

Erratum – Exercices chapitre 1

Dans le premier fascicule d'exercices qui vous a été remis, l'exercice 7 était incomplet. L'énoncé complet figure ci-dessous.

7. Faisceaux torsadés d'hélices

Les maladies à prion (dont font partie la maladie de la 'vache folle', la tremblante du mouton, et la maladie de Creutzfeldt-Jakob) sont associées à la conversion d'une protéine riche en hélice en une structure insoluble, riche en feuillets, dont il est admis que c'est l'élément infectieux associé à la propagation de la maladie. On examine ici un peptide d'une vingtaine d'acides aminés qui est un modèle simple de ces transitions structurales.

L'assemblage de plusieurs molécules d'un même peptide en un faisceau torsadé d'hélices est fortement favorisé lorsque la séquence du peptide contient une répétition d'heptades abcdefg avec en positions a et d une Leucine ou une Isoleucine. On dit que ces heptades sont canoniques. On a trouvé dans une série de protéines comportant des faisceaux torsadés d'hélices les séquences suivantes, en code à une lettre des acides aminés, les heptades ou parties d'heptades étant séparées par un trait d'union (Figure 1):

MELEAR – LAKTEKD
YHLENE – VARLKKL
QWLENE – LNRWRNG
SELEVR – LKKEEKS

KLLEEK – LKEAETR
TQLEKK – LMEVEKE
KELERK – LSDLEKK

N-term -----C-term

Figure 1 : peptides de faisceaux torsadés d'hélices. Les

extrémités N et C terminales sont indiquées.

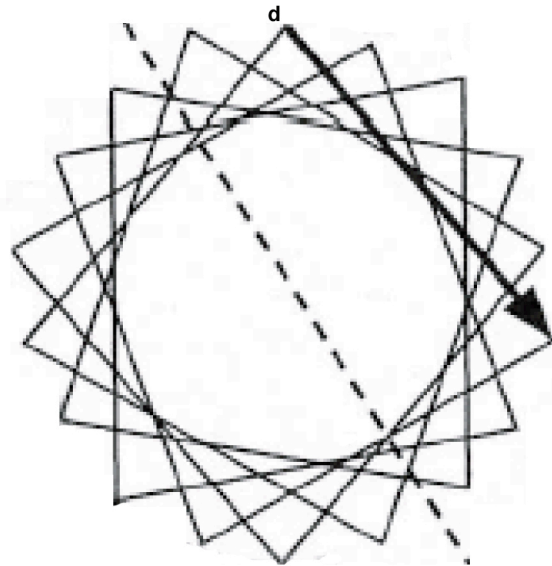


Figure 2 (démarrage de l'hélice en d, dans le sens de la

- 1) Donner la séquence consensus de cette série de peptides en écrivant □ pour chaque résidu □
 - le code à une lettre de l'acide aminé, s'il est parfaitement conservé
 - h s'il s'agit toujours d'un résidu hydrophobe
 - c s'il s'agit toujours d'un résidu chargé
 - x si l'on ne peut rien dire de la nature du résidu
- 2) Quelle est la séparation des résidus de ce consensus qui ont dans toutes les séquences des charges opposées ? Peuvent-ils former un pont salin entre acides aminés d'une hélice (on pourra s'aider de la Figure 2 -représentation des hélices vues de bout - pour raisonner)? L'analyse radiocristallographique montre que ces résidus forment des ponts salins. Quel est le rôle de ces ponts salins dans la formation du faisceau torsadé d'hélices ?
- 3) On conserve les résidus identifiés au 2) et on complète ce consensus pour faire un peptide de 14 acides aminés comprenant deux heptades complètes.
 - Quel acide aminé du consensus devez-vous remplacer et par quel(s) autre(s) acide(s) aminé(s) □ pour rendre la deuxième heptade canonique ?

- Quel(s) acide(s) aminé(s) devez-vous ajouter et à quelle position pour former deux heptades complètes ?
- 4) On stabilise les hélices en favorisant la formation de ponts salins internes aux hélices. On ajoute donc des acides aminés chargés. Quelle contrainte sur la somme des charges doit-on respecter pour pouvoir former des assemblages stables avec les peptides résultants ?
- On veut établir un pont salin entre le glutamate qui suit la Leucine de la première heptade du consensus et un résidu qui le précède. Quel résidu faut-il substituer et à quelle position du consensus à laquelle l'acide aminé n'est pas défini ?
 - On met un acide aminé chargé à la position chargée non appariée du consensus. Quel est le meilleur choix (on rappelle en Figure 3 les propensions des acides aminés à former des hélices) ? Quel acide aminé faut-il incorporer à la position n+4 par rapport à ce résidu pour établir un pont salin interne à l'hélice ?
 - Pour assurer la solubilité maximale du peptide, on met un résidu chargé aux positions non encore définies et comprises entre un acide aminé hydrophile et un acide aminé hydrophobe. Quels sont les meilleurs choix possibles, sachant que l'on évite d'avoir dans la séquence deux résidus consécutifs de même charge et que l'on favorise la formation d'hélices ?
- 5) Pour coiffer le peptide ci-dessus on ajoute en N-terminal un résidu S et en C-terminal deux résidus, I et G. Avec le peptide résultant, on obtient le spectre de dichroïsme circulaire représenté sur la Figure 4 (courbe passant par les symboles pleins). Quelle est la structure secondaire du peptide résultant ?

Amino acid residue	α -helix (P_{α})	Amino acid residue	Relative stabilization of α -helical conformation (kcal/mol)
Glu	1.59	Ala	-0.77
Ala	1.41	Arg	-0.68
Leu	1.34	Lys	-0.65
Met	1.30	Leu	-0.62
Gln	1.27	Met	-0.50
Lys	1.23	Trp	-0.45
Arg	1.21	Phe	-0.41
His	1.05	Ser	-0.35
Val	0.90	Gln	-0.33
Ile	1.09	Glu	-0.27
Tyr	0.74	Cys	-0.23
Cys	0.66	Ile	-0.23
Trp	1.02	Tyr	-0.17
Phe	1.16	Asp	-0.15
Thr	0.76	Val	-0.14
Gly	0.43	Thr	-0.11
Asn	0.76	Asn	-0.07
Pro	0.34	His	-0.06
Ser	0.57	Gly	0
Asp	0.99	Pro	≈ 3

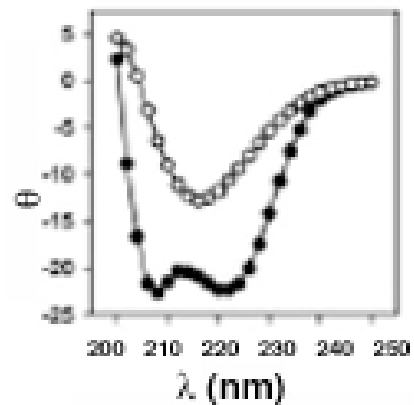


Figure 3

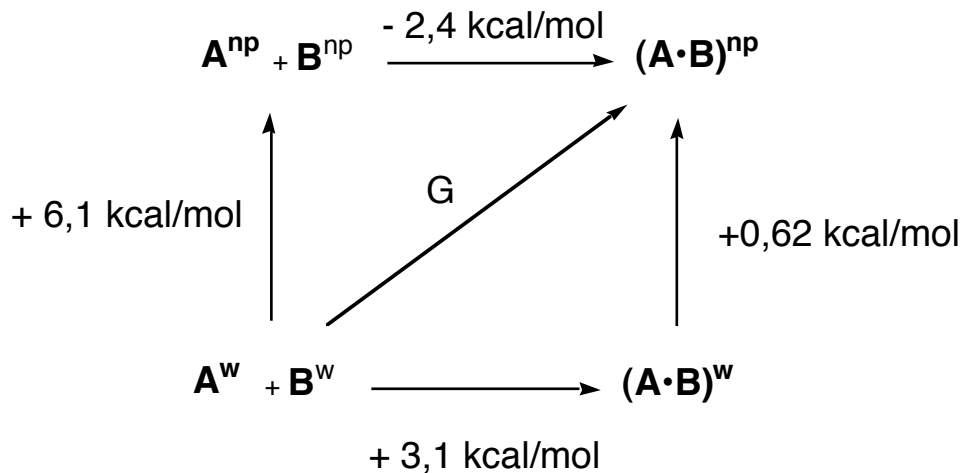
Figure 4

- 6) On voudrait synthétiser un peptide qui passe par une transition hélice-feuillet. Quelle séquence de résidus hydrophiles et hydrophobes favoriserait la structure en feuillet ? Combien reste-t-il de positions sans acide aminé défini dans la séquence ? quels résidus proposeriez-vous d'insérer en ces positions ? A température ambiante, le peptide résultant forme bien une hélice mais, lorsqu'on le chauffe à 37°C pendant plusieurs heures, il adopte une structure secondaire caractérisée par le spectre de dichroïsme circulaire représenté sur la figure 4 (courbe en symboles creux). Que conclure ?

Chapitre 2 – Repliement, forces et stabilité des protéines

1- Origine de la stabilité des protéines

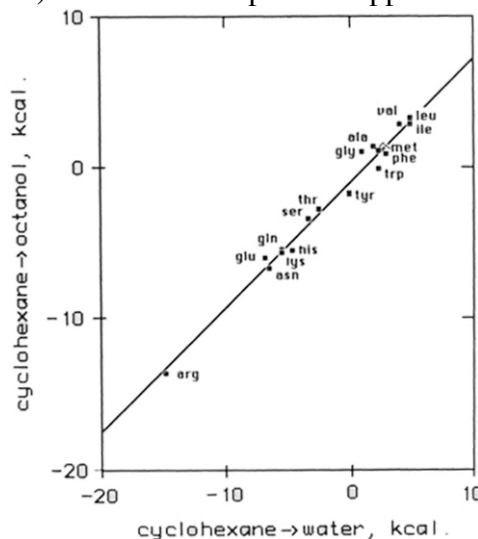
Les petites molécules forment rarement des liaisons hydrogène dans l'eau, probablement en raison de la perte d'entropie lors de la formation de la liaison hydrogène et aussi parce que ces molécules peuvent former des liaisons semblables avec l'eau. Par contre, on trouve souvent des liaisons hydrogènes à l'intérieur des protéines repliées. La question qui se pose est \square est-ce que ces liaisons hydrogène stabilisent ou déstabilisent les protéines \square Pour répondre à la question, il faut comparer l'énergie libre dans l'eau (notée w) de composés susceptibles de former des liaisons hydrogène et leur énergie lorsqu'ils forment une liaison hydrogène dans un milieu apolaire (noté np), qui représente l'intérieur d'une protéine. Ceci peut être analysé en mesurant l'énergie de transfert des composés de l'eau dans un milieu apolaire et la proportion des composés qui forment des liaisons hydrogène dans ces deux milieux. Les résultats sont les suivants pour deux composés particuliers \square



Calculer G . Ce résultat indique-t-il que les liaisons hydrogène sont défavorables au repliement des protéines \square Pourquoi \square

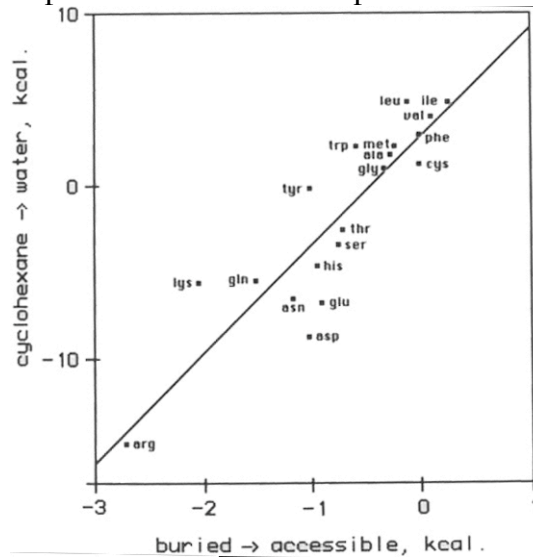
2- Echelle d'hydrophobicité

Une controverse a eu lieu au milieu des années 1980 pour savoir si le tryptophane ou la phénylalanine est l'acide aminé le plus hydrophobe. Pour le déterminer, on mesure la partition des acides aminés entre l'eau et un solvant supposé \square imiter \square l'intérieur des protéines. Des solvants différents (octanol et cyclohexane) ont été utilisés par les supporters des deux camps.



a) dans une première série d'expériences on mesure la partition des 20 acides aminés entre le cyclohexane et l'octanol puis entre l'eau et le cyclohexane. En fait l'expérience est faite avec des composés qui ressemblent le mieux possible aux chaînes latérales des acides aminés. Est-ce justifié et pourquoi? Le résultat est sur la figure ci-dessus. Qu'en déduisez-vous pour ce qui est de la nature du solvant adéquat pour rendre compte du transfert entre un milieu hydrophobe et l'eau?

b) pour conclure, on compare énergie de transfert entre cyclohexane et l'eau avec localisation à l'intérieur ou à l'extérieur de la protéine. Le résultat est présenté sur la figure ci-dessous.



Comment calculer une grandeur équivalente à l'énergie de transfert de l'intérieur à l'extérieur des protéines. Qu'en conclut-on pour la phénylalanine et le tryptophane?

3- Calcul de l'énergie libre de dénaturation d'une protéine

A) La dénaturation de la ribonucléase T1 est suivie en mesurant le spectre de fluorescence de la protéine à 320 nm. La Figure 1 donne les spectres de la protéine native et dénaturée. La variation y de la fluorescence entre la protéine native et dénaturée, dans l'urée, en fonction de la concentration d'urée est donnée par les formules

$$Y = 177.7 + 3.52 [\text{urée}] \text{ pour la protéine native}$$

$$Y = 24.08 + 1.51 [\text{urée}] \text{ pour la protéine dénaturée}$$

Cette variation est présentée sur la Figure 2. On voit aussi qu'à 0M Urée on a $y = 177.4$

On fait l'hypothèse que le système est à deux états (natif et dénaturé). Calculer ΔG de dénaturation à 0M urée ($R = 1.987 \text{ cal/K.mol}$). Quel est le pourcentage de protéine dénaturée dans les conditions de l'expérience (300 K)?

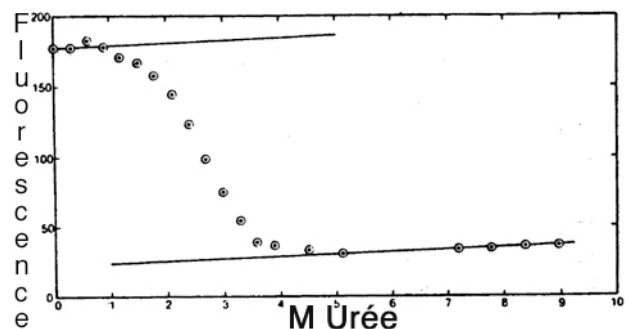
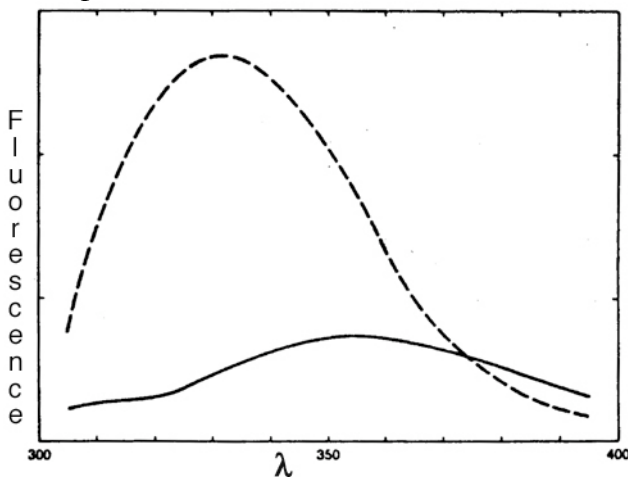


Figure 1

Figure 2

B) On cherche maintenant à évaluer la contributions des interactions non covalentes à la stabilité d'une autre ribonucléase, la barnase (ribonucléase de Bacillus Amyloliquefaciens). Les courbes de dénaturation (Figure 1) et de variation de l'énergie libre (ΔG) (Figure 2) en fonction de la concentration d'urée sont données ci-dessous pour la protéine «sauvage» et trois mutants.

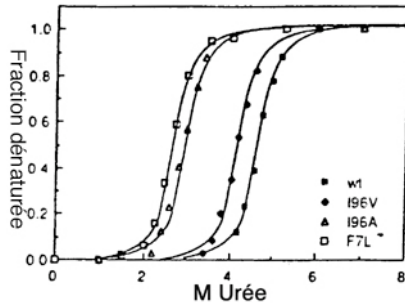


Figure 1

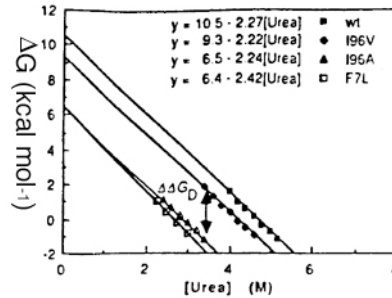


Figure 2

Parmi les quatre protéines de la Figure 1, laquelle est la plus stable?

Proposer un cycle thermodynamique qui à partir des énergies de dénaturation (Figure 2) et de la différence des énergies de solvation dans l'eau de la phénylalanine et de la leucine (Leucine – phénylalanine = 2.24 kcal/mole) permette de calculer la variation d'énergie libre due aux interactions non covalentes lors de la mutation Phe 7 → Leu. Calculer cette variation.

Pour cela, en toute rigueur, il faut faire deux hypothèses supplémentaires. Lesquelles?

4- Interactions électrostatiques

La protéine A que vous étudiez interagit avec une protéine B plus spécifiquement, un résidu Glu de A interagit avec un résidu Lys de B. La protéine C a la même séquence que A sauf qu'elle a un résidu Lys à la place du Glu ci-dessus. Elle interagit moins bien avec B que A (normal). Vous voudriez modifier la protéine B pour qu'elle interagisse avec C plutôt qu'avec A. Vous pensez immédiatement à changer le Lys de B en Glu. En y réfléchissant (un peu) plus, est-il effectivement probable que l'effet soit celui escompté? pourquoi?

Référence originale: Hwang and Warshel (1988) Nature **324**, 270-272