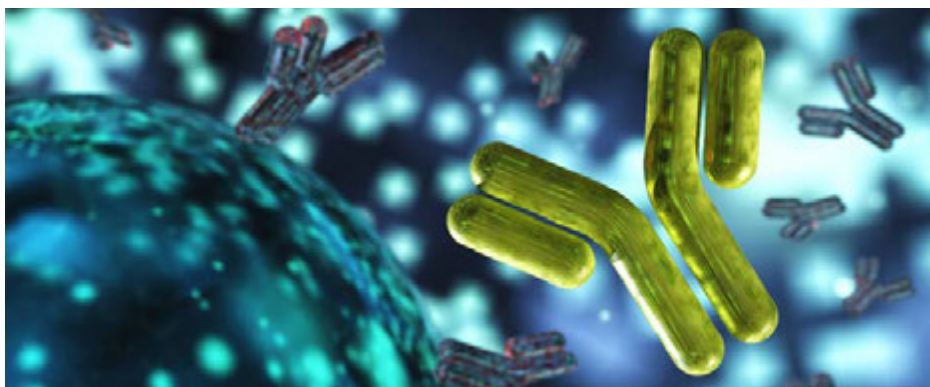


Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen mit dem Agilent Cary 630 FTIR-Spektrometer

Eine schnelle und flexible Methode zur Charakterisierung der Proteinsekundärstruktur mittels FTIR



Autoren

Ravindra Gudihal und
Wesam Alwan
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Proteine erfüllen eine Vielzahl molekularer Funktionen. Dies ist zum Teil auf ihre Fähigkeit zurückzuführen, sich in nahezu unbegrenzte Konformationen zu falten. Die Untersuchung der Sekundärstruktur des Proteins (α -Helix, β -Faltblatt, Schleife und Random Coil) ist daher von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Funktion von Proteinen. In dieser Application Note wurden das **Agilent Cary 630 FTIR**-Spektrometer mit **abgeschwächter Totalreflexion (ATR)** und die **Agilent MicroLab Expert Software** verwendet, um die Sekundärstruktur von Proteinen in Lösung schnell mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) zu untersuchen. Ein Vergleich der FTIR-Ergebnisse mit Röntgenkristallographie-Werten aus der Literatur unterstreicht den Nutzen dieser schnellen und flexiblen Methode zur Charakterisierung der Sekundärstruktur von Proteinen in Lösung.

Einführung

Einige der frühesten Studien zu großen Peptiden und zur Proteinsekundärstruktur wurden mithilfe von Infrarotspektroskopie durchgeführt.¹ Auch die Untersuchung des Circular dichroismus (CD) und die Röntgenkristallographie sind bei der Charakterisierung der Proteinstruktur von großem Wert^{2,3}, beide Techniken haben jedoch Nachteile, die ihre Verwendung einschränken. Für die Röntgenanalyse muss das Protein in kristalliner Form vorliegen, was eine komplexe und oft zeitaufwändige Probenvorbereitung erforderlich macht. CD-Untersuchungen wiederum können nur innerhalb eines begrenzten optischen Dichtebereichs angewendet werden, wodurch die Probenkonzentration auf etwa 0,1 bis 1 mg/ml begrenzt ist.

Bei FTIR-Techniken gibt es weniger derartige Einschränkungen für die Probe. FTIR-Spektren weisen Absorptionsbanden auf, die wertvolle Informationen über die Schwingungsmodi der Amidgruppen des Proteingerüsts liefern, d. h. über die vorhandene Sekundärstruktur.¹ Die Frequenz der Amid-I-Bande ist ein wichtiger und gängiger Parameter zur Bestimmung von Sekundärstrukturen. Die Amid-I-Bande hat sich als empfindlich erwiesen und wird häufig zur Einschätzung der Sekundärstruktur eines Proteins eingesetzt. Dieser Bereich des Infrarotspektrums, der typischerweise zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} liegt, wird hauptsächlich durch die Streckschwingungen der C=O- und C-N-Gruppen bestimmt, die Hinweise auf die Sekundärstruktur des Proteins geben. Die Zuordnung dieser Strukturen erfolgt anhand der charakteristischen Frequenzbereiche für α -Helices und β -Faltblätter innerhalb dieser Bande. Die FTIR bietet zwar nicht die Hochofflösung der Röntgenkristallographie und der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), aber schnellere Ergebnisse, ist einfach durchzuführen und hat eine breitere Anwendungsbasis zur Charakterisierung von Sekundärstrukturen.

Experimentelles

Geräte

In dieser Studie wurde das Cary 630 FTIR-Spektrometer mit ZnSe-Optik mit einem Diamant-ATR-Modul mit Einfachreflexion verwendet, das eine kurze Weglänge aufweist, die die Analyse relativ hochkonzentrierter Proteinproben, einschließlich viskoser Proben, ermöglicht (Abbildung 1). Die Datenakquisition erfolgte mit der MicroLab Expert Software unter Verwendung der gezeigten Parameter (Tabelle 1).



Abbildung 1. Das Agilent Cary 630 FTIR-Spektrometer wurde mit dem Diamant-ATR-Modul mit Einfachreflexion verwendet.

Tabelle 1. Versuchsparameter für das Agilent Cary 630 FTIR.

Parameter	Wert
Spektralbereich	4000 bis 650 cm^{-1}
Proben-/Hintergrundscans	140
Auflösung	4 cm^{-1}
Zerofill-Faktor	Keiner
Apodisation	Triangular
Phasenkorrektur	Mertz
Messtechnologie	ATR

Proben: Bovines Serumalbumin (05470), Lysozym (Hühnereiweiß, L-6876), Papain (P4762), β -Casein (C6905) und Myoglobin (M1882) wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Der monoklonale Antikörper (mAb) wurde von einem pharmazeutischen Händler in Singapur erworben. Die mAb-Probe wurde mit Vivaspin 500 Zentrifugalkonzentratorsäulen (10 kDa MWCO, Sartorius) aufkonzentriert.

Probenvorbereitung: Bovines Serumalbumin (BSA), mAb und Papain wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml verwendet. Lysozym, β -Casein und Myoglobin wurden in einer Konzentration von 25 mg/ml verwendet. Für die Messungen wurden 10 μl jeder Proteinprobe verwendet. Frisches Reinstwasser wurde einem Milli-Q Integral System entnommen, das mit einer Entnahmekartusche mit 0,22- μm -Membran (Merck Millipore) ausgestattet war. Das FTIR-Spektrum von Reinstwasser wurde vom FTIR-Spektrum der Proteinlösungen subtrahiert und das resultierende Spektrum anschließend analysiert.

Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde die MicroLab Expert Software (Version 1.1.0.1) verwendet:

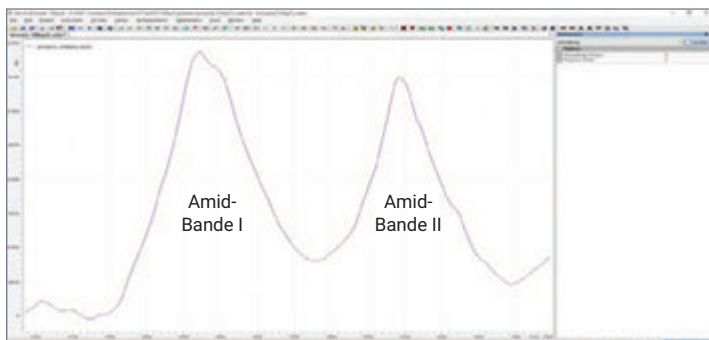
- Für die Datenverarbeitung wurden die (über drei Messungen) gemittelten Spektren herangezogen.
- Mithilfe der Spektrum-Arithmetikfunktion „Subtract Spectra“ auf der Registerkarte „Mathematics“ wurde das Spektrum einer Blindprobe (z. B. Wasser oder Formulierungspuffer) von den gemittelten Spektren subtrahiert.
- Die Spektren nach Subtraktion der Blindprobe wurden mit „Merge View“ auf der Registerkarte „2D View“ zusammengeführt.
- Unter Verwendung von Glättungsfenster 9 und Polynomordnung 3 auf der Registerkarte „Mathematics“ wurde eine weitere Glättung durchgeführt.
- Für die Spektren der Ableitung zweiter Ordnung wurde auf der Registerkarte „Mathematics“ eine Savitzky-Golay-Ableitung zweiter Ordnung mit Glättungsfenster 9 angewendet.

Charakterisierung der Sekundärstruktur mithilfe des Kurvenanpassungsverfahrens mit der MicroLab Expert Software

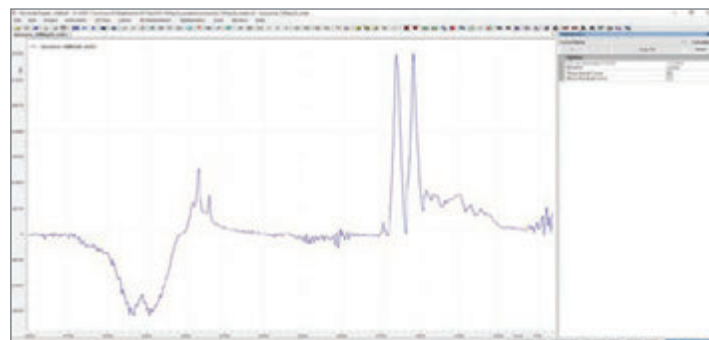
Über den Menübefehl „Curve Fit“ der MicroLab Expert Software wurden die folgenden Aktionen ausgeführt:

1. Durchführung einer Basislinienkorrektur für die Amid-Bande I (1600 bis 1700 cm^{-1}) vor der Kurvenanpassung.
2. Aktivierung des anzupassenden 2D-Datenobjektes.
3. Auswahl des Befehls **Curve Fit** aus dem Menü „Mathematics“.
4. Hinzufügen eines neuen Peaks zur Liste der geschätzten Peaks durch Klicken auf die **Plus**-Schaltfläche.
5. Anpassung aller erforderlichen Parameter auf der Registerkarte „Mathematics“ (FWHM, Maximale X- und Y-Position).
6. Wiederholung des Vorgangs ab Schritt 3, bis die optimale Anzahl von Peaks definiert ist.
7. Klicken auf die Schaltfläche **Auto Fit** zur automatischen Anpassung.
8. Klicken auf die Schaltfläche **Calculate** zur Erstellung einer neuen Tabelle mit detaillierten Peakinformationen der geschätzten Peaks.

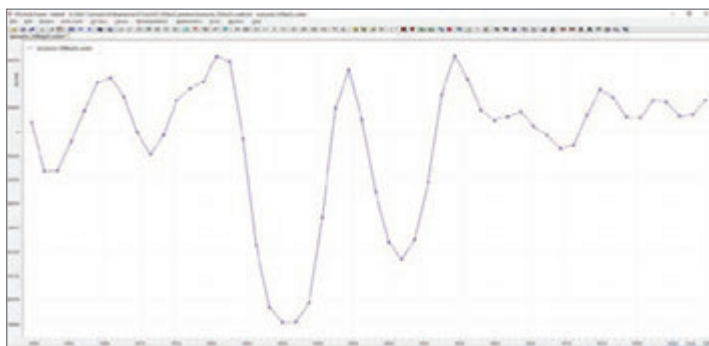
Ein Beispiel für die Kurvenanpassung mit Lysozym ist in Abbildung 2 dargestellt.



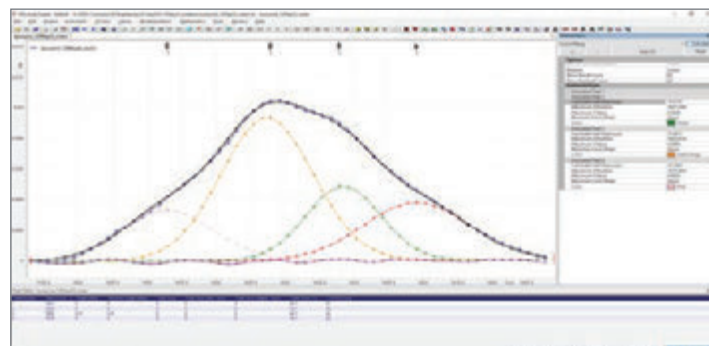
1 Ergebnis der Subtraktion der gemittelten Lysozymspektren von den Wasserspektren



2 Eine Basislinienkorrektur für die Amid-Bande I durchführen (1600 bis 1700 cm^{-1})



3 Einen Savitzky-Golay-Filter mit einem Glättungsfenster von 9 verwenden, um eine Ableitung zweiter Ordnung durchzuführen und so verborgene Peaks zu identifizieren



4 Eine Kurvenanpassung an das in Schritt 2 erhaltene Spektrum mit Schwerpunkt auf den Spektralbereich von 1600 bis 1700 cm^{-1} durchführen

Abbildung 2. Bestimmung der Proteinsekundärstruktur mithilfe des Kurvenanpassungsverfahrens in der Agilent MicroLab Expert Software. Die Beiträge der Komponenten zur Sekundärstruktur wurden anhand der Bandenfläche jedes Komponentenpeaks berechnet.

Die Beiträge der Komponenten zur Sekundärstruktur des Proteins wurden anhand der Bandenfläche jedes Komponentenpeaks berechnet. Sekundärstrukturen wurden gemäß Tabelle 2 zugewiesen. Aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkungen der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Proteinen und den unterschiedlichen Milieus, in dem sie vorkommen, werden alle Zuordnungen als Bereich angegeben. Für die zukünftige Verwendung mit derselben Probe ist die Halbwertsbreite (Full width at half maximum) zu beachten.

Tabelle 2. Korrelation der Sekundärstruktur mit der Amid-I-Banden-Frequenz.⁴

Struktur	Amid-I-Frequenz (cm ⁻¹)
α-Helix	1648 bis 1660
Random	1640 bis 1648
β-Faltblatt	1625 bis 1640
Cross-β-Struktur	1610 bis 1628
Schleifen	1660 bis 1699

Einer Komponente mit Zentrum zwischen 1648 und 1660 cm⁻¹ wurde eine α-Helix als Sekundärstruktur zugewiesen. Banden im Bereich von 1625 bis 1640 cm⁻¹ wird üblicherweise eine β-Faltblatt-Struktur zugeordnet (Tabelle 2). Die Random-Coil-Konformation weist IR-Banden um 1643 und 1649 cm⁻¹ auf.

Ergebnisse und Diskussion

Es wurden die Infrarotspektren von sechs nativen Proteinen mit unterschiedlichen bekannten Sekundärstrukturen untersucht: Myoglobin (helikal), Immunoglobulin G (Faltblatt), Lysozym (helikal), bovines Serumalbumin (überwiegend helikal), Papain (gemischt) und β-Casein (ungeordnet). Die Peak-Anpassung wurde an den Spektren nach Wasserspektrumsabstraktion gemäß dem im Datenanalyse-Abschnitt beschriebenen Verfahren durchgeführt (Abbildung 2). Eine Amid-I-Bande bietet wenig Einblick in die zugrunde liegenden Sekundärstrukturkomponenten, da die Breiten der Banden der verschiedenen Komponenten größer sind als die Abstände zwischen ihren Peaks. Um verborgene Peaks zu identifizieren, wurde die zweite Ableitung des Spektrums als Methode zur Verringerung der Bandenbreite/Peak-Schärfung verwendet. Abbildung 3 zeigt eine Gesamtkurvenanpassung für sechs untersuchte Proteine. Es gibt mehrere diskrete Peaks im Amid-I-Bereich des Spektrums.

Die Zuordnung bestimmter Sekundärstrukturen wie α-Helices und β-Faltblätter erfolgt anhand der Fläche unter der angepassten Kurve in einem Infrarotspektrum entsprechend der Amid-I-Bande. Diese Zuweisung basiert auf Basis charakteristischer Frequenzbereiche, die in Tabelle 2 referenziert sind. Durch Analyse der Fläche unter der angepassten Kurve in der Amid-I-Bande werden die relativen Mengen jeder im Protein vorhandenen Sekundärstruktur geschätzt.

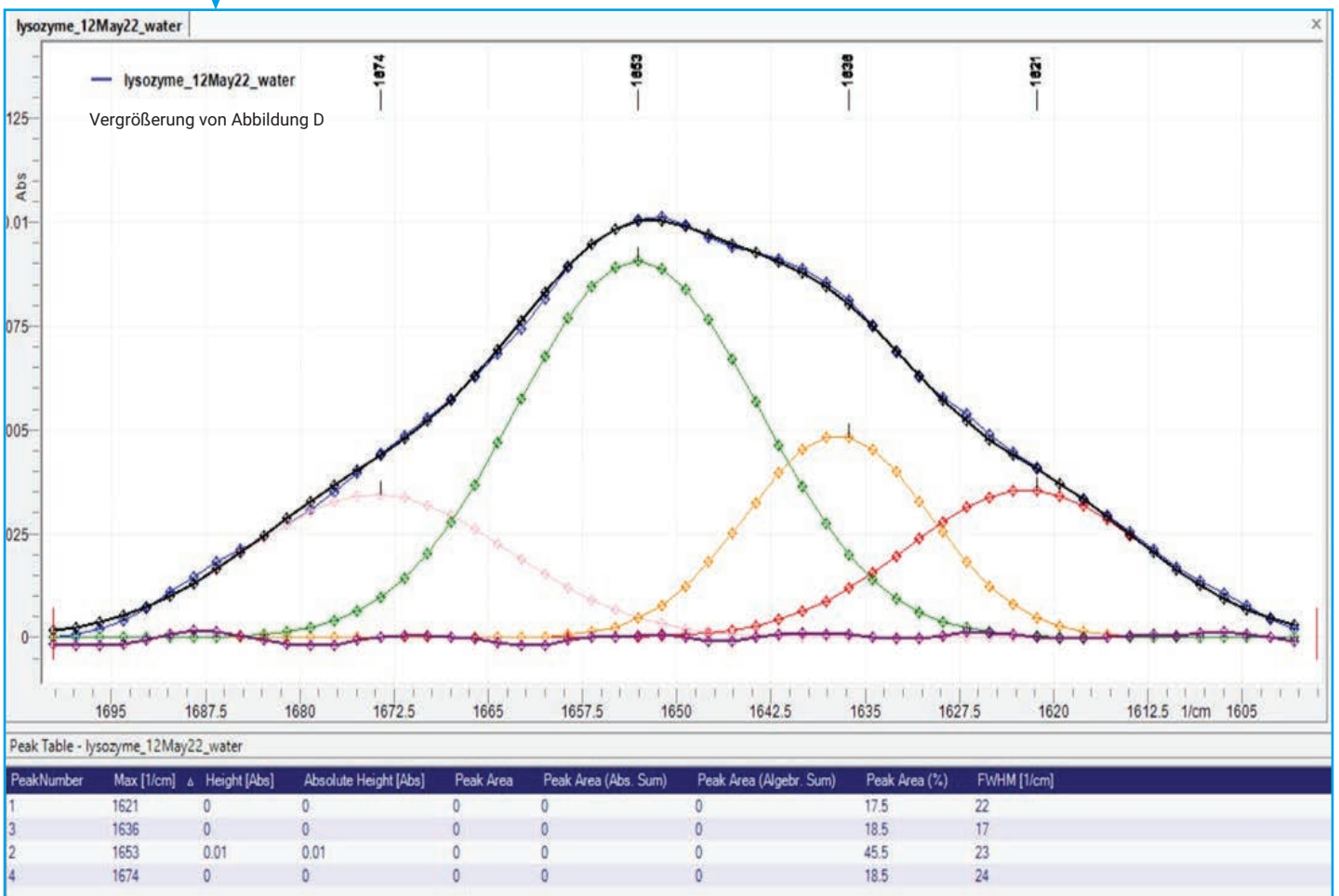
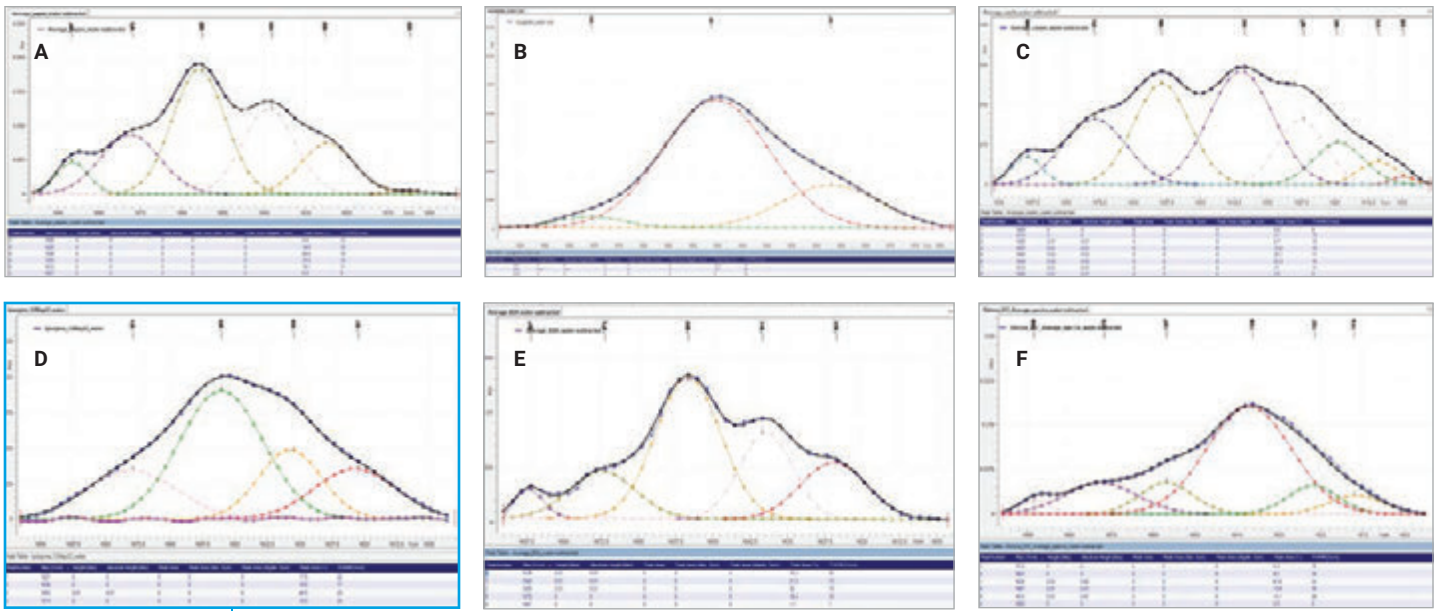


Abbildung 3. Kurvenanpassung für die sechs untersuchten Proteine: (A) Papain (gemischt); (B) Myoglobin (helikal); (C) β -Casein (ungeordnet); (D) Lysozym (gemischt); (E) bovines Serumalbumin (überwiegend helikal); (F) Immunglobulin G (Faltblatt). In dem blauen Feld ist die Lysozym-Anpassungskurve hervorgehoben.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Quantifizierung der Sekundärstrukturen α -Helix, β -Faltblatt, Schleife und Random Coil zusammengefasst.

Tabelle 3. Relativer Anteil von Protein-Sekundärstrukturen, bestimmt mittels FTIR-Kurvenanpassung und Vergleich mit Röntgenuntersuchungen.⁵⁻⁷

Proteine	% Struktur							
	α -Helix		β -Faltblatt		β -Schleife		Random Coil	
	Röntgen	FTIR	Röntgen	FTIR	Röntgen	FTIR	Röntgen	FTIR
BSA	74 ⁽⁷⁾	38	3,1	18	1,4	23	20,6	21
Papain	25 ⁽⁶⁾	36	21	39	4	6	50	19
β -Casein	n. e.	23	n. e.	22	n. e.	21	n. e.	34
Lysozym	45 ⁽⁵⁾	44	19	19	23	16	13	21*
IgG (Rituximab)	3 ⁽⁵⁾	10	67	67	18	14	12	9
Myoglobin	85 ⁽⁵⁾	72	n. e.	23	8	5	7	n. e.

* Einer Cross- β -Struktur zugewiesen

n. e. = Nicht eindeutig

Die Spektren von Immunglobulin G nach Wasserspektrumsabstraktion (Abbildung 1B) zeigten ein sehr ausgeprägtes Amid-I-Banden-Maximum bei 1636 cm^{-1} , was typisch ist für den hohen Anteil an β -Faltblatt-Sekundärstrukturen, wie er in Röntgenuntersuchungen bestätigt wurde.⁵ Der Peak bei etwa 1636 cm^{-1} in den Immunoglobulin-G-Spektren machte 67 % der gesamten Amid-I-Banden-Fläche aus. Die Infrarotspektren von Lysozym nach Wasserspektrumsabstraktion zeigten eine relativ schmale Amid-I-Bande mit einem Maximum bei 1654 cm^{-1} , was für Proteine mit hohem Anteil an α -helikalen Sekundärstrukturen charakteristisch ist.⁵ Wie anhand der Kurvenanpassung geschätzt, wies Lysozym eine ausgeprägte α -helikale Komponente von 44 % an der Bandenposition bei 1654 cm^{-1} und eine β -Faltblatt-Komponente von 19 % auf. Myoglobinprotein zeigte eine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur, aber auch eine β -Faltblatt-Komponente. Proteinen wie BSA, Papain und Casein werden ebenfalls verschiedene Proteinsekundärstrukturkomponenten zugeordnet. Die Sekundärstruktur von BSA reagiert empfindlich auf verschiedene Testbedingungen, was zu einer

Variation der Strukturenverteilung führen kann. Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und das Vorhandensein von oberflächenaktiven Substanzen können die Sekundärstruktur des Proteins, beispielsweise den Anteil an Helices, erheblich beeinflussen. Die Wechselwirkung mit Wassermolekülen und die Konkurrenz um Wasserstoffbrücken können die helikale Struktur destabilisieren. Dies unterstreicht, wie empfindlich das Gleichgewicht der Wechselwirkungen ist, die die Proteinstabilität aufrechterhalten. Kristallisation kann dabei helfen, die native Konformation des Proteins zu bewahren, indem das Lösungsmittel entfernt wird. Dies erklärt, warum die am stärksten helikale Form von BSA in der Regel im kristallinen Zustand beobachtet wird.⁷⁻⁹

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Quantifizierung als prozentuale Anteile von α -Helix, β -Faltblatt, β -Schleife und Random Coil an der Sekundärstruktur zusammengefasst.

Abschließende Bemerkungen

In dieser Application Note wird eine Methode zur Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen in Lösung mittels FTIR vorgestellt. Das Cary 630 FTIR mit Diamant-ATR mit Einzelreflexion wurde aufgrund seiner kurzen Weglänge und der geringen Anforderungen an die Proben verwendet. Für die FTIR-Analyse musste die Amid-I-Bande in ihre Bestandteile aufgelöst werden, was hier mit der MicroLab Expert-Software erfolgte. Zur Bestimmung der relativen Mengen wichtiger sekundärer Strukturmerkmale wurde eine Methode zur Bandenkurven-Anpassung verwendet, und die aus FTIR gewonnenen Ergebnisse stimmten weitgehend mit den Angaben in der Literatur überein.

Die zerstörungsfreie Untersuchung der Proteinstruktur mit dem Cary 630 FTIR in Kombination mit der Anwenderfreundlichkeit des Systems und der minimalen Probenvorbereitung legen eine potenzielle Verwendung dieser Technik bei der schnellen Charakterisierung ungefährender sekundärer Strukturmerkmale und als Hilfsmittel für ein direktes Screening experimentell induzierter Strukturveränderungen nahe.

Referenzen

1. Barth, A. Infrared Spectroscopy of Proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Bioenergetics* **2007**, 1767(9), 1073–1101.
2. Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat. Protoc.* **2006**, 1(6), 2876–2890. doi: 10.1038/nprot.2006.202. PMID: 17406547; PMCID: PMC2728378.
3. Shi, Y. A Glimpse of Structural Biology Through X-Ray Crystallography. *Cell* **2014**, 159(5), 995–1014.
4. Jackson, M.; Mantsch, H. H. The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 30, 95–120.
5. Levitt, M.; Greer, J. Automatic Identification of Secondary Structure in Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* **1977**, 114, 181–239.
6. Kamphuis, I. G.; Kalk, K. H.; Swarte, M. B. A.; Drenth, J. Structure of Papain Refined at 1.65 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1984**, 179, 233–256.
7. Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins. *Mol. Immunol.* **2012**, 52, 174–182.
8. Barreto, M. S. C.; Elzinga, E. J.; Alleoni, L. R. F. The Molecular Insights into Protein Adsorption on Hematite Surface Disclosed by In-Situ ATR-FTIR/2D-COS study. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 13441.
9. Abrosimova, K. V.; Shulenina, O. V.; Paston, S. V. FTIR Study of Secondary Structure of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin. *Journal of Physics: Conference Series* **2016**, 769.

Weitere Informationen

- [Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer](#)
- [Agilent MicroLab FTIR Software](#)
- [Agilent MicroLab Expert](#)
- [FTIR Analysis & Applications Guide](#)
- [FTIR Spectroscopy Basics – FAQs](#)

www.agilent.com/chem/cary630

DE-001141

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Gedruckt in den USA, 1. Oktober 2024
5994-7808DEE