

TD B3P : MOTIFS ET DOMAINES PROTÉIQUES

EXERCICE N°1 : Exemples de motifs protéiques de liaison à l'ADN

Se connecter au portail de l'institut suisse de bioinformatique : **ExpPASy** (Expert Protein Analysis System) :

<http://www.expasy.org>

- Q1.** Effectuer une recherche dans UniProtKB sur le facteur de transcription III A de l'Homme (TFIIIA).
Relever son numéro d'accèsion.
Cliquer sur ce numéro pour accéder à la fiche de la protéine.
Relever les titres des différentes rubriques de la fiche d'une protéine.
Récupérer la séquence primaire de la protéine au format FASTA. Comment se présente t-elle ?
Après être revenu sur la page d'accueil d'ExpPASy, ouvrir le logiciel de recherche de motifs **Prosite**.
Cliquer sur l'outil Scan Prosite
Coller la séquence au format FASTA dans le cadre réservé à cet effet et lancer le scan.
(Remarque : on peut également entrer le numéro d'accèsion)
Relever le type et le nombre de motifs présents dans cette protéine.
Cliquer sur le numéro d'accèsion du motif.
Compléter le tableau fourni en document avec les informations de la rubrique.
- Q2.** Réaliser un scan Prosite pour le répresseur de l'opéron galactose d'*E. coli* (n° d'accèsion : P03024).
Noter la présence d'un nouveau type de motif et cliquer sur son numéro d'accèsion.
Compléter le tableau fourni en document avec les informations de la rubrique.
- Q3.** Réaliser un scan Prosite pour le facteur de transcription 2 de poulet (n° d'accèsion : O93602).
Noter la présence d'un nouveau type de motif et cliquer sur son numéro d'accèsion.
Compléter le tableau fourni en document avec les informations de la rubrique.

Document n°1 : Les motifs protéiques de liaison à l'ADN

Nature / Nom	Description	Propriété fonctionnelle

EXERCICE N°2 : Visualisation de structures tridimensionnelles avec le logiciel RasTop

Préalable : Installation de la visionneuse de molécules 3D RasTop

Dans la barre du navigateur internet, taper l'adresse suivante :

<http://acces.ens-lyon.fr/biotic/rastop/html/telechargement.htm>

Cliquer sur « Téléchargement », puis choisir la version 2.03.

Enregistrer sur le disque, par exemple dans le dossier « Mes documents ».

Ouvrir le dossier enregistré Rastopvf et cliquer sur Rastop.exe, et extraire vers le dossier « Mes documents ».

Récupération de fichiers de structures de protéines

Le logiciel RasTop permet de visionner des structures protéiques au format .pdb (**Protein Data Bank**).

Ouvrir la page d'accueil du site de la Protein Data Bank :

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

À l'aide de la barre de recherche, rechercher la structure de la rhodanase de foie de bœuf (liver bovine rhodanese).

Une fois le fichier repéré, cliquer sur l'icône « *Download files* » puis « *PDB file (text)* » et l'enregistrer dans un dossier « *Fichiers PDB* » de « *Mes documents* » sous l'intitulé « *Rhodanase* ».

EXERCICE N°3 : Étude de la structure tridimensionnelle de la rhodanase

Dans Rastop, afficher la structure de la rhodanase. (*Fichier - Ouvrir*).

Afficher la molécule sous forme rubans (*Rubans - Caricature/Cartoon - Afficher seul*).

Mettre en évidence les différents éléments de structure secondaire (*Atomes - Colorer par - Structure*).

Q1. De combien de chaînes est constituée la rhodanase ? (*Atomes - Colorer par - Chaîne*).

Q2. De combien de domaines est constituée cette molécule ? Les décrire succinctement.

Remarques : Pour une meilleure visualisation, cliquer sur la molécule et déplacer la souris pour observer sous différents angles.

Pour zoomer, sélectionner trans/zoom et déplacer le curseur Z.

EXERCICE N°4 : Étude de la structure 3D d'une immunoglobuline (= anticorps) anti-lysozyme

Dans RasTop, ouvrir le fichier de la structure d'une immunoglobuline : *Fichier - Ouvrir - IgG Totale.pdb*

Afficher en squelette carboné : *Rubans - Type - Caricature/Cartoon - Rubans - Afficher seul*

Q1. Décrire la structure quaternaire de la protéine :

- nombre de chaînes polypeptidiques (*Atomes - Colorer par - Chaîne*)
- composition et dénomination des différentes chaînes (*Molécule - Séquence*)
- localisation des ponts disulfures interchaînes (*Liaisons - Ponts disulfure - type - bâtonnets - 250 - Afficher*)

Q2. Indiquer le nombre de domaines de chaque chaîne et décrire ces domaines.

Q3. Cet anticorps est capable de reconnaître un antigène de manière spécifique : le lysozyme. Étudions les zones d'interactions entre anticorps et antigène.

Sans fermer la molécule d'IgG totale, ouvrir le fichier de molécule présentant un fragment F_{ab} de cette IgG associée à l'antigène correspondant (lysozyme) : *Fichier - Ouvrir - FabIgG + Lysozyme.pdb*

Repérer les différentes chaînes de la molécule affichée : *Atomes - Colorer par - Chaîne*.

(NB : la chaîne qui apparaît en rouge est l'antigène)

Afficher en sphères : *Atomes - Représentation – Sphères*.

Localiser le fragment visualisé par rapport à la molécule entière d'IgG :

- Afficher côte à côte la molécule d'IgG totale et le fragment associé à l'anticorps : *Fenêtre - Mosaïque verticale*.
- Repérer le nom des chaînes sur le fragment F_{ab} : cliquer sur les différentes chaînes et lire les informations dans la fenêtre d'affichage en bas (attention, les couleurs sont inversées entre les deux fichiers)

Afficher en sphères : cliquer sur l'icône "sphères".

Voir le complexe Ac/Ag du dessus : cliquer sur la molécule et la bouger à l'aide de la souris de façon à la voir du "dessus" (l'antigène vers soi).

Découper le complexe couche par couche pour voir l'imbrication de l'antigène dans le site antigénique : l'icône Front étant enfoncée (panneau de commande), cliquer sur la flèche droite.

Reconstruire le complexe couche par couche pour voir l'imbrication de l'antigène dans le site antigénique : procéder de la même façon, mais en cliquant sur la flèche vers la gauche.

EXERCICE N°5 : Différents types de protéines

1. Étude d'une protéine globulaire : la calmoduline

Q1. Avec RasTop, ouvrir le fichier de la calmoduline liée au calcium.

Afficher la structure en mode sphères et décrire la forme globale de la molécule.

Dans la barre de sélection, choisir Éléments Hydrophobes et faire une nouvelle sélection.

Colorer ensuite les atomes sélectionnés en rose. Que dire de leur position ? Justifier cette observation.

Resélectionner toute la structure, l'afficher en mode Caricature/Cartoon et colorer en gris à l'aide de la palette couleur.

Q2. Décrire la structure tertiaire.

Cliquer ensuite sur l'icône de sélection  et taper calcium.

Faire apparaître les atomes de calcium : *Atomes – Représentation – Sphères* puis colorer en vert.

Q3. Décrire précisément le motif de fixation au calcium.

2. Étude de protéines transmembranaires

Q4. Récupérer dans EXPASy, la fiche de la bactériorhodopsine de *Halobacterium salinarum* (N° Accession : P02945).

Noter la localisation cellulaire de cette protéine.

Q5. Retrouver la bactériorhodopsine de *Halobacterium salinarum* dans l'outil ProtScale.

Obtenir le profil d'hydrophobicité de la protéine (Hphob Kyte Doolittle).

Le document ci-après est une **prédiction** des structures secondaires de la bactériorhodopsine

3. Étude d'une protéine fibreuse : le collagène

- Q9.** Récupérer la structure primaire du collagène humain. Quelle remarque peut-on faire ?
Ouvrir avec RasTop le fichier correspondant à la structure d'un fragment de collagène.
Faire apparaître les différentes chaînes et décrire la forme de la molécule.
Repérer la présence de liaisons hydrogène : *Liaisons – Liaisons hydrogène – Afficher.*

La bactérie anaérobie hautement pathogène, *Clostridium perfringens*, sécrète une enzyme qui hydrolyse la liaison peptidique suivante : $X\text{-Gly-Pro-Y} \rightarrow X\text{-COO}^- + {}^3\text{HN-Gly-Pro-Y}$.

- Q10.** Comment la sécrétion de cette enzyme contribue-t-elle au caractère invasif de cette bactérie dans les tissus humains ?

EXERCICE N°6 : Relation structure-fonction d'une globine

L'hémoglobine est une hétéroprotéine tétramérique (4 sous unités protéiques), présente dans les hématies, et intervenant dans le transport du dioxygène. Elle est formée de 4 globines de nature protéique (2 a-globines et 2 b-globines) contenant chacune un groupement prosthétique (= non protéique) appelé hème, au niveau duquel se fixe le dioxygène.

1. Étude du positionnement de l'hème

- Visualiser la β -globine (sous-unité de l'hémoglobine), l'hème, le fer et le O_2 :
Fichier - Ouvrir - betaoxy.pdb - Rubans - Squelette carboné - Rubans – Afficher seul.
Sélectionner , écrire hem, valider, afficher en boules et bâtonnets.
Sélectionner , écrire *.fe, valider, afficher en sphères.
Sélectionner , écrire *.o1 or *.o2, valider, afficher en sphères.
- Ouvrir le fichier betared.pdb et choisir le mode mozaïque : *Fenêtres – Mosaïque.*
Recommencer les mêmes opérations que pour la b-globine oxydée.
Orienter les deux images de façon identique.
- Observer attentivement le positionnement de l'hème dans les 2 cas.

- Q1.** conclure.

2. Repérage de la structure impliquée dans la fixation de l'hème

- Sélectionner la bêtaoxyhémoglobine et l'afficher en mode sphères.
Sélectionner l'hème (Cf. ci-dessus) et le colorer en jaune.
Activer l'icône de sélection des atomes"  et sélectionner une zone juste autour de l'hème.
Colorer par groupe (Les atomes d'un même acide aminé sont de la même couleur).
Désactiver l'icône de sélection.

- Q2.** Préciser les noms des acides aminés présents et leur numéro d'ordre dans la séquence : cliquer sur les groupes sélectionnés et noter la nature et le nom des acides aminés correspondant (voir le panneau de commande).

Remarque : On pourra utiliser le zoom et jouer sur la profondeur en cliquant sur l'onglet Profond puis sur les flèches

3. Étude de l'évolution des globines

- À partir du site Expasy, récupérer les séquences protéiques au format FASTA de la chaîne β de l'hémoglobine des organismes suivants : Gorille (P02024), Homme (P68871), Cheval (P02062), Poisson rouge (P02140), Caïman (P02131).
- Réaliser un alignement multiple à l'aide de T-COFFEE :

<http://tcoffee.org.cat/apps/tcoffee/do:regular>

(saisir les séquences au format FASTA l'une après l'autre puis Submit)

Q3. À l'aide du code couleur fourni sur T-Coffee, comparer les séquences.

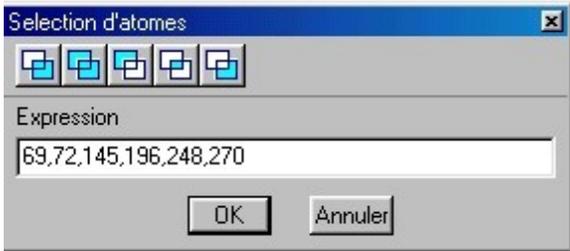
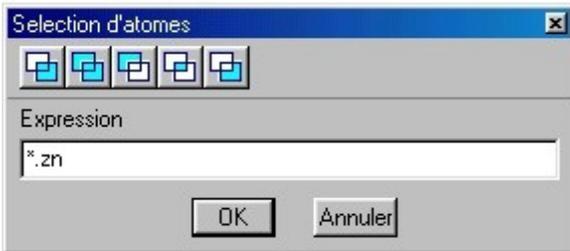
EXERCICE N°7 : Carboxypeptidase et ajustement induit

On cherche à visualiser le modèle de l'ajustement induit et ses conséquences sur les structures moléculaires lors de la liaison entre une enzyme, la carboxypeptidase, et son substrat.

Objectifs	Actions
Afficher le modèle "enzyme-substrat"	- Fichier Ouvrir Choisir le dossier, le fichier carboxypeptidase.pdb
Identifier les acides aminés présents dans le site catalytique.	- Fichier Atomes Colorer par ... chaîne - Afficher en sphères  . - Cliquer sur  pour activer le mode sélection. - Avec le pointeur, cliquer sur l'écran et tirer pour décrire un quadrilatère englobant une portion de la molécule. - Éditer, restreindre. - Lire dans le panneau de commande le nombre d'atomes sélectionnés. - Identifier les atomes.

Résultats :

Les acides aminés présents dans le site catalytique sont His69, Glu72, Arg145, His196, Tyr248 et Glu270.

Objectifs	Actions
Isoler le site catalytique en présence de son substrat.	- Fichier Ouvrir Choisir le dossier, le fichier cpasub.pdb - Ouvrir la fenêtre de sélection d'atomes  . - Écrire les numéros d'ordre des acides aminés (pour repérer le site catalytique)
	
	- Éditer, restreindre, afficher en bâtonnets  . - Ouvrir la fenêtre de sélection d'atomes  . - Écrire *.zn (pour repérer l'atome de zinc).
	
	- Colorer cet atome de zinc. - Afficher en sphère  . - Ouvrir la fenêtre de sélection d'atomes  . - Écrire *s (pour repérer le substrat).

<p>Ajouter dans la même fenêtre, le site catalytique seul.</p> <p>Comparer les modèles.</p> <p>Enregistrer le script seul ou le modèles pdb avec son script.</p>	 <ul style="list-style-type: none"> - Afficher en bâtonnets . - Fichier <ul style="list-style-type: none"> Ajouter <ul style="list-style-type: none"> Choisir le dossier, le fichier cpaseul.pdb - Reprendre la démarche : sélectionner les acides aminés du site catalytique, l'atome de zinc, restreindre ... - Superposer les modèles <ul style="list-style-type: none"> Déplacer les 2 modèles . Déplacer 1 modèle . - Distance entre deux atomes . Cliquer sur le premier puis sur le second. - Fichier <ul style="list-style-type: none"> Enregistrer le fichier sous ...
--	--