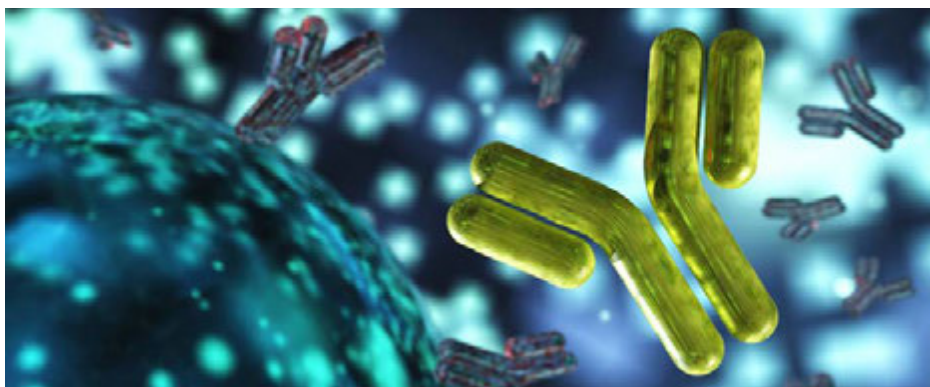


Stima della struttura secondaria di proteine con lo spettrometro FTIR Agilent Cary 630

Un metodo rapido e flessibile per la valutazione della struttura secondaria di proteine tramite FTIR



Autori

Ravindra Gudihal e
Wesam Alwan
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Le proteine assolvono svariate funzioni molecolari, in parte perché grazie al ripiegamento sono in grado di assumere un numero quasi illimitato di conformazioni. Ciò significa che valutare l'entità di α -eliche, foglietti β , turn e random coil presenti nella struttura secondaria di una proteina è fondamentale per comprenderne la funzione. La presente nota applicativa si avvale della spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), su spettrometro **FTIR Agilent Cary 630** dotato di modulo a **riflettanza totale attenuata (ATR)** e software **MicroLab Expert Agilent**, per ottenere rapidamente una stima della struttura secondaria di proteine in soluzione. Il confronto tra i risultati FTIR e i valori di letteratura ottenuti tramite cristallografia a raggi X dimostra la validità di questo approccio quale metodo rapido e flessibile per la stima della struttura secondaria di proteine in soluzione.

Introduzione

Alcuni dei primi studi su peptidi di grandi dimensioni e sulla struttura secondaria delle proteine sono stati condotti con la spettroscopia a infrarossi.¹ Il dicroismo circolare (CD) e la cristallografia a raggi X sono altre due tecniche rivelatesi essenziali per la valutazione della struttura delle proteine^{2,3}, sebbene entrambe soffrano di svantaggi che ne limitano l'uso. Per eseguire l'analisi a raggi X è necessario che la proteina sia in forma cristallina, cosa che rende la preparazione del campione complessa e spesso dispendiosa in termini di tempo. Il dicroismo circolare, d'altro canto, è praticabile soltanto in un ristretto intervallo di densità ottica, il che limita la concentrazione del campione a circa 0,1 - 1 mg/mL.

Le tecniche FTIR impongono meno restrizioni al campione e gli spettri FTIR presentano bande di assorbimento che recano informazioni preziose sui modi vibrazionali accessibili ai gruppi ammidici dello scheletro della proteina, ossia sulla sua struttura secondaria.¹ La frequenza della banda ammidica I è un parametro critico per la determinazione delle strutture secondarie. È ormai provato che tale banda, comunemente impiegata, presenta la sensibilità necessaria per la stima della struttura secondaria delle proteine. Questa regione dello spettro infrarosso, in genere compresa tra 1.600 e 1.700 cm^{-1} , è caratterizzata essenzialmente dalle vibrazioni di stretching dei gruppi C=O e C-N, rappresentativi della struttura secondaria della proteina. Gli intervalli di frequenza caratteristici delle α -eliche e dei foglietti β entro questa banda consentono di assegnare tali strutture. Sebbene la tecnica FTIR non possa vantare l'alta risoluzione della cristallografia a raggi X e della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR), consente però di ottenere risposte in tempi più rapidi, è di facile utilizzo e più ampiamente applicabile alla stima della struttura secondaria.

Condizioni sperimentali

Strumentazione

In questo studio è stato impiegato lo spettrometro FTIR Cary 630 con ottiche in ZnSe e il modulo ATR in diamante a riflessione singola; quest'ultimo è caratterizzato da una breve lunghezza del percorso che permette l'analisi di campioni di proteine a concentrazione relativamente elevata, inclusi campioni viscosi (Figura 1). L'acquisizione dei dati è stata effettuata con il software MicroLab Expert e i parametri mostrati in Tabella 1.



Figura 1. È stato utilizzato lo strumento FTIR Agilent Cary 630 con un modulo ATR in diamante a riflessione singola.

Tabella 1. Parametri sperimentali dello spettrometro FTIR Agilent Cary 630.

Parametro	Valore
Intervallo spettrale	Da 4.000 a 650 cm^{-1}
Scansioni del campione/fondo	140
Risoluzione	4 cm^{-1}
Fattore di riempimento zero	Nessuno
Apodizzazione	Triangolare
Correzione di fase	Mertz
Tecnologia di campionamento	ATR

Campioni: albumina sierica bovina (05470), lisozima (bianco d'uovo di gallina, L-6876), papaina (P4762), β -caseina (C6905) e mioglobina (M1882) sono stati acquistati presso Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'anticorpo monoclonale (mAb) è stato acquistato presso un distributore farmaceutico locale a Singapore. Il campione di mAb è stato concentrato utilizzando concentratori centrifughi Vivaspin 500 (cut-off del peso molecolare 10 kDa; Sartorius).

Preparazione del campione: albumina sierica bovina (BSA), mAb e papaina sono stati utilizzati alla concentrazione di 10 mg/mL. Lisozima, β -caseina e mioglobina sono stati utilizzati alla concentrazione di 25 mg/mL. Per la misura sono stati utilizzati 10 μL di ciascun campione di proteina. L'acqua ultra pura fresca è stata ottenuta con un sistema Milli-Q Integral dotato di cartuccia con membrana da 0,22 μm al punto d'uso (Merck Millipore). Lo spettro FTIR dell'acqua pura è stato sottratto dallo spettro FTIR delle soluzioni di proteina e, successivamente, è stato analizzato lo spettro risultante.

Analisi dei dati

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software MicroLab Expert (versione 1.1.0.1):

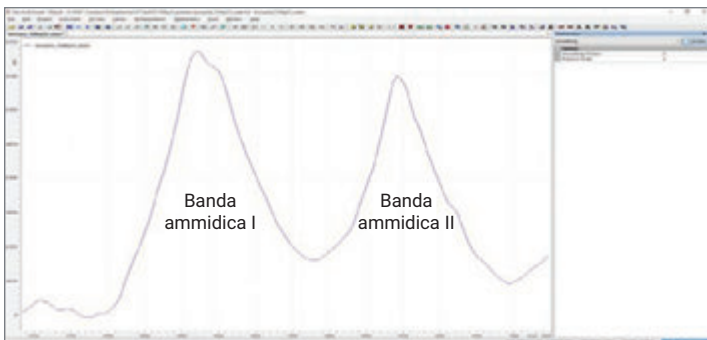
- Per l'elaborazione dei dati è stata utilizzata la media di tre misure degli spettri.
- Dalla media degli spettri è stato sottratto uno spettro del bianco (ossia acqua o soluzione tampone) tramite la funzione Subtract Spectra (Sottrai spettri) di Spectrum Arithmetic nella scheda Mathematics (Strumenti matematici).
- Gli spettri con sottrazione del bianco sono stati combinati tra loro tramite la funzione Merge View (Unisci vista) della scheda 2D View (Vista 2D).
- L'ulteriore smoothing è stato effettuato con una finestra di smoothing 9 e un polinomio di ordine 3 nella scheda Mathematics (Strumenti matematici).
- Per gli spettri derivati di secondo ordine è stata applicata una derivata seconda di Savitzky-Golay con finestra di smoothing 9 nella scheda Mathematics (Strumenti matematici).

Stima della struttura secondaria con la procedura di curve-fitting del software MicroLab Expert

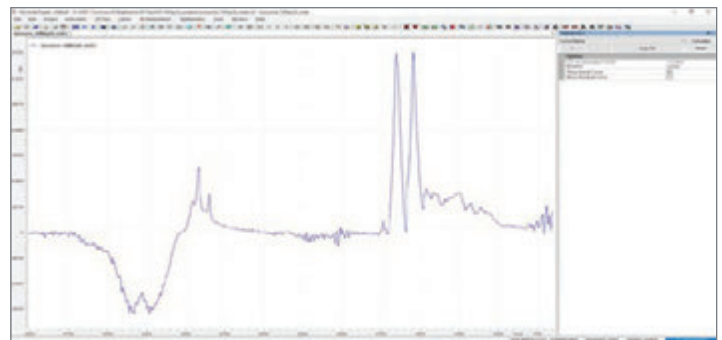
Mediante il menu Curve Fit (Interpolazione della curva) del software MicroLab Expert sono state effettuate le seguenti operazioni:

1. Esecuzione di una correzione della linea di base per la banda ammidica I (da 1.600 a 1.700 cm^{-1}) prima dell'applicazione del curve-fitting.
2. Attivazione dell'oggetto dati 2D da sottoporre a fitting.
3. Dal menu Mathematics (Strumenti matematici), selezione del comando **Curve Fit** (Curve-fitting).
4. Clic sul pulsante **Plus** (Più) per aggiungere un nuovo picco all'elenco dei picchi stimati.
5. Regolazione di tutti i parametri necessari nella scheda Mathematics (Strumenti matematici) (FWHM, posizione X e Y massimo).
6. Ripetizione a partire dal passaggio 3 fino a definire il numero ottimale di picchi.
7. Clic sul pulsante **Auto Fit** (Interpolazione automatica).
8. Clic sul pulsante **Calculate** (Calcola) per creare una nuova tabella con informazioni dettagliate sui picchi stimati.

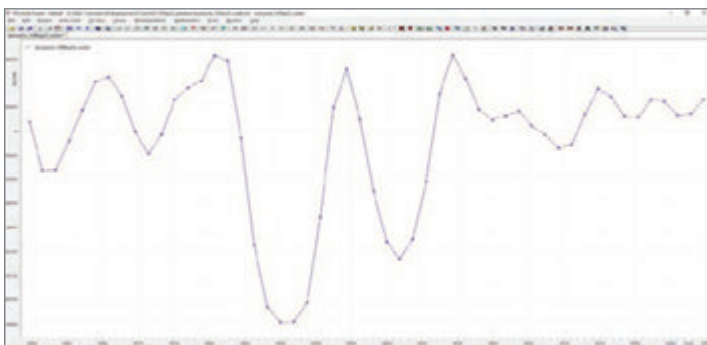
In Figura 2 è riportato un esempio di curve-fitting per il lisozima.



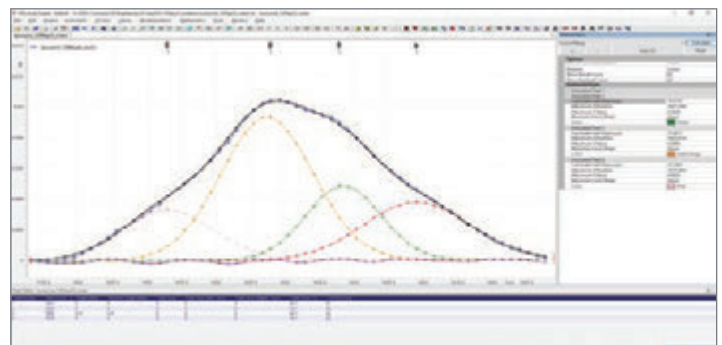
1 Risultato della sottrazione degli spettri medi dell'acqua dagli spettri medi del lisozima



2 Esecuzione di una correzione della linea di base per la banda ammidica I (da 1.600 a 1.700 cm^{-1})



3 Utilizzo di un filtro di Savitzky-Golay con una finestra di smoothing 9 per applicare una derivata seconda allo scopo di identificare picchi nascosti



4 Esecuzione del curve-fitting sullo spettro ottenuto nel passaggio 2, in particolare nell'intervallo spettrale tra 1.600 e 1.700 cm^{-1}

Figura 2. Stima della struttura secondaria di proteine con la procedura di curve-fitting del software MicroLab Expert Agilent. I contributi dei componenti alla struttura secondaria sono stimati calcolando l'area della banda del picco di ciascun componente.

I contributi dei componenti alla struttura secondaria della proteina sono stati calcolati utilizzando l'area della banda del picco di ciascun componente. Le strutture secondarie sono state assegnate in base alla Tabella 2. In considerazione delle diverse interazioni a legame a idrogeno tra proteine e dei diversi ambienti delle stesse, tutte le assegnazioni sono riportate come intervallo. Tenere presente la "larghezza a metà altezza" per l'uso futuro con lo stesso campione.

Tabella 2. Correlazione tra struttura secondaria e frequenza della banda ammidica I.⁴

Struttura	Frequenza ammidica I (cm ⁻¹)
α-elica	Da 1.648 a 1.660
Random	Da 1.640 a 1.648
Foglietto β	Da 1.625 a 1.640
Struttura cross-β	Da 1.610 a 1.628
Turn	Da 1.660 a 1.699

Un componente centrato tra 1.648 e 1.660 cm⁻¹ è stato assegnato alla struttura secondaria ad α-elica. Le bande nella regione compresa tra 1.625 e 1.640 cm⁻¹ sono in genere assegnate alla struttura a foglietto β (Tabella 2). La conformazione random coil presenta bande IR intorno a 1.643 e 1.649 cm⁻¹.

Risultati e discussione

Sono stati esaminati gli spettri infrarossi di sei proteine native caratterizzate da strutture secondarie note differenti: mioglobina (elicoideale), immunoglobulina G (foglietto), lisozima (elica), albumina sierica bovina (per la maggior parte elicoideale), papaina (mista) e β-caseina (disordinata). Il fitting dei picchi è stato effettuato sugli spettri dopo la sottrazione dell'acqua secondo la procedura descritta nella sezione relativa all'analisi dei dati (Figura 2). Una banda ammidica I fornisce informazioni limitate sui componenti sottostanti la struttura secondaria in quanto le ampiezze delle bande dei diversi componenti sono maggiori delle separazioni tra i rispettivi picchi. Per identificare i picchi nascosti si è fatto ricorso alla derivata seconda dello spettro come metodo per restringere le bande/migliorare il profilo dei picchi. In Figura 3 è mostrato un curve-fitting complessivo per le sei proteine oggetto dello studio. Nella regione della banda ammidica I dello spettro sono presenti vari picchi distinti.

L'area sotto la curva interpolata in uno spettro infrarosso, corrispondente alla banda ammidica I, è utilizzata per assegnare specifiche strutture secondarie, quali α-eliche e foglietti β. L'assegnazione si basa sugli intervalli di frequenza caratteristici, cui si fa riferimento in Tabella 2. L'analisi dell'area sotto la curva interpolata nella banda ammidica I consente di stimare le quantità relative di ciascuna struttura secondaria presente nella proteina.

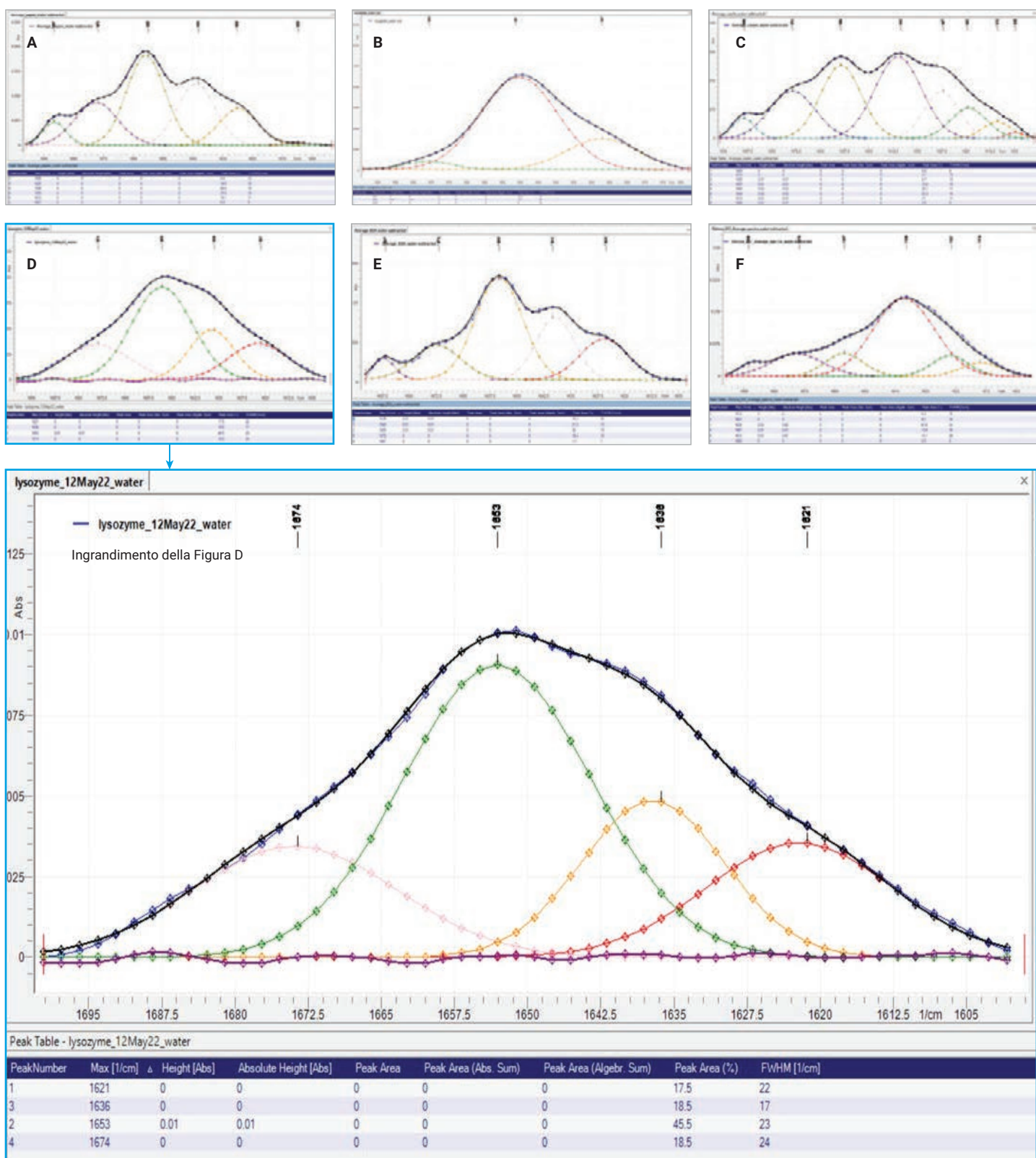


Figura 3. Curve-fitting per le sei proteine oggetto dello studio: (A) papaina (mista); (B) mioglobina (elicoidale); (C) β -caseina (disordinata); (D) lisozima (mista); (E) albumina sierica bovina (per la maggior parte elicoidale); (F) immunoglobulina G (foglietto). Nel riquadro blu è riportato l'ingrandimento del curve-fitting per il lisozima.

In Tabella 3 sono riassunti i risultati della quantificazione per le strutture secondarie α -elica, foglietto β , turn e random coil.

Tabella 3. Quantità relativa di strutture secondarie di proteine stimata tramite curve-fitting FTIR e confronto con gli studi tramite raggi X.⁵⁻⁷

Proteine	% di struttura							
	α -elica		Foglietto β		β -turn		Random coil	
	Raggi X	FTIR	Raggi X	FTIR	Raggi X	FTIR	Raggi X	FTIR
BSA	74 ⁽⁷⁾	38	3,1	18	1,4	23	20,6	21
Papaina	25 ⁽⁶⁾	36	21	39	4	6	50	19
β -caseina	n.d.	23	n.d.	22	n.d.	21	n.d.	34
Lisozima	45 ⁽⁵⁾	44	19	19	23	16	13	21*
IGG (rituximab)	3 ⁽⁵⁾	10	67	67	18	14	12	9
Mioglobina	85 ⁽⁵⁾	72	n.d.	23	8	5	7	n.d.

* Assegnato a struttura cross- β
n.d. = non definito

Gli spettri con sottrazione dell'acqua dell'immunoglobulina G (Figura 3F) presentavano un massimo molto intenso per la banda ammidica I in prossimità a 1.636 cm^{-1} ; ciò ne riflette l'alto contenuto di foglietti β confermato anche dagli studi tramite raggi X.⁵ Il picco a circa 1.636 cm^{-1} negli spettri dell'immunoglobulina G ammontava al 67% dell'area totale della banda ammidica I. Gli spettri infrarossi del lisozima con sottrazione dell'acqua mostravano una banda ammidica I relativamente stretta con un massimo in prossimità a 1.654 cm^{-1} , caratteristico delle proteine con un ingente contenuto di struttura secondaria α -elicoidale.⁵ Secondo la stima ottenuta tramite curve-fitting, il lisozima presentava una distinta componente α -elicoidale del 44% nella posizione della banda a 1.654 cm^{-1} e foglietti β in percentuale pari al 19%. La mioglobina esibiva una struttura secondaria prevalentemente α -elicoidale, oltre che la presenza di foglietti β . Anche proteine quali la BSA, la papaina e la caseina sono assegnate a componenti distinti della struttura secondaria. La struttura secondaria della BSA è sensibile a varie condizioni sperimentali, cosa che può dare luogo a variabilità

nella sua distribuzione strutturale. Fattori quali la temperatura, il pH e la presenza di tensioattivi possono incidere in misura significativa sulla struttura secondaria della proteina, incluso il contenuto elicoidale. L'interazione con le molecole d'acqua e la competizione per i legami a idrogeno possono destabilizzare la struttura elicoidale, sottolineando il delicato equilibrio delle interazioni che mantengono la stabilità della proteina. La cristallizzazione può aiutare a preservare la conformazione nativa della proteina grazie alla rimozione del solvente, il che spiega perché la forma più elicoidale della BSA si osserva in genere nel suo stato cristallino.⁷⁻⁹

In Tabella 3 sono riassunti i risultati della quantificazione in termini di percentuali di strutture secondarie α -elica, foglietto β , turn e random.

Conclusioni

La presente nota applicativa illustra un metodo per l'analisi della struttura secondaria di proteine in soluzione tramite spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier. È stato impiegato lo strumento FTIR Cary 630 con modulo ATR in diamante a riflessione singola in considerazione della breve lunghezza del percorso e della ridotta quantità di campione necessaria. L'analisi FTIR ha richiesto la risoluzione della banda ammidica I nei suoi componenti, obiettivo che è stato raggiunto tramite il software MicroLab Expert. Per stimare le quantità relative delle caratteristiche chiave della struttura secondaria è stato adottato un metodo di curve-fitting; i risultati ottenuti tramite l'analisi FTIR sono generalmente in accordo con quelli riportati in letteratura.

La capacità dello strumento FTIR Cary 630 di studiare la struttura delle proteine in maniera non distruttiva, abbinata alla facilità d'uso e alla minima preparazione del campione, suggeriscono il potenziale uso di questa tecnica per la valutazione rapida delle caratteristiche generali della struttura secondaria, oltre che come strumento per lo screening immediato di variazioni strutturali indotte sperimentalmente.

Bibliografia

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.

Ulteriori informazioni

- [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

Le informazioni fornite possono essere soggette a modifica senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Stampato negli Stati Uniti, 1° ottobre 2024
5994-7808ITE