

Multiple choice questions [1 point per question : 10 maximum points]

- Highlight with a cross (or write) the right answer(s) in the right box / *Indiquez avec une croix la bonne réponse(s) dans la bonne case*
- One correct answer per question

<p>1. Carbohydrates are essential biomolecules that: / <i>Les glucides sont des biomolécules essentielles qui:</i></p> <p>A) Are exclusively composed of C, H, and O atoms. / <i>Sont exclusivement composés d'atomes de C, H et O.</i></p> <p>B) Always have one or more chiral centers and different number of epimeric carbons. / <i>Possèdent toujours un ou plusieurs centres chiraux et un nombre différent de carbones épimériques.</i></p> <p>C) Form linear or branched polymers through hydrolysis reaction / <i>Forment des polymères linéaires ou ramifiés par réaction d'hydrolyse.</i></p> <p>D) Can form complex molecules by covalent binding with proteins, lipids and nucleic acids. / <i>Peuvent former des molécules complexes par liaison covalente avec des protéines, des lipides et des acides nucléiques.</i></p>	<p>A.</p> <p>B.</p> <p>C.</p> <p>D.</p>
<p>2. Which of the following bonds does not exist in naturally occurring lipids. / <i>Parmi les liaisons suivantes, laquelle n'existe pas dans les lipides naturellement présents?</i></p> <p>A) Amide / <i>Amide</i></p> <p>B) Ester / <i>Ester</i></p> <p>C) Azide / <i>Azoture</i></p> <p>D) Phosphoester / <i>Phosphoester</i></p>	<p>A.</p> <p>B.</p> <p>C.</p> <p>D.</p>
<p>3. Select a statement that is true. / <i>Sélectionnez une affirmations qui est vraie.</i></p> <p>A) The great majority of amino acids in human bodies are in the L- stereoisomeric form. / <i>La grande majorité des acides aminés dans le corps humain sont sous la forme stéréoisomérique L.</i></p> <p>B) Monosaccharides switch between D- and L- stereoisomeric forms when in solution. / <i>Les monosaccharides alternent entre les formes stéréoisomériques D et L lorsqu'ils sont en solution.</i></p> <p>C) Carbons that form double bonds in lipids represent stereoisomeric centers. / <i>Les carbones qui forment des doubles liaisons dans les lipides représentent des centres stéréoisomériques.</i></p> <p>D) The conversion from D-glucose to L-glucose can be achieved by glucose-specific epimerase. / <i>La conversion du D-glucose en L-glucose peut être réalisée par une épimérase spécifique au glucose.</i></p>	<p>A.</p> <p>B.</p> <p>C.</p> <p>D.</p>
<p>4. The pK_a of carboxylic acid group in the side chain of glutamate is ~4. Which of the following is not true? / <i>Le pK_a du groupe acide carboxylique dans la chaîne latérale du glutamate est d'environ 4. Laquelle des affirmations suivantes n'est pas vraie?</i></p> <p>A) Their pK_a can change depending on the local interactions with other amino acids. / <i>Leur pK_a peut changer en fonction des interactions locales avec d'autres acides aminés.</i></p> <p>B) The side-chain of glutamate is mostly protonated at pH 4. / <i>La chaîne latérale du glutamate est principalement protonnée à pH 4.</i></p> <p>C) The side chain of glutamate is mostly negatively charged at pH 7. / <i>La chaîne latérale du glutamate est principalement chargée négativement à pH 7.</i></p> <p>D) The side chain of glutamate can form salt bridges with arginines at pH 7. / <i>La chaîne latérale du glutamate peut former des ponts salins avec les arginines à pH 7.</i></p>	<p>A.</p> <p>B.</p> <p>C.</p> <p>D.</p>

<p>5. Which scenario represents a favorable protein-DNA interaction? / <i>Quel scénario représente une interaction favorable entre une protéine et l'ADN?</i></p> <p>A) A protein with a high density of hydrophobic residues binds to a DNA sequence. / <i>Une protéine avec une forte densité de résidus hydrophobes se lie à une séquence d'ADN.</i></p> <p>B) A protein with optimally distributed polar and charged amino acids binds to the DNA. / <i>Une protéine avec une répartition optimale d'acides aminés chargés et polaires se lie à l'ADN.</i></p> <p>C) A protein must have only helical domains to interact with the DNA minor groove. / <i>Une protéine doit avoir uniquement des domaines hélicoïdaux pour interagir avec le petit sillon de l'ADN.</i></p> <p>D) A protein that disrupts Watson-Crick base pairing binds to the DNA major groove. / <i>Une protéine qui perturbe l'appariement des bases Watson-Crick se lie au grand sillon de l'ADN.</i></p>	<p>A.</p> <p>B.</p> <p>C.</p> <p>D.</p>
<p>6. A researcher is using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) to measure binding affinity. Which additional information can ITC provide? / <i>Un chercheur utilise la calorimétrie de titration isotherme (ITC) pour mesurer l'affinité de liaison. Quelle autre information l'ITC peut-elle fournir?</i></p> <p>A) Defining interacting surfaces of binding partners. / <i>Définir les surfaces d'interaction des partenaires de liaison.</i></p> <p>B) Measuring the association (k_a) and dissociation (k_d) rates. / <i>Mesurer les taux d'association (k_a) et de dissociation (k_d).</i></p> <p>C) Determining enthalpy (ΔH°), entropy (ΔS°), and stoichiometry of interaction. / <i>Déterminer l'enthalpie (ΔH°), l'entropie (ΔS°), et la stœchiométrie de l'interaction.</i></p> <p>D) Visualizing conformational changes in the interacting partners. / <i>Visualiser les changements conformationnels des partenaires d'interaction.</i></p>	<p>A.</p> <p>B.</p> <p>C.</p> <p>D.</p>
<p>7. Which type of molecules elutes first in gel filtration (size-exclusion) chromatography? / <i>Quel type de molécules est élué en premier lors d'une chromatographie par filtration sur gel (exclusion de taille) ?</i></p> <p>A) Large molecules that cannot enter the porous beads. / <i>Les grandes molécules qui ne peuvent pas pénétrer dans les billes poreuses.</i></p> <p>B) Small molecules that penetrate all the pores of the beads. / <i>Les petites molécules qui pénètrent dans tous les pores des billes.</i></p> <p>C) Molecules with the highest net positive charge. / <i>Les molécules ayant la charge nette la plus positive.</i></p> <p>D) Molecules with strong hydrophobic interactions. / <i>Les molécules présentant de fortes interactions hydrophobes.</i></p>	<p>A.</p> <p>B.</p> <p>C.</p> <p>D.</p>
<p>8. Which of the following statements is not correct about the folding process? / <i>Laquelle des affirmations suivantes n'est pas correcte concernant le processus de repliement des protéines?</i></p> <p>A) Proteins fold by forming polar interactions among amino acids. / <i>Les protéines se replient en formant des interactions polaires entre les acides aminés.</i></p> <p>B) The enthalpic contribution of folding comes also from formation of the hydrophobic core. / <i>La contribution enthalpique du repliement provient également de la formation du cœur hydrophobe.</i></p> <p>C) The entropic contribution coming from the formation of a structured protein is favorable for folding. / <i>La contribution entropique résultant de la formation d'une protéine structurée est favorable au repliement.</i></p> <p>D) Protein sequences with low identity can still have the same general fold. / <i>Des séquences protéiques présentant une faible identité peuvent néanmoins avoir le même repliement général.</i></p>	<p>A.</p> <p>B.</p> <p>C.</p> <p>D.</p>

<p>9. What is the Michaelis-Menten constant (K_m)? / <i>Quelle est la constante de Michaelis-Menten (K_m)?</i></p> <p>A) Maximum velocity of an enzyme. / <i>Vitesse maximale d'une enzyme</i> B) Substrate concentration at half-maximal initial velocity. / <i>Concentration de substrat à la moitié de la vitesse initiale maximale.</i> C) Enzyme turnover rate. / <i>Taux de renouvellement de l'enzyme.</i> D) Inhibitor binding constant. / <i>Constante de liaison d'un inhibiteur.</i></p>	A. B. C. D.
---	----------------------

<p>10. Which of the following statements regarding biophysical methods is true / <i>Laquelle des affirmations suivantes concernant les méthodes biophysiques est vraie?</i></p> <p>A) Nuclear magnetic resonance (NMR) is based on diffraction of radiofrequent radiation from biomolecules. / <i>La résonance magnétique nucléaire (RMN) est basée sur la diffusion de radiations radiofréquences par les biomolécules.</i> B) Dynamic light scattering (DLS) allows to determine size and shape of the biomolecule under study. / <i>La diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet de déterminer la taille et la forme de la biomolécule étudiée.</i> C) Fourier Transfer Infrared spectroscopy (FTIR) allows to infer information on the content of secondary structure elements inside protein. / <i>La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet de déduire des informations sur le contenu des éléments de structure secondaire dans une protéine.</i> D) Circular dichroism (CD) is based on measurements of differential scattering of left and right polarized light. / <i>La dichroïsme circulaire (CD) est basée sur les mesures de diffusion différentielle de la lumière polarisée à gauche et à droite.</i></p>	A. B. C. D.
--	----------------------

Problème/Problem 3 [4 Points]

An enzyme catalyzes the conversion of substrate S to product P with a K_m of 0.025 M and a k_{cat} of 50 s^{-1} . Determine the substrate concentration at which the enzyme operates at 80% of its maximum rate (velocity). /
Une enzyme catalyse la conversion du substrat S en produit P avec un K_m de 0,025 M et un k_{cat} de 50 s^{-1} . Déterminez la concentration du substrat à laquelle l'enzyme fonctionne à 80% de sa vitesse maximale.

If we use MM equation:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

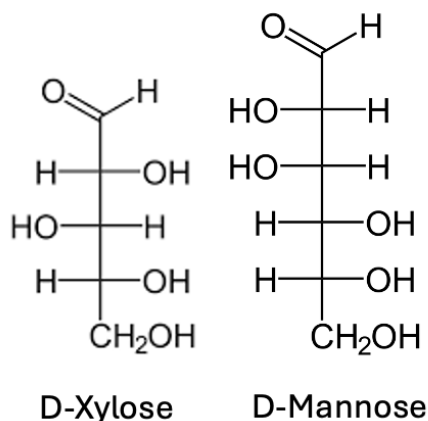
$$0.8V_{max} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

And we solve for [S]:

$$[S] = 0.8 \times K_m / 0.2 = 4 \times K_m = 0.1 M$$

Problème/Problem 4 - [10 points]

Hemicellulose is a heteropolymer present, along with cellulose, in almost all terrestrial plant cell walls. It is partially comprised of D-Xylose and D-Mannose sugars for which the linear structures are provided below. / *L'hémicellulose est un hétéropolymère présent avec la cellulose dans presque toutes les parois cellulaires des plantes terrestres. Elle est partiellement composée de sucres D-Xylose et D-Mannose, dont les structures linéaires sont fournies ci-dessous.*

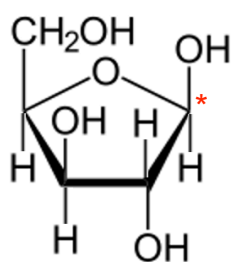


- a. [2 point] Which categories do these sugars belong to, based on the length of carbon chain and primary chemical group? / *À quelles catégories appartiennent ces sucres, en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée et de leur groupe chimique principal?*

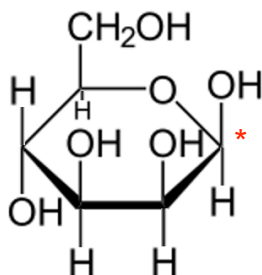
D-xylose = Aldopentose

D-mannose = Aldohexose

- b. [4 points] Draw the cyclic structures of each sugar in beta (β) anomeric form and identify the anomeric carbon in each case. You can use planar projections for the sugar ring but please indicate the positions of -H, -OH and -CH₂OH groups relative to each carbon. / *Dessinez les structures cycliques de chaque sucre sous forme anomérique beta (β) et identifiez le carbone anomérique dans chaque cas. Vous pouvez utiliser des projections planes pour l'anneau de sucre, mais veuillez indiquer les positions des groupes -H, -OH et -CH₂OH par rapport à chaque carbone.*

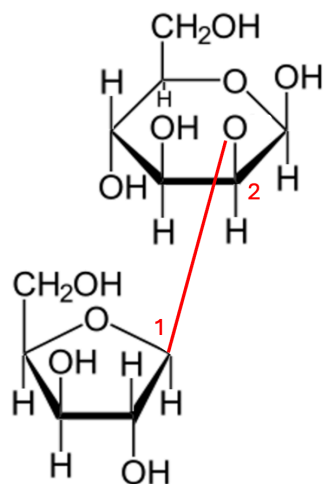


β -D-Xylofuranose



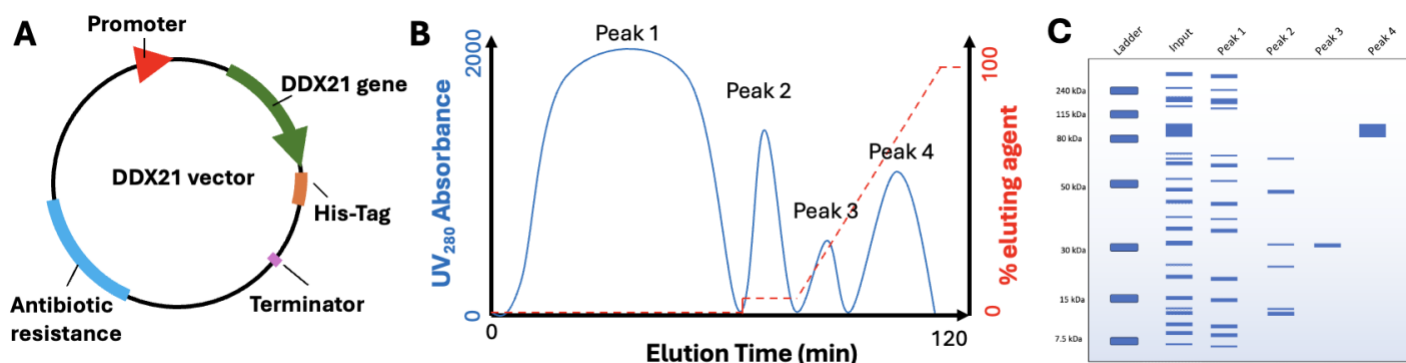
β -D-Mannopyranose

- c. [4 points] One of the disaccharide units that is repeated inside hemicellulose is: β -D-xylosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-mannose, where these two monosaccharides are connected by the β 1 \rightarrow β 2 O-glycosidic bond. Draw the structure of this molecule. You can use the same planar projection system as in question b. / *L'une des unités de disaccharide qui se répète dans l'hémicellulose est : β -D-xylosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-mannose, où ces deux monosaccharides sont reliés par la liaison O-glycosidique β 1 \rightarrow β 2. Dessinez la structure de cette molécule. Vous pouvez utiliser le même système de projection plane que dans la question b.*



Problème/Problem 5 - [11 points]

You wish to express and purify a protein called DDX21, because its downregulation is associated with cancer. Its' primary role is to bind phosphatidyl inositides (PI) on cell membrane. The expected molecular weight of DDX21 is **90 kDa** and it does not contain any post-translational modifications. / *Vous souhaitez exprimer et purifier une protéine appelée DDX21, car sa régulation négative est associée au cancer. Son rôle principal est de se lier aux phosphatidylinositides (PI) sur la membrane cellulaire. Le poids moléculaire attendu de DDX21 est de 90 kDa, et elle ne contient aucune modification post-traductionnelle.*



- a. [2 point] You obtain the expression vector shown in panel (A) of the figure above and decide to express the protein in bacterial cells (*E. coli*). What is the role of the antibiotic resistance on the vector? / *Vous obtenez le vecteur d'expression illustré dans le panneau (A) de la figure ci-dessus et décidez d'exprimer la protéine dans des cellules bactériennes (E. coli). Quel est le rôle de la résistance aux antibiotiques sur le vecteur?*

The role of antibiotic resistance is to select for bacteria that has uptaken the vector DNA. All other bacterial cells will be killed by antibiotic treatment, therefore maximizing the growth of cells that have the capacity to express DDX21.

- b. [2 point] Based on the design of the construct which chromatography technique would you choose as a first step to purify DDX21 from other cellular proteins? What type of column do you need and what chemical reagent would you use to elute the protein? / *En vous basant sur la conception du construct, quelle technique de chromatographie choisiriez-vous comme première étape pour purifier DDX21 des autres protéines cellulaires? Quel type de colonne utiliseriez-vous et quel réactif chimique utiliseriez-vous pour éluer la protéine?*

Affinity chromatography

Ni-based resin (e.g., Ni-NTA) that binds His tag (see the vector map)

Imidazole for eluting from this column

- c. **[3 points]** After the purification method you obtain the chromatogram in figure panel B and you check for the content of different peaks by SDS PAGE gel (figure panel C). Which proteins are in peak 1, 2, 3 and 4? / *Après la méthode de purification, vous obtenez le chromatogramme dans le panneau B et vous vérifiez le contenu des différents pics par un gel SDS-PAGE (panneau C). Quelles protéines se trouvent dans les pics 1, 2, 3 et 4 ?*

Peak 1: Flow-through from the column (unbound protein material)

Peak 2: Wash with low percentage eluting buffer. Non-specifically bound proteins

Peak 3: Non-specifically bound proteins that interact with Ni-column stronger compared to proteins in Peak 2.

Peak 4: Protein of interest (molecular weight on SDS gel confirms it)

- d. **[4 points]** You perform additional purification by size-exclusion chromatography and find that DDX21 exists in higher oligomeric state, as a tetramer. This allows it to bind with high avidity to cellular membranes that have high concentration phosphatidyl inositides. If the Gibbs free energy (ΔG°) for membrane binding in a tetrameric state is -60kJ/mol at room temperature ($T = 298.15\text{ K}$), determine the ΔG° and dissociation constant (K_d) for each individual monomer-lipid interaction. The universal gas constant, $R = 8.314\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ / *Vous effectuez une purification supplémentaire par chromatographie d'exclusion de taille et découvrez que DDX21 existe dans un état oligomérique supérieur, sous forme de tétramère. Cela lui permet de se lier avec une forte affinité aux membranes cellulaires ayant une concentration élevée de phosphatidylinositides. Si l'énergie libre de Gibbs (ΔG°) pour la liaison membranaire à l'état tétramérique est de -60 kJ/mol à température ambiante ($T = 298.15\text{ K}$), déterminez la ΔG° et la constante de dissociation (K_d) pour chaque interaction individuelle entre un monomère et un lipide. La constante universelle des gaz, $R = 8,314\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$.*

Each monomer-lipid interaction with contribute 1/4 of the ΔG° :

$$\Delta G^\circ(\text{monomer}) = \Delta G^\circ(\text{tetramer}) / 4 = -15\text{ kJ/mol}$$

To calculate K_d for monomer-lipid interaction, we can use the relationship with ΔG° (monomer):

$$K_d(\text{monomer}) = e^{[\Delta G^\circ(\text{monomer}) / RT]}$$

$$K_d = 0.00235\text{ M} = 2.35\text{mM}$$

Problème/Problem 6 [10 Points]

You have identified a bacterial protein of 120 amino acids with the following sequence: / *Vous avez identifié une protéine bactérienne de 120 acides aminés avec la séquence suivante:*

**MTRKYISTQMLIIMTALMIANSYYINSEKIGKLLVLLLGPVLVYVGYLYEMKIRGLLAT
WIGALLIADTLLSNKYTIILRVNLLLLLIVRYLIAKVKPKKVVATDEVMTSPSGIKQKWP**

- a. [3 points] Calculate the extinction coefficient (ϵ) for this protein at 280 nm. Extinction coefficients for individual amino acids at 280nm are $\epsilon(\text{Trp}) = 5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{Tyr}) = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{Phe}) = 195 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. / *Calculez le coefficient d'extinction (ϵ) de cette protéine à 280 nm. Les coefficients d'extinction des acides aminés individuels à 280 nm sont $\epsilon(\text{Trp}) = 5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{Tyr}) = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{Phe}) = 195 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.*

From UV280-active amino acids the sequence contains 2 x W and 8 x Y. There are no F.

Using the amino-acid extinction coefficients for W and Y we get that the molar extinction coefficient is:

$$\epsilon = 2 \times 5690 + 8 \times 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 23300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

- b. [3 points] After purifying the protein, you measure an absorbance at 280 nm (A_{280}) using a spectrophotometer with a 1 cm path length (l). The obtained absorbance value is 4.25. Estimate the protein concentration in mg/ml. The molecular weight is: 13586 Da. / *Après avoir purifié la protéine, vous mesurez une absorbance à 280 nm (A_{280}) à l'aide d'un spectrophotomètre avec une longueur de trajet optique de 1 cm (l). La valeur d'absorbance obtenue est de 4,25. Estimez la concentration de la protéine en mg/ml. Le poids moléculaire est de 13586 Da.*

Based on Lambert-Beer equation we have:

$$c = A_{280} / (\epsilon \times l) = 4.25 / (23300 \times 1) \text{ M} = 182.40 \times 10^{-6} \text{ M} = 182.40 \text{ } (\mu\text{mol} / \text{L})$$

Knowing that the MW = 13586 Da = 13586 g/mol

We get:

$$c \text{ (mg/ml)} = 182.40 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times 13586 \text{ g/mol} = 2.48 \text{ g/L} = 2.48 \text{ mg/ml}$$

- c. **[2 point]** Which biophysical method(s) would you use to confirm that the protein is folded and evaluate its secondary structure content? / *Quelles méthode(s) biophysiques utiliseriez-vous pour confirmer que la protéine est repliée et évaluer son contenu en structure secondaire?*

CD and FT-IR are the preferred answers.

Also in theory, structural biology methods like NMR and X-ray

- d. **[2 point]** Assuming that the protein does not aggregate and exists only as monomer, which structural biology method(s) could you apply to determine its 3D structure? / *En supposant que la protéine ne s'agrège pas et existe uniquement sous forme de monomère, quelles méthode(s) de biologie structurale pourriez-vous appliquer pour déterminer sa structure 3D?*

NMR or X-ray crystallography.

The sample is too small for electron microscopy

