**Métodos**

“Elastic Network Model” (ENM):

Los modelos de red elástica, o “Elastic Network Model” (ENM) son modelos de grano grueso que representan a las proteínas 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. En forma general, los sitios de los ENM corresponden a los *Cα* de los aminoácidos. Sin embargo, también se han utilizado como nodos de los resortes los *Cβ*o los centros de masa de las cadenas laterales de los aminoácidos. Más aún, se han implementado modelos de dos nodos por sitio.

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*. ***r****i = (xi yi zi) T* es 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*.

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*. Hasta donde sabemos, todos los modelos propuestos hasta ahora 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 varían en la constante de fuerza que se utiliza para conectar a los sitios vecinos. 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 consideramos el modelo mecanístico de mutación y selección “Stress Model”. Siguiendo este modelo, consideramos a las mutaciones como perturbaciones aleatorias del potencial correspondiente al ENM de la proteína wild-type. Más específicamente, 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.*

Cuanto 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