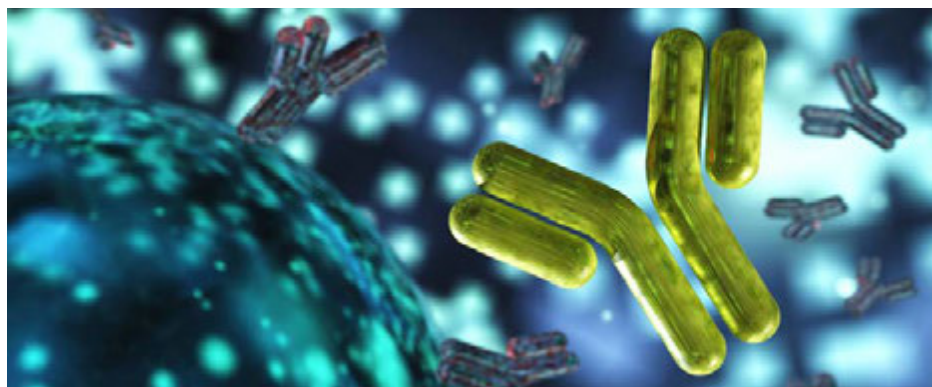


Estimation de la structure secondaire des protéines à l'aide du spectromètre Agilent Cary 630 FTIR

Méthode rapide et modulable d'évaluation de la structure secondaire des protéines par FTIR



Auteurs

Ravindra Gudihal et
Wesam Alwan
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

Les protéines assument un large éventail de fonctions moléculaires, notamment grâce à leur capacité à se replier en un nombre presque illimité de conformations. Pour comprendre la fonction d'une protéine, il est donc essentiel d'évaluer la proportion d'hélices α , de feuillets β , de coudes et de pelotes statistiques dans sa structure secondaire. Cette note d'application décrit l'utilisation d'un spectromètre **Agilent Cary 630 FTIR** équipé d'un module **ATR (réflexion totale atténuée)** et du **logiciel Agilent MicroLab Expert** pour évaluer rapidement la structure secondaire des protéines en solution par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. La comparaison des résultats de FTIR avec les valeurs de la littérature obtenues par cristallographie aux rayons X démontre l'utilité de cette approche en tant que méthode rapide et modulable d'évaluation de la structure secondaire des protéines en solution.

Introduction

Certaines des premières études de la structure secondaire des peptides de grande taille et des protéines ont été réalisées à l'aide de la spectroscopie infrarouge¹. Le dichroïsme circulaire (CD) et la cristallographie aux rayons X se sont également avérés essentiels dans l'évaluation de la structure des protéines^{2,3}, mais ces deux techniques présentent des inconvénients limitant leur utilisation. L'analyse aux rayons X implique que la protéine soit sous forme cristalline, ce qui nécessite une préparation d'échantillon complexe et souvent chronophage, tandis que le CD ne peut être appliqué que dans une gamme de densité optique restreinte, ce qui limite la concentration d'échantillon à une gamme d'environ 0,1 à 1 mg/mL.

Les techniques de FTIR imposent moins de contraintes sur les échantillons, et les spectres FTIR contiennent des bandes d'absorption qui offrent de précieuses informations sur les modes vibratoires des groupes amides du squelette protéique, et par conséquent sur la structure secondaire présente¹. La fréquence de la bande amide I est un paramètre essentiel à la détermination des structures secondaires. La bande amide I est sensible et très utilisée pour l'évaluation de la structure secondaire des protéines. Cette région du spectre infrarouge, typiquement observée entre 1 600 et 1 700 cm^{-1} , est principalement déterminée par les vibrations d'élongation des groupements C=O et C-N, qui donnent des indications sur la structure secondaire de la protéine. Les gammes de fréquences caractéristiques pour les hélices α et les feuillets β au sein de cette bande permettent d'identifier ces structures. Bien que la FTIR n'ait pas la haute résolution offerte par la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN), elle fournit une réponse plus rapide, est simple d'utilisation et est plus largement applicable à l'évaluation des structures secondaires.

Méthode expérimentale

Instruments

Dans cette étude, le spectromètre FTIR Cary 630 équipé d'une optique en ZnSe a été utilisé avec un module ATR diamant simple réflexion, qui comprend un court trajet optique permettant d'analyser des échantillons de protéines assez fortement concentrés, y compris des échantillons visqueux (figure 1). L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel MicroLab Expert Agilent à l'aide des paramètres indiqués (tableau 1).



Figure 1. Le FTIR Agilent Cary 630 a été utilisé avec le module ATR diamant simple réflexion.

Tableau 1. Paramètres expérimentaux du FTIR Agilent Cary 630.

Paramètre	Valeur
Domaine spectral	4 000 à 650 cm^{-1}
Balayages de l'échantillon/du fond	140
Résolution	4 cm^{-1}
Facteur de remplissage nul	Aucune
Apodisation	Triangulaire
Correction de phase	Mertz
Technologie d'échantillonnage	Réflexion totale atténuée

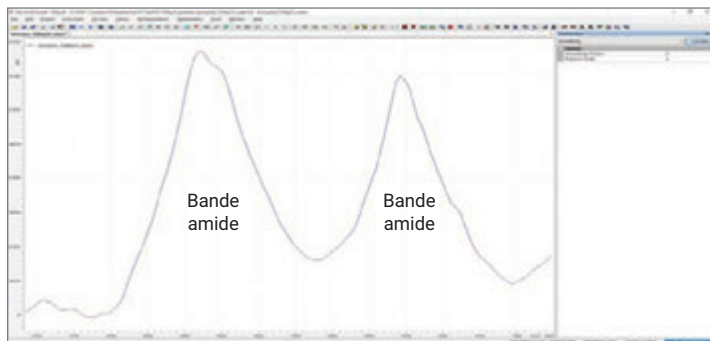
Échantillons : La sérumalbumine bovine (05470), le lysozyme (blanc d'œuf de poulet, L-6876), la papaine (P4762), la caséine β (C6905) et la myoglobine (M1882) ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). L'anticorps monoclonal (mAb) a été acheté auprès d'un distributeur pharmaceutique local à Singapour. L'échantillon de mAb a été concentré à l'aide de concentrateurs centrifuges Vivaspin 500 (Sartorius, avec MWCO de 10 kDa).

Préparation d'échantillon : La sérumalbumine bovine (BSA), le mAb et la papaine ont été utilisés à une concentration de 10 mg/mL. Le lysozyme, la caséine β et la myoglobine ont été utilisés à une concentration de 25 mg/mL. Un volume de 10 μL de chaque échantillon protéique a été utilisé pour les mesures. De l'eau ultrapure fraîchement préparée a été obtenue à partir d'un système Milli-Q Integral équipé d'une cartouche (de Merck Millipore) dotée d'une membrane de 0,22 μm . Le spectre FTIR de l'eau pure a été soustrait du spectre FTIR des solutions protéiques, et le spectre ainsi obtenu a été analysé.

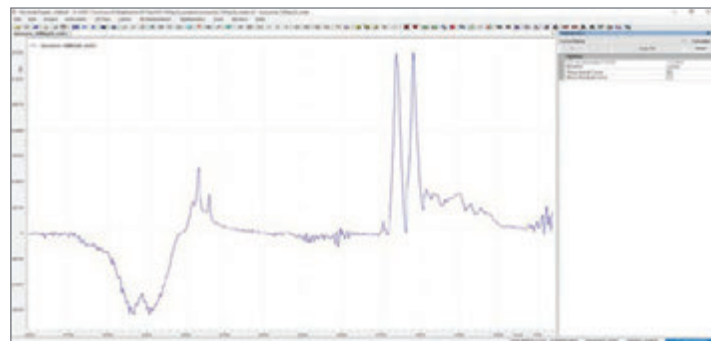
Traitement des données

Le logiciel MicroLab Expert (version 1.1.0.1) a été utilisé pour le traitement des données :

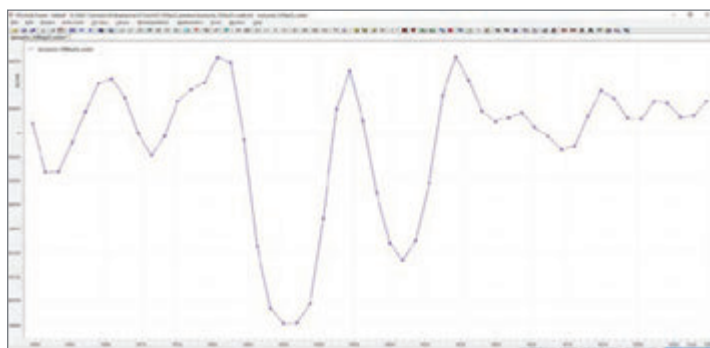
- Le traitement des données a été effectué sur des spectres moyens correspondant à la moyenne des spectres de trois mesures.
- Un spectre de blanc (eau ou tampon de formulation par exemple) a été soustrait des spectres moyens à l'aide de la fonction « Subtract Spectra » (Soustraire des spectres) de la section « Spectrum Arithmetic » (Arithmétique des spectres) de l'onglet « Mathematics » (Mathématiques).
- Les spectres obtenus après soustraction du blanc ont été fusionnés à l'aide de la fonction « Merge View » (Fusionner l'affichage) de l'onglet « 2D View » (Affichage 2D).
- Une fenêtre glissante de 9 points et un polynôme du 3e ordre ont été appliqués dans l'onglet « Mathematics » (Mathématiques) pour lisser davantage les spectres.
- Pour les spectres de dérivée seconde, une dérivée seconde de Savitzky-Golay a été appliquée avec une fenêtre glissante de 9 points sous l'onglet « Mathematics » (Mathématiques).



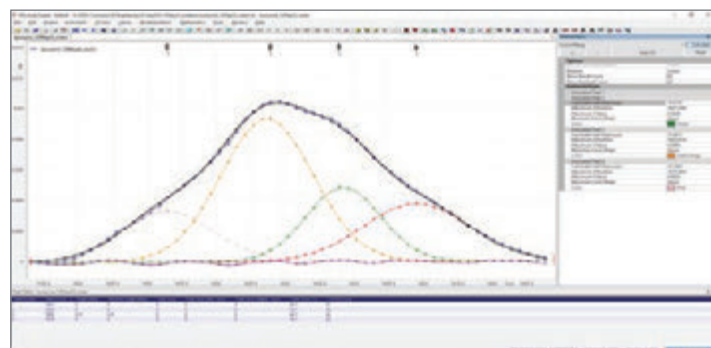
1 Résultat de la soustraction du spectre de l'eau du spectre moyen du lysozyme



2 Correction de la ligne de base pour la bande amide I (1 600 à 1 700 cm⁻¹)



3 Utilisation d'un filtre de Savitzky-Golay avec une fenêtre de lissage de 9 points pour l'application d'une dérivée seconde afin d'identifier les pics sous-jacents



4 Déconvolution du spectre obtenu dans l'étape 2, en se focalisant sur la gamme spectrale entre 1 600 et 1 700 cm⁻¹

Figure 2. Estimation de la structure secondaire d'une protéine à l'aide de la procédure de déconvolution spectrale du logiciel Agilent Microlab Expert. Les contributions des composantes à la structure secondaire sont estimées en calculant l'aire du pic de chaque composante.

Les contributions des composantes à la structure secondaire de la protéine ont été calculées à l'aide de l'aire du pic de chaque composante. Les structures secondaires ont été identifiées comme indiqué dans le tableau 2. Tous ces résultats sont présentés sous forme de gamme afin de tenir compte des différentes interactions par liaisons hydrogène entre les protéines et les différents environnements dans lesquels elles se trouvent. Notez la « largeur complète à mi-hauteur » pour une utilisation ultérieure avec le même échantillon.

Tableau 2. Corrélation entre la structure secondaire et la fréquence de la bande amide I⁴.

Structure	Fréquence de l'amide I (cm ⁻¹)
Hélice α	1 648 à 1 660
Pelote statistique	1 640 à 1 648
Feuillets β	1 625 à 1 640
Feuillets β croisés	1 610 à 1 628
Coudes	1 660 à 1 699

Une composante centrée entre 1 648 et 1 660 cm⁻¹ a été identifiée comme étant une structure secondaire en hélice α . Les bandes dans la région entre 1 625 et 1 640 cm⁻¹ sont généralement associées à des structures en feuillets β (tableau 2). Les conformations en pelotes statistiques présentent des bandes IR vers 1 643 et 1 649 cm⁻¹.

Résultats et discussion

Les spectres infrarouges de six protéines natives caractérisées par des structures secondaires connues – la myoglobine (hélices), l'immunoglobuline G (feuillets), le lysozyme (hélices), la sérumalbumine bovine (prédominance d'hélices), la papaine (mélange de structures secondaires) et la caséine β (désordonnée) – ont été étudiés. Une déconvolution des pics a été effectuée sur les spectres obtenus après soustraction du spectre de l'eau selon la procédure décrite dans la section « Traitement des données » (figure 2). La bande amide I offre peu d'informations sur les composantes sous-jacentes de la structure secondaire, car les largeurs des bandes des différentes composantes sont supérieures à la séparation entre leurs pics. Pour identifier les pics sous-jacents, la dérivée seconde du spectre a été utilisée pour réduire la largeur de bande et affiner les pics. Une déconvolution spectrale globale est présentée sur la figure 3 pour les six protéines étudiées. On peut observer plusieurs pics discrets dans la région amide I du spectre.

L'aire sous la courbe obtenue par déconvolution de la bande amide I du spectre infrarouge est utilisée pour identifier des structures secondaires spécifiques, telles que les hélices α et les feuillets β . Cette identification est basée sur les gammes de fréquences caractéristiques indiquées dans le tableau 2. En analysant l'aire sous la courbe de déconvolution de la bande amide I, on peut estimer les quantités relatives de chaque structure secondaire présente dans la protéine.

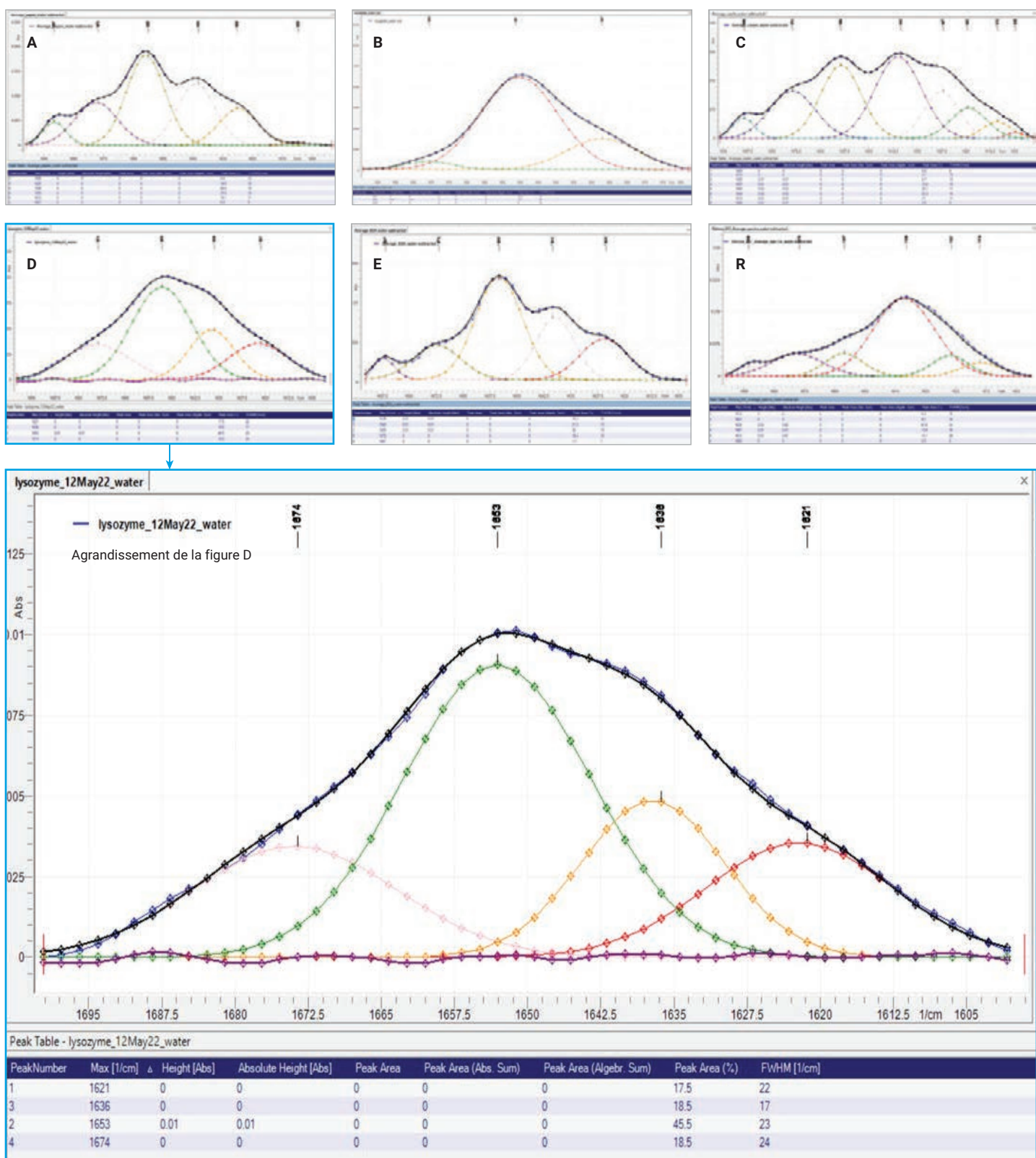


Figure 3. Déconvolution spectrale pour les six protéines étudiées : (A) papaïne (mélange de structures secondaires) ; (B) myoglobine (hélices) ; (C) caséine β (désordonnée) ; (D) lysozyme (mélange de structures secondaires) ; (E) sérumalbumine bovine (prédominance d'hélices) ; (F) immunoglobuline G (feuillets). Un agrandissement de la déconvolution spectrale du lysozyme est présenté dans le cadre entouré de bleu.

Le tableau 3 résume les résultats de quantification pour les structures secondaires en hélices α , feuillets β , coudes et pelotes statistiques.

Tableau 3. Quantité relative des structures secondaires protéiques estimée par déconvolution des spectres FTIR et comparaison avec des études aux rayons X⁵⁻⁷.

Protéines	% structure							
	Hélice α		Feuillets β		Coude β		Pelote statistique	
	Rayons X	FTIR	Rayons X	FTIR	Rayons X	FTIR	Rayons X	FTIR
BSA	74 ⁽⁷⁾	38	3,1	18	1,4	23	20,6	21
Papaïne	25 ⁽⁶⁾	36	21	39	4	6	50	19
Caséine β	n.d.	23	n.d.	22	n.d.	21	n.d.	34
Lysozyme	45 ⁽⁵⁾	44	19	19	23	16	13	21*
IGG (rituximab)	3 ⁽⁵⁾	10	67	67	18	14	12	9
Myoglobine	85 ⁽⁵⁾	72	n.d.	23	8	5	7	n.d.

* Identifié en tant que feuillets β croisés
n.d. = non déterminé

Le spectre de l'immunoglobuline G (figure 3F) obtenu après soustraction du spectre de l'eau présentait une bande amide I très intense vers $1\ 636\ \text{cm}^{-1}$, reflétant son riche contenu en feuillets β confirmé par des études aux rayons X⁵. Le pic vers $1\ 636\ \text{cm}^{-1}$ dans le spectre de l'immunoglobuline G représentait 67 % de la surface totale de la bande amide I. Le spectre du lysozyme obtenu après soustraction du spectre de l'eau présentait une bande amide I relativement étroite avec un maximum vers $1\ 654\ \text{cm}^{-1}$, ce qui est caractéristique des protéines ayant un contenu important en hélices α ⁵. Comme estimé par la déconvolution spectrale, le lysozyme avait une composante distincte en hélice α de 44 % à $1\ 654\ \text{cm}^{-1}$, avec une composante représentant 19 % de feuillets β . La myoglobine avait une structure secondaire majoritairement en hélice α , mais aussi une composante en feuillets β . Les protéines telles que la BSA, la papaïne et la caséine présentaient aussi différentes composantes de structure secondaire protéique. La structure secondaire de la BSA est sensible aux diverses conditions expérimentales,

ce qui peut entraîner des variations dans sa distribution structurale. Les facteurs tels que la température, le pH et la présence d'agents tensioactifs peuvent influencer de manière notable la structure secondaire de cette protéine, ainsi que son contenu hélicoïdal. L'interaction avec les molécules d'eau et la compétition pour l'établissement de liaisons hydrogène peuvent déstabiliser la structure hélicoïdale, ce qui souligne l'équilibre délicat entre les interactions maintenant la stabilité de la protéine. La cristallisation peut permettre de préserver la conformation native des protéines en éliminant le solvant, ce qui explique que la plupart des formes hélicoïdales de la BSA sont observées dans son état cristallin⁷⁻⁹.

Le tableau 3 résume les résultats de quantification sous forme de pourcentages de structures secondaires en hélices α , feuillets β , coudes et pelotes statistiques.

Conclusions

Cette note d'application illustre une méthode d'analyse de la structure secondaire des protéines en solution à l'aide de la FTIR. Le Cary 630 FTIR équipé d'un module ATR diamant simple réflexion a été utilisé en raison de son court trajet optique et de ses faibles exigences en termes de préparation d'échantillon. L'analyse par FTIR a nécessité de résoudre la bande amide I en ses différentes composantes, ce qui a été effectué à l'aide du logiciel MicroLab Expert. Une méthode de déconvolution spectrale de la bande a été utilisée pour estimer les quantités relatives des principales caractéristiques structurales secondaires, et les résultats obtenus par FTIR se sont avérés largement concordants avec les études dans la littérature.

Associée à sa facilité d'utilisation et au niveau minimal de préparation d'échantillon qu'il requiert, la capacité du Cary 630 FTIR à étudier la structure des protéines de façon non destructive suggère que cette technique pourrait être utilisée pour l'évaluation rapide de leurs caractéristiques structurales secondaires générales des protéines, et comme outil de détection directe de modifications structurales induites expérimentalement.

Références

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.

Informations complémentaires (en anglais)

- 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

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Imprimé aux États-Unis, le 1er octobre 2024
5994-7808FR