

EXAMEN DE QUÍMICA I ENGINYERIA DE PROTEÏNES

Llicenciatura de Bioquímica

Optativa de segon cicle, Llicenciatura de Química

5 de juliol de 2005

Cognoms i nom:

Seminari:

Part A: Preguntes de resposta múltiple. Les preguntes són multiresposta, amb una, dues o tres respostes correctes (en aquests dos darrers casos la pregunta està marcada amb un asterisc). La modalitat de correcció és la de multiresposta parcial, segons la qual es té en compte les puntuacions de les diferents parts de la multiresposta. Les respostes fallades tenen una penalització, però les no contestades no en tenen. Al final d'aquesta part de l'examen trobareu una explicació del mètode de correcció.

La puntuació màxima d'aquesta part serà equivalent a 50 punts

1. Els aminoàcids hidrofòbics*

- a Tenen una ΔG° transferència $H_2O \rightarrow$ dissolvent orgànic negativa
- b A les proteïnes, són completament inaccessibles al dissolvent aquós.
- c Són predominants als nuclis globulars de les proteïnes
- d Són, en general, menys reactius que la resta d'aminoàcids

2. A la matriu de substitucions evolutives d'aminoàcids, quin creus que és l'ordre de les probabilitats de substitució de l'àcid aspàrtic per part de Asparagina, Glutàmic, Fenilalanina, Prolina i Valina?

- a Glu-Asn-Pro-Val-Phe
- b Asn-Glu-Phe-Val-Pro
- c Glu-Pro-Val-Phe-Asn
- d Asn-Glu-Pro-Phe-Val

3. Tria les frases correctes:*

- a Tots els α -aminoàcids són molècules quirals
- b Els aminoàcids participen en moltes més reaccions *in vivo* que *in vitro*.
- c La cisteïna, malgrat ser un aminoàcid polar, es troba freqüentment a l'interior de les proteïnes
- d El pK_a de la His fa que aquest aminoàcid sigui un dels més típicament reactius *in vivo*.

4. La reactivitat dels aminoàcids varia si es troben a l'interior o a l'exterior de les proteïnes. Digueu quines afirmacions són certes en relació amb aquest comentari.*

- a El fet que la constant dielèctrica interior sigui superior a la del dissolvent afavoreix la ionització dels grups laterals del nucli de la proteïna
- b La proximitat de grups reactius o ionitzables és un factor important en la reactivitat dels aminoàcids dels centres actius d'enzims
- c Els aminoàcids de l'interior tendeixen a estar no ionitzats per afavorir la solubilitat de la proteïna
- d L'entorn proteic fa variar substancialment el pK_a dels grups ionitzables

5. Les frases següents fan referència a l'estructura primària de les proteïnes:

1) Es possible conèixer la seqüència d'una proteïna mitjançant l'ús de mètodes químics i enzimàtics.

2) L'espècie humana posseeix un nombre tan elevat de proteïnes ($>10^4$) que representa un punt evolutiu gairebé insuperable, al ser aquest nombre proper al màxim esperat de la combinació de només 20 aminoàcids diferents.

3) La seqüenciació automàtica mitjançant l'ús del mètode enzimàtic d'Edman permet seqüenciar proteïnes pures amb una fiabilitat del 98%.

4) Les estructures primàries de les proteïnes fibroses mostren una periodicitat i una descompensació a la seva composició que no s'observa normalment a les globulars.

Digues quines són les dues afirmacions correctes:

- a 3 i 2
- b 1 i 4
- c 1 i 3
- d 2 i 4

6. Aquestes són part de les seqüències de tres enzims relacionats evolutivament:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 | | 105 | | 110 | | 115 | | | | | | | | | | | | | | | |
| K | F | S | - | - | I | L | T | V | N | N | D | I | T | L | L | K | L | A | T | P | A |
| D | W | N | S | N | Q | I | S | K | G | N | D | I | A | L | L | K | L | A | N | P | V |
| Q | Y | K | - | - | M | A | E | S | G | Y | D | I | A | L | L | K | L | E | T | P | V |

Si només et fixes en els aminoàcids de les posicions 100, 109, 114 i 118 podries deduir provisionalment:

- a Que tots els aminoàcids pertanyen al centre actiu
- b Que tots els aminoàcids juguen un paper estructural, però probablement cap pertany al centre actiu.
- c Que els aminoàcids 109 i 114 pertanyen probablement al centre actiu, el 118 té un paper estructural i la cadena lateral del 100 és a la superfície.
- d Que el 109 i el 114 juguen papers estructurals (estan ben conservats), mentre que el 118 forma probablement part del centre actiu en contenir una cadena lateral reactiva. No queda clar quina situació pugui tenir el 100.

7. **Suposem que uns científics comuniquen que s'han aïllat dues proteïnes amb la mateixa activitat enzimàtica, cadascuna procedent d'una espècie diferent. En analitzar les seves seqüències s'ha observat un 35% de diferències. Quin comentari dels següents creus que és el més encertat?**
- a Hi ha d'haver hagut algun error; si tenen la mateixa funció han de tenir el mateix plegament i per tant la mateixa seqüència.
 - b En principi és normal que hi hagi diferències, encara que un 35% de substitucions és un valor impossible per ser massa elevat.
 - c Les substitucions, observades en un grau força elevat, i que es pot explicar per una considerable distància evolutiva entre les espècies, han de localitzar-se majoritàriament a residus no vitals per l'activitat catalítica.
 - d Les diferències observades només s'expliquen dient que es tracta de proteïnes completament diferents amb, casualment, la mateixa activitat enzimàtica.
8. **Respecte de les estructures secundàries de les proteïnes podem dir:**
- 1) **En el model d'estructura secundària d'hèlix- α la distància entre els C^{α} adjacents és la màxima que pot adoptar la estructura polipeptídica.**
 - 2) **La fulla plegada β és el model d'estructura secundària de proteïnes on l'esquelet principal de la cadena polipeptídica està en la forma més compacta.**
 - 3) **Les cadenes laterals dels aminoàcids d'una estructura polipeptídica no tenen cap paper en relació a que la cadena adopti estructura secundària en hèlix- α o fulla plegada β .**
 - 4) **En el model d'estructura en hèlix- α de les proteïnes les cadenes laterals dels aminoàcids estan situades cap a l'interior de la hèlix.**
- a 1 i 3 són correctes.
 - b 2 i 4 són correctes.
 - c 2 i 3 són correctes
 - d totes són incorrectes.
9. **A l'estructura en hèlix α**
- a tots els grups NH dels aminoàcids que en formen part es troben formant enllaços d'hidrogen.
 - b aminoàcids de caràcter bàsic situats a l'extrem C-terminal estableixen el dipol de la hèlix.
 - c les cadenes laterals estan projectades cap a l'interior de la hèlix.
 - d s'hi incorporen tots els aminoàcids amb la mateixa proporció.
10. **Quin és l'ordre correcte?**
- a dominis - motius estructurals - estructura secundària - seqüència - proteïna globular
 - b seqüència - estructura secundària - dominis - motius estructurals - proteïna globular
 - c seqüència - estructura secundària - motius estructurals - dominis - proteïna globular
 - d motius estructurals - seqüència - estructura secundària - proteïna globular - dominis

11. **Amb quina o quines d'aquestes expressions relacionaries l'estructura β ? ***
- a Torsió cap a la dreta
 - b Clau grega
 - c Hèlix – gir – hèlix
 - d *Coiled-coil*
12. **A una distància de 8 Å de la His de centre actiu d'un enzim *wild type* es troba un residu Asp. En mutar aquest Asp per una Asn,**
- a el pKa de la histidina disminuirà
 - b el pKa de la histidina augmentarà
 - c variaran els valors de pKa de His i Asn
 - d només variarà el pKa de Asn
13. **Amb quina o quines d'aquestes expressions relacionaries les estructures secundàries helicoidals? ***
- a π i 3_{10}
 - b Periodicitat de 7 Å
 - c Clau grega
 - d Teòricament pot ser levògira
14. **Les proteïnes de membrana**
- a Tenen sempre el seu extrem N-terminal a l'exterior de la cèl·lula o orgànul i el seu C-terminal a l'interior
 - b Sempre es pleguen en forma d'hèlices α per travessar la bicapa lipídica
 - c Són clarament reconeixibles si es fa un perfil dels volums de la cadena lateral al llarg de la seqüència
 - d La zona de la proteïna on es du a terme la seva acció biològica tant pot ser al domini soluble com al domini transmembrana
15. **La quimotripsina és un exemple per l'estudi de la relació estructura-funció a proteïnes. Quines de les afirmacions següents sobre la quimotripsina són CERTES? ***
- a és una proteïna bidomini i el seu centre actiu es troba entremig dels dos.
 - b comparada amb altres serina-proteases, les regions d'estructura secundària són les més conservades i, per tant, és en elles on ha de residir el centre actiu.
 - c la seva butxaca d'especificitat és idèntica a la de les altres serina-proteases
 - d actua mitjançant l'acció d'una triada catalítica que permet estabilitzar les espècies resultants d'un atac nucleofílic sobre el substrat peptídic.
16. **Digues quines de les frases següents són certes***
- a La relació aminoàcids apolars/aminoàcids polars de la mioglobina és superior a la de qualsevol de les subunitats de l'hemoglobina
 - b En presència de substrat a concentració elevada, l'estat R (relaxat) d'un enzim alostèric amb cooperativitat positiva és més estable que l'estat T (tens)
 - c No hi ha cap disposició quaternària de proteïnes que permeti un creixement indefinit de l'agregat de proteïna
 - d Una de les avantatges de les estructures quaternàries és l'estalvi de material genètic

17. Sobre el plegament de proteïnes en general, és CERT que:

- a** El plegament sempre depèn de xaperones moleculars.
- b** Que els factors cinètics no influencien al procés de plegament.
- c** La formació d'un nucli hidrofòbic és important per l'estabilitat però no pel plegament de les proteïnes.
- d** Les proteïna disulfur isomerasas acceleren el procés de plegament de proteïnes amb ponts S-S.

18. Respecte a les vies de plegament, es FALS que: *

- a** Durant el procés de plegament augmenta l'entalpia i es redueix l'entropia del sistema.
- b** L'anomenat mètode de l'enginyeria de proteïnes permet conèixer la estructura de l'estat de transició a partir de dades cinètiques.
- c** L'anomenat "molten globule" correspon a una única conformació menys estable que la nativa
- d** Durant la via de plegament d'una proteïna rica en disulfurs una vegada es produeix un enllaç S-S nadiu aquest es pot tornar a desfer.

19. Relatiu als processos de modificació post-traducció:

- a** Totes les proteïnes sintetitzades *in vivo* contenen un pèptid senyal al seu extrem N-terminal, independentment de la seva localització cel·lular final.
- b** La proteòlisi limitada només afecta a aquelles proteïnes l'activitat de les quals ha de ser regulada de forma reversible.
- c** L'expressió en tàndem de precursors de neuropèptids permet que el processament posterior generi quantitats equimolars de cadascun d'ells.
- d** La majoria de proteïnes intracel·lulars estan glicosilades.

20. Quines frases relatives a la modificació post-traduccional són correctes?: *

- a** Els pèptids senyal són difícils de predir a partir de la seqüència primària de la proteïna.
- b** La seqüència que determina la translocació d'una proteïna entre diferents compartiments cel·lulars no ha de ser necessàriament eliminada per proteòlisi limitada.
- c** La proteòlisi limitada sempre implica, a més de la hidròlisi d'enllaços peptídics, una reestructuració conformacional de la proteïna resultant per tal que aquesta sigui activa.
- d** Certes xaperones moleculars actuen al transport de proteïnes dins les mitocondries.

21. Pel que fa a la evolució bioquímica de proteïnes es CERT que: *

- a** La seqüència sempre es conserva més que el plegament.
- b** Les fusions gèniques són més habituals a procariotes
- c** La taxa d'acumulació de mutacions depèn del tipus de proteïna.
- d** El trobar mutacions a l'interior proteic és més freqüent que detectar-les als loops.

22. Les mutacions en la seqüència d'una proteïna acumulades durant l'evolució: *

- a Són bons marcadors de la distància evolutiva entre espècies.
- b Són degudes principalment a errors en la maquinària replicativa del DNA.
- c Afecten sempre la seva estructura tridimensional.
- d El grau de fixació depèn de la zona proteica afectada.

23. Relatiu a la proteòmica es CERT que: *

- a Es pot predir l'estructura 3D d'una proteïna amb una homologia seqüencial del 10% al de un altre proteïna d'estructura coneguda.
- b El proteoma d'un organisme es defineix en funció del lloc, el moment i les condicions d'estudi.
- c El nombre de nous tipus de plegament creix més ràpidament que el de noves seqüències de proteïnes.
- d A procariotes dominen les classes funcionals lligades a metabolisme i transport.

24. Respecte a les tècniques emprades en proteòmica és FALS que: *

- a L'electroforesi bidimensional es una tècnica emprada habitualment per a la comparació de les proteïnes expressades diferencialment en dos condicions diferents.
- b El "BIFC" permet visualitzar per fluorescència una interacció en temps real.
- c El sistema del doble híbrid es basa en la purificació de les proteïnes que interactuen.
- d L'espectrometria de masses acoblada a l'anàlisi computacional permet identificar la presència d'una proteïna en un proteoma a partir de fragments de la mateixa.

25. Les dues columnes contenen expressió que fan relació a la producció heteròloga de proteïnes relaciona-les.

- | | | |
|----------------------------------|---|--------------------------------------|
| 1 Ponts disulfur | a | Optimització d'us de codó |
| 2 Formació de cossos d'inclusió | b | Proteòlisi |
| 3 Baixa disponibilitat de oxigen | c | Pèrdua del plàsmid |
| 4 Síntesi química del DNA | d | Coexpressió de PDI |
| 5 Glicosilació | e | Disminució temperatura de creixement |
| 6 N-terminal no optimitzat | f | Curta vida mitja de la proteïna |
| 7 Excés de còpies del plàsmid | g | Expressió en cèl·lules eucariotes |

- a 1d 2e 3g 4b 5a 6d 7c
- b 1d 2e 3b 4a 5g 6f 7c
- c 1d 2g 3c 4b 5a 6f 7d
- d 1f 2g 3c 4g 5b 6d 7a

26. Respecte a la producció heteròloga i el redisseny de proteïnes.

- a** Els canvis en els llaços superficials són en general millor tolerats que els canvis en el nucli hidrofòbic.
 - b** Una de les avantatges de la producció heteròloga de proteïnes humanes en llevat és que les modificacions post-traduccionals són idèntiques a les de la proteïna purificada de teixit humà.
 - c** Els canvis no isostèrics, és a dir, aquells en que els aminoàcids original i mutat tenen diferent volum, són ben tolerats, degut a la natura elàstica de l'interior proteic.
 - d** L'expressió intracel·lular en cèl·lules d'insectes té un rendiment molt inferior a la de la resta de sistemes eucariotes.
-

Part A-bis: Preguntes de resposta múltiple. A respondre **NOMÉS** per part de les persones que **no han participat** als seminaris voluntaris fets durant el curs.

27. Tria les frases correctes. *

- a Les aquaporines no permeten el pas de protons a través de la membrana cel·lular.
- b Les immunoglobulines són proteïnes de seqüència molt variable, tant a les cadenes pesades (H) com a les lleugeres (L)
- c És possible activar la via apoptòtica per atacar cèl·lules canceroses
- d Les caspases són proteases que s'expressen en forma de zimògens i actuen al proteasoma

28. Tria les frases correctes*

- a A les fibres amiloides, les cadenes, majoritàriament en estructura α , es disposen paral·lelament a l'eix de la fibra.
- b L'estructura secundària predominant a la forma PrP^c de la proteïna priònica és l' α -hèlix.
- c Cada receptor olfactiu només reconeix un tipus de molècula odorífera.
- d La farmacogenòmica pretén estudiar l'efecte d'un gran nombre de fàrmacs sobre genomes individuals.

29. Tria les frases correctes*.

- a La proteòmica funcional té com a finalitat la definició del mapa complet de les interaccions entre proteïnes d'un proteoma
- b Tot OMG (organisme modificat genèticament) és un transgènic.
- c Els inhibidors de proteases específics poden ser emprats pel tractament del càncer.
- d La proteasa del virus de la SIDA és una aspàrtic proteasa

Correcció dels exàmens de multiresposta parcial

L'examen s'avalua en base a la puntuació de les diferents parts de la multiresposta, de manera que una pregunta parcialment contestada obté una porció de la puntuació total de la pregunta. La penalització per respostes incorrectes també és variable, de manera que:

Si

N = nombre d'opcions (en aquest cas 4)

M = nombre d'opcions vàlides (en aquest cas, 1, 2, o 3),

La puntuació per resposta encertada és $1/M$

La penalització per resposta fallada és $1/(N-M)$

Exemple:

Tenim 4 opcions possibles i tres respostes correctes com a màxim

| Pregunta | Resposta correcta | Resposta donada | Valor encert | Valor error | Encerts | Error | Puntuació |
|----------|-------------------|-----------------|----------------|-------------------|---------|-------|-----------|
| 1 | a | a, b | $(1/1) = 1$ | $1/(4-1) = -0,33$ | 1 | 1 | 0,66 |
| 2 | a, c | a, c | $(1/2) = 0,5$ | $1/(4-2) = -0,5$ | 2 | 0 | 1 |
| 3 | a, b | a, b, c | $(1/2) = 0,5$ | $1/(4-2) = -0,5$ | 2 | 1 | 0,5 |
| 4 | a, d | b, d | $(1/2) = 0,5$ | $1/(4-2) = -0,5$ | 1 | 1 | 0 |
| 5 | a, b, c | a, c | $(1/3) = 0,33$ | $1/(4-3) = -1$ | 2 | 0 | 0,66 |
| 6 | a, c, d | a, b, d | $(1/3) = 0,33$ | $1/(4-3) = -1$ | 2 | 1 | -0,33 |

Part B: Preguntes curtes. Heu de triar **6 de les 8** preguntes proposades. Cal respondre (com a màxim) dins l'espai indicat.
La puntuació total d'aquesta part és de 35 punts

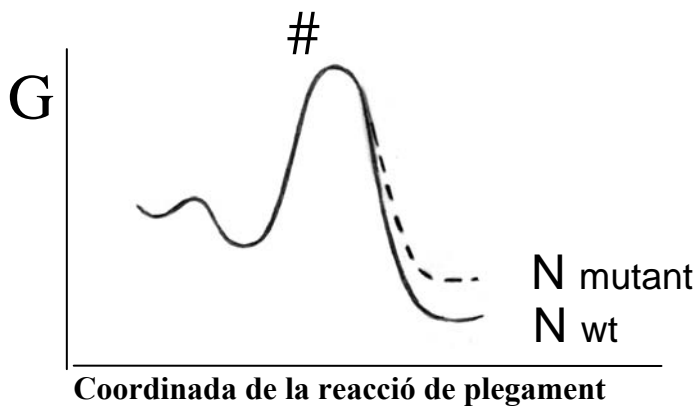
- 1 A condicions fisiològiques, la poli-Lys assumeix una conformació en random coil. A quines condicions podrà formar una hèlix α ? Explica el perquè de les dues situacions.

- 2 Aquesta figura representa un _____ estructural proteic de la família _____. En concret, el que apareix a la figura rep el nom de _____ ja que l'estructura està formada per 4 _____. Aquesta darrera estructura es caracteritza per presentar _____ residus/volta i per tenir les _____ projectades cap a l'exterior de l'estructura. Per a generar el plegament que es veu a la figura cal que es produeixi una _____ de les _____ amb les _____ a la superfície de les hèlices. L'interior de l'estructura global no conté molècules d' _____. És esperable que els quatre fragments regulars tinguin un caràcter _____, de manera que els residus de tipus _____ restin amb les seves _____ dirigides cap a l'interior.



3 A la quimotripsina, una serina del centre actiu reacciona atacant nucleofilicament un grup carbonil de la cadena polipeptídica substrat. En canvi, si posem en contacte una proteïna substrat amb un excés de serina al medi, no hi ha cap mena de reacció proteolítica. Explica per què la serina és tan reactiva dins la quimotripsina.

4 Observa la figura, on es representa la coordinada de reacció del plegament d'una proteïna wild type i d'un mutant seu. En el mutant s'ha desestabilitzat una hèlix α , introduint-hi una prolina al mig.



5 Tenim dues proteïnes molt semblants estructural i seqüencialment. Una d'elles forma agregats citotòxics i l'altre no. Com identificaries i provaries que hi ha una regió curta de la proteïna citotòxica responsable de l'agregació.

6 Com i perquè es glicosilen certes proteïnes?

7 Explica breument tres maneres de confirmar que una proteïna A interacciona amb un altre proteïna B.

8 Hem obtingut una proteïna d'un animal marí amb potencial us com antitumoral. El principal problema es que es tracta d'una proteïna molt inestable i a l'organisme es ràpidament proteolitzada abans de que arribi al tumor. Com usaries l'enginyeria de proteïnes per tal millorar el seu comportament com a fàrmac?

Part C: Problemes. Cal respondre dins l'espai indicat
La puntuació total d'aquesta part és de 15 punts

1 Els grups α -amino i ϵ -amino de la Lisina tenen uns pKas de 8.95 i 10.5, respectivament.

Quina serà la concentració de la forma protonada de cadascun d'aquest grups en una solució 10^{-1} M de lisina a pH 9.0?

I en una solució 10^{-1} M de Lisina a pH 11.0?

2. Una forma mutant de l'hormona angiotensina II te la composició d'aminoàcids següent:

(Asp, Arg, Ala, Met, Phe, Glu, Tyr, Val)

Es realitzen les observacions següents:

- a) La tripsina produeix un dipèptid que conté Asp i Arg i un hexapèptid amb tota la resta.
- b) La fragmentació amb bromur de cianògen produeix un dipèptid que conté Phe i Glu i un hexapèptid que conté la resta.
- c) La quimotripsina fragmenta l'hormona donant dos tetrapèptids amb les composicions següents:

(Asp, Arg, Tyr, Val) i (Ala, Met, Phe, Glu).

- d) El primer producte de la fragmentació amb carboxipeptidasa A és Phe.

Quina és la seqüència?

3. En un laboratori estudien el paper dels enllaços -S-S- .

El seu mètode d'estudi es el següent:

- 1) Redueixen (amb 2-mercaptoetanol) i desnaturalitzen (amb 8M urea) les proteïnes.
- 2) Després eliminen aquest reactiu de manera que la proteïna pot replegar espontàniament.
- 3) Analitzen el percentatge d'activitat recuperat després del procés.
- 4) Calculen la recuperació d'activitat teòrica si els enllaços S-S es formessin a l'atzar.
- 5) Comparen els resultats dels apartats 3 i 4.

Després d'analitzar un bon nombre de proteïnes amb diferent nombre de enllaços S-S arriben a les següents conclusions:

- A) L'activitat recuperada experimentalment es casi be sempre molt superior a la teòrica.
- B) Quan més enllaços S-S tingui la proteïna menor serà el percentatge d'activitat recuperat.

En base als teus coneixements sobre el plegament de proteïnes podries explicar si son lògiques aquestes conclusions.

* Considerem en aquest cas que una proteïna es activa només si te totes les Cys aparellades correctament.