

# Examen de Glyco-Enzymologie membranaire UE Bio-membranes M1 BBT 2017

Emeline Fabre

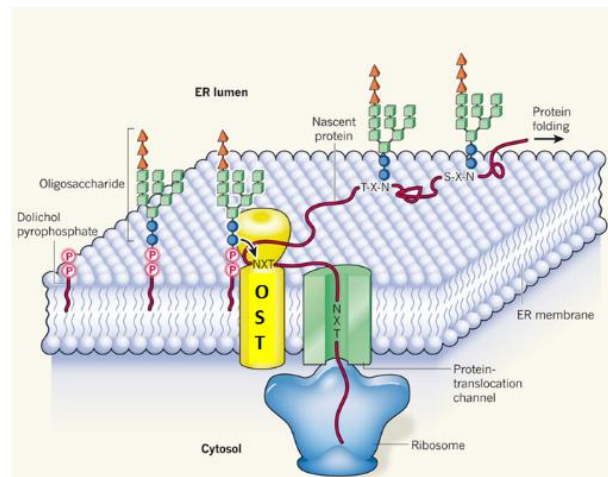
Durée : 1h30

Restitution: 1 copie double maximum ; Tableaux et schémas recommandés ;  
Documents de cours et TD autorisés

La N-glycosylation est une modification des protéines qui consiste en l'addition de glucides aux chaînes polypeptidiques en croissance au cours de leur traduction. Cette modification est importante à la fois pour la structure et la fonction des protéines concernées.

Au cours de cette réaction, un oligosaccharide est transféré « en bloc », à partir d'un lipide membranaire « donneur », sur un acide aminé asparagine (Asn) appartenant à un séquen consensus « accepteur » Asn-X-Ser/Thr (X représentant n'importe quel acide aminé et Ser et Thr correspondant à la sérine ou la thréonine).

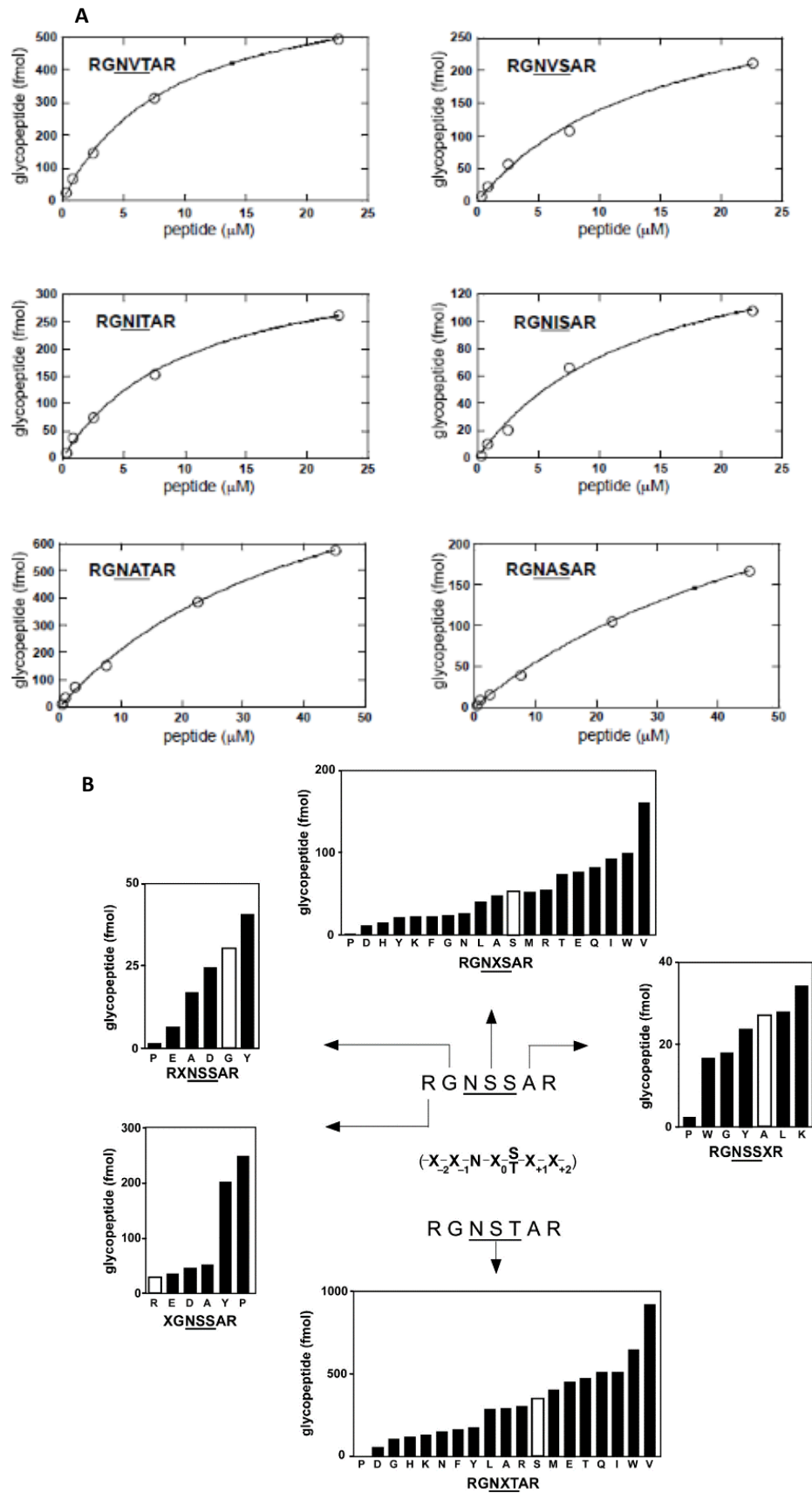
Chez les eucaryotes, la réaction est catalysée dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), par un complexe multi-enzymatique appelé oligosaccharyltransférase (OST), inséré dans la membrane de cet organite (voir figure 1). Chez l'homme, les mutations affectant le complexe OST sont causes de « désordres congénitaux de glycosylation », responsables de retards psychomoteurs lourds, difformités et immunodéficiences. Chez certaines bactéries Gram négatives et Archaeas, une réaction analogue, périplasmique, est catalysée par une enzyme unique, insérée dans la membrane plasmique. L'enzyme Archéobactérienne AgIB (Archeal Glycosylation B) est employée comme modèle dans l'ensemble des études suivantes (issues les travaux de Kohda, 2010-2017).



**Figure1** : Réaction de N-glycosylation catalysée par l'oligosaccharyltransférase (OST) eucaryote.

Dans le but de définir l'environnement peptidique optimum du séquen reconnu par AgIB, les auteurs ont placé l'enzyme AgIB en présence de substrat donneur en concentration saturante, et fait varier la concentration de différents peptides accepteurs. La réaction a été stoppée au bout de 60 minutes (durant lesquelles la vitesse réactionnelle est demeurée constante) et les produits glycopeptidiques ont été quantifiés (voir figure 2.A).

- 1- Extrapolez les courbes  $\text{Produit} = f(\text{Substrat})$  de la figure 2.A afin de déterminer **approximativement**, pour chacune d'elles,  $V_{\text{max}}$ ,  $K_M$  et Eff (efficacité =  $V_{\text{max}}/K_M$ ), puis classez les peptides accepteurs selon l'efficacité de la réaction de N-glycosylation catalysée. *Présentez vos résultats en remplissant le tableau 1 en fin de document.*



**Figure 2 :** Préférences en acides aminés de l'enzyme AgIB pour le proche environnement peptidique du séquen substrat accepteur. A- Représentations de Michaelis-Menten pour 6 différents peptides accepteurs. B- Résumé des préférences en acides aminés de AgIB. Les quantités de produit glycopeptidique présentées sur les axes des ordonnées ont été mesurées au terme de 1 heure de réaction enzymatique.

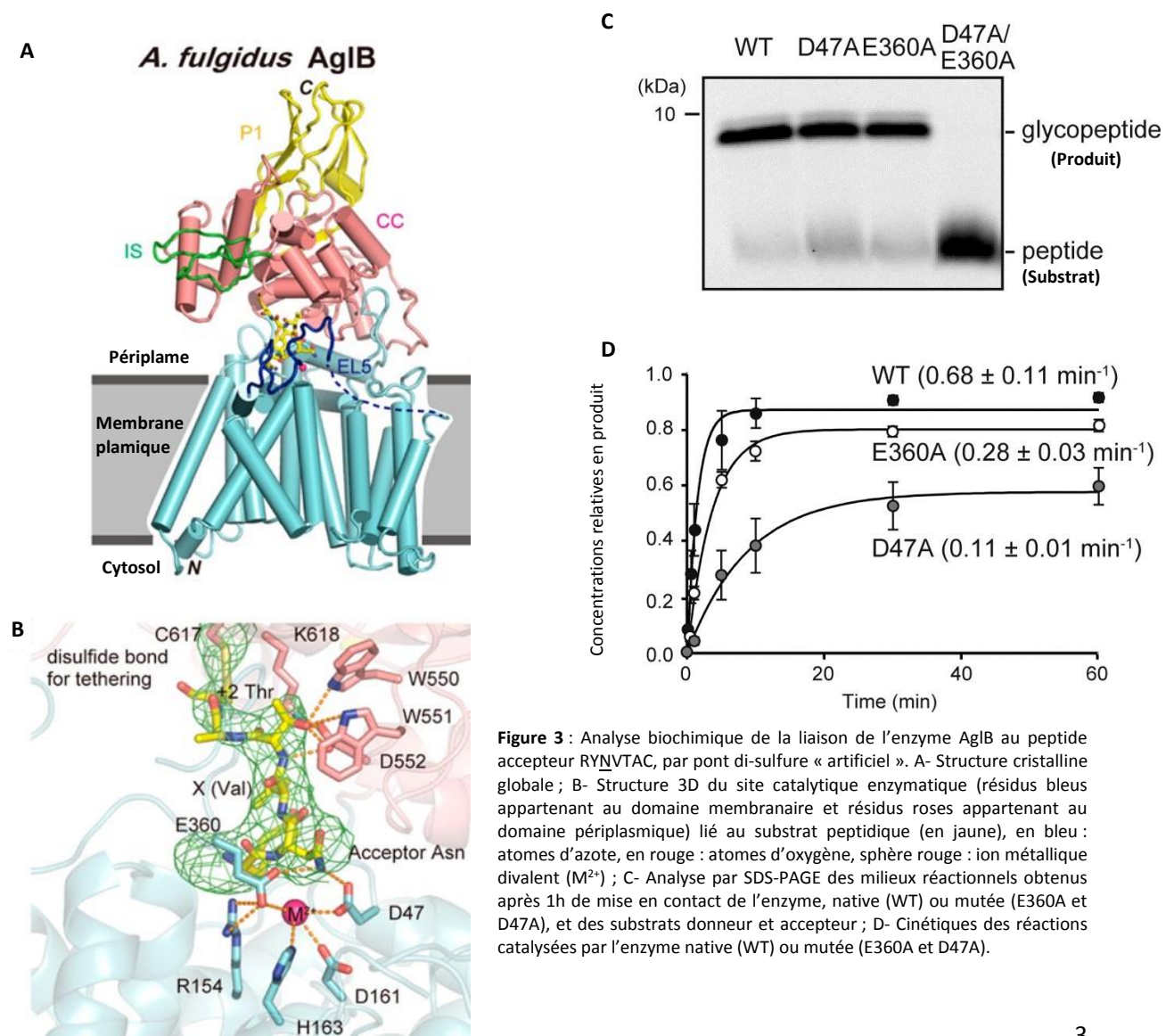
Les auteurs ont poursuivi leurs études dans le but de comparer les efficacités réactionnelles selon les acides aminés présents aux différentes positions environnantes  $X_n$  du séquen accepteur, en explorant chacune des 20 possibilités d'acide aminé (voir figure 2.B).

- 2- Aux vues des résultats (figure 2.B), quel est le type principal d'interaction entre le site de liaison de l'enzyme et le peptide accepteur, à proximité du site de N-glycosylation Asn de ce dernier (aide : table des acides aminés en fin de document) ? Dessinez le peptide accepteur idéal.

Le peptide idéal est synthétisé par voie chimique, soit de façon isolée (peptide « optimum »), soit au centre d'un long peptide de 15 acides aminés (peptide « long »).

- 3- Sachant que l'ensemble des paramètres cinétiques ( $V_{max}$ ,  $K_M$  et Eff) déterminés pour chacun de ces peptides, « optimisé » et « long », se sont révélés similaires (voir tableau 1), quelle est votre conclusion concernant la taille de la séquence reconnue par AgIB ?

Les auteurs sont parvenus à co-cristalliser l'enzyme AgIB et le peptide accepteur RYNVTAC, où la cystéine terminale permet la liaison covalente par pont di-sulfure « artificiel » à un résidu cystéine enzymatique situé à proximité du site de liaison (voir figure 3).



**Figure 3 :** Analyse biochimique de la liaison de l'enzyme AgIB au peptide accepteur RYNVTAC, par pont di-sulfure « artificiel ». A- Structure cristalline globale ; B- Structure 3D du site catalytique enzymatique (résidus bleus appartenant au domaine membranaire et résidus roses appartenant au domaine périplasmique) lié au substrat peptidique (en jaune), en bleu : atomes d'azote, en rouge : atomes d'oxygène, sphère rouge : ion métallique divalent ( $M^{2+}$ ) ; C- Analyse par SDS-PAGE des milieux réactionnels obtenus après 1h de mise en contact de l'enzyme, native (WT) ou mutée (E360A et D47A), et des substrats donneur et accepteur ; D- Cinétiques des réactions catalysées par l'enzyme native (WT) ou mutée (E360A et D47A).

- 4- Proposez au moins deux principes généraux d'obtention de cristaux d'enzymes membranaires.
- 5- A l'aide de la figure 3B, décrivez le mode d'interaction entre la fonction amine de l'Asn acceptrice et les résidus du site actif enzymatique (aide : table des acides aminés ci-après).
- 6- Interprétez les résultats des mutations des résidus catalytiques D47 et E360 en alanines, lorsque enzyme et peptide accepteur sont liés artificiellement par pont di-sulfure (figures 3C et 3D).
- 7- Sachant que les mêmes mutations ont été analysées en présence du couple enzyme-substrat **NON liés artificiellement**, et que chaque mutant ponctuel D47A et E360A s'est révélé totalement inactif, quelles sont vos conclusions quant au rôle de chacun des résidus D47 et E360 pour la liaison au substrat ? Pour la catalyse ?

Tableau 1, réponse à la question 1 :

Peptide accepteur	Km (μM)	Vmax (fmol/h)	Eff	Classement
RGNVTAR				
RGNITAR				
RGNATAR				
RGNVSAR				
RGNISAR				
RGNASAR				
Optimum	10,5	1940	185	-
Long	10,3	1730	168	-

Nom	Code	Structure	pK <sub>a</sub> -COOH	pK <sub>a</sub> -NH <sub>2</sub>	pK <sub>R</sub>
<i>Chaîne latérale aliphatique</i>					
Glycine	Gly / G		2,4	9,8	
Alanine	Ala / A		2,4	9,9	
Valine	Val / V		2,2	9,7	
Leucine	Leu / L		2,3	9,7	
Isoleucine	Ile / I		2,3	9,8	
<i>Chaîne latérale contenant un groupement hydroxyle</i>					
Sérine	Ser / S		2,2	9,2	≈ 13
Thréonine	Thr / T		2,1	9,1	≈ 13
Tyrosine	Tyr / Y	<i>Cf chaîne latérale aromatique</i>			
<i>Chaîne latérale contenant un atome de Soufre</i>					
Cystéine	Cys / C		1,9	10,8	8,3
Méthionine	Met / M		2,1	9,3	
<i>Chaîne latérale contenant un groupement acide carboxylique ou leurs amides</i>					
Acide aspartique	Asp / D		2,0	9,9	3,9
Acide glutamique	Glu / E		2,1	9,5	4,1
Asparagine	Asn / N		2,1	8,8	
Glutamine	Gln / Q		2,1	9,5	4,1

Nom	Code	Structure	pK <sub>a</sub> -COOH	pK <sub>a</sub> -NH <sub>2</sub>	pK <sub>R</sub>
<i>Chaîne latérale contenant un groupement basique</i>					
Lysine	Lys / K		2,2	9,2	10,8
Arginine	Arg / R		1,8	9,0	12,5
Histidine	His / H		1,8	9,3	6,0
<i>Chaîne latérale contenant un groupement aromatique</i>					
Tyrosine	Tyr / Y		2,2	9,1	10,1
Phénylalanine	Phe / F		2,2	9,2	
Tryptophane	Trp / W		2,4	9,4	
<i>Acide iminé</i>					
Proline	Pro / P		2,0	10,6	