTQIRVVKA F(1094)	(Kraev et al., 1999)
Secernentea	<i>Caenorhabditis elegans</i>	CAA09303.1	ARNm de Ca ²⁺ ATPasa (mca3)	R(1064)SGQILWVRGLTRLQTQLRVVKA F(1087)	(Kraev et al., 1999)
Kinetoplastea	<i>Leishmania major</i>	XP_001680970.1	Ca ²⁺ ATPasa tipo Vacuolar	W(1058)YRAYAEHVGTLRVVNAF(1075)	(Pérez-Gordones et al., 2017)

*Secuencias de CaMBD comprobadas experimentalmente.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Tabla 1 (cont.)

Clase	Especie	Número de acceso	Tipo	Secuencia aminoacídica	Referencia
Kinetoplastea	<i>Trypanosoma equiperdum</i>	AQT20549.1	PMCA	S(1037)RWRRLQAEHVKKPRVVNAFRR AWTD(1062)*	(Pérez-Gordones et al., 2017; Ramírez-Iglesias et al., 2018)
Kinetoplastea	<i>Trypanosoma brucei</i>	XP_846957.1	Ca ²⁺ ATPasa tipo Vacuolar	W(1039)RRLQAEHVKKPRVVNAF(1056)	(Pérez-Gordones et al., 2017)
Kinetoplastea	<i>Trypanosoma cruzi</i>	AAC38969.1	Ca ²⁺ ATPasa tipo Vacuolar	W(1058)QQVREHHIAVRSVNAF(1074)	(Pérez-Gordones et al., 2017)
Eumycetozoa	<i>Dictyostelium discoideum</i>	CAA61551.1	mRNA de proteína PAT1	W(1067)QIVRQTHKKLVVINALKE(1085)	(O'Day, Mathavarajah, et al., 2020; O'Day, Taylor, et al., 2020)
Magnoliopsida	<i>Brassica oleracea</i>	CAA68234.1	ARNm de Ca ²⁺ ATPasa (BCA1)	A(19)RQRWRSSVSIVKNRARRFRMISNL(43)*	(Malmström et al., 1997)
Magnoliopsida	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_191292.1	Ca ²⁺ ATPasa autoinhibida (ACA11)	R(20)QRWRSSVGLVKNRARRF(37)*	(Lee et al., 2007)
Magnoliopsida	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAC26997.1	PMCA (ACA2)	V(20)LEKWRNLGCVV(31)	(Harper et al., 1998)
Magnoliopsida	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAG35585.1	PMCA (ACA4)	K(13)NPSLEARQRWRSSVSIVKNRTRRF RNIRDLD(44)	(Geisler et al., 2000)
Magnoliopsida	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB96189.1	Ca ²⁺ ATPasa autoinhibida (ACA 8)	I(41)ERLQQWRKAALVLN(55)*	(Bonza et al., 2000)
Magnoliopsida	<i>Glycine max</i>	AAG28435.1	PMCA (SCA1)	L(21)QRWRRLCGIVKNPRRRFRF(40)* M(53)RRTIQEKLRIAILVSKA(70)*	(Chung et al., 2000)

*Secuencias de CaMBD comprobadas experimentalmente.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺-ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Alineamiento de las secuencias de Ca²⁺-ATPasas y de sus CaMBD

Las secuencias de Ca²⁺-ATPasas presentes en las bases de datos fueron alineadas dependiendo de la localización del CaMBD en la proteína, ya sea en el dominio N o C terminal. La **Figura 1** muestra el alineamiento de las bombas con sus CaMBD ubicados en el C terminal. En total son 16 secuencias de longitudes entre 23 y 29 aminoácidos, en las cuales se muestra la sección mejor alineada, que incluye la región del CaMBD, detalladas en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, junto con residuos adicionales.

A pesar de las diferencias entre secuencias, es posible detectar similitudes como la presencia del residuo W en todos los organismos, ubicado hacia el extremo N terminal de la porción alineada. De igual forma, se observa la predominancia de residuos arginina (R), valina (V), alanina (A) y fenilalanina (F), localizados hacia el extremo C terminal.

Figura 1. Alineamiento de los CaMBD localizados en el dominio C terminal de las Ca²⁺-ATPasas presentes en las bases de datos.

1. Homo sapiens PMCA4b (NP 001675.3)	E	L	R	R	G	Q	I	L	-	-	W	F	R	G	L	N	R	I	Q	T	Q	I	K	V	V	K	A	F	H	
2. Rattus norvegicus PMCA4 (AAA81006.1)	E	L	R	R	G	Q	I	L	-	-	W	V	R	G	L	N	R	I	Q	T	Q	I	R	V	V	K	V	F	H	
3. Tetranychus urticae PMCA2 (XP 025018446.1)	V	K	R	T	G	Q	I	L	-	-	W	I	R	G	L	T	R	L	Q	T	Q	V	-	I	G	G	E	L	Q	
4. Callinectes sapidus PMCA (AFE19188.1)	S	K	R	T	G	Q	I	L	-	-	W	I	R	G	L	T	R	L	Q	T	Q	V	C	V	G	G	P	V	R	
5. Procambarus clarkii PMCA3 (AAR28532.1)	E	L	R	R	G	Q	I	L	-	-	W	F	R	G	L	N	R	I	Q	T	Q	I	E	V	V	N	A	F	K	
6. Stylophora pistillata PMCA (AAR13013.1)	-	-	-	-	A	R	L	L	-	-	W	I	R	G	L	T	R	L	Q	H	Q	I	R	V	V	N	A	F	R	
7. Strongylocentrotus purpuratus PMCA (NP 001028822.1)	-	-	K	R	A	Q	I	L	-	-	W	M	R	G	L	T	R	L	Q	Q	Q	I	R	V	V	H	A	F	Q	
8. Tridacna squamosa PMCA (AML22898.1)	-	G	R	R	G	Q	I	L	-	-	W	V	R	G	L	T	R	L	Q	Q	Q	I	R	V	V	N	A	F	Q	
9. Fasciola hepatica PMCA (AFM84633.1)	L	N	L	G	G	K	I	L	-	-	W	V	R	G	V	N	R	I	Q	T	Q	M	K	V	V	D	A	F	R	
10. Caenorhabditis elegans PMCA (CAA09308.1)	H	Q	R	A	G	Q	S	L	-	-	W	L	L	G	L	T	R	L	Q	T	Q	I	R	V	V	K	A	F	Q	
11. Caenorhabditis elegans CalcioATPasa (CAA09303.1)	-	-	R	S	G	Q	I	L	-	-	W	V	R	G	L	T	R	L	Q	T	Q	L	R	V	V	K	A	F	R	
12. Leishmania major VATPasa (XP 001680970.1)	K	A	K	R	A	R	V	L	S	L	W	Y	R	A	Y	A	E	H	V	G	T	L	R	V	V	N	A	F	R	
13. Trypanosoma equiperdum PMCA (AQT20549.1)	G	R	L	R	A	Q	S	R	-	-	W	R	R	L	Q	A	E	H	V	K	K	P	R	V	V	N	A	F	R	
14. Trypanosoma brucei VATPasa2 (XP 846957.1)	G	R	L	R	A	Q	S	R	-	-	W	R	R	L	Q	A	E	H	V	K	K	P	R	V	V	N	A	F	R	
15. Trypanosoma cruzi CalcioATPasa (AAC38969.1)	R	R	L	L	A	Q	A	M	-	-	W	Q	Q	V	R	E	H	H	I	-	-	A	V	R	S	V	N	A	F	R
16. Dictyostelium discoideum PMCA PAT1 (CAA61551.1)	L	N	K	P	T	Q	V	G	R	G	W	Q	I	V	R	Q	T	H	K	-	-	K	L	V	V	I	N	A	L	K

Por otra parte, el alineamiento de las Ca²⁺-ATPasas con CaMBD localizados en el dominio N terminal, denota un alto nivel de conservación en esta región (**Figura 2**). Cabe recalcar que, la sección mejor alineada fue delimitada usando como referencia la secuencia de CaMBD de *Arabidopsis thaliana* PMCA ACA4, con el número de acceso AAG35585.1, la cual presenta la región más extensa de todos los CaMBD analizados.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺-ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Figura 2. Alineamiento de los CaMBD localizados en el dominio N terminal de las Ca²⁺-ATPasas presentes en las bases de datos.

1. Brassica oleracea PMCA (CAA68234.1)	K	N	P	S	L	E	A	R	Q	R	W	R	S	S	V	S	I	V	K	N	R	A	R	R	F	R	M	I	S	N	L	E	K	L	A	E
2. Arabidopsis thaliana PMCA ACA11 (NP 191292.1)	K	N	P	S	L	E	A	R	Q	R	W	R	S	S	V	G	L	V	K	N	R	A	R	R	F	R	M	I	S	N	L	D	K	L	A	E
3. Arabidopsis thaliana PMCA ACA4 (AAG35585.1)	K	N	P	S	L	E	A	R	Q	R	W	R	S	S	V	S	I	V	K	N	R	T	R	R	F	R	N	I	R	D	L	D	K	L	A	D
4. Arabidopsis thaliana PMCA (AAC26997.1)	K	H	S	S	E	E	V	L	E	K	W	R	N	L	C	G	V	V	K	N	P	K	R	R	F	R	F	T	A	N	L	S	K	R	Y	E
5. Arabidopsis thaliana PMCA (CAB96189.1)	K	N	A	S	I	E	R	L	Q	Q	W	R	K	A	-	A	L	V	L	N	A	S	R	R	F	R	Y	T	L	D	L	K	K	-	-	-
6. Glycine max PMCA (AAG28435.1)	K	N	S	P	E	E	V	L	Q	R	W	R	L	C	G	I	V	K	N	P	R	R	R	F	R	F	T	A	N	L	S	K	R	D	E	

Con las secciones mejor alineadas de los CaMBD presentes en los dominios N y C terminal, se obtuvo un alineamiento general de las 22 secuencias (**Figura 3**), donde se evidencia al residuo W como el aminoácido más conservado en ambos dominios. Sin embargo, no se evidencian otros residuos que sean altamente conservados en todos los organismos.

Figura 3. Alineamiento de los CaMBD ubicados hacia los dominios N y C terminal, de las secuencias Ca²⁺-ATPasas.

1. Homo sapiens PMCA4b (NP 001675.3)	-	-	E	L	R	R	G	Q	I	L	W	F	R	-	-	-	G	L	N	R	I	Q	T	Q	I	K	V	V	K	A	F	H
2. Rattus norvegicus PMCA4 (AAA81006.1)	-	-	E	L	R	R	G	Q	I	L	W	V	R	-	-	-	G	L	N	R	I	Q	T	Q	I	R	V	V	K	V	F	H
3. Tetranymphus urticae PMCA2 (XP 025018446.1)	-	-	V	K	R	T	G	Q	I	L	W	I	R	-	-	-	G	L	T	R	L	Q	T	Q	V	-	I	G	G	E	L	Q
4. Callinectes sapidus PMCA (AFE19188.1)	-	-	S	K	R	T	G	Q	I	L	W	I	R	-	-	-	G	L	T	R	L	Q	T	Q	V	C	V	G	G	P	V	R
5. Procambarus clarkii PMCA3 (AAR28532.1)	-	-	E	L	R	R	G	Q	I	L	W	F	R	-	-	-	G	L	N	R	I	Q	T	Q	I	E	V	V	N	A	F	K
6. Stylophora pistillata PMCA (AAR13013.1)	-	-	-	-	-	-	A	R	L	L	W	I	R	-	-	-	G	L	T	R	L	Q	H	Q	I	R	V	V	N	A	F	R
7. Strongylocentrotus purpuratus PMCA (NP 001028822.1)	-	-	-	-	K	R	A	Q	I	L	W	M	R	-	-	-	G	L	T	R	L	Q	Q	Q	I	R	V	V	H	A	F	Q
8. Tridacna squamosa PMCA (AML22898.1)	-	-	-	G	R	R	G	Q	I	L	W	V	R	-	-	-	G	L	T	R	L	Q	Q	Q	I	R	V	V	N	A	F	Q
9. Fasciola hepatica PMCA (AFM84633.1)	-	-	L	N	L	G	G	K	I	L	W	V	R	-	-	-	G	V	N	R	I	Q	T	Q	M	K	V	V	D	A	F	R
10. Caenorhabditis elegans PMCA (CAA09308.1)	-	-	H	Q	R	A	G	Q	S	L	W	L	L	-	-	-	G	L	T	R	L	Q	T	Q	I	R	V	V	K	A	F	Q
11. Caenorhabditis elegans Calcio-ATPasa (CAA09303.1)	-	-	-	R	S	G	Q	I	L	W	V	R	-	-	-	-	G	L	T	R	L	Q	T	Q	L	R	V	V	K	A	F	R
12. Leishmania major V-ATPasa (XP 001680970.1)	K	A	K	R	A	R	V	L	S	L	W	Y	R	-	-	-	A	Y	A	E	H	V	G	T	L	R	V	V	N	A	F	R
13. Trypanosoma equiperdum PMCA (AQT20549.1)	-	-	G	R	L	R	A	Q	S	R	W	R	R	-	-	-	L	Q	A	E	H	V	K	K	P	R	V	V	N	A	F	R
14. Trypanosoma brucei V-ATPasa2 (XP 846957.1)	-	-	G	R	L	R	A	Q	S	R	W	R	R	-	-	-	L	Q	A	E	H	V	K	K	P	R	V	V	N	A	F	R
15. Trypanosoma cruzi Calcio-ATPasa (AAC38969.1)	-	-	R	R	L	L	A	Q	A	M	W	Q	Q	-	-	-	V	R	E	H	H	I	A	V	R	S	V	N	A	F	R	
16. Dictyostelium discoideum PMCA PAT1 (CAA61551.1)	L	N	K	P	T	Q	V	G	R	G	W	Q	-	-	-	-	I	V	R	Q	T	H	K	K	L	V	V	I	N	A	L	K
17. Brassica oleracea PMCA (CAA68234.1)	K	N	P	S	L	E	A	R	Q	R	W	R	S	S	V	S	I	V	K	N	R	A	R	R	F	R	M	I	S	N	L	E
18. Arabidopsis thaliana PMCA ACA11 (NP 191292.1)	K	N	P	S	L	E	A	R	Q	R	W	R	S	S	V	G	L	V	K	N	R	A	R	R	F	R	M	I	S	N	L	D
19. Arabidopsis thaliana PMCA ACA4 (AAG35585.1)	K	N	P	S	L	E	A	R	Q	R	W	R	S	S	V	S	I	V	K	N	R	T	R	R	F	R	N	I	R	D	L	S
20. Arabidopsis thaliana PMCA (AAC26997.1)	K	H	S	S	E	E	V	L	E	K	W	R	N	L	C	G	V	V	K	N	P	K	R	R	F	R	F	T	A	N	L	S
21. Arabidopsis thaliana PMCA (CAB96189.1)	K	N	A	S	I	E	R	L	Q	Q	W	R	K	-	A	A	L	V	L	N	A	S	R	R	F	R	Y	T	L	D	L	K
22. Glycine max PMCA (AAG28435.1)	K	N	S	P	E	E	V	L	Q	R	W	R	R	L	C	G	I	V	K	N	P	R	R	R	F	R	F	T	A	N	L	S

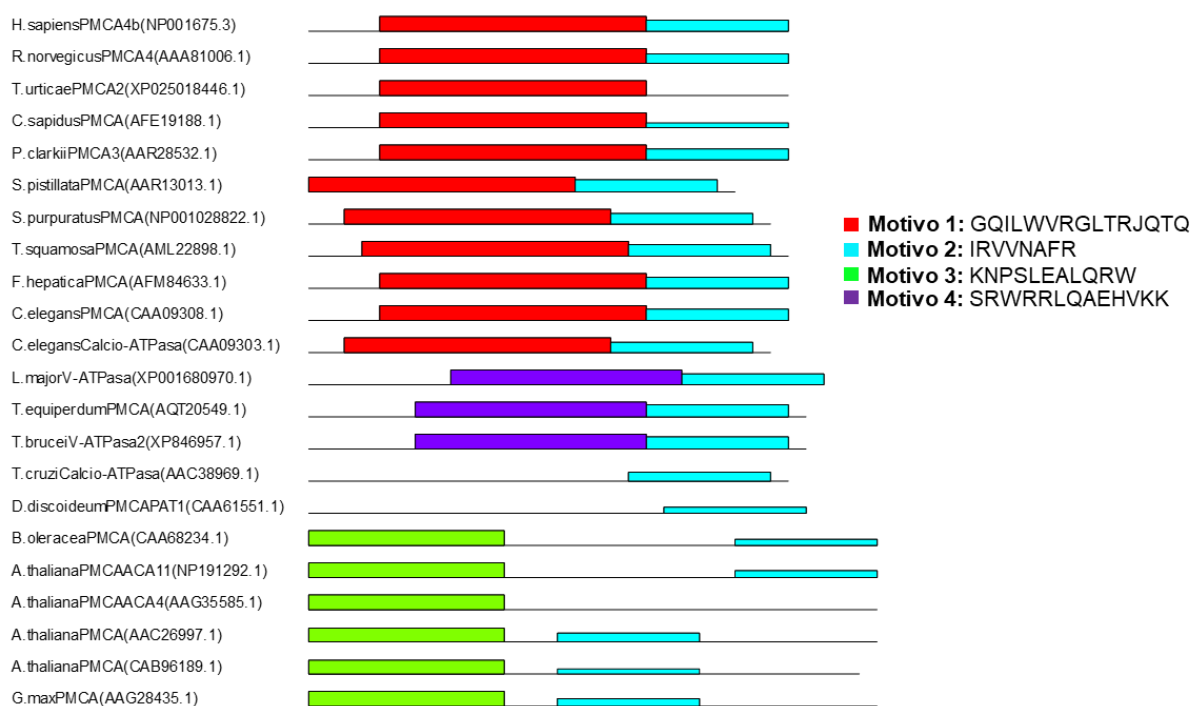
La sección de secuencias alineadas, mostradas en la **Figura 3**, fueron introducidas en el servidor de MEME para detectar los motivos y patrones de CaMBD presentes en los organismos evaluados. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se presentan los 4 motivos identificados con sus respectivos colores, que demuestran su posición en las secuencias de CaMBD. El Motivo CaMBD-1 (GQILWVRGLTRJQTQ) se encontró en todos los organismos multicelulares pertenecientes al reino Animalia. El Motivo CaMBD-2

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

(IRVVNAFR) es altamente conservado y está presente en todos los organismos unicelulares y pluricelulares, además de, ubicarse tanto en el dominio C terminal como el N terminal de las Ca^{2+} -ATPasas. Por otra parte, el Motivo CaMBD-4 (SRWRRLQAEHVKK) se encontró en 3 de las 5 secuencias pertenecientes a organismos unicelulares, estando ausente en *Trypanosoma cruzi* y *Dictyostelium discoideum*, mientras que, en las secuencias pertenecientes a las plantas se identifica claramente al Motivo CaMBD-3 (KNPSLEALQRW), ubicado en el dominio N terminal.

Cabe recalcar que, el valor de E para el Motivo 1 fue de $7.1\text{e-}060$ siendo este el menor, seguido por el Motivo 2 con un valor de $6.1\text{e-}026$ y, por último, tenemos a el Motivo 3 y 4 con valores de E de $2.6\text{e-}013$ y $1.2\text{e-}003$ respectivamente.

Figura 4. Detección de motivos MEME en CaMBD de Ca^{2+} -ATPasas de diferentes organismos.



Ocurrencia de motivos de CaMBD1-4 y análisis filogenético

Con los motivos detectados por el servidor MEME se realizaron diversos BLAST de proteína que permitieron recopilar 98 secuencias de Ca^{2+} -ATPasas provenientes de 18 clases taxonómicas. Al utilizar el Motivo CaMBD-1 se obtuvieron 47 secuencias, pertenecientes a las

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

clases Insecta (8), Malacostraca (6), Arachnida (8), Chromadorea (8), Bivalvia (5) y Mammalia (12). El Motivo CaMBD-2 se utilizó para recuperar 23 secuencias de las clases Trematoda (7), Amphibia (5), Reptilia (5), Echinoidea (1), Choanoflagellata (1) y Eumycetozoa (4). Además, el Motivo CaMBD-3 permitió incluir 15 secuencias pertenecientes a Magnoliopsida (outgroup). Por otra parte, la combinación de los Motivos CaMBD 1 y 2 para la búsqueda, dio como resultado 20 secuencias de Ca^{2+} -ATPasas de Aves (5), Actinopteri (10) y Anthozoa (5), mientras que, la combinación de los Motivos 2 y 4 añadió 15 secuencias al análisis de las clases Oomycetes (5) y Kinetoplastea (10). En total, se emplearon 120 (22 de las bases de datos y 98 recuperadas del BLASTp) secuencias aminoacídicas de Ca^{2+} -ATPasas, utilizadas en los análisis filogenéticos, las cuales presentaban entre 600 a 1800 residuos aa.

En el Anexo A se evidencia la localización de los motivos CaMBD1-4 en 111 secuencias analizadas. El Motivo 3 se encuentra orientado hacia el N-terminal de las secuencias mientras que los Motivos 1, 2 y 4 se posicionan en el dominio C-terminal.

La matriz de p-distance intra clases taxonómicas (**Anexo B**) muestra valores de divergencia desde 0.0066 hasta 0.3341 perteneciendo estos a Aves y Oomycetes. El Anexo C muestra la matriz de p-distance entre las clases taxonómicas, los valores obtenidos están comprendidos entre 0,1699 y 0,6496 donde, Kinetoplastea es la clase taxonómica con los valores de divergencia más altos.

Se infirió el árbol del Anexo D por el método de Neighbor-Joining donde hubo 3284 posiciones en el conjunto de datos final. Además, utilizando el método de Máxima Parsimonia se infirió el árbol (**Anexo E**) con una longitud de 23430, el índice de consistencia (IC) es 0.4833, el índice de retención (IR) es 0.6956 y el composite index es 0.3361.

El modelo con el menor valor de Bayesian Information Criterion (BIC) describe el patrón de sustitución de aminoácidos el cual fue el General 'Variable Time' Matrix (VT) con un 95% de confianza (**Anexo F**). El Anexo G se muestran las tasas de sustitución de

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

aminoácidos en ambos sentidos siendo la más frecuente I ↔ V con 0.1 y, las menos frecuentes

D ↔ F (0.0011) y W ↔ N (0.0012).

El árbol filogenético inferido a partir del método de Maximum Likelihood (**Figura 5**) con el modelo de sustitución VT y bootstrap de 1000 posee un LogL de -121492.552887 y una longitud de 56.9481 con una suma de ramas internas de 29.4255.

Los grupos taxonómicos definidos a partir del análisis filogenético efectuado en este estudio se basaron en valores de bootstrap mayor a 95 de los nodos más externos. Esto dio como resultado la identificación de 9 grupos, indicados como **G1 al G9**. El Grupo 1 (**G1**) (**BS=100**) está conformado por las clases taxonómicas Insecta, Malacostraca y Arachnida, las mismas que pertenecen al filo de Arthropoda. Los Grupos 2, 3 y 4 (**G2-4**) (**BS=100 cada uno**) representan las clases taxonómicas de Chromadorea, Bivalvia y Trematoda respectivamente. El Grupo 5 (**G5**) (**BS=100**) está compuesto por las clases taxonómicas de Mammalia, Amphibia, Reptilia, Aves y Actinopetri, que a su vez pertenecen al filo de Chordata. Sin embargo, en este grupo también se presenta una secuencia perteneciente a Malacostraca, que es *Procambarus clarkii*. Los Grupos 6 y 7 (**G6-7**) (**BS=100 cada uno**) poseen secuencias de Anthozoa y Oomycetes respectivamente. El Grupo 8 (**G8**) (**BS=97**) está conformado por Eumycetozoa que pertenece al clado de Ophistokonta y Kinetoplastea al clado de Discoba. Los G1 al G8 pertenecen están constituidos por las secuencias cuyo los CaMBD localizadas en el C-terminal, mientras que, el Grupo 9 (**G9**) (**BS=100**) está compuesto por Magnoliopsida, con sus CaMBD localizados en el N-terminal.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Figura 5. Árbol filogenético obtenido por el método de Maximum Likelihood con los valores

de bootstrap y los grupos seleccionados para el análisis de parámetros físico químicos.



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Análisis de la estructura primaria y parámetros físico químicos de los motivos de CaMBD presentes en los grupos taxonómicos

El análisis de la estructura primaria de los CaMBD de los G1-9 definidos, se realizó empleando secuencias delimitadas con base en los CaMBD 1-4, de las 22 secuencias originales.

La Figura 6, muestra la ocurrencia de residuos aminoacídicos en el CaMBD de cada grupo. La arginina (R) es el aminoácido con mayor ocurrencia en los CaMBD de todos los grupos, con un promedio de 17.83%, seguido por la leucina (L) y glutamina (Q) con 11.37% y 9.93% respectivamente. Los grupos con la presencia más predominante de residuos R, L y Q son el G9 (26.65%), el G4 (11.37%) y el G3 (13.84%), respectivamente. Por otro lado, valina (V), isoleucina (I), alanina (A), glicina (G) y treonina (T) poseen porcentajes de frecuencia de 8.5, 7.11, 6.88, 6.27 y 5.15 % respectivamente, excepto V en G4 (2.22%), I en G8 (2.33%) y G9 (2.29%), A en G5 (0.85), G en G9 (2.54%) y T en G9 (1.01%). Por el contrario, prolina (P), metionina (M), tirosina (Y) y cisteína (C) son los aminoácidos con menor frecuencia teniendo 0.99, 0.75, 0.35 y 0.11 % respectivamente. El residuo W presenta la menor variación de % de ocurrencia de todos los aminoácidos analizados, con valores cercanos al 4% para casi todos los grupos a excepción del G7 (**Figura 6**).

La representación por mapa de calor para cada taxon muestra que el aminoácido con la mayor frecuencia es R (**Figura 7**), resaltando que la mayoría de secuencias posee más de 4 argininas, siendo excepciones *Trachynyrnmx zeteki* y *Elaeis guineensis* con 10 y 9 residuos respectivamente. De igual manera, los residuos L y Q se presentan más de 5 veces en gran parte de las secuencias analizadas. Por otra parte, V, I y G están presentes con 2 a 3 residuos por secuencia.

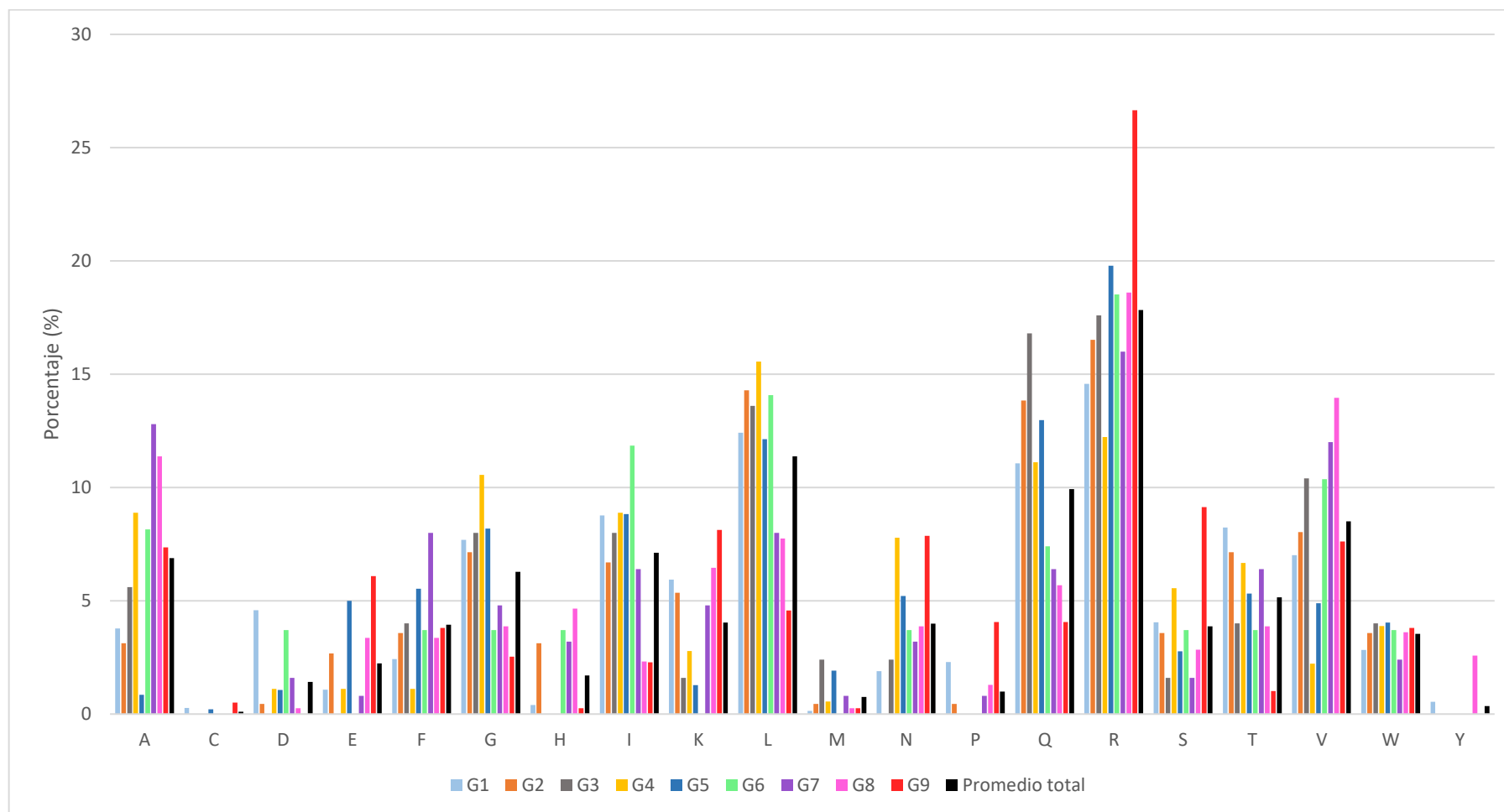
Es importante recalcar que F, S y W a pesar de no tener una alta frecuencia presentan al menos 1 residuo en la mayoría de las secuencias, siendo el más conservado el triptófano ya que,

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

no está presente únicamente en *Aphanomyces astaci* y *Aphanomyces invadans*. Los residuos C y Y son los aminoácidos con menor frecuencia en los CaMBD.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

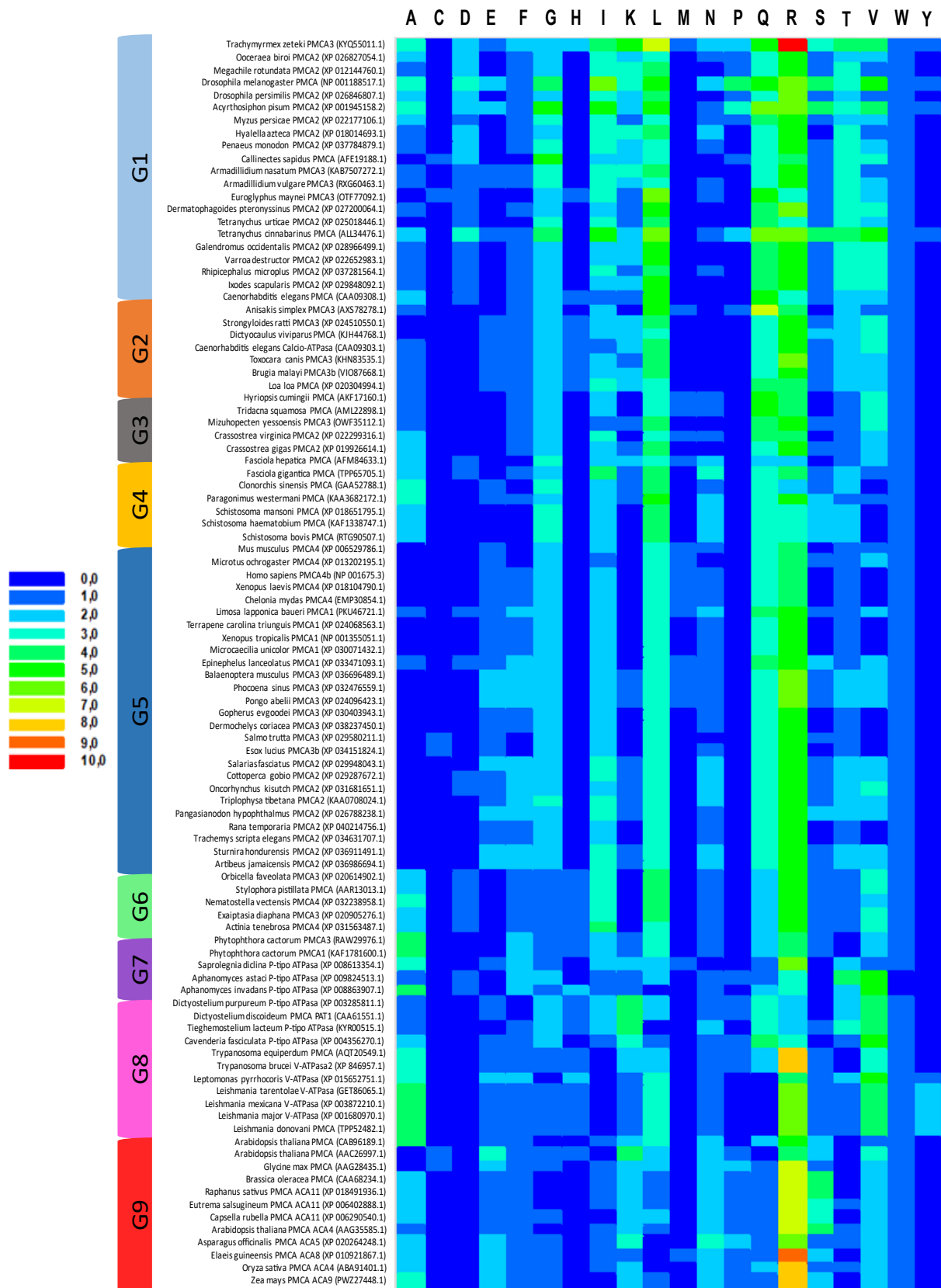
Figura 6. Ocurrencia de aminoácidos en los motivos de CaMBD de Ca^{2+} -ATPasas de los Grupos del 1 al 9 y el promedio total de cada residuo.



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Figura 7. Mapa de calor que muestra la ocurrencia de aminoácidos en los motivos de CaMBD

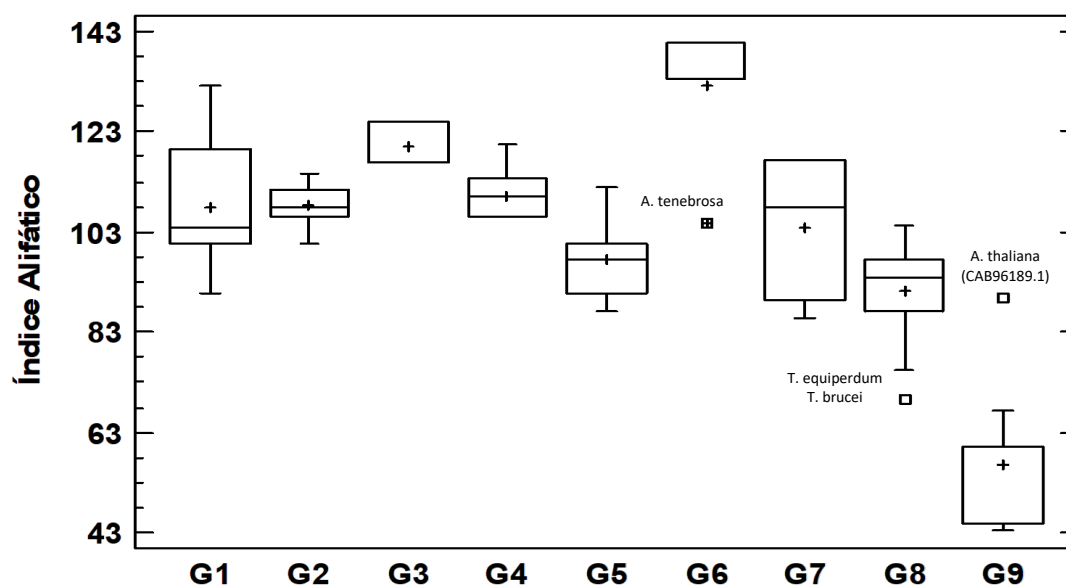
por secuencia evaluada de Ca²⁺-ATPasas de los Grupos del 1 al 9.



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

El análisis de los 4 parámetros físico químicos tuvieron una alta significancia estadística ($p < 0.05$). El índice alifático (**Figura 8**) de los G1 al G8 muestra valores de media altos (>90) en comparación al grupo 9 (56.395 ± 2.531), demostrando una diferencia entre G9 y el resto de grupos taxonómicos. Además, G3 presento una media de 120 ± 4.384 , que en contraste con G5 (97.316 ± 1.59) y G8 (91.159 ± 2.62), generan una diferencia estadística significativa.

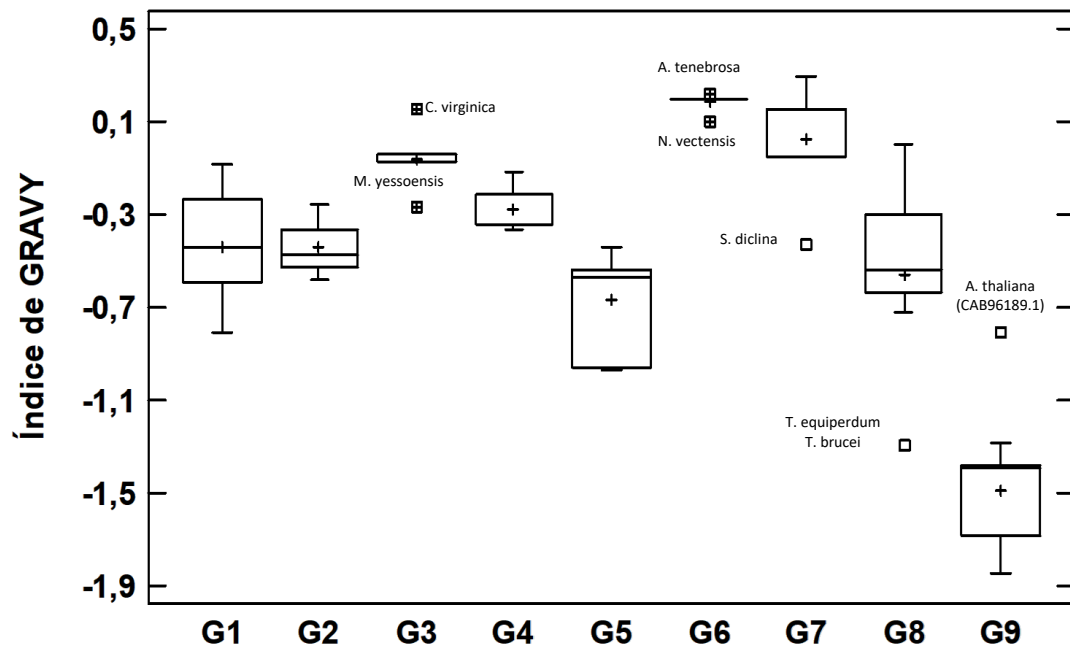
Figura 8. Comparación del Índice Alifático de los motivos de CaMBD por grupos mediante diagrama de caja y bigotes.



En concordancia, el índice de GRAVY (**Figura 9**) demuestra una diferencia significativa de G9 (-1.487 ± 0.059) respecto al resto de grupos, los cuales tienden a ser más positivos siendo el valor más alto de G6 (0.180 ± 0.102).

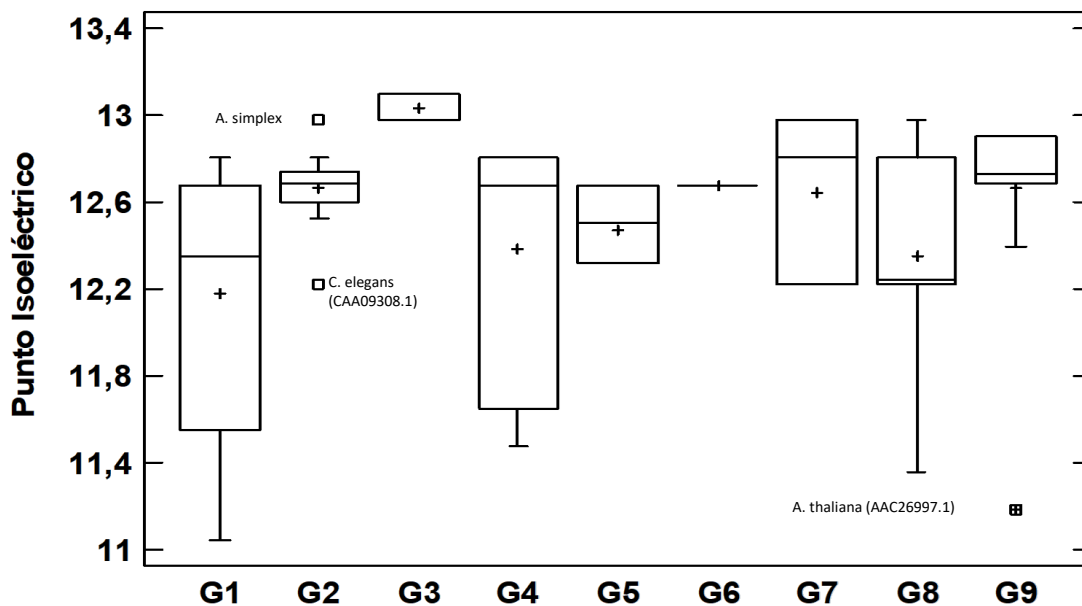
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Figura 9. Comparación del Índice de GRAVY de los motivos de CaMBD por grupos mediante diagrama de caja y bigotes.



El punto isoelectrico (**Figura 10**) es bastante alto para todos los grupos, siendo G3 el que posee el mayor valor con 13.028 ± 0.169 , generando diferencias significativas con los demás grupos que tienen valores cercanos a 12.

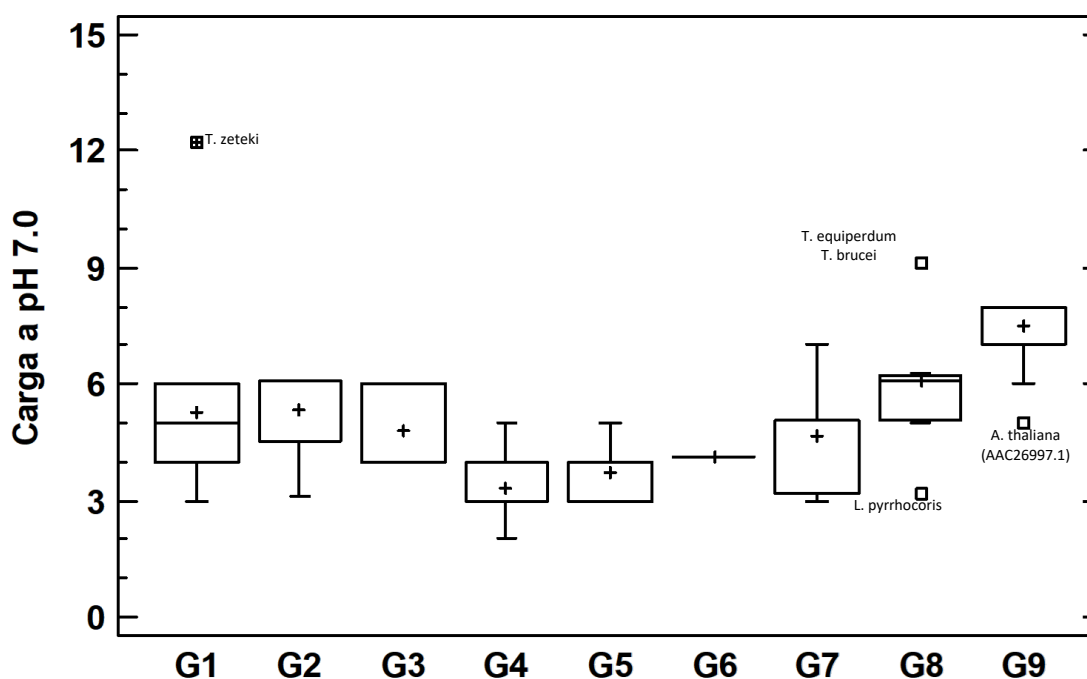
Figura 10. Comparación del Punto Isoeléctrico de los motivos de CaMBD por grupos mediante diagrama de caja y bigotes.



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

La media de la carga de los CaMBD a pH 7.0 (**Figura 11**) posee valores comprendidos entre 3 y 8, siendo G5 (3.705 ± 0.199) y G4 (3.286 ± 0.463) los grupos con los valores más bajos, lo cual genera diferencias significativas con G9 (7.527 ± 0.312) y G8 (6.057 ± 0.327) que poseen los valores más altos.

Figura 11. Comparación de la Carga a pH 7.0 de los motivos de CaMBD por grupos mediante diagrama de caja y bigotes.



En el Anexo H se muestran los valores de media, desviación estándar, límite inferior y superior de cada uno de los parámetros físico químicos evaluados para cada grupo taxonómico respecto a las secuencias aminoacídicas de los motivos de CaMBD.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Discusión

El presente trabajo se basó en la información proporcionada por los estudios experimentales sobre la regulación de Ca^{2+} -ATPasas que demuestran la existencia de CaMBD y su interacción con la calmodulina en organismos unicelulares y pluricelulares. Gracias a estas investigaciones previas es posible determinar mediante programas bioinformáticos, posibles motivos en CaMBD o a su vez incrementar el entendimiento de los procesos homeostáticos del Ca^{2+} . De igual forma, posible asociar alteraciones en el CaMBD con patologías y condiciones específicas tal como la disminución de extrusión de Ca^{2+} por parte de PMCA3 mutada, pudiendo ser un factor en enfermedades del cerebelo (Zanni et al., 2012) y la expresión de isoformas de Ca^{2+} -ATPasas en tejidos específicos con actividades enzimáticas diferentes debido al splicing alternativo (E. E. Strehler & Zacharias, 2001).

El análisis de las 22 secuencias iniciales de CaMBD identificó 4 motivos cuyas longitudes están comprendidas entre 8 y 15 aminoácidos, lo cual concuerda con el tamaño de motivos involucrados en la interacción con CaM (Andrews et al., 2021) además, los valores de E obtenidos demuestran la baja probabilidad de que los motivos sean secuencias artefacto, es decir, su presencia en el CaMBD sea al azar. Por otro lado, al poseer valores de E menores a 0.001 denota una alta significancia estadística (Gupta et al., 2007).

Es importante recalcar que, debido al tamaño de los motivos identificados podrían ser considerados sus patrones como motivos lineales cortos o short-linear motifs (SLiMs) ya que, MEME al utilizar el algoritmo de Expectation Maximization (EM) descubre motivos al

optimizar parámetros estadísticos para determinar la posición y longitud de los motivos en las secuencias, siendo este método utilizado en la predicción SLiMs en proteínas con CaMBD (Li et al., 2018).

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺-ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

El CaMBD-1 está presente en los organismos pertenecientes a Animalia acompañado en la mayoría de casos del CaMBD-2 que, a su vez es el motivo más conservado al estar presente en los clados de Plantae y Opisthokonta. El CaMBD-3 es propio de Plantae mientras que CaMBD-4 solamente está presente en el orden de Trypanosomatida. Al comparar los CaMBD1-4 con los motivos de unión a calmodulina canónicos, se observa una similitud del CaMBD-1 con los motivos de unión a CaM Ca²⁺ dependientes, el CaMBD-2 presenta una estructura primaria parecida al motivo no canónico encontrado en PMCA4 (Mruk et al., 2014). Mientras que, CaMBD-3 y CaMBD-4 podrían ser considerados posibles motivos no canónicos al no presentar ningún patrón de motivos de unión a calmodulina Ca²⁺ dependientes y Ca²⁺ independientes.

La detección de motivos en las 22 secuencias iniciales y las 98 secuencias recopilados a partir del BLAST que incluían 18 clases taxonómicas, denotan la presencia de cualquiera de los 4 motivos en 111 secuencias de las 120 secuencias de Ca²⁺-ATPasas, detectados a través de MAST con $p < 0.0001$ y $E < 1$ demostrando una elevada significancia estadística al tener una probabilidad baja de detección de los motivos en posiciones al azar (Gupta et al., 2007).

Los análisis filogenéticos realizados a las 120 secuencias demostraron que, dentro de cada clase taxonómica no existe una alta variabilidad, lo cual puede deberse a la cantidad reducida de secuencias utilizadas. Por otro lado, la distancia entre clases es alta en especial con relación a Kinetoplastea, ya que, es la única clase taxonómica que posee el CaMBD-4 (Bailey & Gribskov, 1998). A partir de las distancias calculadas, se elaboró el árbol de Neighbor-Joining cuya topología es bastante parecida a la obtenida por el método de Máxima Parsimonia, cuyo IC indica una probabilidad de casi la mitad de tener homologías de las cuales, un alto porcentaje representarían sinapomorfias reales por el valor de IR. El árbol obtenido por Maximum Likelihood también presentó una topología similar a los árboles anteriores,

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

existiendo diferencias en las posiciones de secuencias pertenecientes a la misma especie por lo que, es este último el que se utilizó para la formación de grupos.

El árbol se enraíza en el grupo externo o outgroup (G9) compuesto por la clase Magnoliopsida del reino Plantae. En el siguiente nodo se evidencia la separación con los reinos Animalia y Protista, siendo G8 el más ancestral, conformado por Eumycetozoa del clado de Ophistokonta y Kinetoplastea del clado de Discoba. Luego se encuentra G7 perteneciente a Oomycetes del grupo SAR o Heterokonta. En este punto, se encuentra *S. rosetta* del reino Protista cuya clase taxonómica, es conocida por ser el organismo unicelular más cercano a los animales y marca la aparición de los primeros organismos pluricelulares (Cai et al., 2015).

El siguiente nodo determina a G6 conformado por Anthozoa del reino Animalia representando el grupo más ancestral de Metazoa, le sigue una secuencia de Echinoidea y se observa claramente a G5 formado casi en su totalidad por clases del filo de Chordata sin embargo, está presente una secuencia de *P. clarkii* perteneciente a Malacostraca, lo cual puede deberse a que, en animales superiores existen 4 genes que transcriben y traducen a las isoformas PMCA1, PMCA2, PMCA3 y PMCA4, las mismas que en estudios filogenéticos suelen agruparse entre sí por su función y expresión en tejidos, por tanto la PMCA3 de *P. clarkii* se agrupo con Chordata por su funcionalidad (Gao & Wheatly, 2004; E. E. Strehler & Zacharias, 2001).

Los siguientes nodos dividen a los grupos G4, G3 y G2 conformados por, Trematoda del filo Platyhelminthes, Bivalvia del filo Mollusca y, Chromadorea del filo Nematoda respectivamente. El Grupo 1 compuesto por el filo Arthropoda es el más reciente según la topología del árbol. Es importante recalcar que, la ausencia del reino Fungi en este estudio se debe a la falta de una secuencia putativa o comprobada experimentalmente ya que, se tiene un único registro de la existencia de homólogos de proteína de PMCA1 los cuales fueron diseñados

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

a partir de una Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Listeria monocytogenes* (Cai & Clapham, 2012; Faxén et al., 2011).

La mayoría de secuencias de los G1-7 poseen los CaMBD1-2, ya sea, combinados o con una separación de varios residuos entre sí. Sin embargo, existen casos en G1 y G4 que poseen solamente el CaMBD-1. El CaMBD-3 está en el N-terminal de las secuencias pertenecientes a G9. Los CaMBD-4 y CaMBD-2 están presentes en Eumycetozoa y Kinetoplastea de G8. Por último, CaMBD-1, CaMBD-2 y CaMBD-4 están localizados en el C-terminal de las secuencias de Ca^{2+} -ATPasas.

El análisis de la estructura primaria de los CaMBD de G1-9 presenta una elevada ocurrencia y porcentaje promedio de R y Q que son residuos hidrofílicos. Sin embargo, existe una presencia considerable de residuos L, V, I, A, G y T en todos los grupos que son de carácter hidrofóbico, además, es evidente el alto grado de conservación de F y W al estar presente al menos 1 residuo en casi todas las consecuencias. Esto concuerda con que, para la unión de CAM al CaMBD es necesaria la interacción entre residuos polares y cargados para generar unión superficial mientras que, los residuos hidrofóbicos actúan como anclas para CAM con un patrón determinado al tener posiciones muy conservadas, siendo común la presencia de dos a tres residuos hidrofóbicos en el CaMBD (Andrews et al., 2021; Rhoads & Friedberg, 1997), por lo general se encuentra F, I, L, V y W dentro de este grupo de residuos hidrofóbicos ya sea en la primera o última posición para anclar los dos lóbulos de la calmodulina, mientras que, los espacios intermedios entre estos residuos son altamente variables debido a la flexibilidad de la hélice central de CAM (Mruk et al., 2014).

Por otra parte, la localización celular de las Ca^{2+} -ATPasas varía según el nivel de complejidad biológica. En organismos del reino Animalia y organismos unicelulares, se presentan en las membranas plasmáticas, mientras que en las plantas están ubicadas en vacuolas intracelulares.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Se evaluaron cuatro propiedades fisicoquímicas del CaMBD, teniendo valores de p menores a 0.05, denotando una significancia estadística (Tanha et al., 2017). Los valores del índice alifático de los CaMBD de G1-8 poseen valores de media altos, indicando que son térmicamente estables y a la vez contienen una cantidad elevada de aminoácidos hidrofóbicos como A, V, I y L (Ikai, 1980) además, G5 posee valores cercanos al índice alifático de la PMCA3 de *Mus musculus* (93.48) cuyos motivos son canónicos (E. Strehler, 2005) mientras que, G9 al poseer valores entre 40 y 60 denota una menor presencia de residuos hidrofóbicos a comparación de los demás grupos.

El índice de GRAVY de G6 y G7 al poseer valores positivos presenta una mayor hidrofobicidad lo cual va acorde a los picos presentados en el índice alifático por otro lado, los demás grupos al tener valores negativos tienden a ser más hidrofílicos y por ende aumenta su solubilidad, además esto concuerda especialmente con lo anteriormente descrito de G9 (Kyte & Doolittle, 1982). Todos los grupos poseen puntos isoeléctricos altos comprendidos entre 12 y 13 por lo que, el CaMBD presenta predominantemente residuos cargados positivamente como lo es R, esto si los comparamos con la carga neta a pH 7, donde G1-9 poseen valores entre 3 y 7 parecidos a la carga neta (3 a 6) del motivo canónico dependiente de Ca²⁺ (1-8-14) (Rhoads & Friedberg, 1997).

Los resultados obtenidos en esta investigación pueden ser acoplados a bases de datos enfocadas a la identificación de dominios que se basan en la homología de secuencias con patrones de motivos en la mayoría canónicos como es el caso de Calmodulin Target Database (Yap et al., 2000), incrementando su poder de búsqueda al eliminar posibles motivos no canónicos al no tener un patrón de residuos hidrofóbicos determinado. Por otra parte, plataformas como InterProScan, SMART y PROSITE al analizar las secuencias desde una perspectiva de ocurrencias de patrones de residuos, reducen la posibilidad de detectar motivos al azar, sin embargo, no toman en cuenta las características fisicoquímicas de los mismos las

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

cuales, podrían dar indicios de la funcionalidad de esos motivos (Quevillon et al., 2005; Schultz et al., 2000; Sigrist et al., 2010). Sin embargo, para lograr añadir los motivos detectados en este estudio (CaMBD1-4) a estas bases de datos es necesario ampliar el número de secuencias analizadas para abarcar la mayor cantidad de clases taxonómicas posibles y detectar motivos en diversos organismos tanto unicelulares como pluricelulares, de tal manera se lograría obtener información acerca de la interacción de la calmodulina en otros supergrupos como Cryptista, Apicompleza, Archaeplastida, entre otros (Burki et al., 2020) ya que, no existe una gran cantidad de estudios experimentales sobre sitios de unión a calmodulina en PMCA para la mayoría supergrupos lo que su identificación y caracterización por medios bioinformáticos.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Conclusiones

Los CaMBD identificados en este estudio están presentes en diferentes escalones evolutivos y su localización en la estructura primaria de las Ca^{2+} -ATPasas varía dependiendo si pertenecen al reino Plantae en cuyo caso se localiza en el N-terminal y presenta CaMBD-3 mientras que, en el reino Animalia se detectaron CaMBD-1 y CaMBD-4 hacia el C-terminal. El CaMBD-2 es el único motivo presente en la gran mayoría de secuencias sin importar si los organismos son unicelulares o pluricelulares.

En combinación con los análisis filogenéticos y los patrones de CaMBD1-4 se determinaron 9 grupos para la evaluación de parámetros fisicoquímicos, los mismos que, denotaron el cumplimiento de las características principales de sitios unión a calmodulina al poseer de 1 a 2 residuos hidrofóbicos como mínimo otorgando una hidrofobicidad moderada, acompañada por una carga neta positiva y una longitud entre 8 y 15 residuos. Por lo que, se podría concluir que se identificaron patrones de sitios de unión a CAM en Ca^{2+} -ATPasas de membrana y tipo-P, teniendo CaMBD-1 una similitud general con motivos de unión a CaM Ca^{2+} dependientes, mientras que CaMBD2-4 podrían ser considerados motivos no canónicos.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Referencias citadas

- Andrews, C., Xu, Y., Kirberger, M., & Yang, J. J. (2020). *Molecular Sciences Structural Aspects and Prediction of Calmodulin-Binding Proteins*. <https://doi.org/10.3390/ijms22010308>
- Andrews, C., Xu, Y., Kirberger, M., & Yang, J. J. (2021). Structural Aspects and Prediction of Calmodulin-Binding Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–26. <https://doi.org/10.3390/IJMS22010308>
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP335>
- Bailey, T. L., & Gribskov, M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(1), 48–54. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/14.1.48>
- Bailey, T. L., & Gribskov, M. (2000). Concerning the accuracy of MAST E-values. *Bioinformatics*, 16(5), 488–489. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.5.488>
- Bootman, M. D., & Bultynck, G. (2020). Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A038802>
- Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T. L., Matten, W. T., McGinnis, S. D., Merezuk, Y., Raytselis, Y., Sayers, E. W., Tao, T., Ye, J., & Zaretskaya, I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W29. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT282>
- Brini, M., & Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiological Reviews*, 89(4), 1341–1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2008>
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., & Simpson, A. G. B. (2020). The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 35(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>
- Cai, X., & Clapham, D. E. (2012). Ancestral Ca²⁺ Signaling Machinery in Early Animal and Fungal Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 29(1), 91. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSR149>
- Cai, X., Wang, X., Patel, S., & Clapham, D. E. (2015). Insights into the early evolution of animal calcium signaling machinery: a unicellular point of view. *Cell Calcium*, 57(3), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.11.007>
- Calì, T., Brini, M., & Carafoli, E. (2017). Regulation of Cell Calcium and Role of Plasma Membrane Calcium ATPases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 332, 259–296. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.01.002>
- Chen, H. Y., Roer, R. D., & Watson, R. D. (2013). Molecular cloning of a plasma membrane Ca²⁺ ATPase (PMCA) from Y-organs of the blue crab (*Callinectes sapidus*), and determination of spatial and temporal patterns of PMCA gene expression. *Gene*, 522(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2013.03.085>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

- di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D., & Carafoli, E. (2008). The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.026>
- Dürvanger, Z., & Harmat, V. (2019). Structural Diversity in Calmodulin - Peptide Interactions. *Current Protein & Peptide Science*, 20(11), 1102–1111. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190925101937>
- Elías, J., Yáñez, M., Pereira, T. M. C., Gil-Longo, J., MacDougall, D. A., & Campos-Toimil, M. (2020). An Update to Calcium Binding Proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1131, 183–213. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_8
- Faxén, K., Andersen, J. L., Gourdon, P., Fedosova, N., Morth, J. P., Nissen, P., & Møller, J. V. (2011). Characterization of a *Listeria monocytogenes* Ca²⁺ Pump: A SERCA-TYPE ATPase WITH ONLY ONE Ca²⁺-BINDING SITE*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1609. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.176784>
- Gao, Y., & Wheatly, M. G. (2004). Characterization and expression of plasma membrane Ca²⁺ ATPase (PMCA3) in the crayfish *Procambarus clarkii* antennal gland during molting. *The Journal of Experimental Biology*, 207(Pt 17), 2991–3002. <https://doi.org/10.1242/jeb.01101>
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG563>
- Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L., & Noble, W. S. (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, 8(2), 1–9. <https://doi.org/10.1186/GB-2007-8-2-R24/TABLES/3>
- Hoeflich, K. P., & Ikura, M. (2002). Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*, 108(6), 739–742. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00682-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00682-7)
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895–1898. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A133168>
- Ip, Y. K., Hiong, K. C., Goh, E. J. K., Boo, M. v., Choo, C. Y. L., Ching, B., Wong, W. P., & Chew, S. F. (2017). The whitish inner mantle of the giant clam, *Tridacna squamosa*, Expresses an apical plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) which displays light-dependent gene and protein expressions. *Frontiers in Physiology*, 8(OCT), 781. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00781/BIBTEX>
- Ishida, H., & Vogel, H. (2006). Protein-Peptide Interaction Studies Demonstrate the Versatility of Calmodulin Target Protein Binding. *Protein & Peptide Letters*, 13(5), 455–465. <https://doi.org/10.2174/092986606776819600>
- Ishida, H., & Vogel, H. J. (2010). The Solution Structure of a Plant Calmodulin and the CaM-binding Domain of the Vacuolar Calcium-ATPase BCA1 Reveals a New Binding and Activation Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(49), 38502. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.131201>
- Kraev, A., Kraev, N., & Carafoli, E. (1999). Identification and functional expression of the plasma membrane calcium ATPase gene family from *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(7), 4254–4258. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4254>
- Krebs, J. (2017). The Plasma Membrane Calcium Pump (PMCA): Regulation of Cytosolic Ca²⁺, Genetic Diversities and Its Role in Sub-plasma Membrane Microdomains. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 981, 3–21. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5_1

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺-ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

- Krebs, J., Agellon, L. B., & Michalak, M. (2015). Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), 114–121. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.02.004>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Kumar, V., Chichili, V. P. R., Zhong, L., Tang, X., Velazquez-Campoy, A., Sheu, F. S., Seetharaman, J., Gerges, N. Z., & Sivaraman, J. (2013). Structural Basis for the Interaction of Unstructured Neuron Specific Substrates Neuromodulin and Neurogranin with Calmodulin. *Scientific Reports*, 3. <https://doi.org/10.1038/SREP01392>
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- la Verde, V., Dominici, P., & Astegno, A. (2018). Towards Understanding Plant Calcium Signaling through Calmodulin-Like Proteins: A Biochemical and Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1331. <https://doi.org/10.3390/ijms19051331>
- Lear, S., & Cobb, S. L. (2016). Pep-Calc.com: A set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 30(3), 271–277. <https://doi.org/10.1007/S10822-016-9902-7/FIGURES/4>
- Li, Y., Maleki, M., Carruthers, N. J., Stemmer, P. M., Ngom, A., & Rueda, L. (2018). The predictive performance of short-linear motif features in the prediction of calmodulin-binding proteins. *BMC Bioinformatics*, 19(Suppl 14). <https://doi.org/10.1186/S12859-018-2378-9>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Mruk, K., Farley, B. M., Ritacco, A. W., & Kobertz, W. R. (2014). Calmodulation meta-analysis: Predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *The Journal of General Physiology*, 144(1), 105. <https://doi.org/10.1085/JGP.201311140>
- Pedersen, C. N. S., Axelsen, K. B., Harper, J. F., & Palmgren, M. G. (2012). Evolution of plant p-type ATPases. In *Frontiers in plant science* (Vol. 3, p. 31). <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00031>
- Penheiter, A. R., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., & Caride, A. J. (2005). Kinetic analysis of the calmodulin-binding region of the plasma membrane calcium pump isoform 4b. *Biochemistry*, 44(6), 2009–2020. <https://doi.org/10.1021/BI0488552>
- Pérez-Gordones, M. C., Ramírez-Iglesias, J. R., Cervino, V., Uzcanga, G. L., Benaim, G., & Mendoza, M. (2017). Evidence of the presence of a calmodulin-sensitive plasma membrane Ca(2+)-ATPase in *Trypanosoma equiperdum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 213, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.02.001>
- Pittman, J. K. (2011). Vacuolar Ca(2+) uptake. *Cell Calcium*, 50(2), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.004>
- Plattner, H., & Verkhratsky, A. (2015). The ancient roots of calcium signalling evolutionary tree. *Cell Calcium*, 57(3), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.004>
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W116. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI442>

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺-ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

- Ramírez-Iglesias, J. R., Pérez-Gordones, M. C., del Castillo, J. R., Mijares, A., Benaim, G., & Mendoza, M. (2018). Identification and characterization of a calmodulin binding domain in the plasma membrane Ca(2+)-ATPase from *Trypanosoma equiperdum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 222, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.04.005>
- Rhoads, A. R., & Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(5), 331–340. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.11.5.9141499>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hottot, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2020. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAAA062>
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., & Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 231. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.231>
- Sigrist, C. J. A., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Bulliard, V., Bairoch, A., & Hulo, N. (2010). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D161. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP885>
- Skupin, A., & Thurley, K. (2012). Calcium signaling: from single channels to pathways. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 531–551. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_24
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28(6). <https://doi.org/10.2144/00286IR01>
- Strehler, E. (2005). Plasma membrane calcium transporting ATPase isoform 3. *AfCS-Nature Molecule Pages*. <https://doi.org/10.1038/MP.A001843.01>
- Strehler, E. E., & Zacharias, D. A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiological Reviews*, 81(1), 21–50. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.1.21/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0110117008.JPEG>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120>
- Tanha, K., Mohammadi, N., & Janani, L. (2017). P-value: What is and what is not. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 31(1), 65. <https://doi.org/10.14196/MJIRI.31.65>
- Tidow, H., & Nissen, P. (2013). Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *The FEBS Journal*, 280(21), 5551–5565. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12296>
- Vetter, S. W., & Leclerc, E. (2003). Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *European Journal of Biochemistry*, 270(3), 404–414. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03414.X>
- Villalobo, A., Ishida, H., Vogel, H. J., & Berchtold, M. W. (2018). Calmodulin as a protein linker and a regulator of adaptor/scaffold proteins. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1865(3), 507–521. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2017.12.004>
- Wu, X., Weng, L., Zhang, J., Liu, X., & Huang, J. (2018). The Plasma Membrane Calcium ATPases in Calcium Signaling Network. *Current Protein & Peptide Science*, 19(8), 813–822. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180416122745>

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

- Yamniuk, A. P., & Vogel, H. J. (2004). Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. *Molecular Biotechnology*, 27(1), 33–57. <https://doi.org/10.1385/MB:27:1:33>
- Yap, K. L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., & Ikura, M. (2000). Calmodulin target database. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 1(1), 8–14. <https://doi.org/10.1023/A:1011320027914>
- Zanni, G., Calì, T., Kalscheuer, V. M., Ottolini, D., Barresi, S., Lebrun, N., Montecchi-Palazzi, L., Hu, H., Chelly, J., Bertini, E., Brini, M., & Carafoli, E. (2012). Mutation of plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca²⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14514–14519. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1207488109/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Zoccola, D., Tambutté, E., Kulhanek, E., Puverel, S., Scimeca, J.-C., Allemand, D., & Tambutté, S. (2004). Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral *Stylophora pistillata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1663(1–2), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.02.010>

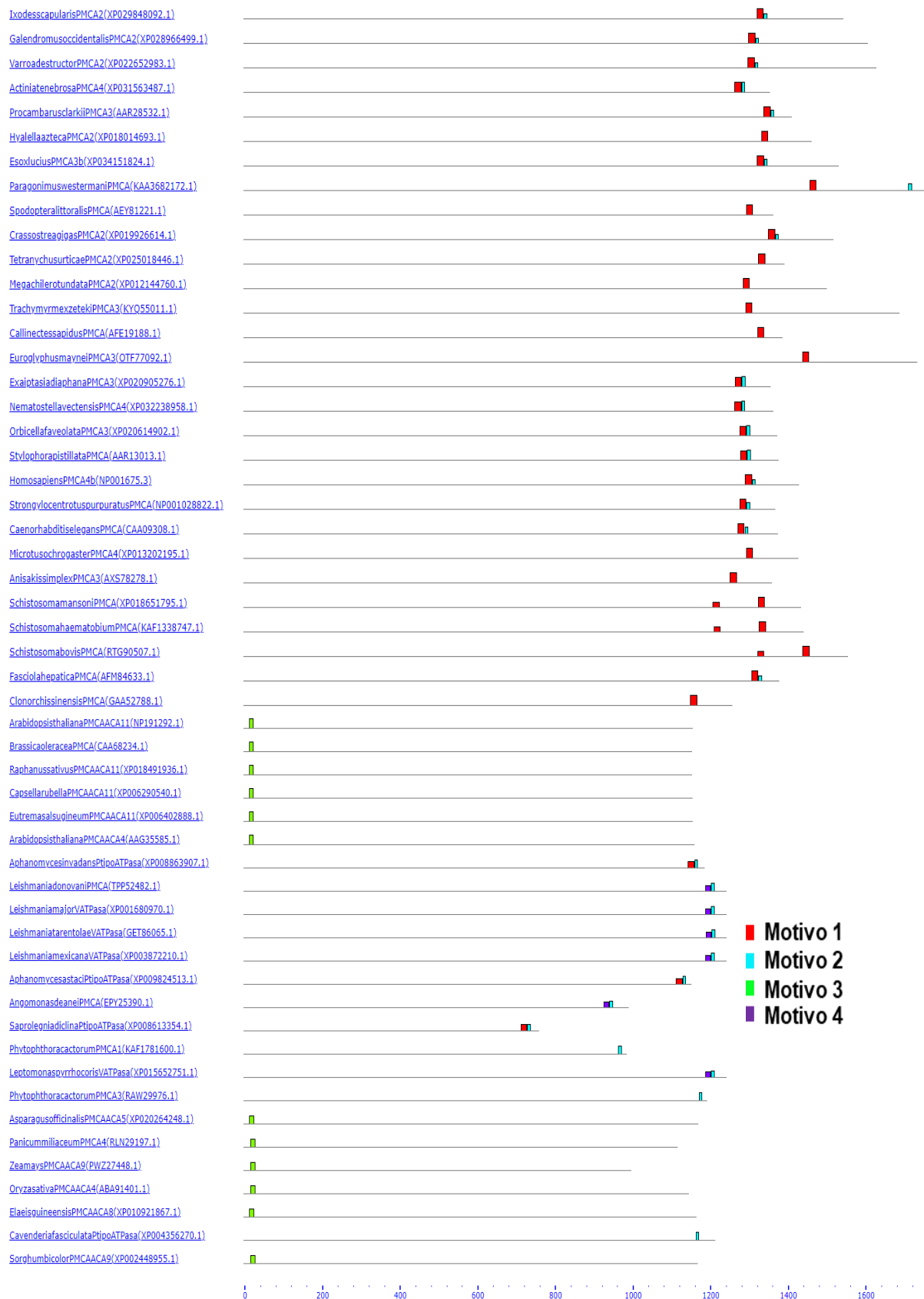
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Anexo A

Identificación de los motivos 1-4 de CaMBD en secuencias de Ca^{2+} -ATPasas a través del servidor MAST.



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Anexo B

Matriz de p-distance intra clases taxonómicas obtenida en MEGA 11.

Anthozoa	0,2134
Insecta	0,2176
Kinetoplastea	0,3274
Chromadorea	0,2718
Oomycetes	0,3341
outgroup	0,3157
Malacostraca	0,2712
Mammalia	0,1945
Eumycetozoa	0,316
Reptilia	0,1987
Trematoda	0,2913
Actinopteri	0,2047
Bivalvia	0,2969
Arachnida	0,2995
Aves	0,0066
Amphibia	0,2107

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Anexo C

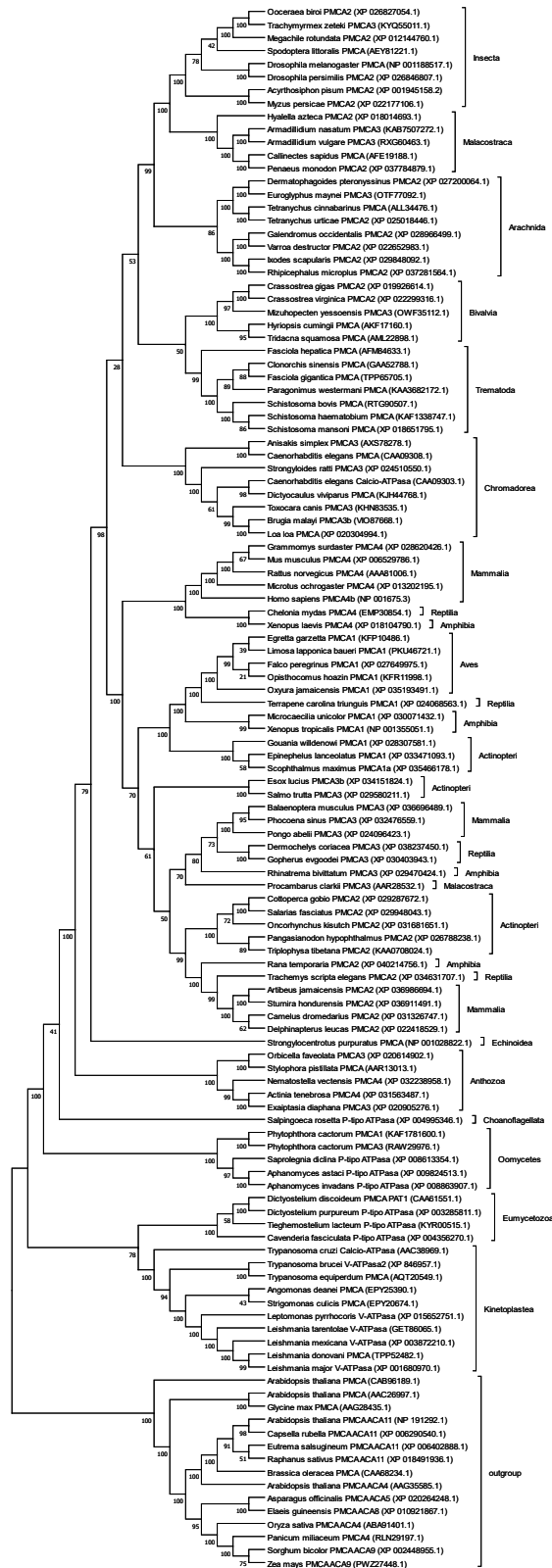
Matriz de p-distance inter clases taxonómicas obtenida en MEGA 11.

	Anthozoa	Insecta	Kinetoplastea	Chromadorea	Oomycetes	Magnoliopsida	Malacostraca	Mammalia	Eumycetozoa	Reptilia	Trematoda	Actinopteri	Bivalvia	Arachnida	Aves	Amphibia	Choanoflagellata
Insecta	0,4290																
Kinetoplastea	0,6263	0,6325															
Chromadorea	0,4455	0,3869	0,6296														
Oomycetes	0,5102	0,5226	0,6207	0,5188													
Magnoliopsida	0,5973	0,5804	0,6385	0,5730	0,5830												
Malacostraca	0,4394	0,3192	0,6332	0,3851	0,5139	0,5797											
Mammalia	0,4394	0,3907	0,6233	0,3905	0,5094	0,5785	0,3665										
Eumycetozoa	0,5746	0,5762	0,6131	0,5715	0,5619	0,5760	0,5761	0,5791									
Reptilia	0,4426	0,3906	0,6260	0,3915	0,5082	0,5768	0,3651	0,2071	0,5803								
Trematoda	0,4581	0,4186	0,6373	0,4366	0,5213	0,5849	0,4277	0,4362	0,5894	0,4381							
Actinopteri	0,4423	0,3981	0,6299	0,3992	0,5084	0,5825	0,3729	0,2367	0,5855	0,2174	0,4430						
Bivalvia	0,4350	0,3717	0,6351	0,3952	0,5161	0,5850	0,3875	0,4037	0,5761	0,3992	0,4202	0,4104					
Arachnida	0,4338	0,3565	0,6313	0,3960	0,5155	0,5844	0,3667	0,3971	0,5766	0,4005	0,4376	0,4089	0,3866				
Aves	0,4375	0,3870	0,6201	0,3902	0,4999	0,5688	0,3643	0,2239	0,5745	0,1787	0,4372	0,2129	0,3982	0,3868			
Amphibia	0,4410	0,3910	0,6277	0,3931	0,5083	0,5789	0,3681	0,2194	0,5806	0,1982	0,4421	0,2201	0,4027	0,3973	0,1699		
Choanoflagellata	0,5282	0,5450	0,6392	0,5443	0,5403	0,6165	0,5432	0,5351	0,5935	0,5397	0,5580	0,5456	0,5458	0,5467	0,5346	0,5432	
Echinoidea	0,4467	0,4301	0,6496	0,4461	0,5229	0,5964	0,4394	0,4347	0,5728	0,4292	0,4659	0,4348	0,4299	0,4436	0,4251	0,4317	0,5406

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca^{2+} -ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Anexo D

Árbol filogenético de las Ca^{2+} -ATPasas analizadas en este estudio, obtenido por el método de Neighbor-Joining con los valores de Bootstrap.



ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Anexo F

Modelo de sustitución de aminoácidos para el análisis de Maximum Likelihood de las 120 secuencias utilizadas en este estudio, obtenido en el servidor de IQ-TREE.

Modelo	LogL	AIC	w-AIC	AICc	w-AICc	BIC	w-BIC	Invariant	Gamma
VT+I+G4	-24364.0159	243415,2196	1,0000	243452,9069	1,0000	244872,3590	1,0000	0,0415	0,7119

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Anexo G

Tasas de sustitución de aminoácidos obtenidas en RAXML.

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y
R	0,0083																		
N	0,0082	0,0106																	
D	0,0093	0,0051	0,0528																
C	0,0166	0,0097	0,0066	0,0015															
Q	0,0149	0,0371	0,0203	0,0111	0,0031														
E	0,0157	0,0091	0,0135	0,0651	0,0030	0,0458													
G	0,0224	0,0088	0,0162	0,0129	0,0074	0,0059	0,0093												
H	0,0065	0,0331	0,0417	0,0144	0,0102	0,0538	0,0110	0,0058											
I	0,0060	0,0029	0,0062	0,0015	0,0061	0,0033	0,0027	0,0019	0,0039										
L	0,0072	0,0056	0,0028	0,0024	0,0095	0,0090	0,0038	0,0024	0,0072	0,0404									
K	0,0100	0,0674	0,0296	0,0098	0,0023	0,0407	0,0291	0,0060	0,0122	0,0042	0,0038								
M	0,0128	0,0084	0,0063	0,0027	0,0082	0,0128	0,0050	0,0040	0,0093	0,0455	0,0540	0,0115							
F	0,0046	0,0028	0,0034	0,0011	0,0114	0,0024	0,0016	0,0025	0,0092	0,0154	0,0293	0,0026	0,0156						
P	0,0184	0,0088	0,0048	0,0072	0,0029	0,0155	0,0102	0,0052	0,0124	0,0032	0,0068	0,0094	0,0033	0,0025					
S	0,0432	0,0129	0,0412	0,0149	0,0245	0,0156	0,0123	0,0206	0,0132	0,0041	0,0060	0,0133	0,0072	0,0074	0,0238				
T	0,0356	0,0090	0,0261	0,0101	0,0118	0,0145	0,0107	0,0048	0,0108	0,0177	0,0069	0,0172	0,0226	0,0046	0,0131	0,0595			
W	0,0037	0,0102	0,0012	0,0017	0,0109	0,0060	0,0028	0,0063	0,0042	0,0038	0,0102	0,0039	0,0099	0,0225	0,0029	0,0046	0,0030		
Y	0,0036	0,0060	0,0073	0,0050	0,0145	0,0062	0,0039	0,0023	0,0522	0,0058	0,0084	0,0053	0,0073	0,0698	0,0032	0,0064	0,0058	0,0305	
V	0,0313	0,0052	0,0031	0,0031	0,0152	0,0043	0,0060	0,0042	0,0036	0,1000	0,0238	0,0052	0,0273	0,0115	0,0040	0,0063	0,0230	0,0038	0,0067

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EVOLUTIVO DE DOMINIOS DE UNIÓN A CALMODULINA EN Ca²⁺- ATPasas DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE ORGANELOS

Anexo H

Valores de los parámetros físico químicos de los motivos de CaMBD.

Grupo	Índice de GRAVY				Índice Alifático				Punto Isoeléctrico				Carga a pH 7.0			
	Media	SD	LI	LS	Media	SD	LI	LS	Media	SD	LI	LS	Media	SD	LI	LS
1	-0,436	0,050	-0,505	-0,366	107,747	2,139	104,749	110,744	12,182	0,082	12,067	12,297	5,243	0,267	4,868	5,617
2	-0,446	0,080	-0,559	-0,333	108,260	3,466	103,403	113,117	12,660	0,133	12,473	12,847	5,338	0,433	4,731	5,944
3	-0,063	0,102	-0,206	0,079	120,000	4,384	113,856	126,144	13,028	0,169	12,792	13,264	4,800	0,548	4,032	5,568
4	-0,279	0,086	-0,399	-0,158	110,320	3,705	105,128	115,512	12,389	0,143	12,189	12,588	3,286	0,463	2,637	3,935
5	-0,666	0,037	-0,718	-0,615	97,316	1,590	95,087	99,544	12,465	0,061	12,379	12,551	3,705	0,199	3,427	3,984
6	0,180	0,102	0,038	0,323	132,132	4,384	125,988	138,276	12,680	0,169	12,444	12,916	4,100	0,548	3,332	4,868
7	0,025	0,102	-0,118	0,167	103,600	4,384	97,456	109,744	12,642	0,169	12,406	12,878	4,680	0,548	3,912	5,448
8	-0,563	0,061	-0,648	-0,478	91,159	2,620	87,488	94,831	12,348	0,101	12,207	12,489	6,057	0,327	5,598	6,516
9	-1,487	0,059	-1,569	-1,405	56,399	2,531	52,852	59,946	12,660	0,097	12,524	12,797	7,527	0,316	7,083	7,970

SD: Desviación Estándar. LI: Límite Inferior. LS: Límite Superior