**Pr F.Benabdesselam Maiza**

**Département BPC**

**FSNV- UAMB**

**TD 1 Structure et Fonctions des Protéines ( Master 1)**

1. Propriétés acido-basiques et spectrales des acides aminés aromatiques

A partir d’une solution aqueuse de tyrosine à 150 mg/l, on prépare les 4 solutions suivantes :

- 5 ml de solution mère + 5 ml d’eau

- 5 ml de solution mère + 5 ml de Na OH 0,2 N

- 5 ml de solution mère + 5 ml de tampon carbonate pH 9,5

- 5 ml de solution mère + 5 ml de tampon carbonate pH 10,5

 **1.1**. Quel est le titre, exprimé en moles /l, des solutions ainsi obtenues ?

**1.2**. Quel est théoriquement, le pH de chacune de ces solutions et quelles sont, à chacun de pH, les formes prédominantes de la tyrosine ?

**1.3**. On trace les spectres de chacune des solutions ci-dessus entre 250 et 320 nm . On relève un maximum d’absorption à 260 nm pour la solution aqueuse et à 295 nm pour la solution en milieu base forte.

 Quelle est la partie de la molécule responsable d’une absorption dans le proche UV ?

Comment interpréter le déplacement du maximum d’absorption lorsqu’on passe d’une solution à une autre ?

* 1. Les absorbances, relevées aux deux longueurs d’onde ci-dessus,

Sont respectivement pour les 4 solutions placées dans des cuves de 1 cm

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  Solutionabsorbance | aqueuse | soude | pH9,5 | pH10,5 |
| A 260 | 0,58 | 0,48 | 0,56 | 0,48 |
| A295 | 0 | 1,00 | 0,36 | 0,75 |

Calculer les coefficients d’extinction molaire à 260 nm dans l’eau et à 295 nm dans la soude .

Données : les pka de la tyrosine sont αCOOH :2,2 αNH3+ :9,1 et pKr 10,1

 Chaine latérale phénolique

1. **Séquençage :**

Dans le but de déterminer la structure primaire d’un polypeptide linéaire, on réalise les expériences suivantes

1. L’action du DNFB suivie d’hydrolyse en milieu HCl 6N conduit à un mélange de DNPCys, Arg, Gly, Lys, Tyr et Val en quantités équimolaires
2. L’action brève de la carboxypeptidase A libère Gly
3. L’action de la trypsine directement sur le peptide initial permet d’isoler la glycine et un peptide ; cette même action, précédée de l’addition dans le milieu du β mercaptoéthanol aboutit à un mélange de :

 Glycine

Dipeptide formé de Arg et Cys

Tétrapeptide formé de Cys,Lys, Tyr et Val

1. L’action de la chymotrypsine sur le tétrapeptide ci-dessus conduit à l’obtention de 2 dipeptides dont l’un contient Cys et Tyr.

Quelles sont les séquences peptidiques compatibles ave ces différents résultats ?

Proposer une expérience complémentaire permettant de lever l’ambiguïté.

Ecrire les séquences avec nomenclature à une lettre.

**3.Ecriture de séquences et prédiction de structure**

 Soit le polypetide suivant :

NH2-Ala-Arg-Val-Ser-Met-Lys-Ile-Glu-Ala-Lys-Gly-Asp-Trp-Thr-Gly- Gly – Gln-Met-Thr-Gly-Asp-Ala-Asn-Phe-Arg-Ala-Ser-Val-Glu-Leu- COOH

1. Quelle est la charge globale du peptide à Ph 6 ?
2. Réécrire la séquence en symbole à une lettre
3. Quels sont les acides aminés hydrophobes, polaires , chargés du peptides ?
4. En utilisant la méthode statistique de Chou- Fasman quelle est ou sont la (les ) structure(s) secondaire(s) prévisibles ?
5. Quels sont les résidus susceptibles de former une boucle ou tournant β ?

Données :

 Propension des 20acides aminés à être dans chaque structure secondaire.



P(h) propension à figurer dans hélice α

P(f) propension à figurer dans feuillet β

**Règles pour une hélice α :**

**-** Identifier les régions de 6 résidus consécutifs pour lesquels les 2/3 des résidus sont P(h) >100

 Etendre ces régions dans les deux directions jusqu’à atteindre 4 résidus consécutifs de P(h) moyen < 100 à ce moment là c’est la fin de l’hélice

 Les régions pour lesquelles P(h) > P(f) sont déclarées hélice α.

**Règles pour un feuillet β :**

**-** Identifier les régions de 5 résidus consécutifs pour lesquels 3 résidus au moins satisfont à

 P(f )> 100

- Etendre ces régions

- Les régions pour lesquels P(f) > 105 et P(f) > P(h) sont déclarées feuillet β

 Indice de Correction : 60%



The Chou-Fasman method of secondary structure prediction depends on assigning a set of prediction values to a residue and then applying a simple algorithm to those numbers [9]. The table of numbers is as follows:

Name P(a) P(b) P(turn) f(i) f(i+1) f(i+2) f(i+3)

Alanine 142 83 66 0.06 0.076 0.035 0.058

Arginine 98 93 95 0.070 0.106 0.099 0.085

Aspartic Acid 101 54 146 0.147 0.110 0.179 0.081

Asparagine 67 89 156 0.161 0.083 0.191 0.091

Cysteine 70 119 119 0.149 0.050 0.117 0.128

Glutamic Acid 151 037 74 0.056 0.060 0.077 0.064

Glutamine 111 110 98 0.074 0.098 0.037 0.098

Glycine 57 75 156 0.102 0.085 0.190 0.152

Histidine 100 87 95 0.140 0.047 0.093 0.054

Isoleucine 108 160 47 0.043 0.034 0.013 0.056

Leucine 121 130 59 0.061 0.025 0.036 0.070

Lysine 114 74 101 0.055 0.115 0.072 0.095

Methionine 145 105 60 0.068 0.082 0.014 0.055

Phenylalanine 113 138 60 0.059 0.041 0.065 0.065

Proline 57 55 152 0.102 0.301 0.034 0.068

Serine 77 75 143 0.120 0.139 0.125 0.106

Threonine 83 119 96 0.086 0.108 0.065 0.079

Tryptophan 108 137 96 0.077 0.013 0.064 0.167

Tyrosine 69 147 114 0.082 0.065 0.114 0.125

Valine 106 170 50 0.062 0.048 0.028 0.053

The actual algorithm contains a few simple steps:

1. Assign all of the residues in the peptide the appropriate set of parameters.
2. Scan through the peptide and identify regions where 4 out of 6 contiguous residues have P(a-helix) > 100. That region is declared an alpha-helix. Extend the helix in both directions until a set of four contiguous residues that have an average P(a-helix) < 100 is reached. That is declared the end of the helix. If the segment defined by this procedure is longer than 5 residues and the average P(a-helix) > P(b-sheet) for that segment, the segment can be assigned as a helix.
3. Repeat this procedure to locate all of the helical regions in the sequence.
4. Scan through the peptide and identify a region where 3 out of 5 of the residues have a value of P(b-sheet) > 100. That region is declared as a beta-sheet. Extend the sheet in both directions until a set of four contiguous residues that have an average P(b-sheet) < 100 is reached. That is declared the end of the beta-sheet. Any segment of the region located by this procedure is assigned as a beta-sheet if the average P(b-sheet) > 105 and the average P(b-sheet) > P(a-helix) for that region.
5. Any region containing overlapping alpha-helical and beta-sheet assignments are taken to be helical if the average P(a-helix) > P(b-sheet) for that region. It is a beta sheet if the average P(b-sheet) > P(a-helix) for that region.
6. To identify a bend at residue number j, calculate the following value

p(t) = f(j)f(j+1)f(j+2)f(j+3)

where the f(j+1) value for the j+1 residue is used, the f(j+2) value for the j+2 residue is used and the f(j+3) value for the j+3 residue is used. If: (1) p(t) > 0.000075; (2) the average value for P(turn) > 1.00 in the tetrapeptide; and (3) the averages for the tetrapeptide obey the inequality P(a-helix) < P(turn) > P(b-sheet), then a beta-turn is predicted at that location.