

#### Práctica 4. MUTACIONES PUNTUALES DE PROTEÍNAS

Con la llegada de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva se ha incrementado la información sobre las mutaciones puntuales de las proteínas, lo que ha conllevado a plantear algoritmos computacionales para poder predecir el fenotipo molecular de un polimorfismo genético a nivel de proteínas, específicamente de polimorfismos de nucleótido único (SNP siglas en inglés) que cambia la secuencia de aminoácidos de una proteína al provocar una sustitución no sinónima. Lo anterior ha generado que en la actualidad exista más genotipos que fenotipos observados, y porque cuanto más se secuencia se hace patente que los individuos de una especie son portadores de múltiples mutaciones de diferente naturaleza.

Estudios previos han sugerido que los efectos de las mutaciones puntuales sobre la estructura de la proteína (y por tanto la función) dependen en parte de dónde se produzcan. No tiene el mismo efecto cambiar un aminoácido en una región de giro en una proteína, o uno que este junto con otro de un lazo vecino. Del mismo modo, una sustitución en el interior de una hélice alfa no se puede comparar con la eliminación de un residuo catalítico o de otro clave para interaccionar con otras proteínas. Así, medir la estabilidad que tienen mutaciones individuales dependiendo de su contexto de estructura, ya sea secundaria o terciaria, es importante para entender si la mutación afecta la función de la proteína y por ende puede ser patogénica para el individuo portador de la misma.

#### **BASES DE DATOS:**

**OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*):** es una base de datos que cataloga todas las enfermedades humanas conocidas con un componente genético, la base de datos está disponible de forma telemática en la web oficial (<http://www.omim.org/>) o en la web del Centro Nacional para la información biotecnológica o **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) y se actualiza prácticamente a diario.

**El Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information (NCBI)** es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (National Library of Medicine), una rama de los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health o NIH). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. El NCBI ofrece además algunas herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN, ARN y proteínas, siendo BLAST una de las más usadas. NCBI alberga genoma secuenciado en GenBank, y un índice de los artículos biomédicos de investigación en PubMed Central y PubMed, así como otra información relevante a la biotecnología. Todas estas bases de datos son accesibles en línea con el motor de búsqueda de Entrez.

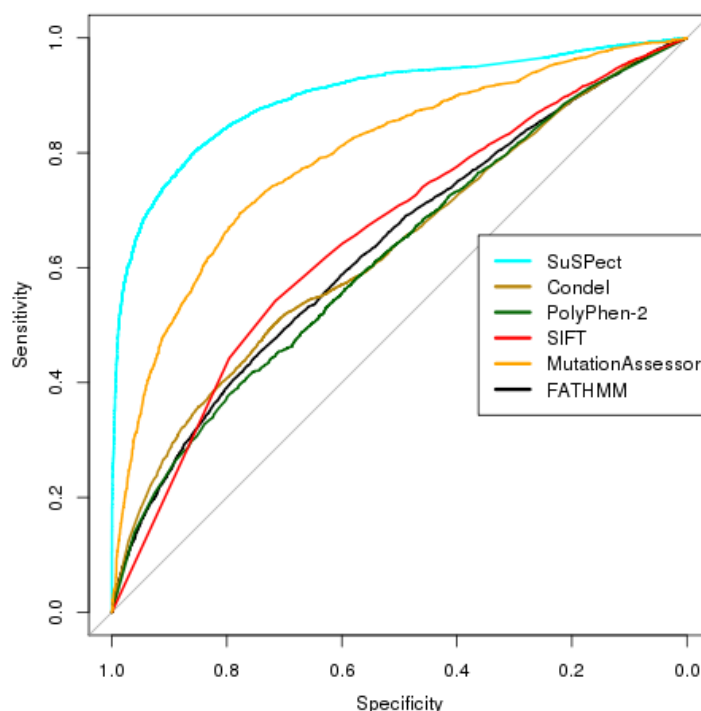
**Uniprot:** La misión de UniProt es proporcionar a la comunidad científica un recurso completo, de alta calidad y de acceso gratuito a la secuencia de proteínas e información funcional. <https://www.uniprot.org/>.

**Protein Data Bank (RCSB PDB):** Esta base de datos contiene información sobre las formas 3D de proteínas, ácidos nucleicos y conjuntos complejos que ayuda a los estudiantes e investigadores a comprender todos los aspectos de la biomedicina y la agricultura, desde la síntesis de proteínas hasta la salud y la enfermedad. <https://www.rcsb.org/>.

### SERVIDORES

**PolyPhen-2** (Polymorphism Phenotyping v2): es un servidor que predice el posible impacto de una sustitución de aminoácidos en la estructura y la función de una proteína humana utilizando consideraciones físicas y comparativas directas.

**SusPect:** es un servidor que utiliza características basadas en la secuencia, la estructura y la biología de sistemas para predecir los efectos fenotípicos de las mutaciones en las proteínas. Actualmente se considera el servidor online con la mejor sensibilidad y especificidad logrando una precisión equilibrada del 82% y un coeficiente de correlación de Matthews de 0,65 con respecto a otros métodos probados.



**Swiss-PdbViewer:** es una aplicación que proporciona una interfaz fácil de usar que permite analizar varias proteínas al mismo tiempo. Las proteínas pueden superponerse para deducir alineaciones estructurales y comparar sus sitios activos o cualquier otra parte relevante. Las mutaciones de aminoácidos, los enlaces H, los ángulos y las distancias entre los átomos son fáciles de obtener gracias a la interfaz intuitiva de gráficos y menús. Swiss-PdbViewer está estrechamente vinculado a SWISS-MODEL, un servidor de modelado de homología automatizado desarrollado dentro del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) en el Grupo de Bioinformática

Estructural en el Biozentrum en Basilea. Trabajar con estos dos programas reduce en gran medida la cantidad de trabajo necesario para generar modelos, ya que es posible plegar una secuencia primaria de proteína en una plantilla 3D y obtener una respuesta inmediata de qué tan bien la estructura de referencia aceptará la proteína plegada antes de enviarla. Swiss-PdbViewer también puede leer mapas de densidad de electrones y proporciona varias herramientas para incorporar la densidad. Además, varias herramientas de modelado están integradas y los residuos pueden mutar.

## OBJETIVO GENERAL

Predecir los cambios del fenotipo molecular de la **proteína EGFR** con diferentes servidores online para análisis bioinformáticos empleando cambios puntuales en sus aminoácidos consignados en las bases de datos del NCBI y OMIM.

## Procedimiento

Con la guía del profesor siga cada uno de los pasos para realizar los análisis. **En cada uno de los pasos, debe escribir el procedimiento realizado acompañado por imágenes tomadas de los sitios web a los que se ingresa y de los resultados obtenidos mediante pantallazos editados.**

1. Identifique en la tabla 1 el conjunto de mutaciones que le correspondió analizar a su grupo de trabajo

Grupo	Mutaciones asignadas			
<b>Ejemplo</b>	p.Ala763Val	Esta mutación será usada como ejemplo por la instructora en las distintas secciones de la guía		
<b>Grupo 1</b>	p.Val765Leu	p.Val765Met	p.Val742Ile	p.Glu884Gly
<b>Grupo 2</b>	p.Val765Leu	p.Val765Met	p.Ile821Met	p.Gly901Arg
<b>Grupo 3</b>	p.Val765Leu	p.Val765Met	p.Arg836Cys	p.Glu884Gly
<b>Grupo 4</b>	p.Val765Leu	p.Val765Met	p.Arg999Cys	p.Gly901Arg
<b>Grupo 5</b>	p.Val765Leu	p.Val765Met	p.Leu703Phe	p.Glu884Gly
<b>Grupo 6</b>	p.Val765Leu	p.Val765Met	p.Val742Ile	p.Gly901Arg

Tabla 1. Listado de mutaciones asignadas a cada grupo de trabajo

2. Ingrese a la base de datos **OMIM** (<http://www.omim.org/>) y realice la búsqueda de la proteína EGFR.

# OMIM®

An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders

Updated November 21, 2022

EGFR

Advanced Search : OMIM, Clinical Synopses, Gene Map

Need help? : Example Searches, OMIM Search Help, OMIM Video Tutorials

Mirror site : <https://mirror.omim.org>

OMIM is supported by a grant from NHGRI, licensing fees, and generous contributions from people like you.

Como resultado de la búsqueda obtendrá la pantalla que se ilustra en la figura 2



About Statistics Downloads Contact Us MIMmatch Donate Help ?

EGFR

View Results as: **Ge**  
Display: ☒ Highlights

Search: 'EGFR '  
Results: 244 entries.

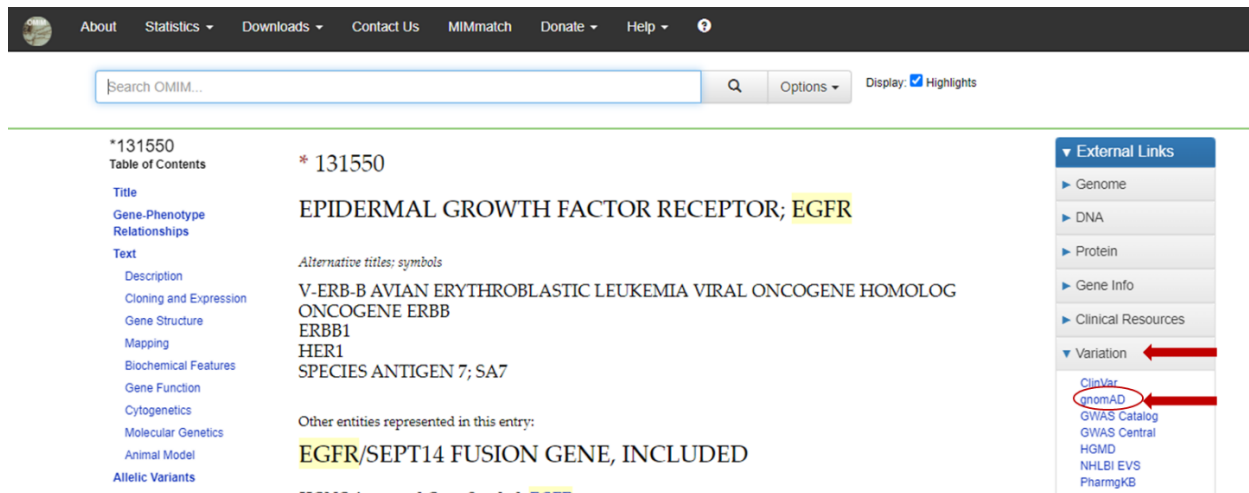
Show 100 | Download As | « First | < Previous | Next > | Last »

1: \* 131550. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR; EGFR  
EGFR/SEPT14 FUSION GENE, INCLUDED  
Cytogenetic location: 7p11.2, Genomic coordinates (GRCh38): 7:55,019,017-55,211,628  
Matching terms: egfr  
► Gene-Phenotype Relationships ► Links

Figura 2. Resultado de la búsqueda en EGFR en OMIM

Para continuar haga click sobre el texto indicado con la flecha azul en la figura 2

3. Abrir la pestaña 'links' del OMIM, en la opción **VARIATION** abrir el servidor 'gnomAD'



Search OMIM...  Options

\*131550  
Table of Contents

Title  
Gene-Phenotype  
Relationships  
Text  
Description  
Cloning and Expression  
Gene Structure  
Mapping  
Biochemical Features  
Gene Function  
Cytogenetics  
Molecular Genetics  
Animal Model  
Allelic Variants

\* 131550  
EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR; **EGFR**

Alternative titles; symbols  
V-ERB-B AVIAN ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG  
ONCOGENE ERBB  
ERBB1  
HER1  
SPECIES ANTIGEN 7; SA7

Other entities represented in this entry:  
**EGFR/SEPT14 FUSION GENE, INCLUDED**  
HNC Anomalous Gene Symbol: **EGFR**

External Links  
Genome  
DNA  
Protein  
Gene Info  
Clinical Resources  
Variation  
ClinVar  
**gnomAD**  
GWAS Catalog  
GWAS Central  
HGMD  
NHLBI EVS  
PharmgKB

Figura 3. Ubicación de la pestaña variación y gnomAD en la base de datos OMIM. Las pestañas de elección están indicadas con flechas rojas

- Al hacer click sobre gnomAD usted obtendrá una tabla con las distintas mutaciones como se muestra en la figura 4

Consequence occurs in a non-coding transcript are denoted with a red dot. Consequences in a specific transcript are the transcript name.

Variant ID	Source	HGVSc Consequence	VEP Annotation	LoF Curation	Clinical Significance	Flags	Allele Count	Allele Number
7-55225498-G-C	E	c.1298+52G>C	● intron				4	247548
7-55227781-A-G	E	c.1299-51A>G	● intron				2	246286
7-55227783-A-G	E	c.1299-49A>G	● intron				3	247132
7-55227787-T-C	E	c.1299-45T>C	● intron				2	248362
7-55227794-A-C	E	c.1299-38A>C	● intron				1	249500
7-55227795-A-AT	E	c.1299-32dupT	● intron				1	249666
7-55227801-C-T	E	c.1299-31C>T	● intron				2	250328
7-55227803-C-T	E G	c.1299-29C>T	● intron				64	281970
7-55227804-C-T	E	c.1299-28C>T	● intron				2	250596
7-55227807-A-G	E G	c.1299-25A>G	● intron				21	282294
7-55227809-G-C	E	c.1299-23G>C	● intron				1	250946
7-55227813-T-C	E	c.1299-19T>C	● intron		Likely benign		1	251090
7-55227819-C-T	E G	c.1299-13C>T	● intron		Likely benign		19	282570
7-55227823-C-T	E	c.1299-9C>T	● intron				1	251290
7-55227825-A-G	E G	c.1299-7A>G	● splice region		Benign		612	282712
7-55227826-A-T	E	c.1299-6A>T	● splice region				1	251328
7-55227832-T-A	E	p.His433Gln	● missense				1	251366

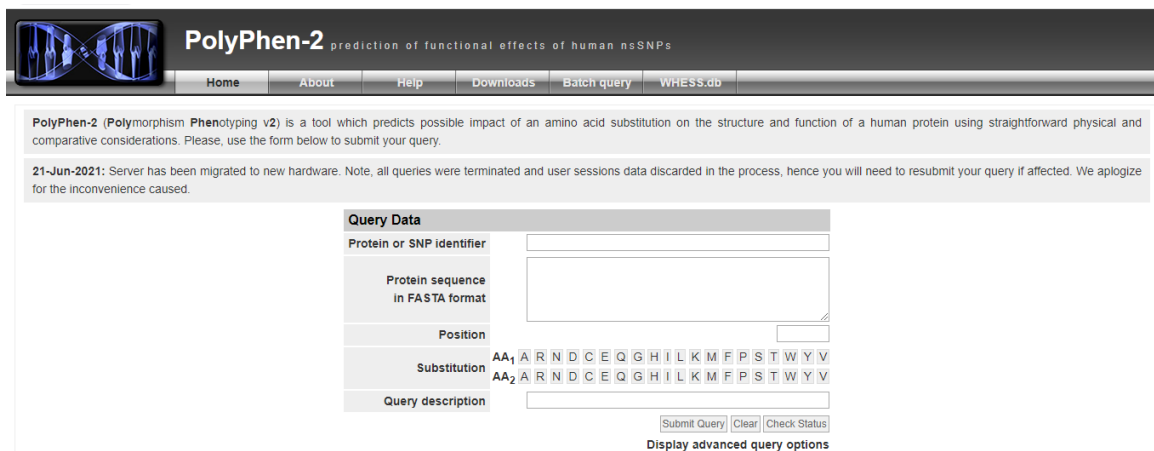
Figura 4. Apariencia del listado de mutaciones de la base OMIM para el gen EGFR

- Desplazándose a lo largo de la tabla ubique cada una de las mutaciones que le ha correspondido trabajar y describa los resultados obtenidos. Para guiarse sobre cómo debe realizar la descripción puede tomar el ejemplo que le brido a continuación:

### Ejemplo descripción de la mutación p.Ala763Val OMIM

La mutación pAla763Val es causada un cambio puntual de citocina por timina en la secuencia del gen EFGR. Esta mutación ha sido reportada en exomas, pero no en genomas. La significancia clínica de esta mutación según la base de datos OMIM es incierta.

6. Siga con el servidor **PolyPhen-2** (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>). Una vez usted acceda a la página obtendrá una pantalla como la que se ilustra en la figura 5



**PolyPhen-2** prediction of functional effects of human nsSNPs

Home About Help Downloads Batch query WHESs.db

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) is a tool which predicts possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein using straightforward physical and comparative considerations. Please, use the form below to submit your query.

21-Jun-2021: Server has been migrated to new hardware. Note, all queries were terminated and user sessions data discarded in the process, hence you will need to resubmit your query if affected. We apologize for the inconvenience caused.

**Query Data**

Protein or SNP identifier

Protein sequence in FASTA format

Position

Substitution AA<sub>1</sub> ARNDCEQGHILKMFPSTWYV  
AA<sub>2</sub> ARNDCEQGHILKMFPSTWYV

Query description

[Display advanced query options](#)

Figura 5. Apariencia general de la base de datos PolyPhen-2

Para continuar su trabajo usted debe llenar los siguientes datos:

En la **casilla protein or SNP identifier** por favor escribir P00533 (este es el identificador que la base de datos Uniprot asigna a la proteína que estamos estudiando que es el EFGR)

En la casilla **Position** debe escribir la posición de la mutación que va a analizar, en el ejemplo que he trabajado en los puntos anteriores de la guía la mutación es pAla763 Val, entonces para este caso la posición es la 763

En la casilla para sustitución debo seleccionar en AA1 la letra A que corresponde a alanina (Ala) y en la sección AA2 la letra V (Val) que corresponde a la Valina

Al terminar de llenar los datos usted obtendrá una situación como la que se ilustra en la figura 6, la única diferencia es que usted llenará los datos que le corresponden a cada una de las mutaciones asignadas para su grupo en este ejercicio

Query Data

Protein or SNP identifier

P00533

Protein sequence in FASTA format

Position

763

Substitution

AA<sub>1</sub> A R N D C E Q G H I L K M F P S T W Y V  
AA<sub>2</sub> A R N D C E Q G H I L K M F P S T W Y V

Query description

Submit Query

Clear

Check Status

Display advanced query options

Figura 6. Ventana de consulta de polyphen para la mutación de ejemplo

- Oprima el botón submit query marcado con el círculo rojo en la figura 6. Después de algunos segundos de realizar este proceso usted obtendrá una pantalla como la que se ilustra en la figura 7A.

A.

Grid Gateway Interface

v2.2.8



[Help](#) | [Troubleshooting FAQ](#)

---

Service Name: PolyPhen-2

Session ID: 05161180c67d2fc74bb424d1df1deba3ceb1af6 ☐ Overwrite default

Grid Status:

Load	Health	Jobs:	Pending	Running
Medium	100%	10	18	

Jobs (3 total):

Completed (2)				
ID	Results	Errors	Date/Time	Delete
8625367	<a href="#">View</a>	-	2022-11-23 04:45:17	<input type="checkbox"/>
8625371	<a href="#">View</a>	-	2022-11-23 04:47:12	<input type="checkbox"/>

Pending/Running (1/0)				
ID	Pos.	State	Date/Time	Delete
8625446	10	qw	2022-11-23 05:06:24	<input type="checkbox"/>

B.



Figura 7. Consulta de mutaciones en polyphen A. Ventana inicial de resultados B. Ventana de evaluación del impacto de las mutaciones

Haga click sobre la palabra **View** ubicada en la columna **results** (está marcado en círculos rojos en la figura 7A). Una vez usted haya hecho click en **View** usted obtendrá una ventana como la que se ilustra en la figura 7B. Con los resultados que arroja la base de datos Polyphen usted puede complementar la descripción de resultados obtenida con la base de datos OMIM. Para guiar su descripción de resultados por favor observe el ejemplo que muestro a continuación.

### Ejemplo descripción de resultados de la mutación p.Ala763Val OMIM y Polyphen

La mutación pAla763Val es causada un cambio puntual de citocina por timina en la secuencia del gen EFGR. Esta mutación ha sido reportada en exomas, pero no en genomas. La significancia clínica de esta mutación según la base de datos OMIM es incierta. En contraste, en el servidor Polyphen la mutación es clasificada como posiblemente deletérea con un puntaje de 1.0

- Continúe con el servidor **SusPect**: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~suspect/index.html> . En la casilla mutations de la sección *search for human variants* Figura 8. Ustedes deben escribir la identificación de su proteína según el código uniprot es decir P00533 seguido de la mutación a estudiar, en el caso del. Tenga presente que en este servidor los aminoácidos se reportan con la abreviatura de una sola letra (para consultar las abreviaturas de aminoácidos consulte el anexo 1). Es decir que para el ejemplo tratado en esta guía la consulta sería P00533 A763V Una vez terminen de escribir su mutación hagan click en el botón Submit (Figura 8).



The image shows the SusPect web interface. At the top, there is a logo of a person smoking a pipe with the text 'SusPect'. Below the logo are links: Home, About, Contact, Download. The main content area is divided into two columns. The left column is titled 'Search for human variants' and contains instructions: 'Enter variants in the box (using UniProt accessions or chromosomal locations)', 'Alternatively, upload a file in VCF format', and 'Scores based on March 2013 UniProt release'. Below these instructions is a text box labeled 'Mutations (human only)' containing the text 'P0053 A763V'. Below the text box is a 'VCF File' section with a 'Seleccionar archivo' button and 'Ninguno archivo selec.' text. There is also a checkbox for 'Return structures (Where available, non-commercial users only. Slower than just retrieving scores.)'. At the bottom of this column is a 'Submit' button, which is circled in red. The right column is titled 'Mutate an entire protein' and contains instructions: 'Upload a sequence (raw or FASTA format) or a protein structure file (PDB format), or provide a UniProt accession.', and 'Why not try using Phyre2 to generate a structural model?'. Below these instructions are radio buttons for 'UniProt Accession' and 'Amino Acid Sequence'. There is a text box for 'Paste your sequence here (one sequence only)'. Below this text box are radio buttons for 'Protein Structure' and 'Human protein'. There is also a 'Chain ID (default A):' text box and a 'File:' section with a 'Seleccionar archivo' button and 'Ninguno archivo selec.' text. At the bottom of this column is a 'Run SuSPect' button. At the very bottom of the page is a link for 'Accessibility Statement'.

Figura 8. Búsqueda de mutaciones en el servidor *Suspect*



Después de unos pocos segundos usted obtendrá el resultado de la evaluación en una pantalla como la que se ilustra en la figura 9.

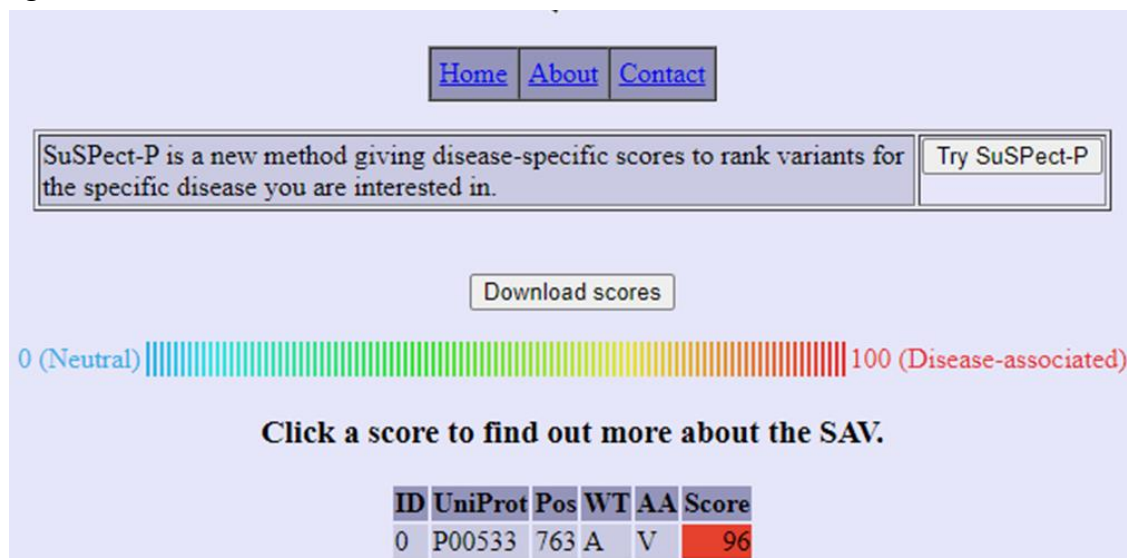


Figura 9. Ventana de resultados para la mutación de ejemplo en el servidor *Suspect*

- Con los resultados obtenidos en *Suspect* complemente la descripción de resultados que lleva hasta el momento para cada una de sus mutaciones como se ilustra en el ejemplo.

### Ejemplo descripción de resultados de la mutación p.Ala763Val OMIM, Polyphen y Suspect

La mutación pAla763Val es causada un cambio puntual de citocina por timina en la secuencia del gen EFGR. Esta mutación ha sido reportada en exomas, pero no en genomas. La significancia clínica de esta mutación según la base de datos OMIM es incierta. En contraste, en el servidor *Polyphen* la mutación es clasificada como posiblemente deletérea con un puntaje de 1.0. De manera similar el servidor *Suspect* reporta esta mutación con un puntaje de 96 sobre 100 de asociación con enfermedad en humanos

### Para tener en cuenta para la descripción de resultados a realizar en el informe de laboratorio



La descripción de resultados debe ir acompañada de una tabla o una figura. En su equipo de trabajo discutan como podrían presentarse los resultados de los distintos servidores para las mutaciones ¿Será conveniente separar el resultado de cada servidor o será mejor agrupar la información de todos los servidores en una única tabla o figura realizada cada una de las mutaciones evaluadas?

### Para tener en cuenta en la discusión de resultados a realizar en el informe de laboratorio

Algunas preguntas posibles para discutir pueden ser

¿A qué podría deberse la discrepancia o similitud reportada por cada una de las bases de datos?

Además de la mutación en el DNA señalada por OMIM ¿Qué otras mutaciones habrían podido llevar a la misma modificación de aminoácidos? Consulte el código genético

10. Diríjase a la base de datos de Protein *data bank* **RCSB PDB** (<https://www.rcsb.org/>). En la casilla de buscar escriba **PDB 1XKK** de clic sobre el ícono de la lupa (Figura 10 A). Usted obtendrá un resultado como el que se ilustra en la figura 10 B. A continuación, usted debe hacer **clic** sobre el texto que está encerrado en el círculo rojo (Figura 10B). Usted observará una pantalla como la que se ilustra en la figura 10C, haga clic sobre el texto *Download files* (encerrado en un círculo rojo en la figura 10C) y seleccione el formato PDB

A.



B.



C.



Figura 10. Procedimiento para bajar el archivo 1XKK del *Protein data Bank* que contiene el cristal para la proteína EGFR

11. Descargue el programa **Swiss-PdbViewer**: <https://spdbv.vital-it.ch/>

12. Abra **Swiss-PdbViewer** vaya a la pestaña open PDB file y seleccione el archivo 1XKK.pdb que posiblemente está en su carpeta de descargas. Al finalizar usted deberá observar una pantalla como la que se ilustra en la figura 11

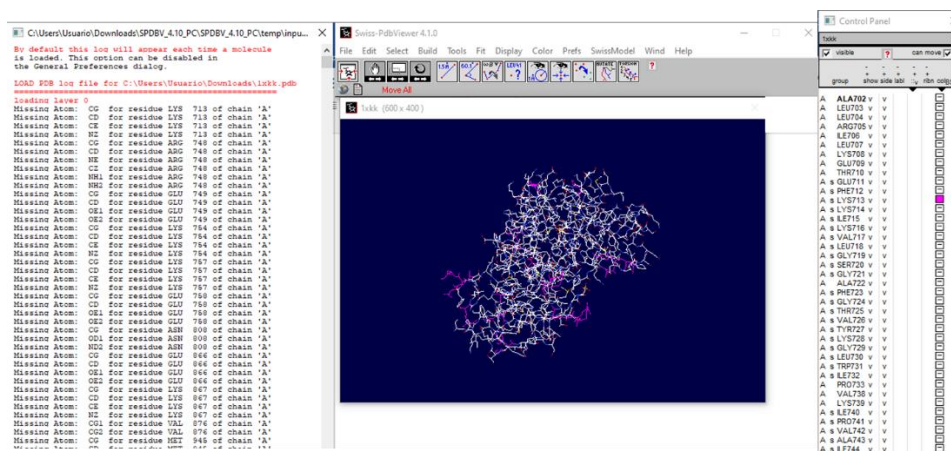


Figura 11. Estructura de la proteína EGFR observada en PDB viewer

13. Con ayuda de los íconos rotar, seleccionar y ampliar (figura 12) haremos una primera exploración sobre la estructura del factor EGFR

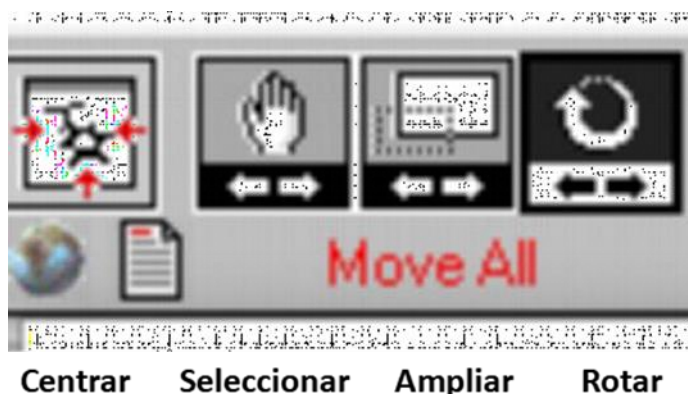
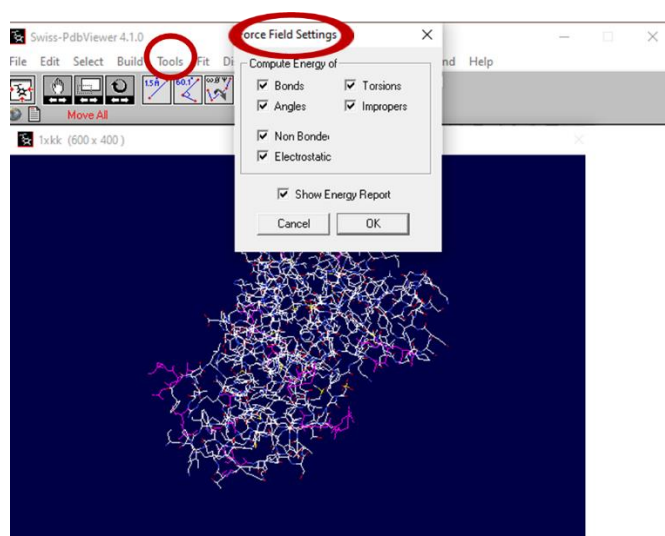


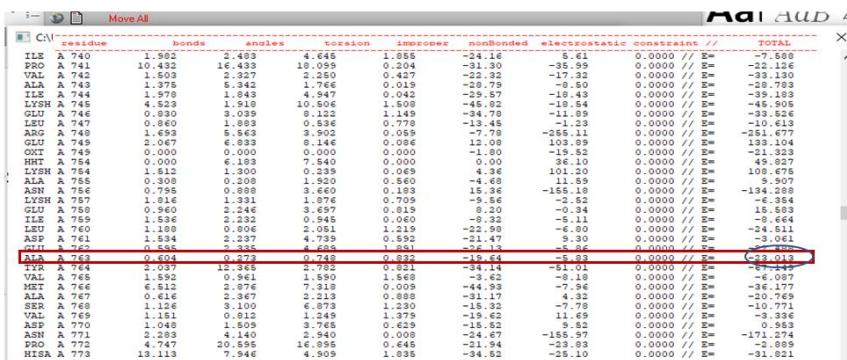
Figura 12. Íconos básicos para explorar la estructura de la proteína en el programa Swiss pdb Viewer

14. En la opción *tools* seleccione la opción compute energy (force field) (Figura 13)



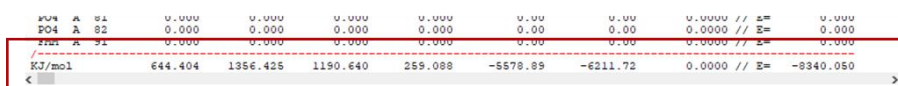
15. Observe atentamente la información de la tabla emergente. **Registre la energía del aminoácido de interés para cada una de las mutaciones a evaluar.** En el caso del ejemplo desarrollado en la guía sería la posición A 763 (Figura 13 A). Descienda hasta el final de la table De igual y registre la energía libre para toda la proteína (Figura 13 B). Alternativamente guarde una captura de pantalla con la información solicitada

A.



Residue	bonds	angles	torsion	impropres	nonbonded	electrostatic	constraints	TOTAL
ILE A 740	1.992	2.493	4.648	1.858	-24.16	8.61	0.0000 // E=	-7.690
PRO A 741	10.432	16.433	18.099	0.204	-31.30	-36.99	0.0000 // E=	-22.126
VAL A 742	1.503	2.327	2.250	0.437	-22.32	-17.32	0.0000 // E=	-33.130
ALA A 743	1.375	8.342	1.766	0.019	-20.79	-8.80	0.0000 // E=	-28.783
ILE A 744	1.979	1.843	4.947	0.042	-29.57	-18.43	0.0000 // E=	-39.183
LYSH A 745	4.823	1.918	10.606	1.608	-45.82	-18.84	0.0000 // E=	-48.906
GLU A 746	0.830	3.039	8.122	1.149	-34.78	-11.89	0.0000 // E=	-33.826
LEU A 747	0.860	1.893	0.536	0.778	-13.45	-1.23	0.0000 // E=	-10.613
ARG A 748	1.693	8.563	3.902	0.059	-7.78	-255.11	0.0000 // E=	-251.677
GLU A 749	2.067	8.833	8.146	0.086	11.08	103.89	0.0000 // E=	133.104
ORIT A 749	0.000	0.000	0.000	0.000	-1.80	-19.52	0.0000 // E=	-21.323
HHT A 754	0.000	6.183	7.540	0.000	0.00	36.10	0.0000 // E=	49.827
LYSH A 754	1.512	1.300	0.235	0.065	4.36	101.20	0.0000 // E=	108.675
ALA A 755	0.308	0.208	1.520	0.560	-4.68	11.59	0.0000 // E=	9.907
ASN A 756	0.756	0.888	3.660	0.183	15.36	-155.18	0.0000 // E=	-134.288
LYSH A 757	1.816	1.391	1.876	0.709	-9.86	-2.52	0.0000 // E=	-6.364
GLU A 758	0.960	2.246	3.697	0.819	8.20	-0.34	0.0000 // E=	16.583
ILE A 759	1.536	2.232	0.945	0.060	-9.32	-5.11	0.0000 // E=	-9.664
LEU A 760	1.188	0.806	2.051	1.219	-22.98	-6.00	0.0000 // E=	-24.611
ASP A 761	1.834	2.237	4.739	0.892	-21.47	9.30	0.0000 // E=	-3.061
ALA A 763	0.604	0.273	0.748	0.832	-12.64	-8.83	0.0000 // E=	-23.013
TYR A 764	2.037	12.365	2.782	0.821	-34.14	-51.01	0.0000 // E=	-87.243
VAL A 765	1.592	0.961	1.590	1.568	-3.62	-8.18	0.0000 // E=	-6.087
HET A 766	6.812	2.876	7.318	0.009	-44.93	-7.96	0.0000 // E=	-36.177
ALA A 767	0.616	2.367	2.213	0.888	-31.17	4.32	0.0000 // E=	-30.769
SER A 768	1.126	3.100	6.873	1.230	-15.32	-7.78	0.0000 // E=	-10.771
VAL A 769	1.151	0.812	1.245	1.375	-19.62	11.69	0.0000 // E=	-3.336
ASP A 770	1.048	1.509	3.765	0.629	-15.52	9.82	0.0000 // E=	0.953
ASN A 771	2.283	5.140	2.940	0.008	-24.67	-155.97	0.0000 // E=	-171.274
PRO A 772	4.747	20.585	16.895	0.645	-21.84	-23.93	0.0000 // E=	-2.889
HISA A 773	13.113	7.946	4.909	1.836	-34.52	-26.10	0.0000 // E=	-31.821

B.



Residue	bonds	angles	torsion	impropres	nonbonded	electrostatic	constraints	TOTAL
KJ/mol	644.404	1356.425	1190.640	259.088	-5578.89	-6211.72	0.0000 // E=	-8340.050

Figura 13. A. Tabla representativa de los parámetros de energía obtenidos para el cristal 1XKK. En el recuadro se observa la posición de interés para el ejemplo B. En el recuadro de observa la energía obtenida para toda la proteína antes de la mutación

- Una vez haya realizado este paso vaya al icono *mutate* en la barra de herramientas. Una vez haya realizado este paso con el *mouse* ubique el aminoácido de interés de manera que este aparezca destacado en frente del aviso *pick one group or hit 'esc'*, tal como se muestra en la figura 16

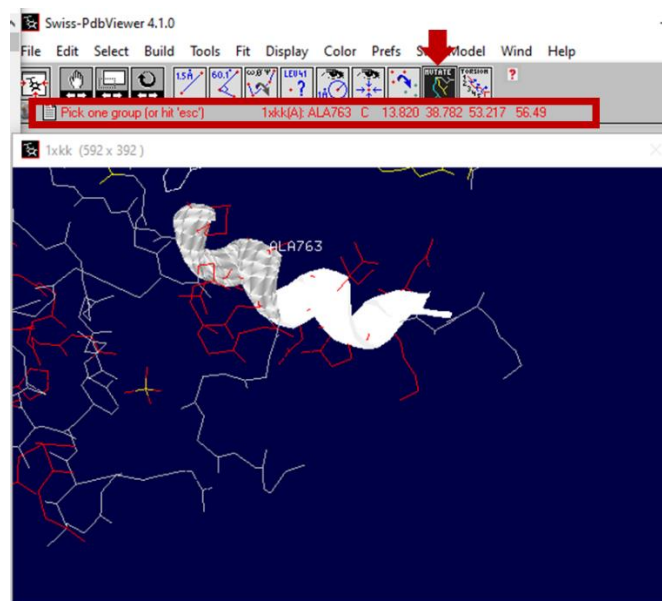


Figura 16. Selección del aminoácido Ala 763 para realizar la mutación

Inmediatamente después haga clic sobre el aminoácido y aparecerá un menú desplegable en el que aparecerá la lista de aminoácidos. Seleccione la mutación indicada para su ejercicio. **Describa que cambia cuando usted realiza este proceso y adquiera la imagen correspondiente como se ilustra en la Figura 17**

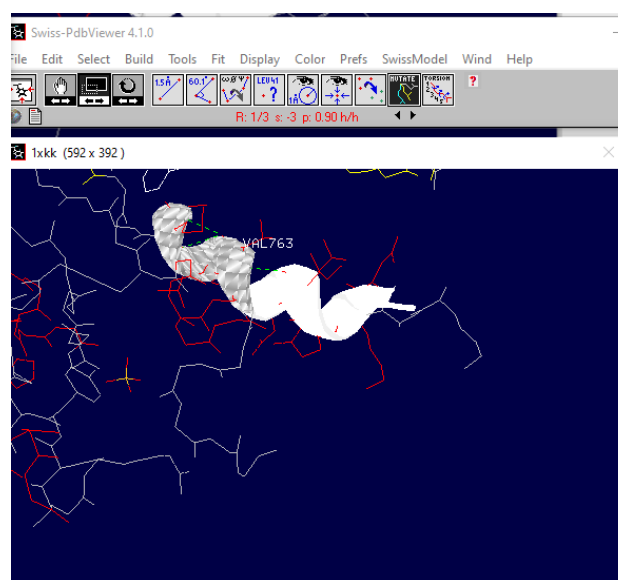


Figura 17. Captura de pantalla mutación Ala 763 Val 763

18. Para cada aminoácido de interés repita los procedimientos 14 y 15 de la guía. Anote la energía para los aminoácidos mutados. Así mismo apunte la energía libre para toda la proteína.

**Para tener en cuenta para la descripción de resultados a realizar en el informe de laboratorio**



En comparación con el aminoácido original ¿Cómo se observa la cadena lateral del aminoácido mutante?



¿Cómo es la energía calculada para el aminoácido mutante con respecto al original?



¿Cómo impactan estas mutaciones en la energía calculada para toda la proteína?

**Para tener en cuenta en la discusión de los resultados**

¿En las mutaciones evaluadas el aminoácido original es mutado por otro del mismo tipo de aminoácidos?

¿Las cadenas laterales de los aminoácidos mutados son de tamaño similar a los aminoácidos originales?

¿Cómo se relacionan estos posibles cambios en la estructura de los aminoácidos mutantes con la energía libre de Gibbs reportada?

¿Cómo se relacionan estos cambios en la energía con la severidad de las mutaciones que revelan las bases de datos OMIM, Polyphen y Suspect?

¿En qué enfermedades humanas están involucradas las mutaciones en el receptor EFGR?

### **Ejemplo de una discusión para la mutación descrita en el problema**

La mutación de Alanina en la posición 763 por valina lleva al cambio de dos aminoácidos de naturaleza hidrofóbica. Sin embargo, la cadena lateral de la valina es más larga que la de la alanina, pues mientras alanina tiene solo un solo grupo CH<sub>3</sub> valina tiene 3 grupos CH<sub>3</sub> (cita). Esto llevar a que el cambio de este aminoácido causara inestabilidades en la estructura de la proteína, pues la cadena lateral de mayor longitud podría impedir el correcto plegamiento de la misma. Esta hipótesis podría verse reforzada por el cambio en la energía que pasa de -23 en el aminoácido original a 90 indicando que el cambio por valina podría hacer la estructura más inestable. En línea con estos hallazgos, se observa que los servidores Polyphen y Suspect califican a esta mutación como con alto potencial deletéreo, pues al producir un cambio estructural posiblemente también modifican la función de la proteína (Cita)

### **Para responder en la conclusión**

A partir de sus hallazgos y discusión se les sugiere contestar la siguiente pregunta

¿Puede considerarse a priori que una mutación puntual en el ADN por ser un cambio tan mínimo no tiene un efecto en el fenotipo molecular y la función de las proteínas?