

Biochimie (Réactions Cellulaires)

2014-2015

Partiel de Novembre 2014

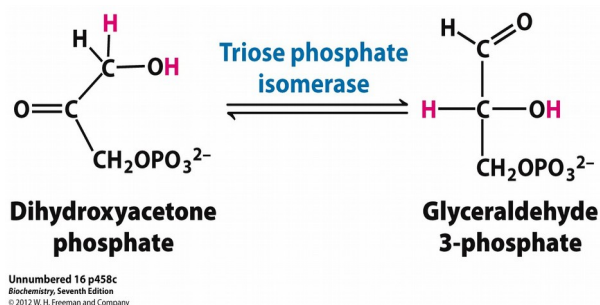
Calculatrice permis, Documents non-permis

Durée 1 heure.

A) Cette question concerne la cinétique d'une réaction d'isomérisation entre un aldéhyde et une cétone, comme nous l'avons vu en cours.

1. Donnez un exemple de ce type de réaction, et l'enzyme qui la fait. (4)

L'interconversion de di-hydroxy acetone phosphate (cétone) et glyceraldéhyde 3 phosphate (aldéhyde) fait par l'enzyme Triose phosphate isomerase (TIM) en est un exemple.



Dans le tableau sont indiquées les concentrations de produit (aldéhyde) en fonction de temps pour quatre échantillons. Les différents échantillons avaient des conditions initiales différentes en concentration de substrat (cétone) et contenaient tous 0.5 μM d'enzyme.

Concentration de produit (μM) en fonction de temps

Temps	Echantillon 1	Echantillon 4	Echantillon 4	Echantillon 4
	0.3 mM cétone	1 mM cétone	3 mM cétone	10 mM cétone
0 sec	0.04	-0.30	0.15	0.09
30 sec	19.5	51.0	71.0	123.0
60 sec	40.0	100.0	145.0	230.0
90 sec	58.0	149.5	210.0	340.0

2. Quelles sont les vitesses initiales des réactions dans les quatre cas. (6)

Les vitesses initiales des réactions sont (environ) 40 $\mu\text{M}/\text{min}$, 100 $\mu\text{M}/\text{min}$, 140 $\mu\text{M}/\text{min}$ et 240 $\mu\text{M}/\text{min}$. Il faut les chiffres (approximatives) et les unités. (Evidemment les valeurs en $\mu\text{M}/\text{sec}$ sont également acceptables – 0.67; 1.67; 2.33 et 4.00)

3. Estimer les valeurs de K_m et V_{max} observées pour l'enzyme. (4)

Les valeurs sont de environ $V_{max} = 5\mu\text{M}/\text{sec}$ et $K_m = 3\text{mM}$ cétone. Les meilleurs reponses utilisaient une graphique lineaire (Eadie-Hoffstee ou Lineweaver-Burk). Les chiffres et les unités sont importants. V_{max} est forcement plus grand que tous les vitesses mesurés.

4. Connaissant la concentration d'enzyme, calculer la constante catalytique (k_{cat}). (2)

$$k_{cat} = V_{max} / [\text{concentration de l'enzyme}] = (5 \mu\text{M}/\text{sec}) / (0.5\mu\text{M}) = 10 \text{ sec}^{-1}.$$

5. La vitesse de la réaction depend du pH. A partir de vos connaissances de la catalyse par ce type d'enzyme, quels groupements ionisables pourraient être impliqués. (4)

La vitesse de la réaction ve dependre des groupement ionisables impliqués dans la mechanisme réactionelle – une chaine laterale de glutamate/aspartate (pK_a environ 4.0) et la chaine laterale de histidine (pK_a environ 6.0). Nous pouvons attendre egalement des effets du a la liaison du substrate donc les pK_a de phosphate, et les groupement +ve sensible a le lier.

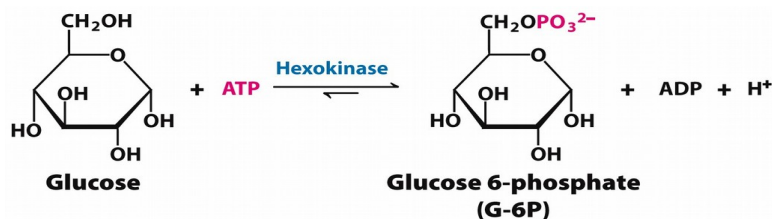
B) Les groupements phosphoryles (PO_4) sont très importants dans le métabolisme et sa régulation.

1. Pourquoi les métabolites sont ils souvent phosphorylés? (2)

Ca augmente leur réactivité (en particulier avec des enzymes) et facilite leur maintien dans les cellules.

2. Donner un exemple d'une enzyme et la réaction qui phosphoryle un métabolite non-phosphorylé (5)

Hexokinase : tranfert une groupement phosphoryle de ATP vers glucose pour produire G6P et ADP.



3. Quelles sont les caractéristiques thermodynamiques (ΔG et ΔG°) constatées en général pour les réactions de phosphorylation? Comment peut-on expliquer cela en quelques mots? (5)

Ces réactions sont souvent tres loin d'equilibre (ΔG grande et négative), et ils sont les réactions rendu chimiquement facile (ΔG° grande et négative) par le couplage de la phosphorylation avec l'hydrolyse d'ATP.

4. La phosphorylation joue des rôles également dans la régulation (8). Donner des exemples de :
1. Une localisation dépendante de la phosphorylation ;

Hexokinase 2 (note dans ce section il y plusieurs exemples possibles)

2. Une dimérisation dépendante de la phosphorylation ;

Hexokinase 2

3. Une activité enzymatique dépendant de la phosphorylation ;

Hexokinase 2

4. Un signal transmis dans la cellule grâce à la phosphorylation ;

Hexokinase 2

5. Une stabilité dépendante de la phosphorylation

Mth1 (avec Grr1)

Biochimie (Réactions Cellulaires)
ENSBI3U1 et ENSNT5U23

2013-2014

Partiel – 1 heure

Les calculatrices sont permises (mais pas nécessaires)

Répondre à une seule des questions A ou B

A) Ce sujet concerne la catalyse et une enzyme de la glycolyse l'hexokinase. Le tableau donne une série de mesures de la production du glucose-6-phosphate (G6P) dans différentes conditions. Les concentrations de deux Substrats sont celles au début de l'expérience. Les réactions ont été faites dans un volume de 3.5 ml à 25°C et dans un tampon à pH 7.6, avec l'addition de 1 microgramme de protéine.

Temps (minutes)	[Substrat 1] (mM)	[Substrat 2] mM	[G6P] mM
0	0.25	0.25	0.000
2	0.25	0.25	0.015
10	0.25	0.25	0.070
60	0.25	0.25	0.250
10	0.05	0.25	0.034
10	0.10	0.25	0.050
10	0.50	0.25	0.083
10	10.00	0.25	0.091
10	10.00	0.50	0.105

1. Quels sont les deux substrats ajoutés à la réaction (il n'est pas nécessaire de savoir lequel est Substrat 1 ou 2) ? (2)

Les deux substrats sont du Glucose (1) et de l'ATP (2).

2. Quelle est la vitesse initiale de production de produit avec 0.25mM de substrat 1 (2)

A partir des premières 4 lignes (un graphique de [G6P] en ordonné contre le temps en abscisse était une bonne idée) nous pouvons observer une vitesse initiale de 7,5 $\mu\text{M}/\text{min}$.

3. Pourquoi la vitesse n'est elle pas constante dans le temps ? (2)

Sur le même graphique on remarque que la vitesse diminue. Ceci pour deux raisons, épuisement des substrats (à 60 minutes il n'en reste plus) et accumulation des produits et ainsi une approche de l'équilibre. (Pour cette

réaction ΔG° est grande et négative donc l'épuisement des substrats est le plus important.)

4. A l'aide d'un graphique estimez les valeurs des paramètres K_m et V_{max} à partir des 8 premières lignes de résultats dans cette expérience (6)

Pour cette partie il fallait calculer la vitesse initiale aux 5 concentrations de substrat 1 différents.

[Substrat 1] (mM)	Vitesse $\mu\text{M}/\text{min}$.
0.05	3.4
0.1	5.0
0.25	7.0
0.5	8.3
10.0	9.1

Ensuite il faut estimer V_{max} et K_m . Les meilleurs résultats sont obtenus avec le graphique de Lineweaver Burk (car les données sont bonnes)... mais je n'imposais pas une méthode. Les résultats devaient être

- $V_{max} = 10 \mu\text{M}/\text{min}$.
- $K_m = 0.1 \text{ mM}$ (Substrat 1).

Quelques commentaires (sans importance pour la notation) le V_{max} est sous-estimé car à partir des questions 2/3 on sait que la réaction commence à ralentir à 10 minutes. Pour cette raison c'était mieux d'utiliser des données à 10 minutes pour toutes les concentrations.

5. Que peut-on déduire en comparant les deux dernières lignes du tableau ? (2)

Les deux dernières lignes montrent que la concentration du substrat 2 est limitante pour la réaction (en augmentant la concentration on augmente la vitesse). L'effet est quand même pas très grand. Ceci veut dire que notre estimation de V_{max} est un peu trop basse.

6. Dans nos réactions nous avons ajouté combien d'unités d'enzyme ? (2)

Une unité d'enzyme (ou une unité d'activité enzymatique) est la quantité nécessaire/suffisante à donner une quantité de $1 \mu\text{mole}/\text{minute}$. Donc si notre volume de réaction était de 1 l on aurait 10 U, mais le volume n'est que de 3.5 ml donc la réponse est de **0.035 U**.

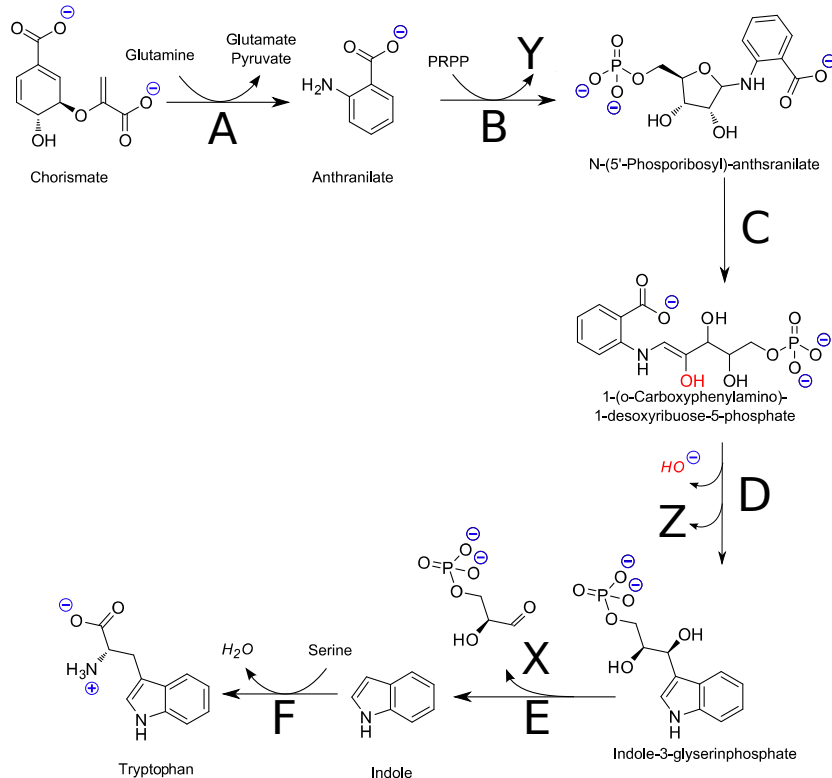
7. Quelle est l'activité spécifique de l'enzyme (2) ?

L'activité spécifique est les unités d'enzyme (ou unités d'activité enzymatique) par mg de protéine donc 0.035 U pour $1 \mu\text{g}$ de protéine = **$35 \text{ U}/\text{mg}$ protéine**.

8. Si la protéine a une masse moléculaire de 55 kDa et une valeur de k_{cat} de 200 sec^{-1} que peut-on déduire de la pureté de la protéine ? (2)

On peut calculer l'activité spécifique de l'enzyme pure à partir de ces informations. 1 mg de protéine (55 kDa => 55 mg/μmole) 1/55 μmole. 200 sec⁻¹ est 12000 min⁻¹ donc une activité spécifique de 218 U/mg... bien supérieure de ce qu'on a mesuré... Soit la protéine n'est pas très pure, soit elle est abimée soit les conditions ne sont pas bonnes.

B) Ce sujet concerne le métabolisme et sa régulation. La figure montre quelques réactions tirées d'une partie du métabolisme de la levure. Le PRPP est le phosphoribosyl pyrophosphate que nous avons vu dans la synthèse des ARN.



1. Dans le schéma les noms ou structures de certains réactifs et substrats manquent. A quoi correspondent les produits 'Y' et 'Z' (4)

Pour cette partie s'il fallait connaître un peu ce qui était PRPP et compter les atomes. Y est du pyrophosphate (j'admets deux phosphates aussi), Z est du CO₂.

2. Suggérez un nom raisonnable pour les enzymes qui catalysent les réactions 'C' et 'F' (4)

la C est une désoxygénase (l'indice est dans le nom de son produit) mais j'acceptais également des reductases deshydrogenases etc qui correspondent à

l'introduction d'une double liaison). Je donnais du crédit partiel également si vous avez indiqué un nom d'enzyme qui agit sur phosphoribosyl anthrailate ou carboxy-phenyl-amino desoxy-ribulose phosphate. Le F s'appelle la tryptophane synthase, mais j'accepte pas mal d'options logiques comme serine-indole ligase ou déshydratase etc.

3. Quelles réactions dans le schéma sont propices pour la régulation ? Justifiez votre réponse à partir de vos connaissances sur la régulation. (4)

La régulation se fait à des réactions hors-équilibre. Ce sont souvent des réactions qui utilisent de l'énergie ou libèrent des gas (qui peuvent s'échapper). De plus j'indique en dessous que l'enzyme pour la réaction A subit une phosphorylation (indication d'une régulation) Donc à partir de cette logique les réactions à indiquer sont A (question 4), B (les phosphates) et D (le CO₂).

4. L'enzyme catalysant la réaction 'A' subit une phosphorylation quand la levure est en présence de glucose. Expliquez comment ce signal pourrait être transmis en comparant avec ce que nous avons vu. (4)

Le signal (présence de glucose) pourrait être transmis à l'enzyme pour induire la phosphorylation (un effet) par la voie de la récepteur à glucose couplé aux protéines G (Gpr1). Cette protéine active l'adenylate cyclase (Cyr1) qui elle produit l'AMP cyclique qui, à son tour, active la protéine kinase A (Tpr1/2/3) ce qui phosphoryle des protéines.

5. S'agit il, d'une partie du catabolisme ou de l'anabolisme ? Justifiez votre réponse. (2)

C'est de l'anabolisme (synthèse de tryptophane) ça utilise de l'énergie (dérivé du PRPP) même si le nombre d'atomes à l'arrivée est inférieur à celui du départ !!

6. Vous avez déjà vu le composant X ! Pouvez vous l'identifier ? (2)

X c'est du glycéraldehyde-3-phosphate = G3P.