**Métodos**

“Elastic Network Model” (ENM):

Los modelos de red elástica, o “Elastic Network Model” (ENM), representan a una proteína como una red de sitios, o nodos, conectados por resortes. Este tipo de modelos se ha utilizado en variedad de aplicaciones y, a pesar de su simplicidad, ha tenido muy buenos resultados.

Los ENM convencionales representan la conformación de una proteína de N-sitios con el vector columna de 3N coordenadas cartesianas de los N *Cα:* ***r*** *= (x1 y1 z1 x2 y2 z2 ... xN yN zN)T*, siendo ***r****i = (xi yi zi) T* el vector de posición del *i*-*ésimo* *Cα*. El vector que une los sitios *i* y *j* es ***d****ij =* ***r****j -* ***r****i* con longitud *dij =* ***d****ij*. Utilizamos ***r****0*para la conformación de equilibrio de la proteína en la que el *i-ésimo* sitio está en ***r****0i*.

De esta forma, la energía potencial del ENM está dado por:

Donde ***d****0ij* y *kij* son, respectivamente, la longitud de equilibrio y la constante de fuerza del resorte *ij*. Todos los modelos propuestos hasta el momento suponen que ***d****0ij = dij (****r****0) =* ***r****0j-****r****0i*, es decir, que en la conformación de equilibrio **r**0, todos los resortes están relajados.

Existen diferentes modelos de red elástica que se diferencian en la constante de fuerza elástica que utilizan para conectar a los sitios. Dos modelos de gran importancia y que utilizaremos en este trabajo son el “Anisotropic Network Model” (ANM) y el “parameter-free Anisotropic Network Model” (pfANM). En primer lugar, el ANM considera:

*kij = {1 d0ij ≤ Rcut;*

*0 d0ij > Rcut }*

Siendo Rcut un valor que suele rondar los 10 – 18 Å. Por su parte, el pfANM considera:

*kij = 1/(d0ij)2*

Modelo “Stress Model”:

En este trabajo utilizamos el modelo mecanístico de mutación y selección “Stress Model” (ref). Siguiendo este modelo, consideramos a las mutaciones como perturbaciones aleatorias del potencial correspondiente al ENM de la proteína wild-type. Más específicamente, consideramos que una mutación aleatoria en el sitio *i* conlleva a un mutante cuyo potencial *Vmut* es obtenido de la Eq. (x) mediante la perturbación de la longitud de equilibrio de cada resorte acoplado al sitio: ***d****0ij →* ***d****0ij + δij*. Se asume que los resortes son perturbados de forma independiente y que las perturbaciones son independientes del resorte, seleccionadas de forma aleatoria de una distribución con media cero y varianza constante: *⟨δij⟩ = 0* y *⟨δ2ij⟩ = α2.*

Cuando la proteína wild-type se encuentra en su conformación de equilibrio ***r****0wt*, todos los resortes se encuentran relajados. En contraste, cuando el mutante se encuentra en ***r****0wt*, los resortes acoplados al sitio mutado están estresados (comprimidos o expandidos). De esta forma, se definió al “Mean Local mutational Stress” (MLmS) de la siguiente forma:

donde〈 … 〉*mut*@*i* corresponde al promedio de mutaciones aleatorias en el *i*-ésimo sitio.

El modelo se completa con la función de selección. Para esto, primero se asume que hay una sola conformación activa, que es ***r****active*. Luego, se asume que la actividad proteica es proporcional a la concentración de proteínas en la conformación activa. Finalmente se asume que ***r****active =* ***r****0wt*  y que, de esta forma, la probabilidad de aceptación del mutante será:

Donde *CFmut* y *CFwt* son las concentraciones de proteínas en estado plegado para el caso del mutante y del wild-type, respectivamente y es la función de densidad de probabilidad de Boltzman:

Según mecánica estadística, las constantes de equilibrio de los estados plegado - desplegado para las proteínas wild-type y mutante son, respectivamente, CFwt/CUwt = ZFwt/ZUwt y CFmut/CUmut = ZFmut/ZUmut. Asumimos además que la función de partición y la concentración de la proteína desplegada es la misma para los mutantes y la proteína wild-type. Por lo tanto, CFmut/CFwt = ZFmut/ZFwt. Reemplazando esta relación y la Ec. (x) en la ecuación (x) encontramos:

Por último, promediando mutaciones en el sitio *i* y usando la Ec. (x) se obtiene la tasa de aceptación:

Donde *β* representaría no solo la temperatura sino la presión selectiva.

Selección de mutantes para ANM:

Dado un sitio *i* dado y dado un set de fuerzas *fij* que representan la mutación de ese sitio, la probabilidad de aceptar la mutación según es *Stress Model* será:

Aplicando el logaritmo:

Si promediamos *ln(p(i))* sobre distintas mutaciones en el sitio *i* obtenemos:

Como no depende ni de *i* ni de *j*, sino que es una constante, llamémosla *fp*:

Entonces obtenemos,

Como la suma es sobre todos los sitios *j* en contacto con *i*, es equivalente al número de contactos:

Por lo tanto, el promedio sobre todos los sitios de la proteína es:

Por lo que, aproximadamente, se acepta una proporción de mutaciones de:

Típicamente, en un régimen de fuerte selección, se aceptan un 10-20% de las mutaciones, en un régimen intermedio 50%, en un régimen con selección débil 80 - 90%.

Podemos usar entonces

Para verificar que esto esté bien, cada vez que realizamos una mutación, aumentamos un contador Nmut = Nmut+1 (inicializado en 0), y cada vez que aceptamos una mutacion Nsubs = Nsubs+1. Al final de un linaje calculamos w = Nsubs/Nmut: la proporción de mutaciones aceptadas sobre intentos totales.

ENM

* EXPLICACION
* MODELOS: ANM – PF ANM
* MODELOS 2 NODOS POR SITIO

STRESS MODEL

* EXPLICACIÓN
* MODELO 1 NODO X SITIO
* MODELO 2 NODOS X SITIO

CONJUNTO EXPERIMENTAL

* EXPLICACION
* ALINEAMIENTO
* PROTEÍNA DE REFERENCIA
* CÁLCULO DE CORE

SIMULACIÓN DE MUTANTES

* ENM, STRESS MODEL, CA, CM

COMPARACIÓN PERFILES

Estructura

* COORDENADAS CARTESIANAS:
  + - SIN ROT, CON ROT, ROT WINDOW CONTACTS, ROT WINDOWS NORMAL
    - SIMILITUD DEL ENTORNO
* COORDENADAS MODOS NORMALES
  + - PN
    - QN

Dinámica

* nH,
* nR
* MSF

Implementacion computacional

Gráficos