

Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen mittels FT-IR Spektroskopie

Dr. Ronny Wirz

Analyse von Proteinstrukturen

1. Primärstruktur (Aminosäure-Sequenz): **Mass spec**



2. Sekundärstruktur: **CD, FTIR**

β -sheet: ordered in two parallel/antiparallel layers

random coil: chain without periodic structure

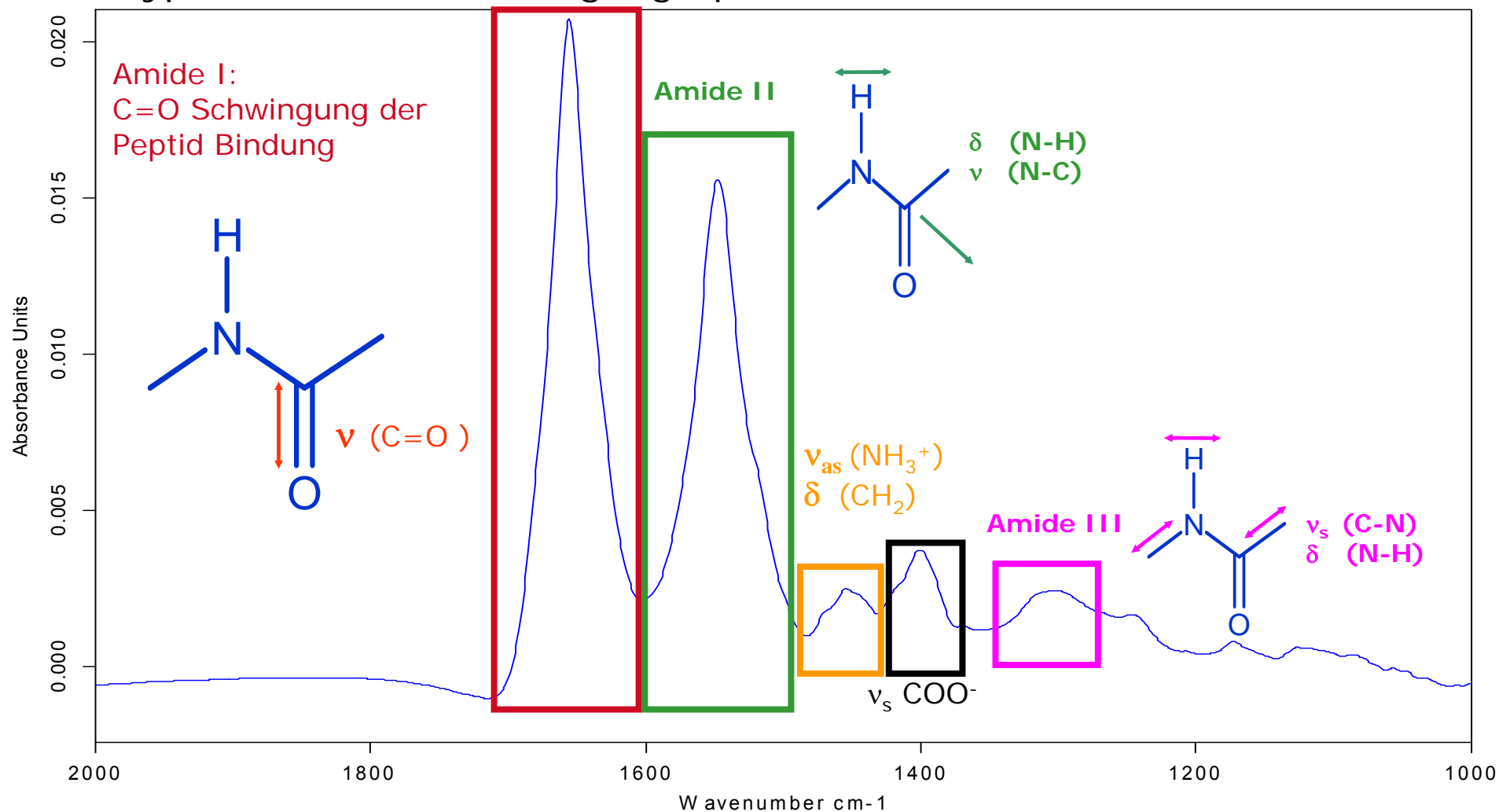
α -helix: screwed structure

⇒ Proportionen dieser drei Strukturtypen können mit FTIR bestimmt werden

3. 3d-Struktur: **NMR, X-ray**

IR Spektroskopie an Proteinen

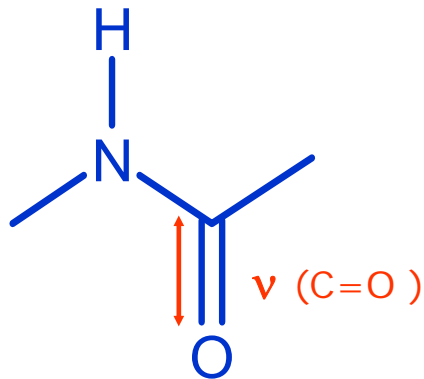
Typisches Proteinschwingungsspektrum



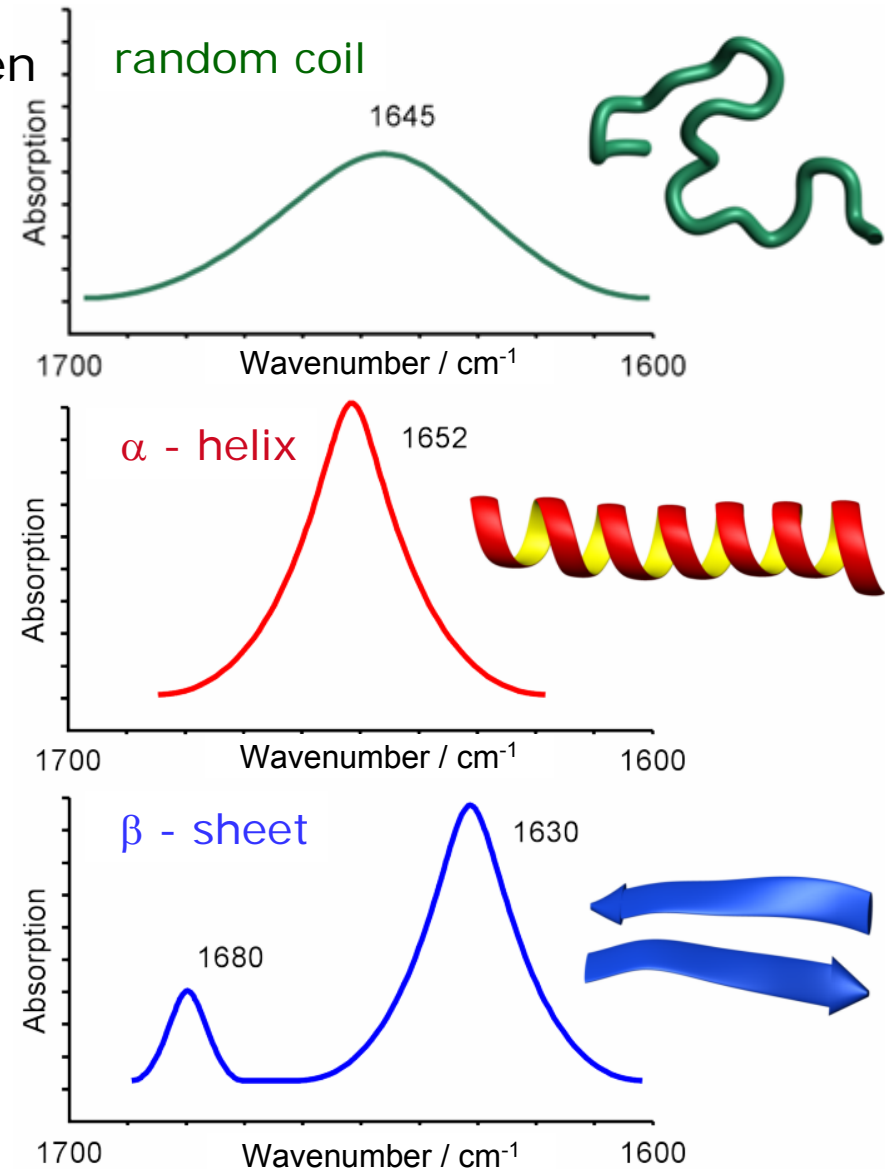
IR Spektroskopie an Proteinen

Typische Proteinschwingungsspektren

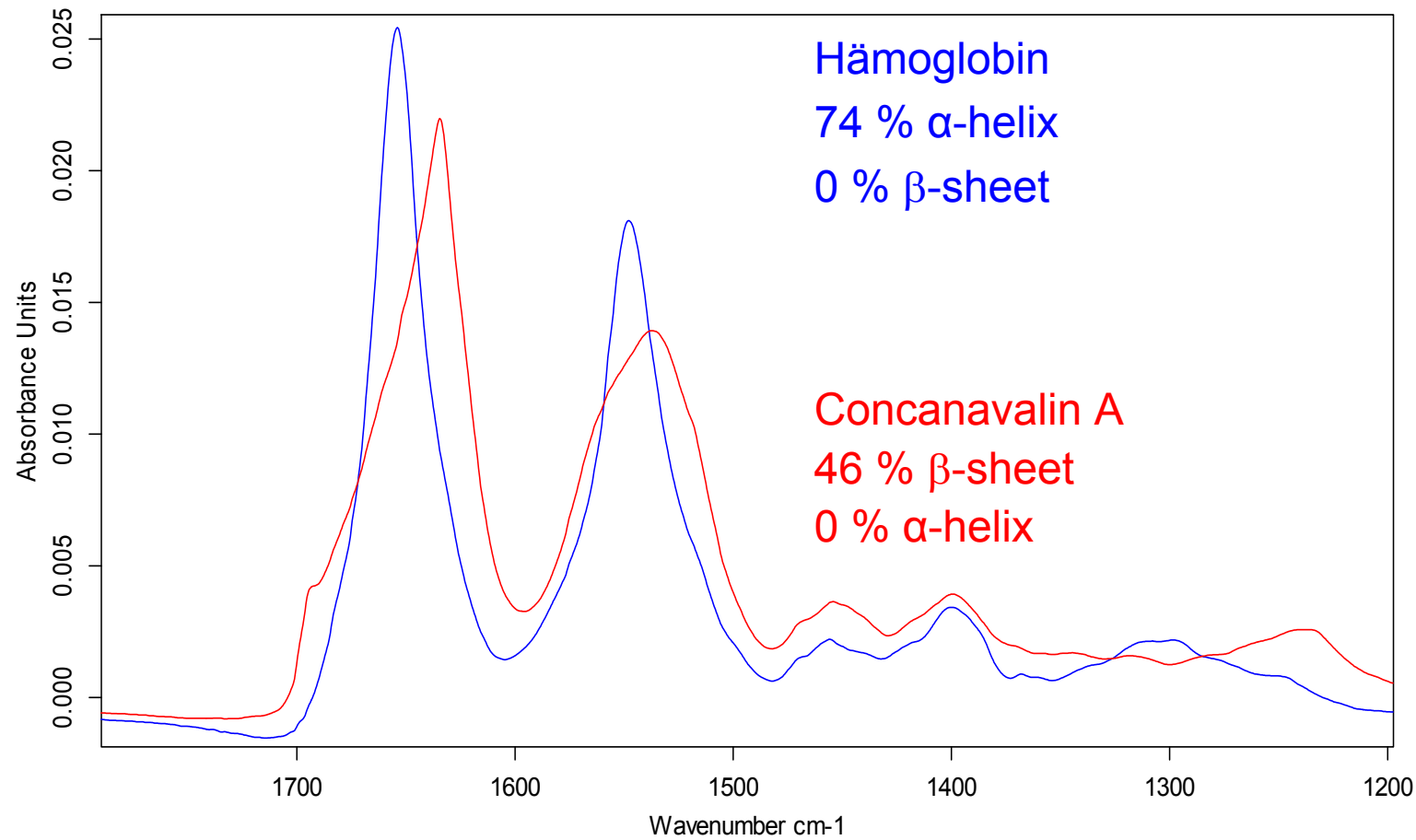
Amide I:
C=O Schwingung der
Peptid Bindung



...reagiert empfindlich
auf konformationelle
Änderungen!



Zwei Beispiele: Hämoglobin und Concanavalin



Typische IR Signale von Proteinen

Amide I (cm ⁻¹)	Protein type	
	H ₂ O-Soluble	Membrane
1. aggregated strands	~1615	
2. β-sheet	1620-1635	
3. irregular	1640-1650	
4. 3 ₁₀ -helix	~ 1640	
5. α-helix	1650-1658	1658-1662
6. 3 ₁₀ -helix	~ 1660	
7. turns&loops	1655-1685	
8. β-sheet (antiparallel)	1675-1695	
9. aggregated strands	~ 1685	

Fabian, H. & Schultz, C.P. (2000) "Fourier transform infrared spectroscopy in peptide and protein analysis". In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Ed.: Meyers, R.A., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 5779-5803

IR Spektroskopie von Proteinen in wässriger Lösung

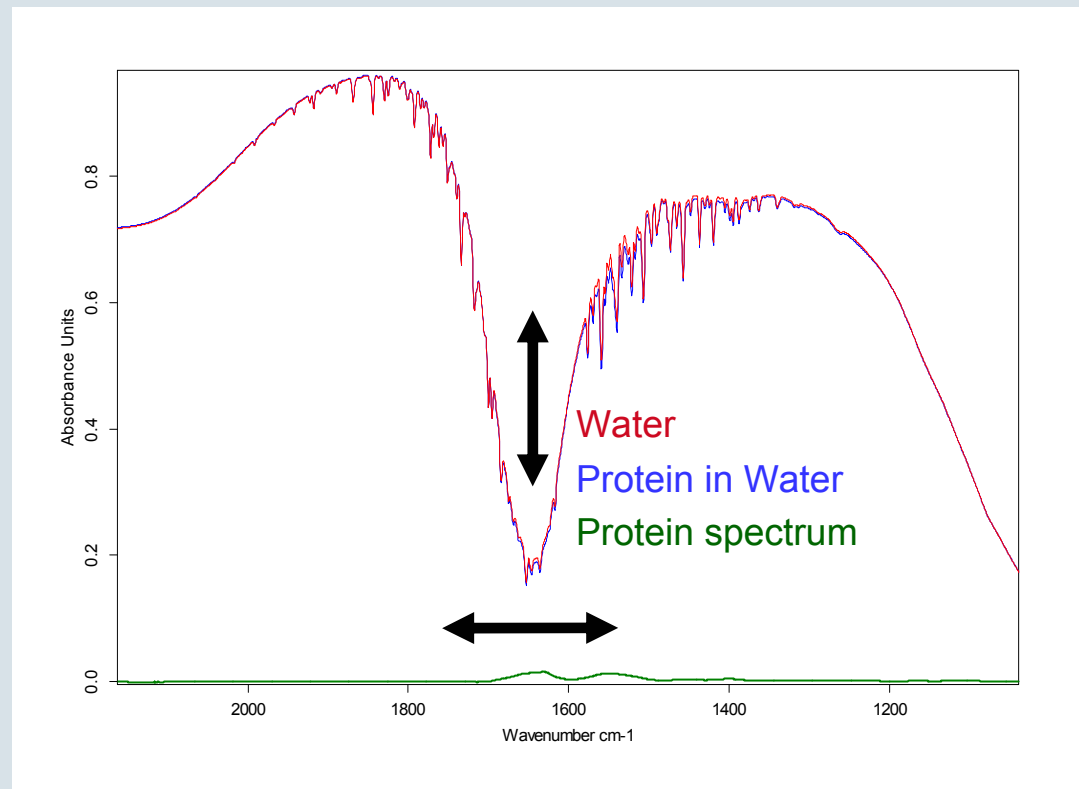


Problem:

Absorption des IR Lichts durch Wasser und Wasserdampf überdeckt das Proteinsignal.

Voraussetzungen zur Proteinmessung:

- Konstante Temperatur ($< 0.1\text{K}$)
- Stabilität des opt. Weges ($< 0.1\% \approx 7\text{ nm}$)
- geschlossenes System



Anwendungen

AquaSpec:

Durchfluss Transmissionszelle

- ❖ Konzentrationsbestimmung
- ❖ Sekundärstrukturbestimmung
- ❖ Stabilitätsuntersuchungen
- ❖ Quantifizierung von strukturellen Änderungen/Denaturierung
- ❖ Protein-Ligand / Protein-Protein Wechselwirkungen



Bio ATR II Zelle:

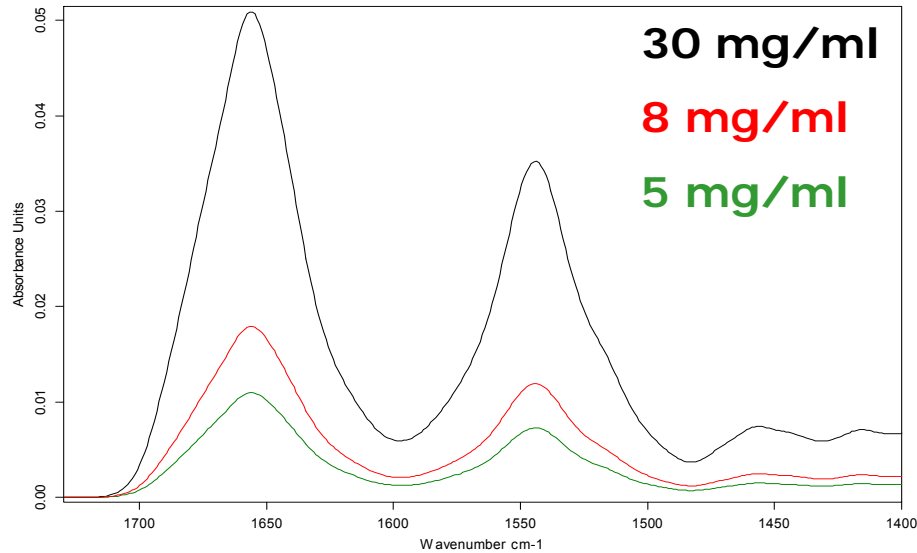
- ❖ Temperaturrampen Experimente
- ❖ Aggregationsprozesse
- ❖ Untersuchung von Membranproteinen



Bestimmung der Konzentration und Sekundärstruktur



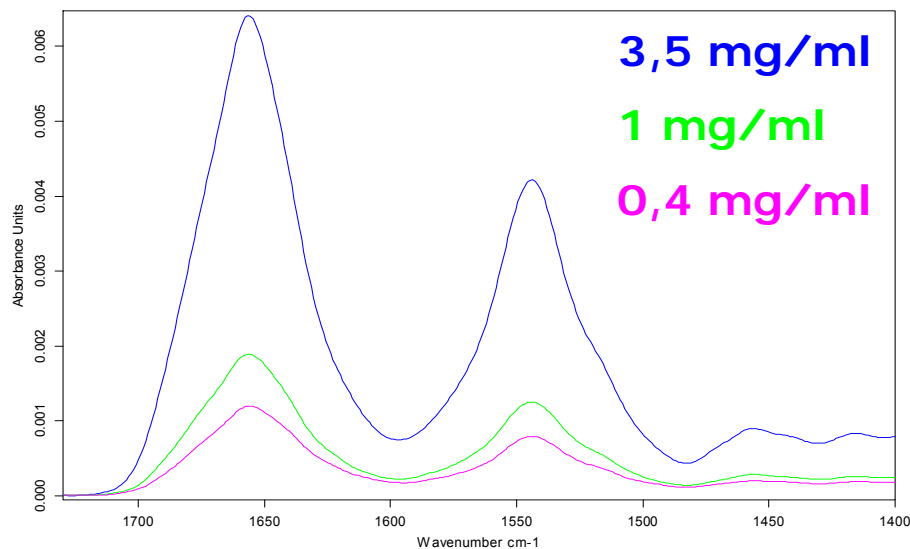
Messung verschiedener Konzentrationen



Lysozym in H₂O

Optische Auflösung: 4 cm⁻¹

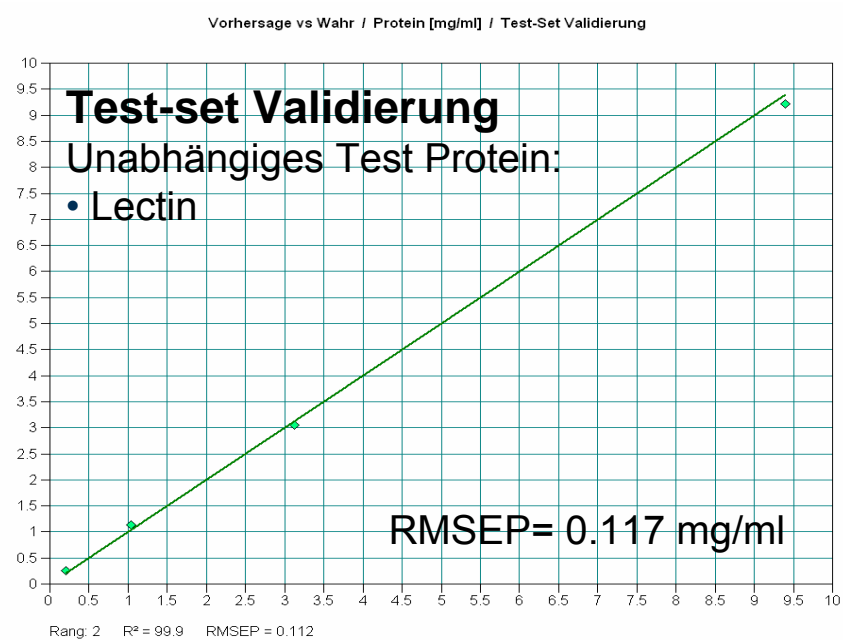
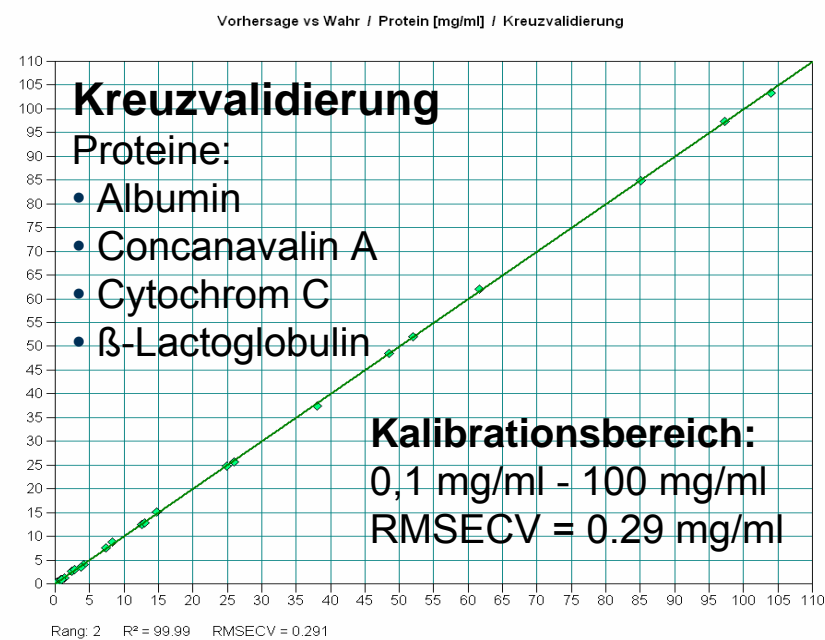
Messzeit/Probe: 25 sec



**Konzentration proportional
zu Absorption (Lambert-Beer)**

**Konzentrationen über 3
Größenordnungen messbar!**

Auswertung: Proteinkonzentration

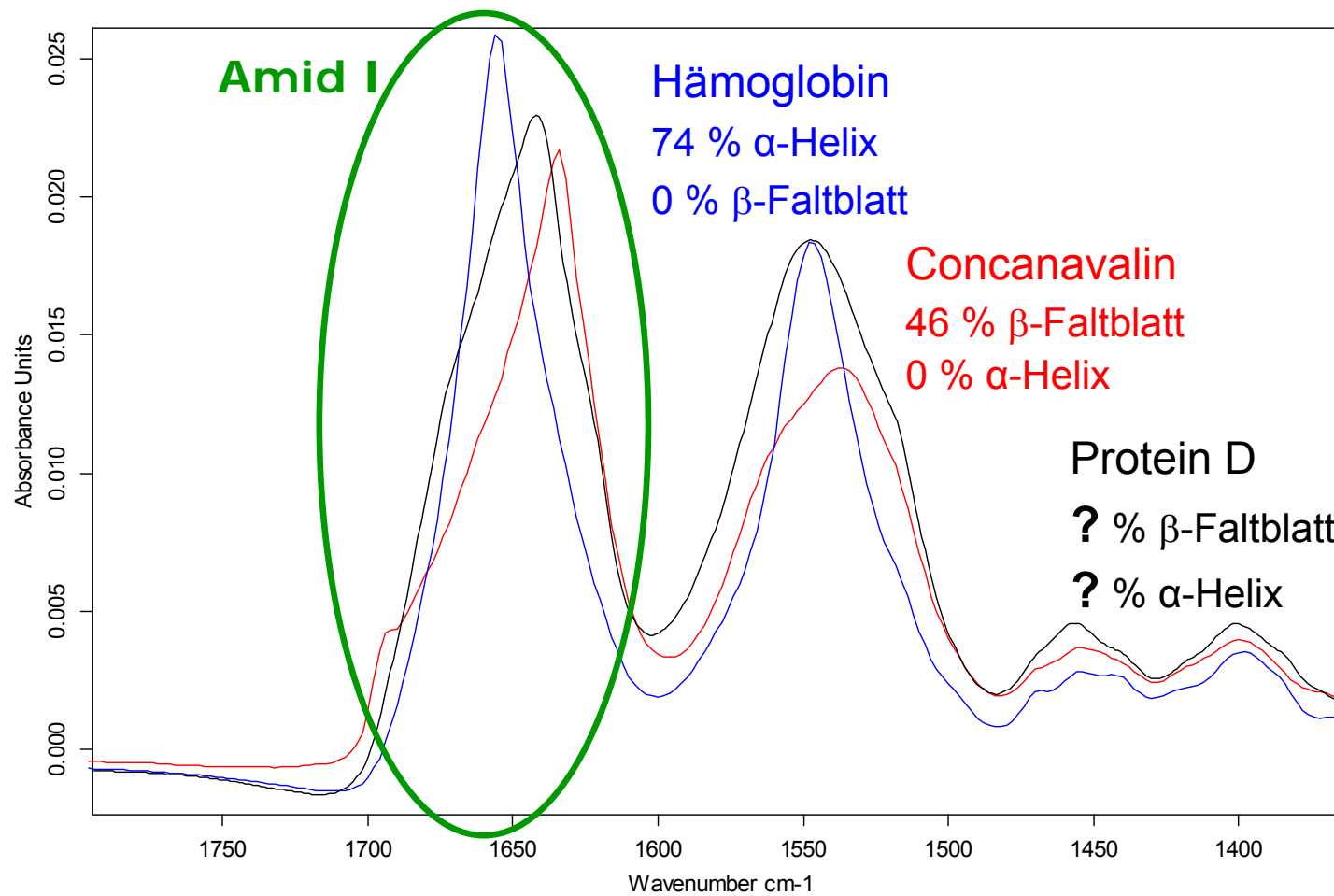


- ➔ **Direkte Messung eines breiten Konzentrationsbereichs ohne Verdünnung!**
- ➔ **Konzentrationsbestimmung unabhängig von Proteingröße und Struktur!**
- ➔ **Kalibration aus Concanavalin, Albumin, Cytochrom C, β -Lactoglobulin und Lectin verfügbar (0,1 mg/ml - 100 mg/ml)**
- ➔ **Einfache Erstellung eigener Kalibrationen mit Quant 2 (PLS Modelle)**

CONFOCHECK: Sekundärstrukturbestimmung



Bestimmung der α -Helix und β -Faltblatt-Anteile

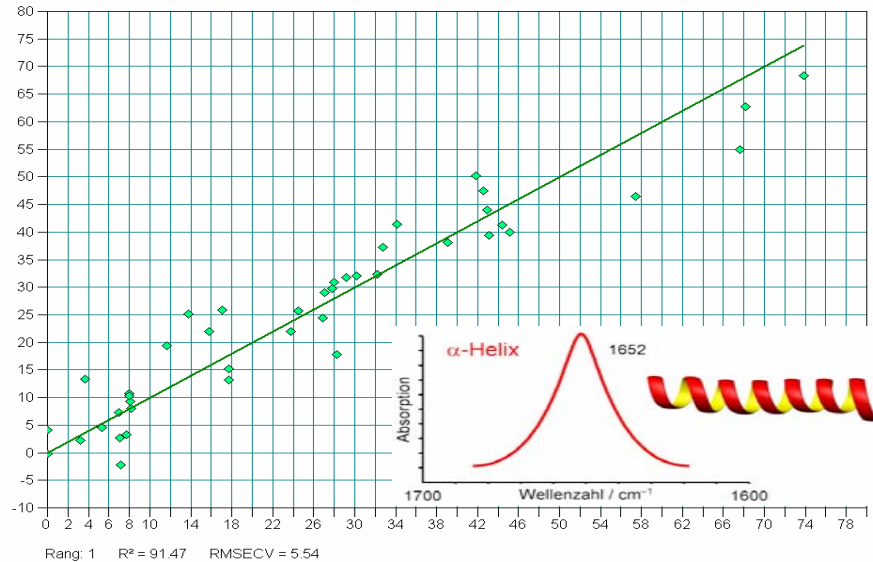


Auswertung: Sekundärstruktur

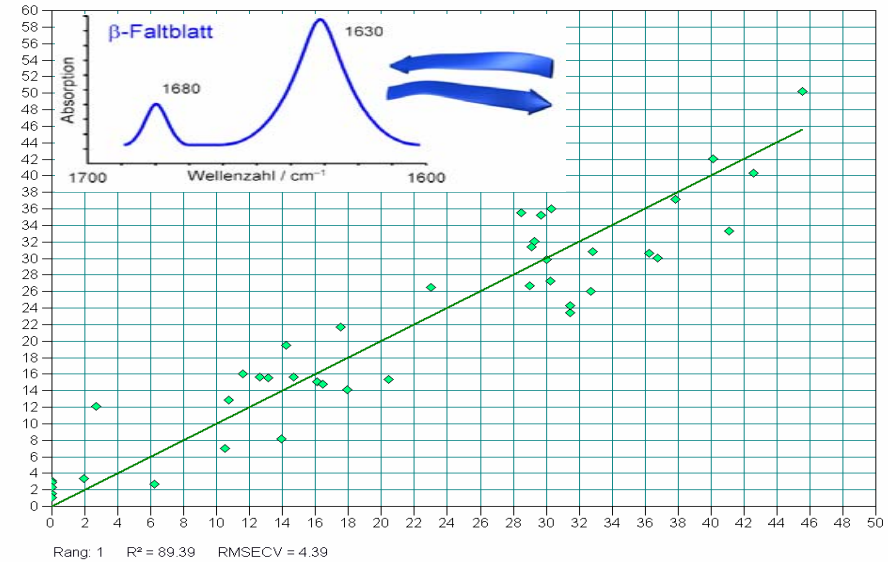


Proteinbibliothek (43 Proteine)

Vorhersage vs Wahr / alpha-helix [%] / Kreuzvalidierung



Vorhersage vs Wahr / beta-sheet [%] / Kreuzvalidierung



α - Helix

Kalibrationsbereich: 0 - 75 %

Vorhersagefehler: 5,5 %

β - Faltblatt

Kalibrationsbereich: 0 - 48 %

Vorhersagefehler: 4,4%



Struktur jedes Proteins automatisch mit PLS-Kalibration bestimmt

Protein D (Lambda-Phagen-Hüllprotein)

	Probenname	Komponente	Vorhersage	Einheit	Außen	Mah. Dist.	Grenze	Ausreißer
1	ProteinD_1mg_ml	alpha-Helix	11.272	%		0.2	0.47	
2	ProteinD_5mg_ml	alpha-Helix	9.6539	%		0.23	0.47	
3	ProteinD_20mg_ml	alpha-Helix	10.347	%		0.14	0.47	
4	ProteinD_1mg_ml	beta-Sheet	43.048	%		0.37	0.4	
5	ProteinD_5mg_ml	beta-Sheet	39.297	%		0.21	0.4	
6	ProteinD_20mg_ml	beta-Sheet	38.667	%		0.19	0.4	

Ergebnis: 10 % α -Helix und 39 % β -Faltblatt

Ergebnisse sind unabhängig von der Protein-Konzentration!

Methode auch für Membranproteine anwendbar!

Formulierung von Protein-Wirkstoffen



Typische Vorgehensweise:

1) AquaSpec (Messung in Transmission):

- Vergleich der FTIR-Spektren verschiedener Formulierungen oder verschieden „gestresster“ Formen einer Formulierung (Differenzspektren)
- Vermessung verschiedener Mischungen von denaturiertem und „gesundem“ Protein
→ Erstellung eines **eigenen** PLS-Modells zur automatischen Quantifizierung von Strukturänderungen



2) BioATR II (Messung in Reflexion):

- Temperaturrampen: Bestimmung des Schmelzpunktes und Analyse der Denaturierung
- Denaturierung bei bestimmter Temperatur; Vergleich der zeitlichen Verläufe bei verschiedenen Formulierungen



Automatisierte Quantifizierung von Strukturänderungen

Problem:

Strukturänderung eines Proteins soll quantifiziert werden

Vorteile der IR-Spektroskopie:

- ❖ Anwendbar auf alle Proteine unabhängig von deren Struktur oder Größe
- ❖ Keine Verdünnung notwendig im Gegensatz zu chromatographischen Methoden
- ❖ Keine Einschränkung durch Puffer oder Salze
- ❖ Schnell (Analyse innerhalb ~1 min)
- ❖ Wenig Probe notwendig (30 µg)



Automatisierte Quantifizierung von Strukturänderungen

Kalibration am Beispiel eines Antikörper-Proteins (IgG):

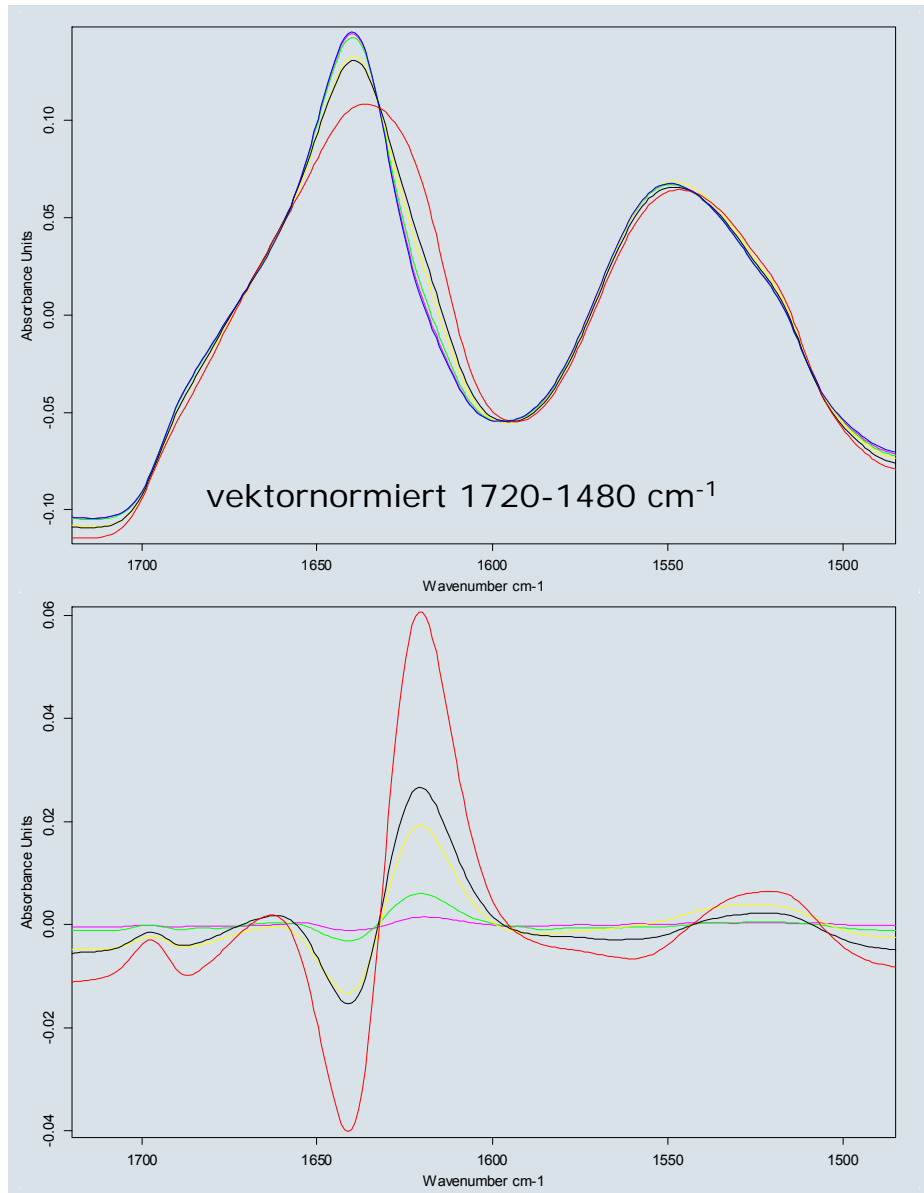
- IgG-Lösung in Formulierungspuffer, nativ,
- IgG-Lösung in Formulierungspuffer, gestresst (3h bei 50° C)
- 6 Mischungen der nativen und der gestressten IgG-Lösungen (1:1, 2:1, 6:1, 24:1)
- Referenz: Formulierungspuffer (Placebo)

Messparameter:

- Auflösung: 4 cm⁻¹
- Messzeit / Probe: 25 sec



Kalibrations-Messungen



➤ 1. Messung: Kalibrationsspektren

➤ 2. Vektornormierung des Proteinsignals (1720 - 1480 cm⁻¹)

→ Vektornormierung macht Analyse-methode unabhängig von der Konzentration

Nativ
Gestresst
 Mischung Nativ/Gestresst 1:1
Mischung Nativ/Gestresst 2:1
Mischung Nativ/Gestresst 6:1
Mischung Nativ/Gestresst 24:1

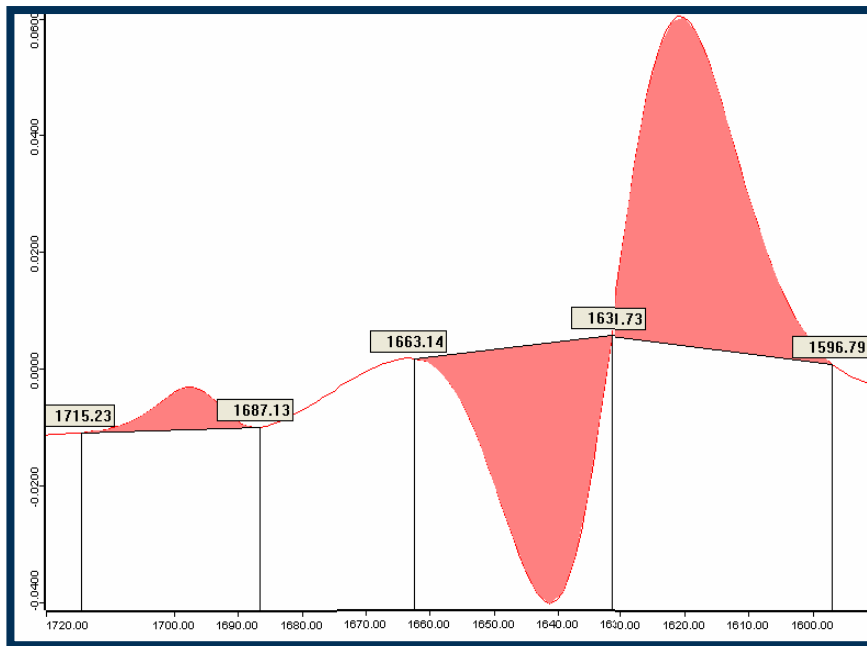
➤ 3. Berechnung der Differenzspektren

Proben 2-6 (denaturiert) minus Probe 1 (nativ)

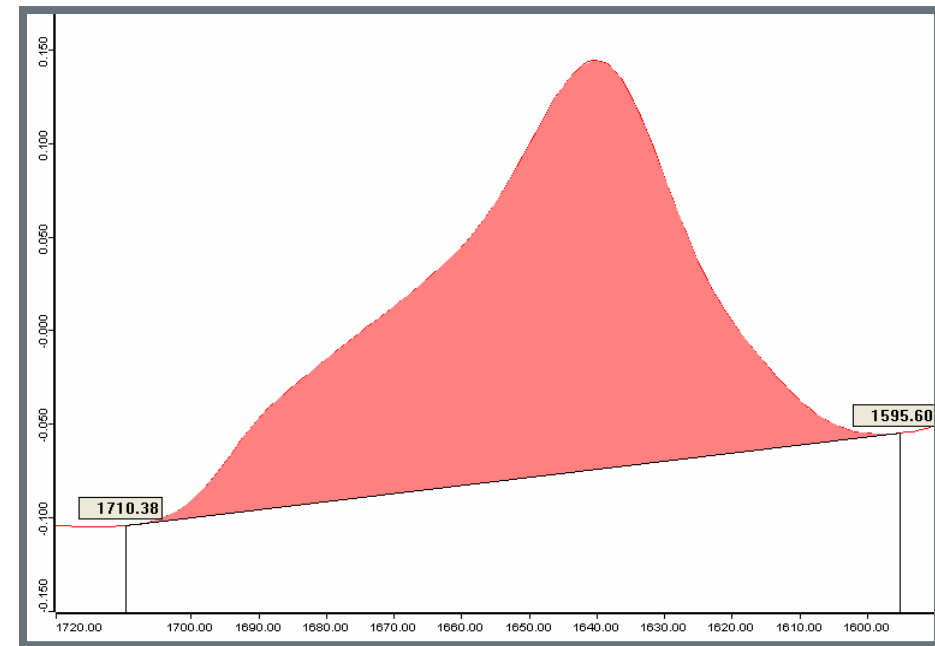
Bestimmung der Referenzwerte



1. Integration des Differenzsignals



2. Integration des Ausgangssignals



3. Berechnung der Konformationsänderung ΔK aus dem Verhältnis von Differenz- zu Ausgangssignal \rightarrow Referenzwerte für die Kalibrierung

$$\Delta K = \frac{\int \text{Amid I Differenz Stress} - \text{Nativ}}{2 \cdot \int \text{Amid I Nativ}} \cdot 100\%$$

Erstellung der Kalibration



Multivariate Kalibration unter Verwendung der Ausgangsspektren und der errechneten Referenzwerte (OPUS/Quant)

Kalibrationsbereich

0 - 16% Denaturierung

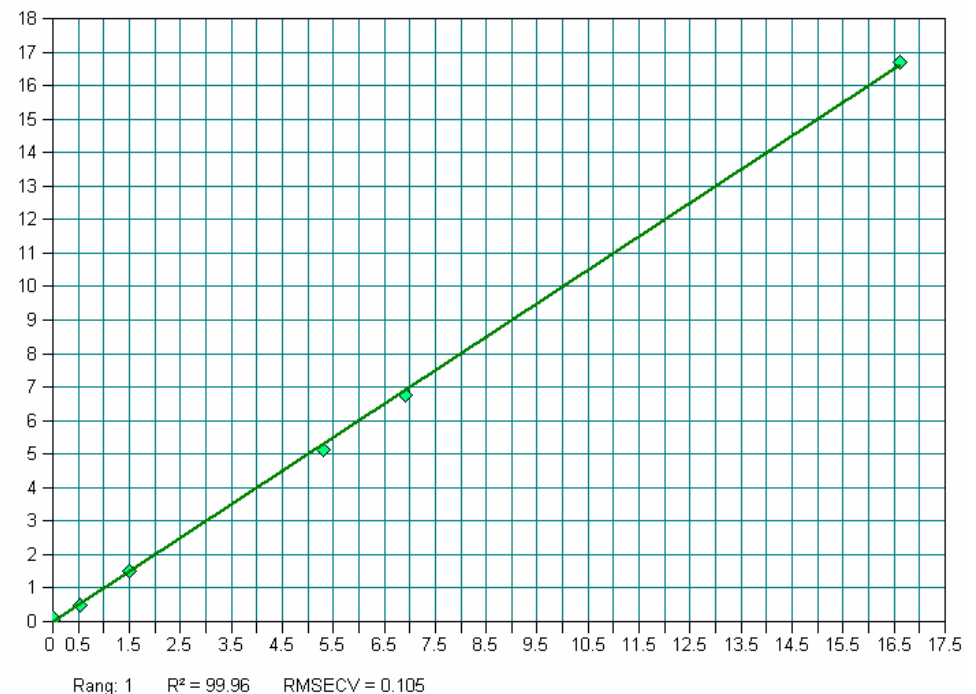
Bestimmungskoeffizient

$R^2 = 99.96$

Fehler der Kreuzvalidierung

RMSECV = 0.1%

Vorhersage vs Wahr / IgG-Aggregate [%] / Kreuzvalidierung

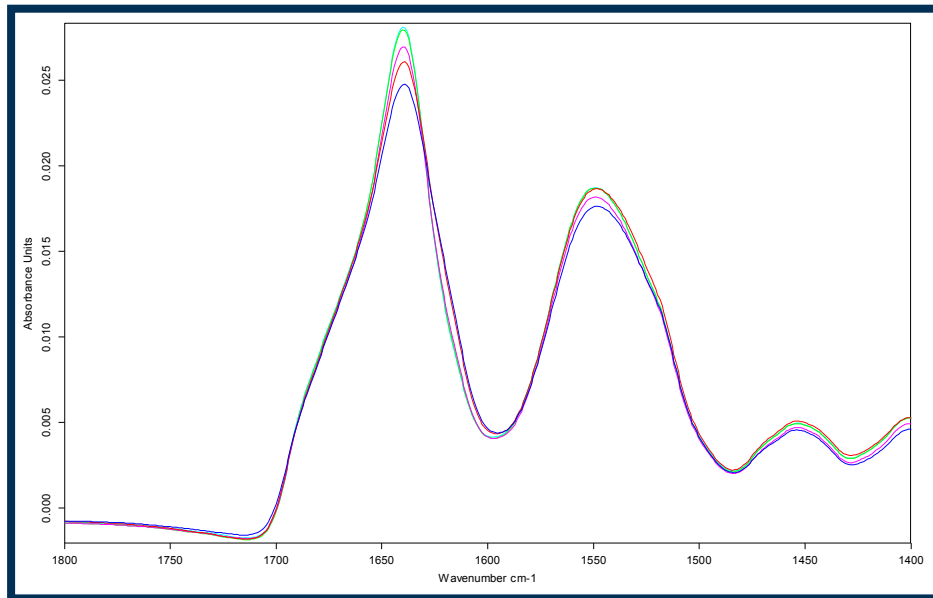


➡ ***Kalibration dient der automatischen Bestimmung von Aggregaten in unbekanntem Proben !***

Auswertung per Knopfdruck



OPUS/Quant 2: Analyse unbekannter Proben (% Änderung)



1. Messung Probenspektren

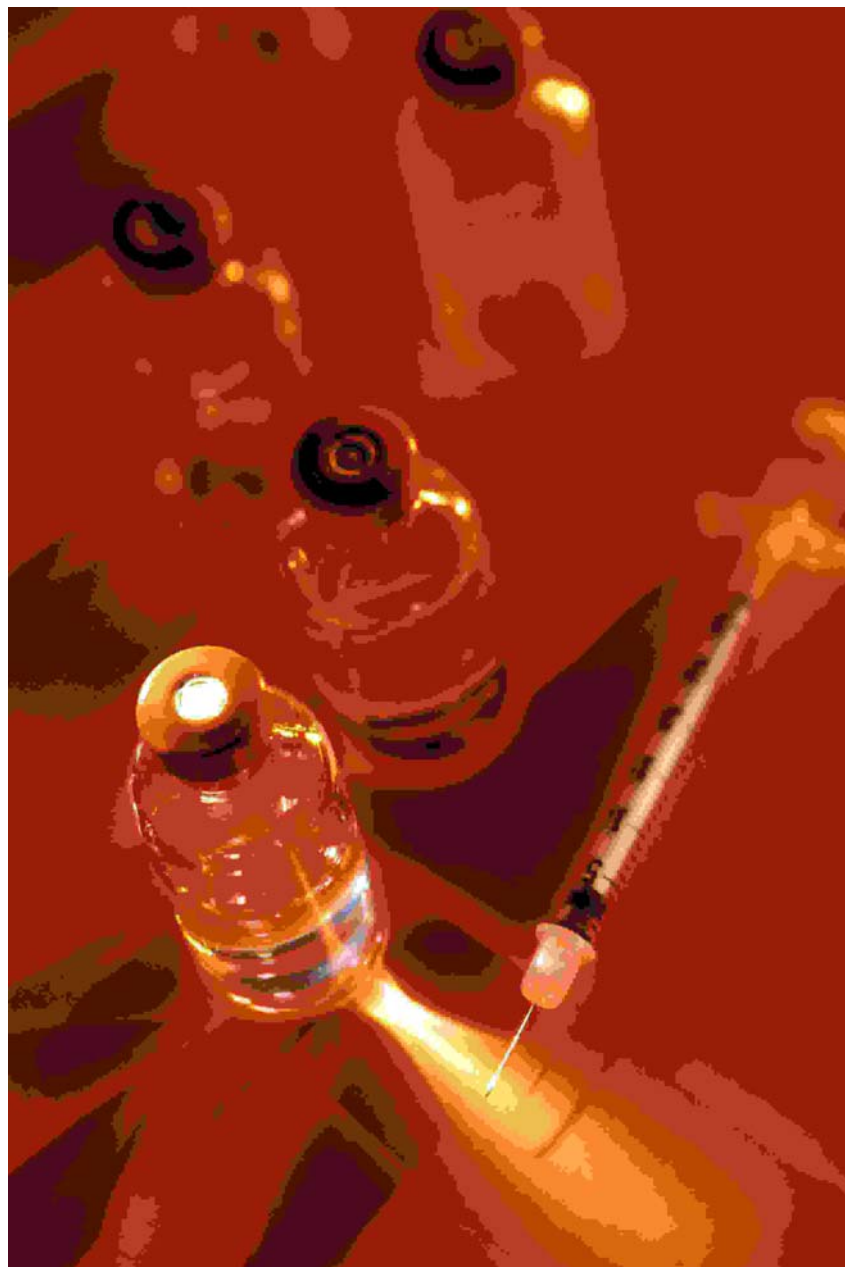
	Dateiname	Wahr	Vorhersage	Differenz
1	IgG-denat1.0	16.6256	16.71	-0.0829
2	IgG-denat2.0	6.90981	6.753	0.156
3	IgG-denat3.0	5.29916	5.141	0.158
4	IgG-denat4.0	1.50358	1.493	0.0111
5	IgG-denat5.0	0.524089	0.4729	0.0512
6	IgG-nativ.0	0	0.1223	-0.122
7	IgG-1-Av.0	0	0.0416	-0.0416
8	IgG-1-filtriert-	0	0.1082	-0.108

2. Analyse per Knopfdruck

- ➡ *Automatische Bestimmung der Strukturänderung in unbekanntem Proben mit Hilfe der Quant 2 Methode !*
- ➡ *Analyse innerhalb 1 Minute!*

Schmelzkurven

Bestimmung des Schmelzpunktes und Analyse der Denaturierung



IR- Messung von Temperaturrampen



Messzubehör:

Bio-ATR II

Probenvolumen: 20 μ l

Messparameter:

Auflösung: 4 cm^{-1}

Messzeit: 50 sec



Software automatisierte Temperaturrampen:

25 - 55° C, $\delta T = 10\text{K}$

55 - 95° C, $\delta T = 2\text{K}$

Protein Dynamics

Grundeinstellungen | Temperatursteuerung | Messung | Anzeige | Justiermodus

Temperatursteuergerät
Thermostat: Haake DC 30/K20
Serielle Schnittstelle: COM1 Vordefinierte Schnittstellenparameter verwenden

Temperaturcharakteristik
Temperaturmodus: Temperature Ramp (2 Temp-Ranges)

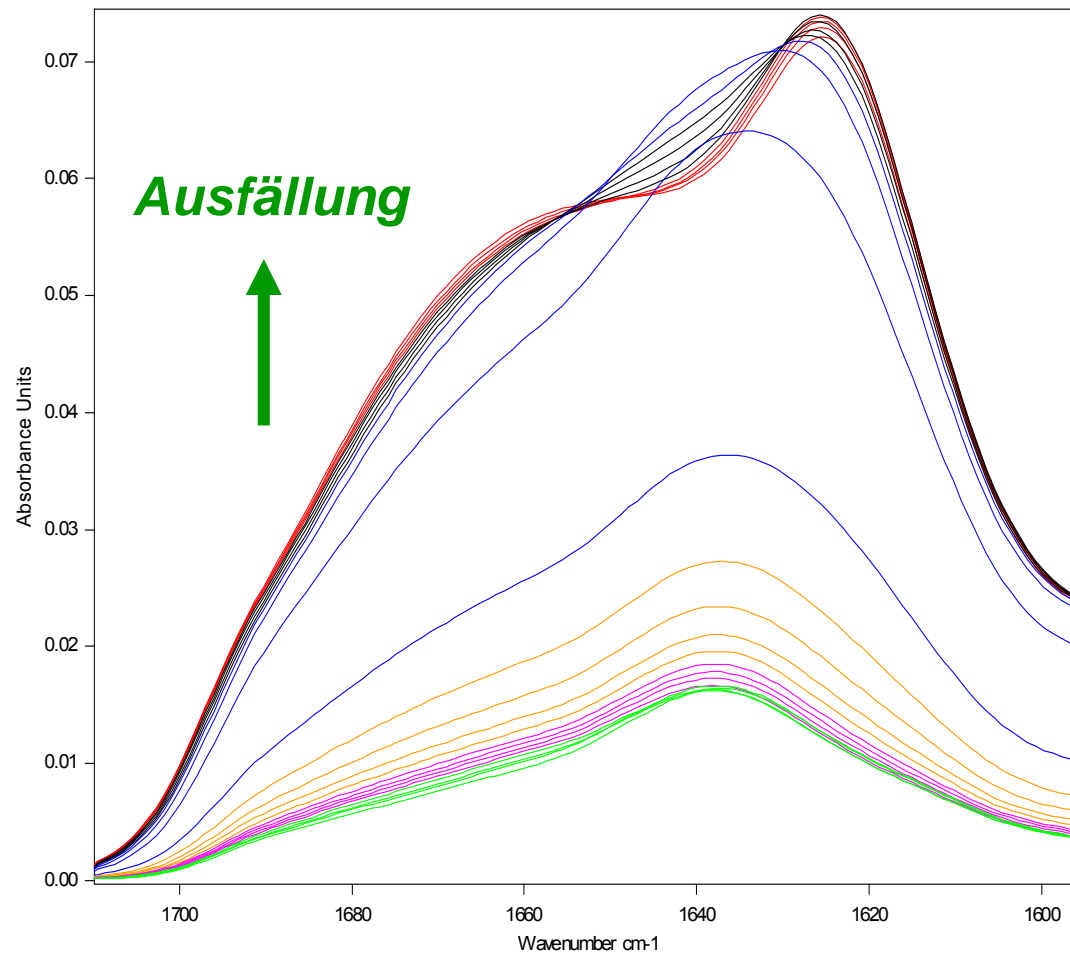
	Start temp. °C	Delta T °C	End Temp. °C	Äquilibrierungszeit sec
Temperatur Bereich 1	25	10	55	90
Temperatur Bereich 2	55	5	95	60

Temp. Rampe (auch bei Abkühlung) Start Temp. setzen

IR- Messung von Temperaturrampen



Probe: Therapeutischer Antikörper



Temperaturrampe:

25 - 55°C

57 - 63°C

65 - 71°C

73 - 79°C

81 - 87°C

89 - 95°C

$\delta T=10K$

$\delta T=2K$

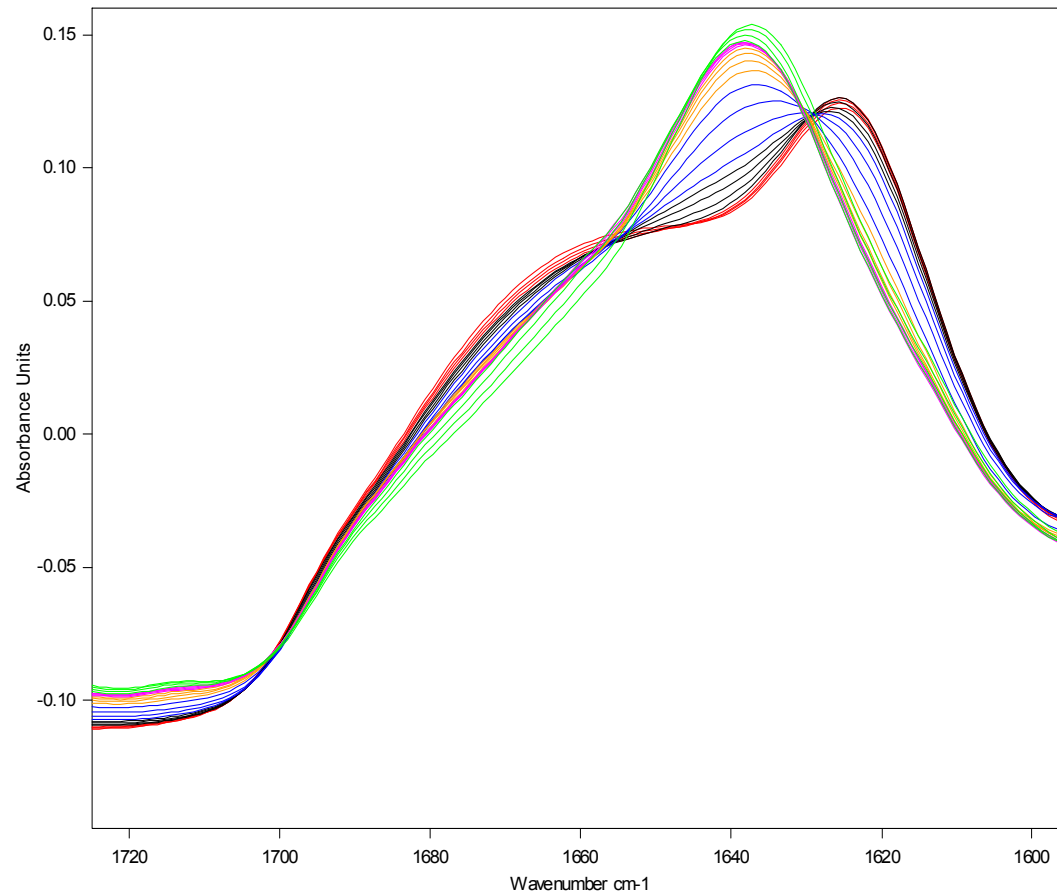
Spektren Offset-korrigiert

Anstieg der spektralen Intensität während des Denaturierungsprozesses durch Ausfällung

IR- Messung von Temperaturrampen



Auswertung: Temperaturinduzierte Konformationsänderungen eines therapeutischen Antikörpers



Temperaturrampe:

25 - 55°C

57 - 63°C

65 - 71°C

73 - 79°C

81 - 87°C

89 - 95°C

$\delta T = 10K$



$\delta T = 2K$

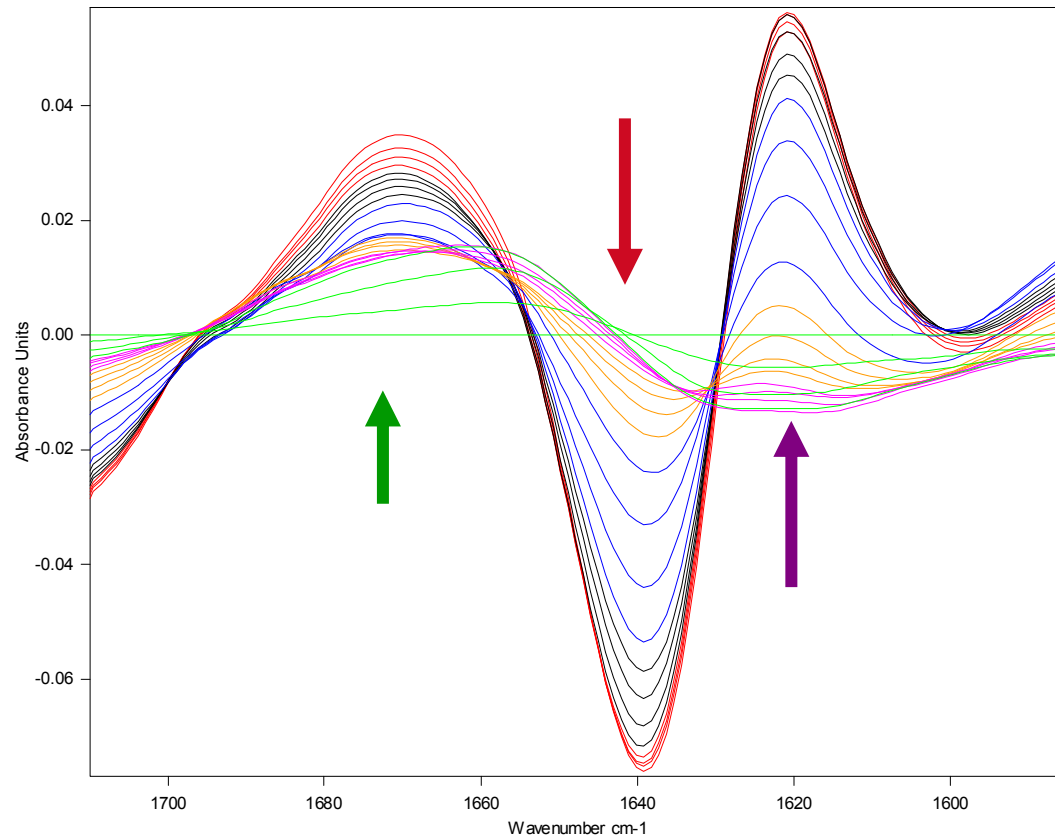
Spektren vektornormalisiert

Änderung der Bandenform liefert Information zur Umwandlung der Konformation → siehe Differenzspektren nächste Folie

IR- Messung von Temperaturrampen



Temperaturinduzierte Konformationsänderungen eines therapeutischen Antikörpers: Differenzspektren gegen Ausgangszustand



Temperaturrampe:

25 - 55°C

57 - 63°C

65 - 71°C

73 - 79°C

81 - 87°C

89 - 95°C

$\delta T=10K$

$\delta T=2K$

Bestimmung der Konformationsänderung:

Abnahme der nativen β -Faltblattstruktur

Bildung intermolekularer β -Faltblattstrukturen

Zunahme ungeordneter Struktur

IR- Messung von Temperaturrampen

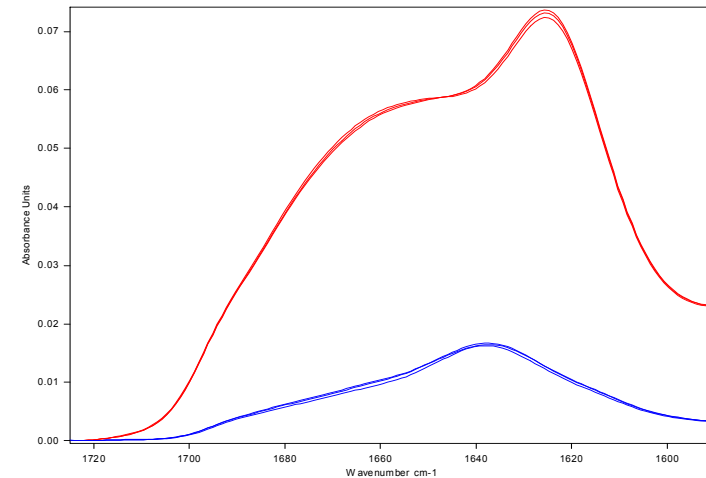


Auswertung: Schmelzkurve eines therapeutischen Antikörpers

(Erstellung einer Schmelzkurve mit Hilfe multivariater Datenauswertung)

1. Verwendung der Rampen-Spektren ohne Strukturänderung (= vor und nach der Umfaltung) zur Methodenerstellung:

25°C - 45°C 0% Umfaltung
91°C - 95°C 100% Umfaltung

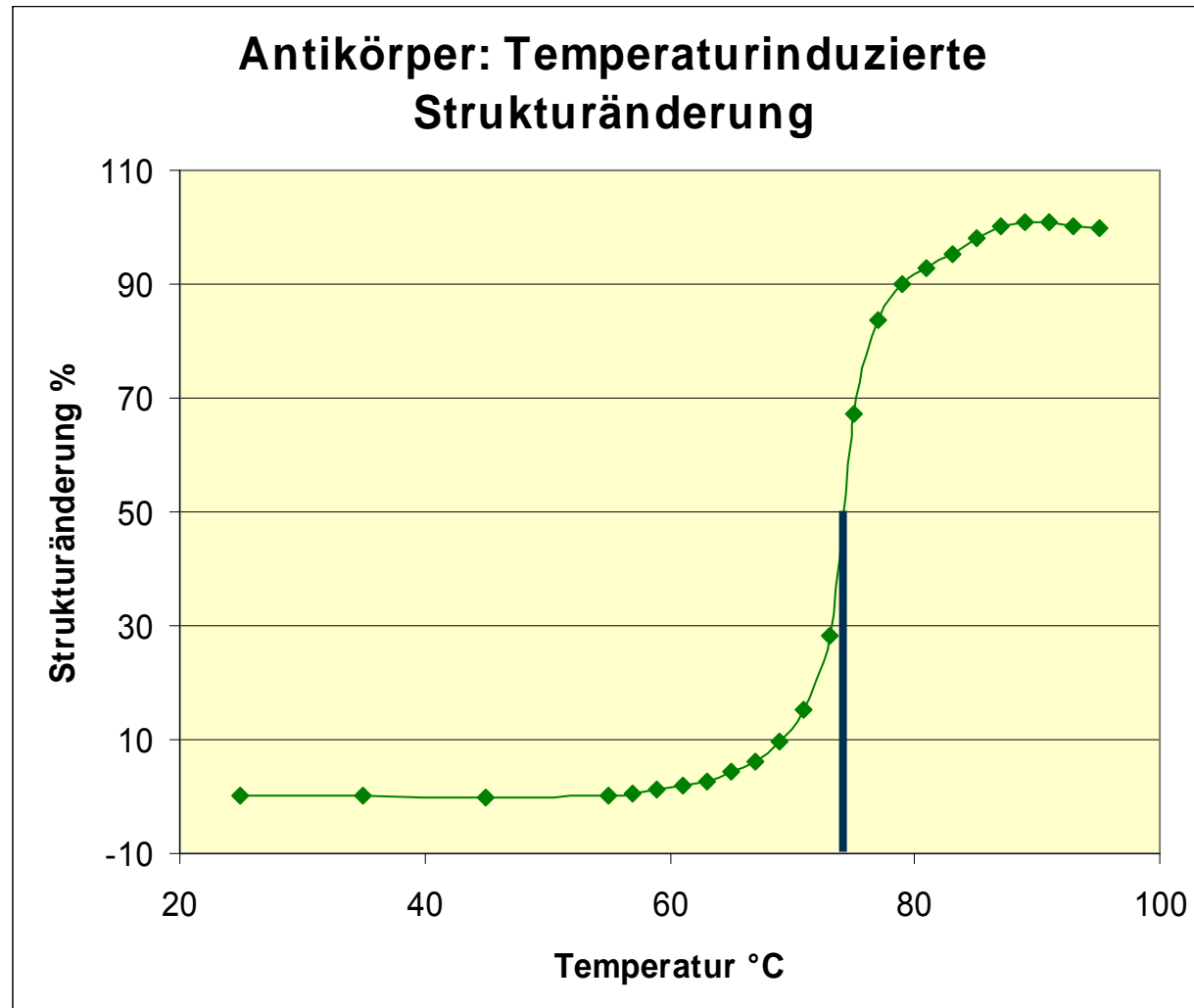


2. Analyse aller Rampen-Spektren mit Hilfe der oben erstellten Kalibration
3. Auftragung der Analysenwerte gegen die Messtemperatur (z.B. MS Excel) → Diagramm siehe nächste Folie

IR- Messung von Temperaturrampen



Auswertung: Schmelzkurve eines therapeutischen Antikörpers



$$T_{1/2} = 75 \text{ °C}$$

Schmelzpunkt abhängig von Formulierung!



Konformationsänderungen durch Liganden-Bindung



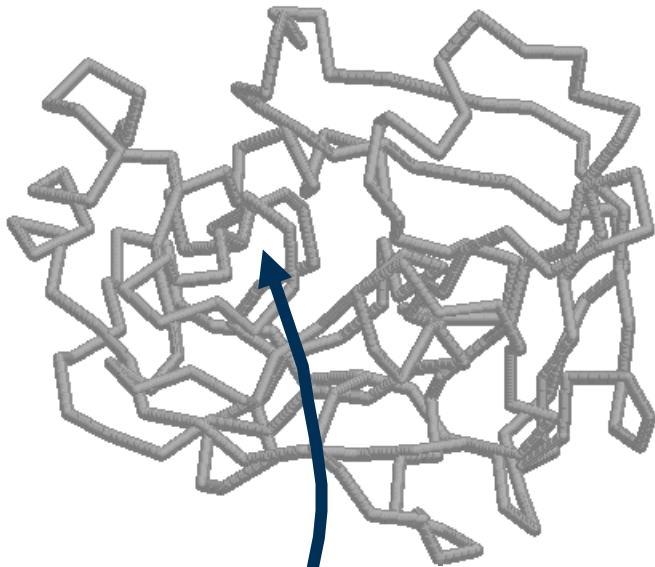


Protein-Liganden-Bindung

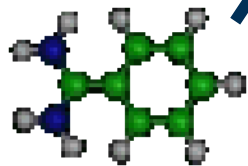
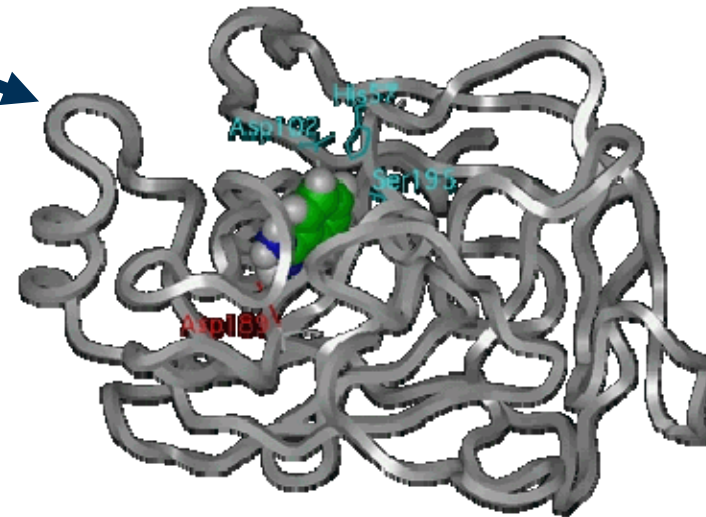


Trypsin: Interaktion mit Liganden

Protein: Trypsin



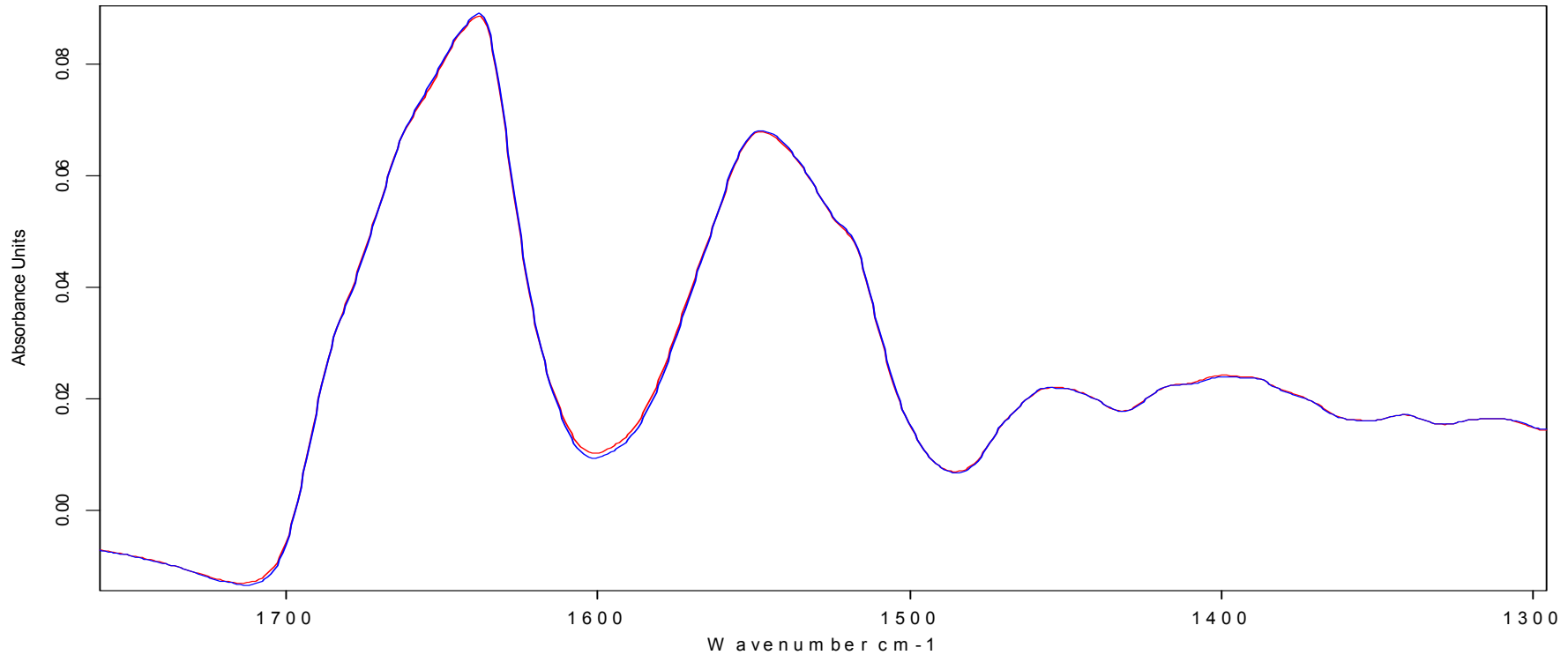
Trypsin-Benzamidin Komplex



Ligand: Benzamidin



Ligand: Benzamidin



Blau: Trypsin

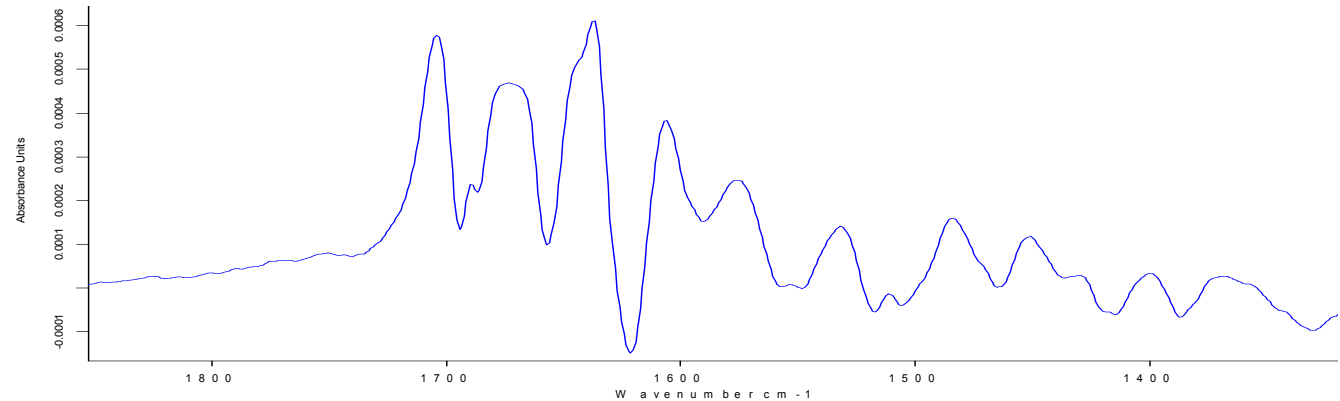
Rot: Trypsin nach Zugabe von Benzamidin



Trypsin: Interaktion mit Liganden



Trypsin
Differenzsignal nach
Zugabe von
Benzamidin



Benzamidin



Trypsin
Benzamidinsignal
vom Differenzsignal
subtrahiert

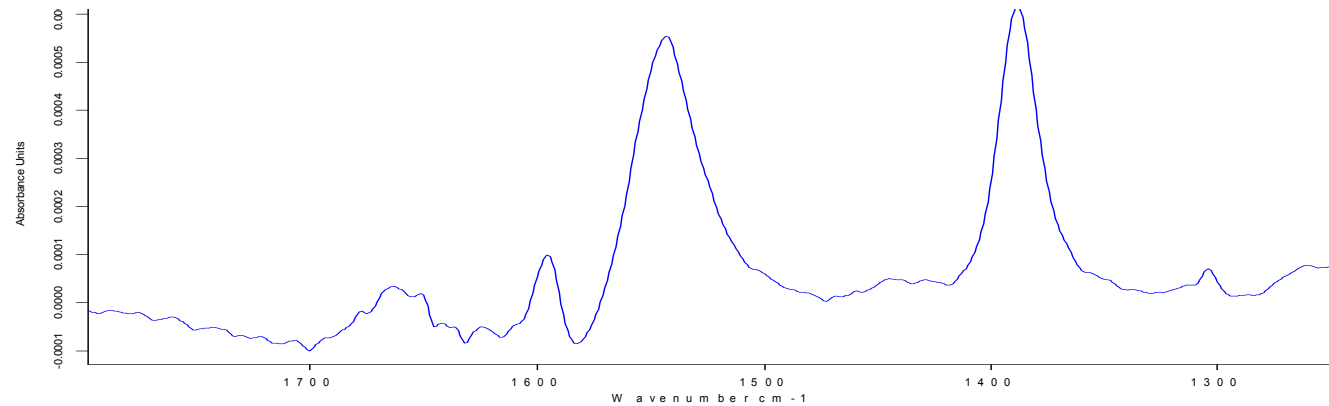




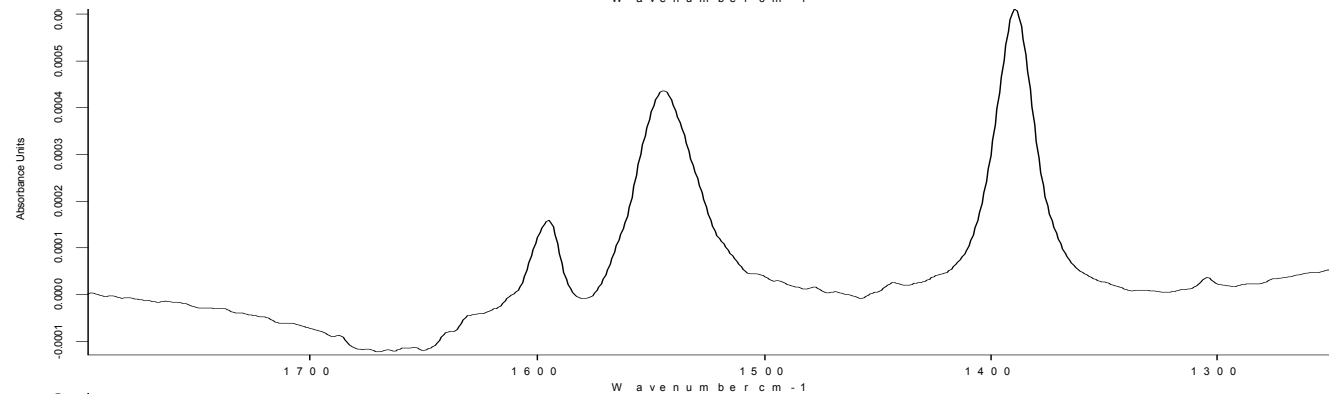
Trypsin: Interaktion mit Liganden



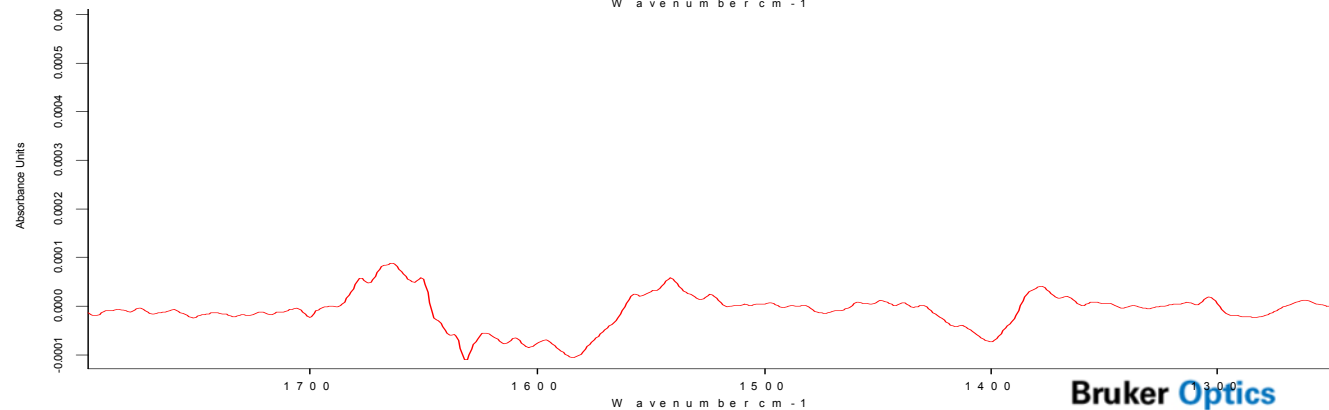
Trypsin
Differenzsignal nach
Zugabe von
Benzoessäure



Benzoessäure

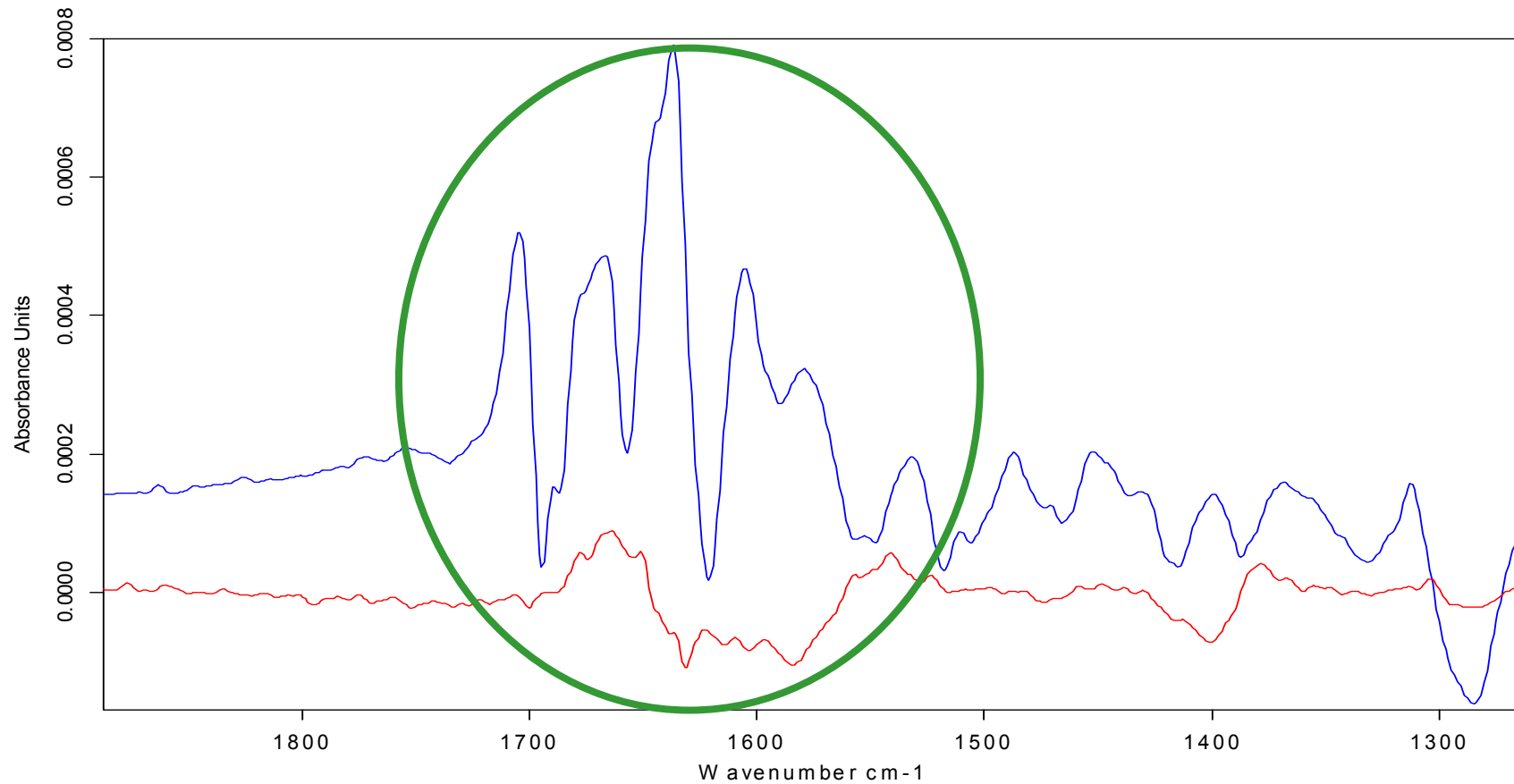


Trypsin
Benzoessäuresignal
vom Differenzsignal
subtrahiert





Vergleich Interaktion Trypsin mit Benzamidin / Benzoesäure



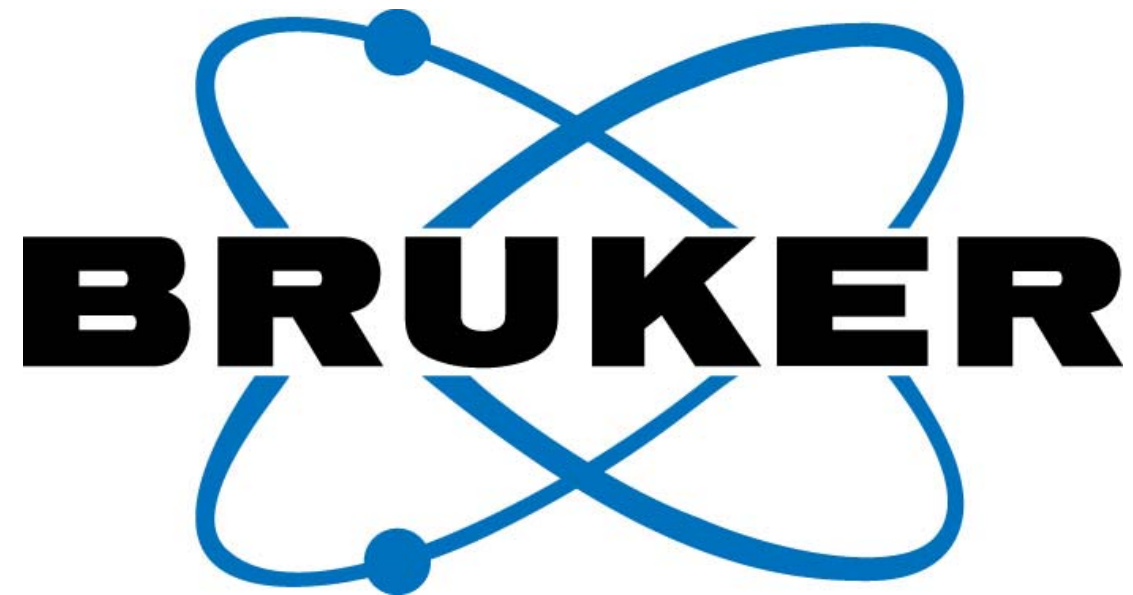
Blau: Differenzsignal Benzamidinzugabe

Rot: Differenzsignal Benzoesäurezugabe

Anwendungen

- ✓ Schnelle Detektion von Konformationsänderungen
 - Optimierung von Formulierungen
 - Charakterisierung von Proteinen
 - Protein-Stabilität
 - Protein-Liganden-Bindung

- ✓ Quantifizierung von Strukturänderungen
- ✓ Charakterisierung von Strukturänderungen
- ✓ Schnelle Bestimmung von Protein-Konzentrationen
- ✓ Temperatur-induzierte Entfaltung (Schmelz-Temperaturen; Analyse von Denaturierungen)
- ✓ Schnelle Bestimmung der Sekundärstruktur



ronny.wirz@bruker.ch