

1- a- Indiquer sur la séquence de l'ADNc où se trouvent situées les bornes (codon de démarrage et codon STOP) du cadre ouvert de lecture de la Stathmine, en précisant comment vous les avez identifiées.

Il s'agit d'une cellule eucaryote. Par conséquent, la traduction commence à partir du 1^{er} codon codon AUG de l'ARNm (donc du 1^{er} ATG sur le brin codant de l'ADNc) en partant de l'extrémité 5'.

Codon de démarrage : le 1^{er} ATG en partant du 5' correspond à la 1^{ère} M (méthionine), qui est sur la 2^{ème} ligne (phase 2).

Codon stop : le premier codon STOP (ici TAA) dans la phase de l'ATG, c'est à dire sur la 2^{ème} ligne.

1 11 21 31 41 51 61 71 81 91 101 111
5'-TGTGCGTTGTCTTCTATTCCACCATGGCTTCTTCTGATATCCAGGTGAAAGAACTGGAGAAGCGTGCCTCAGGCCAGGCTTTTGAGCTGATTCTCAGCCCTCGGTCAAAAGAAATCTGTTC
C R L S S I H M C F F . Y P G E R T G E A C L R P G F . A D S Q P S V K R I C S
V A C L L L F T M A S S D I Q V K E L E K R A S G Q A F E L I L S P R S K E S V P
S L V F Y S L W L L L I S R . K N W R S V P Q A R L L S . F S A L G Q K N L F O

121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221 231
AGAATTCCTCCCTTTCCCTCCAAAGAGAAGGATCTTTCCTGGAGGAAATTCAGAGAAATTAAGCTGCAGAGAAGAACACGCAAGTCCCATGAAGCTGAGTCTTGAAGCAGCTGGC
R I P P F P S K E E G S F P G G N S E E I R S C R R K N T Q V P . S . G L E A A G
E F P L S P P K K K D L S L E E I Q K K L E A A E E R R K S H E A E V L K Q L A
N S P F P L Q R R R I F P W R K F R R N . K L Q K K D A S P M K L R S . S S W L

241 251 261 271 281 291 301 311 321 331 341 351
TGAGAAACGAGAGCAGCAGAGAAAGTGCTTTCAGAAAGCAATAGAAGAGAAACAACCTTCAGTAAATGGCAGAGAGAGAACTGACCCACAAAATGGAAGCTAATAAGAGAACCGAGA
. E T R A R E R E S A S E G N R R E E Q Q L Q . N G R E R E T D P Q N G S . . R E P R
E K R E H E K E V L Q K A I E E N N F S K M A E E K L T H K M E A N K E N R E
R N E S T R K K C F R R Q . K R T T T S V K W Q K R N . P T K M W L I K R T E R

361 371 381 391 401 411 421 431 441 451 461 471
GGCACAATGGCTGCCAACTGGAACGTTTCCGAGAGAAGGATAAGCACATTGAAGAAGTCCGGAAGAACAAAGAAATCCAAAGACCTGCTGACGAGACTGAAGCTGACTAATTTGTTCT
G T N G C Q T G T F A R E G . A H . R S A E E Q R I Q R P C . R D . S . L . C S
A Q M A A K L E R L R E K D K H I E E V R K N K E S K D P A D E T E A D . F V L
H K W L P N W N V C E R R I S T L K K C G R T K N P K T L L T R L K L L N L F .

481 491 501 511 521 531
GAGAACTGACTTTCTCCCCATCCCCTTCTTAATATCCAAAGACTGTACTGGCCAGTGTG C'
E N . L S P H P L P K Y P K T V L A S V
R T D F L P I P F L N I Q R L Y W P V S
E L T F S P S P S . I S K D C T G Q C

b- Quels sont les quatre résidus d'acides aminés N-terminaux et les quatre résidus d'acides aminés C-terminaux de la Stathmine ?

Nter MASS ... TEAD Cter

c- Quel est exactement le nombre total de résidus d'acides aminés de la Stathmine ?

Premier nucléotide codant (A du ATG) : position 23

Dernier nucléotide codant (C du GAC) : position 469

Nombre de nucléotides codants : $469-23+1=447$

$447/3=149$ acides aminés

d- Sachant que le poids moléculaire moyen d'un résidu d'acide aminé est 110 D, quel est le poids moléculaire approximatif de la Stathmine ?

16390 Daltons, ou 16,4 kDa environ.

2- Que pourrait-on apprendre de l'observation du signal fluorescent dans des cellules exprimant la protéine de fusion ?

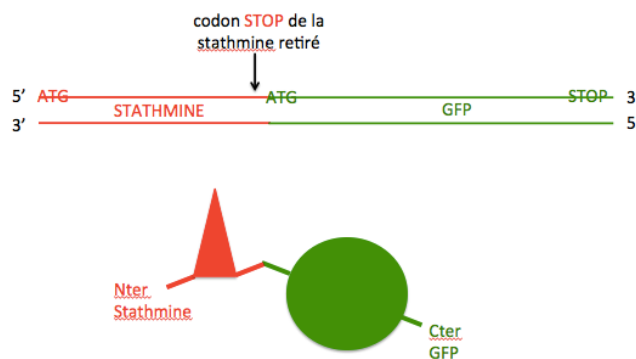
[Une réponse suffisait]

Elle permet :

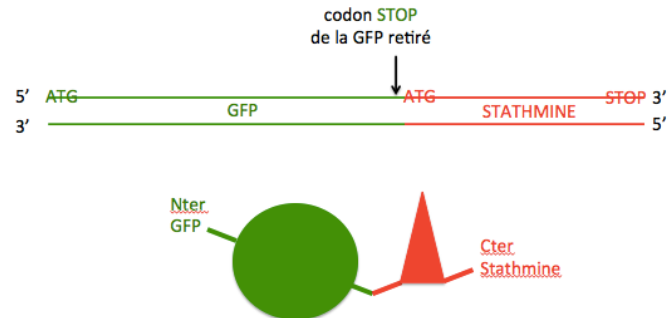
1) de déterminer la localisation de la stathmine, ce qui permet de poser des hypothèses sur sa fonction.

2) de repérer, grâce à la fluorescence, les cellules exprimant la stathmine-GFP, ce qui peut guider des hypothèses sur la fonction de la stathmine.

3- 1^{ère} façon d'assembler les deux ADN et protéine correspondante :



2^{ème} façon d'assembler les deux ADN et protéine correspondante :



4- a- Quel(s) élément(s) doit(ven)t-être présent(s) pour permettre la transcription et la traduction de l'ADN recombinant dans les cellules de souris ?

Pour permettre l'expression de la fusion en cellules humaines il doit contenir :

- un promoteur eucaryote actif dans ces cellules
- un site indiquant où l'ARNm devra être polyadénylé (signal de polyAdénylation sur l'ADN)

b- Quel(s) élément(s) doit(ven)t-être présent(s) pour permettre l'amplification du plasmide dans le colibacille ?

Pour persister dans les bactéries, le plasmide doit contenir :

- une origine de réplication procaryote
- un marqueur de sélection conférant la résistance à un antibiotique (ie. unité de transcription complète d'un gène de résistance à un antibiotique, avec son promoteur/terminateur).

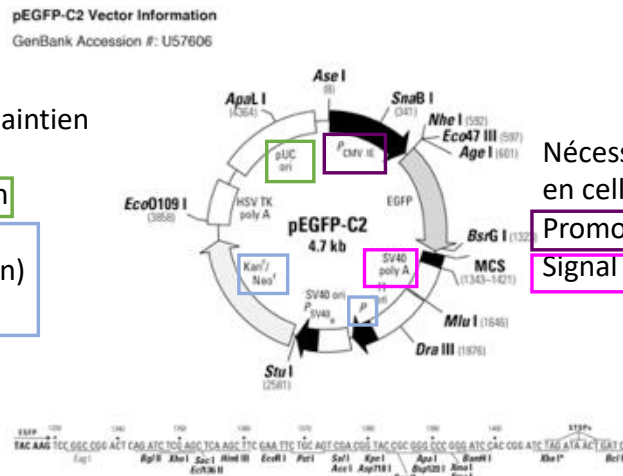
c- Faire un schéma légendé du plasmide que l'on souhaite ainsi construire sur lequel figure les différents éléments mentionnés.

De plus, le plasmide contient un site de clonage au niveau duquel insérer l'ADNc codant la stathmine.

Nécessaire pour le maintien en bactérie:

Origine de réplication

Gène de résistance à un antibiotique (Kan) avec son promoteur

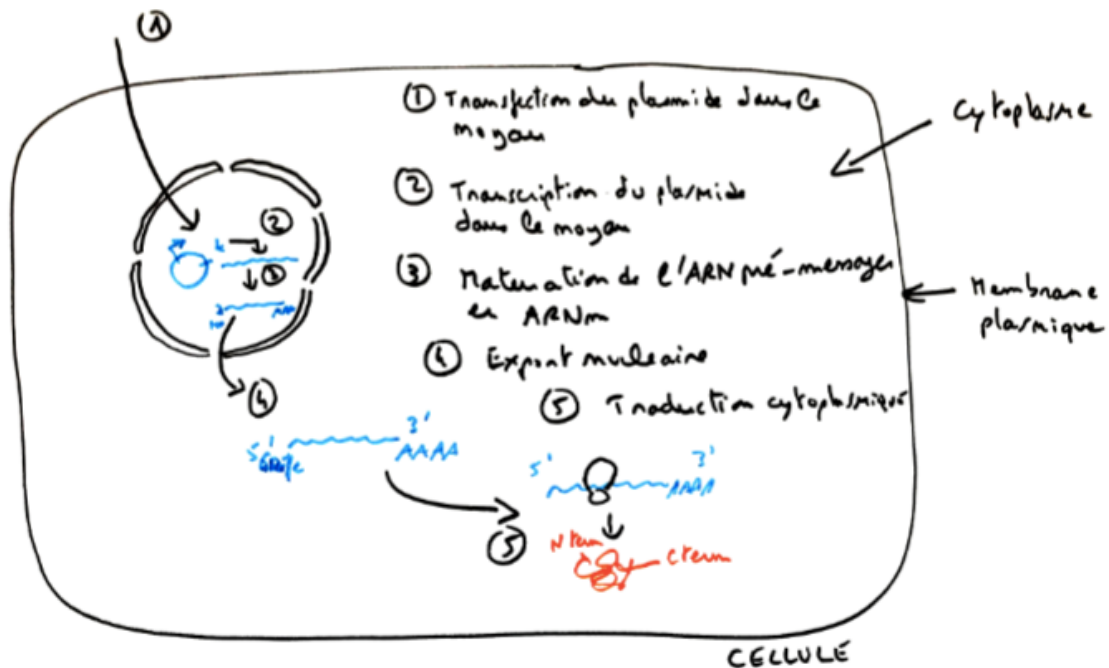


5- On introduit le vecteur d'expression ainsi construit dans une cellule de souris.

Faire un schéma d'une cellule transformée par ce vecteur et indiquer les différentes étapes (et où elles s'effectuent dans la cellule) menant à l'expression de la protéine de fusion.

Étapes :

- Le plasmide, grâce à un agent chimique ou éventuellement à un choc électrique, pénètre à l'intérieur de la cellule.
- Le plasmide gagne le noyau. Il y est transcrit en ARN-pré-messager puis doit subir des maturation (ajout d'une coiffe en 5' et d'un polyA en 3'). A noter ici qu'il n'y a pas d'épissage (on a un ADNc, donc dépourvu d'introns).
- L'ARNm est exporté du noyau vers le cytoplasme.
- Il y est traduit en protéine par les ribosomes.



6- Que peut-on conclure quant à la structure de la protéine de fusion ? Justifier précisément.

L'analyse par SDS-PAGE, en donc conditions dénaturantes, révèle une espèce moléculaire d'un poids moléculaire apparent de 42 kDa.

L'analyse en condition native (= non dénaturante, qui permet ainsi à la protéine de conserver ses structures secondaires, sa structure tertiaire et potentiellement sa structure quaternaire) révèle une seule espèce moléculaire d'un poids moléculaire apparent environ double, de 85 kDa.

On conclut que la protéine de fusion GFP-stathmine est donc une protéine de 42 kDa qui forme dans la cellule un homodimère.