



Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen mittels Infrarotspektroskopie

Christian Zscherp, Andreas Barth, Suja Sukumaran und Karin Hauser
überarbeitet von Annette Kopitz und Georg Wille, Stand: 01.11.2010

1 Motivation

Die Kenntnis der Struktur eines Proteins ist eine wichtige Grundlage für das Verständnis seiner Funktion. Dieser Versuch führt Sie in eine weit verbreitete infrarotspektroskopische Methode zur Analyse der Proteinsekundärstruktur ein. Sie lernen sowohl die Möglichkeiten als auch die Grenzen dieser Methode kennen. Diese relativ kritische Betrachtung wird Sie vielleicht wundern, in Anbetracht der Tatsache, dass die Infrarotspektroskopie an Proteinen ein Forschungsschwerpunkt am Institut für Biophysik ist. Des Rätsels Lösung ist einfach: Uns interessiert weniger die statische Sekundärstruktur, als vielmehr die Änderung von Struktur und Umgebung einzelner funktionell wichtiger Proteingruppen im Verlaufe von Proteinreaktionen. Dennoch vermittelt Ihnen der Versuch Kenntnisse, mit denen Sie den Löwenanteil der infrarotspektroskopischen Arbeiten kritisch beurteilen können.

Eine ähnliche Aussagekraft und ähnliche Probleme wie die hier vorgestellte Methode der Sekundärstrukturbestimmung mit der Infrarotspektroskopie hat die Sekundärstrukturbestimmung mit Circular dichroismus. Letzterer sagt α -Helices besser vorher, die Infrarotspektroskopie β -Faltblätter.

2 Grundlagen

2.1 Infrarotspektroskopie an Proteinen

2.1.1 Absorption im infraroten Spektralbereich

Absorbiert ein Molekül Licht im infraroten Spektralbereich, geht es in einen höher angeregten Schwingungszustand über. Absorption kann nur stattfinden, wenn sich während einer Schwingung das Dipolmoment der betreffenden Atomgruppierung ändert. Die Intensität einer Absorptionsbande ist proportional zum Quadrat der Dipolmomentsänderung im Gleichgewichtsabstand. Je nach Schwingungsform unterscheidet man zwischen Valenz- oder Streckenschwingungen (Änderung von Bindungslängen, ν) und Deformations- oder Biegeschwingungen (Änderungen von Bindungswinkeln, δ).

Die Frequenz, bei der eine Schwingung absorbiert, hängt von der Masse der beteiligten Atome, der Kraftkonstante der Bindung, der Bindung zu den Nachbaratomen und der Kopplung mit anderen Molekülschwingungen ab. Sie berechnet sich für ein zweiatomiges Molekül nach:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \nu: \text{Schwingungsfrequenz } k: \text{Kraftkonstante, } \mu: \text{reduzierte Masse}$$

Es ist üblich, nicht die Frequenzen selbst anzugeben, sondern die energieproportionalen *Wellenzahlen*, die sich aus dem Kehrwert der Wellenlänge ergeben. Für die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ist die Einheit cm^{-1} gebräuchlich.

2.1.2 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Für das Verständnis biologischer Reaktionen gewinnt die Infrarot-Spektroskopie zunehmend an Bedeutung, insbesondere weil sie Informationen liefert, die mit Methoden der Strukturaufklärung wie NMR, Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse nicht erhalten werden. Sie erlaubt Aussagen über Struktur und Umgebung des Proteinerückgrats und vieler Aminosäureseitenketten. Sie macht dynamische Vorgänge zugänglich, wie z.B. die Änderung von Bindungslängen und -geometrien im Verlauf einer Proteinreaktion, die Modifizierung chemischer Gruppen (z.B. Protonierung) oder die veränderte Ladungsdichte einer chemischen Bindung.

Die Empfindlichkeit moderner Infrarotspektrometer ist heute prinzipiell groß genug, um mit speziellen Techniken die Beiträge einer einzelnen Aminosäure zu detektieren. Ein Protein liefert jedoch im Absorptionsspektrum eine Vielzahl überlappender Banden des Peptid-Rückgrates (Amid-Banden; Tab.1, Abb. 1) und der Aminosäure-Seitenketten.

Darüber hinaus werden die Peptid-C=O-Moden von einer starken Wasserbande bei ca. 1650 cm^{-1} überlagert, die zwar, im Vergleich zu den Moden der AS-Seitenketten, einen schwachen Extinktionskoeffizienten ($20\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) besitzt, aber bereits bei einer Schichtdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ aufgrund des hohen Wassergehaltes der Proben zu einer Extinktion von 1 führt (d.h. nur 10% des eingestrahlenen Lichtes wird gemessen).

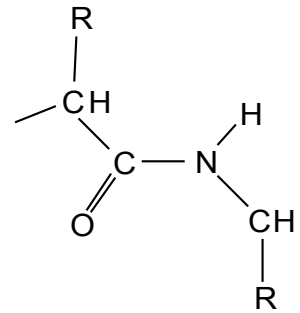


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Peptidbindung

2.1.3 Absorptionsbanden der Peptidgruppe

Einer (hypothetischen) freien, planaren Peptidgruppe können 9 Schwingungsmoden zugeordnet werden, die mit abnehmender Wellenzahl der Absorptionsbande als Amid A, B und Amid I bis VII bezeichnet werden. Für Strukturuntersuchungen ist besonders die Amid I-Schwingung von Bedeutung.

Für die Amid I-Schwingung, deren potentielle Energie zu 80% aus der C=O-Valenzschwingung der Carbonylpeptidgruppe stammt, kann die Lage der Absorptionsbande mit der Sekundärstruktur des betreffenden Polypeptids korreliert werden. Die genaue Analyse der Amid I-Bande kann daher in Verbindung mit mathematischen Verfahren zur Trennung überlappender Absorptionsbanden (Fourier-Selbstdekonvolution, Derivativspektroskopie) die Aussage über die Sekundärstruktur von Proteinen unterstützen.

Sekundärstruktur	Bandenposition in $\text{H}_2\text{O} / \text{cm}^{-1}$		Bandenposition in $^2\text{H}_2\text{O} / \text{cm}^{-1}$	
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich
α -Helix	1654	1648-1657	1652	1642-1660
β -Faltblatt	1633 1684	1623-1641 1674-1695	1630 1679	1615-1638 1672-1694
Schleifen	1672	1662-1686	1671	1653-1691
Ungeordnet	1654	1642-1657	1645	1639-1654

Tab.1: nach E. Goormaghtigh et al. (1994), Subcellular Biochemistry 23: 405-450.

Anmerkung: oft tauchen in ähnlichen Tabellen unterschiedliche Bandenpositionen für die hochfrequente Bande von parallelem und antiparallelem β -Faltblatt auf. Dies beruht auf der berechneten Bandenposition (für β -parallel). Experimentell kann jedoch nicht zwischen parallelem und antiparallelem β -Faltblatt unterschieden werden.

Wasserstoff-Deuterium-Austausch (H/D-Austausch) verändert die Massen der schwingenden Atome, damit die Schwingungsfrequenz und die Lage der Absorptionsbanden im Spektrum. Dabei ist die Bandenverschiebung abhängig von der Sekundärstruktur: die schwache hochfrequente Amid I-Bande von β -Faltblatt und von Turns ($\sim 1690\text{ cm}^{-1}$) wird oft mit ca. 15 cm^{-1} am stärksten zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben, während bei allen anderen Sekundärstrukturelementen die Verschiebung nur wenige cm^{-1} beträgt. Tab. 1 zeigt eine Zusammenstellung der Amid I-Moden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente. Die Amid II-Bande (40-60% N-H Biegeschwingung, 18-40% C-N Streckschwingung, ca. 10% C-C Streckschwingung) zeigt gegenüber der Amid I-Bande eine weitaus größere Empfindlichkeit gegenüber H/D-Austausch: sie wird um etwa 100 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Dabei verändert sich der Charakter der Schwingung: Sie ist hauptsächlich eine C-N Streckschwingung und enthält keine Anteile mehr der N-H Biegeschwingung. Diese Eigenschaft ermöglicht die Kontrolle des Deuterierungsgrades des Proteins über das Verschwinden des Amid II- und das Entstehen des sog. Amid II'-Signals bei 1450 cm^{-1} in $^2\text{H}_2\text{O}$.

Abhängig von der Stabilität der Proteinstruktur zeigen die verschiedenen Bereiche eines Proteins unterschiedliche H/D-Austauschgeschwindigkeiten, was zur Zuordnung der Absorptionsbanden zu einzelnen Sekundärstrukturelementen genutzt werden kann.

2.1.4 Die Beiträge der Aminosäureseitenketten

Im Bereich der Amid I-Bande absorbierende Aminosäureseitenketten (Tyr, Lys, Phe, Glu, Arg) tragen etwa 10-15% zur Gesamtaborption in diesem Spektralbereich bei. Der Einfluss der jeweiligen Proteinumgebung (Solvatation, Dielektrizitätskonstante) auf die Absorptionseigenschaften der Seitenketten macht es unmöglich, die jeweils genaue Lage der Absorptionsbanden aufgrund von Modellspektren der Aminosäuren in wässriger Lösung vorherzusagen.

2.2 Fourier Transform Infrarot (FTIR) Spektroskopie

Moderne Infrarotspektrometer arbeiten meist nach dem Fourierprinzip. Ein solches Spektrometer besitzt als Herzstück statt eines Monochromators (dispersives Spektrometer, wie z. B. Spektrometer für den sichtbaren Spektralbereich) ein Michelson Interferometer (s.u.). Im Vergleich zur herkömmlichen dispersiven Infrarotspektroskopie hat die FT-Spektroskopie drei Vorteile zu bieten.

- ⇒ Eine erhebliche Zeitersparnis entsteht dadurch, daß ein komplettes Spektrum sehr viel schneller aufgenommen werden kann (Fellget- oder Multiplexvorteil).
- ⇒ Weil bei der FT-Spektroskopie der Strahl nicht durch Spalte eingengt werden muß, steht eine höhere Lichtintensität zur Verfügung, was sich in einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis niederschlägt (Jacquinotvorteil).
- ⇒ Wegen der Kontrolle der Spiegelposition durch einen HeNe-Laser ist die Genauigkeit der Wellenlängenbestimmung sehr hoch (Connesvorteil).

2.2.1 Das Interferogramm

Im FT-Spektrometer wird das Spektrum der Probe nicht direkt gemessen. Stattdessen erhält man zunächst ein sogenanntes Interferogramm, das mittels einer Fourier-Transformation in ein Spektrum umgewandelt wird. Das Interferogramm wird durch ein Interferometer vom Michelson-Typ erzeugt (Abb. 2). Dazu wird polychromatisches Licht aus einem Globar durch einen Strahlteiler auf einen feststehenden bzw. einen beweglichen Spiegel geleitet. Die rückreflektierten Teilstrahlen werden durch denselben Strahlteiler wieder vereinigt und auf den Detektor gelenkt, wo sie interferieren. Das Interferogramm stellt die Intensitätsverteilung des Infrarotlichtes in Abhängigkeit von der Position des beweglichen Spiegels dar. Im Falle von monochromatischem Licht erhält man eine Kosinusfunktion. Dies wird zur Kontrolle der Spiegelposition ausgenutzt, indem das Licht eines HeNe-Lasers (632 nm) ebenfalls in das Interferometer eingekoppelt wird. An den Nulldurchgängen des Laser-Interferogramms wird das Infrarot-Interferogramm digitalisiert. Aus der Wellenlänge des Lasers ergibt sich, dass die Nulldurchgänge einen Abstand von $1/31600 \text{ cm}$ besitzen, was zu einer Wellenzahlkalibrierung des Gerätes mit einer Genauigkeit in der Größenordnung von $0,01 \text{ cm}^{-1}$ führt.

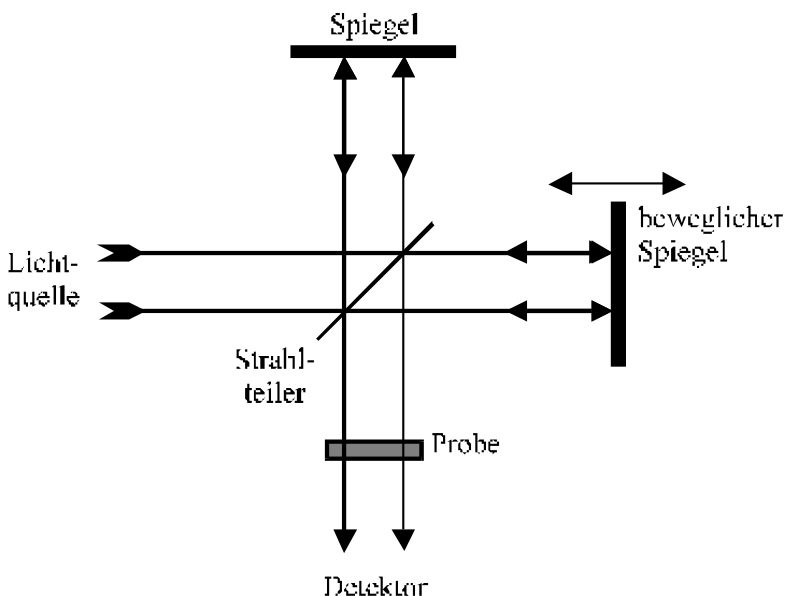


Abbildung 2: Schema des Michelson-Interferometers, dem Kernstück des FT-Spektrometers

Das Interferogramm einer polychromatischen Lichtquelle ist durch einen Punkt maximaler Intensität (Weißlichtposition) gekennzeichnet, an dem sich das Licht aller Frequenzen konstruktiv überlagert, da die Abstände zwischen dem festen und dem beweglichen Spiegel gleich sind. An allen anderen Punkten ist die Bedingung für konstruktive Interferenz nur für einige Wellenlängen aus dem Spektrum erfüllt, während andere sich destruktiv überlagern.

2.2.2 Die Fourier-Transformation

Die Intensität am Detektor $I(x)$ als Funktion der Spiegelposition x (das Interferogramm) und die Intensität $S(\nu)$ als Funktion der Wellenzahl $\nu = \lambda^{-1}$ des Lichtes (das sogenannte Einkanalspektrum) stellen ein Fouriertransformationspaar dar:

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \exp(i2\pi\nu x) dx$$
$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} S(\nu) \exp(-i2\pi\nu x) d\nu$$

Natürlich wird in der Praxis kein kontinuierliches Interferogramm unendlicher Ausdehnung gemessen. Stattdessen wird eine endliche Anzahl N von Interferogrammpunkten im Abstand Δx digitalisiert. Ersetzt man x durch $n\Delta x$, ν durch $k\Delta\nu$ und das Integral durch eine Summe, so erhält man die diskrete Fourier-Transformation

$$S(k\Delta\nu) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n\Delta x) \exp\left(\frac{i2\pi kn\Delta\nu\Delta x}{N}\right)$$

Die berechneten Punkte im Frequenzraum besitzen den Abstand

$$\Delta\nu = \frac{1}{N\Delta x}$$

Der Punkteabstand $\Delta\nu$, der die spektrale Auflösung bestimmt, ist also umgekehrt proportional zum Spiegelweg. Probleme, die bei der diskreten Fourier-Transformation entstehen, und deren Korrektur werden in den nächsten Abschnitten behandelt.

2.2.3 Apodisation

Wegen der endlichen Länge der gemessenen Interferogramme kann es bei der Fourier-Transformation zu Artefakten kommen. Das bei $x = x_{max}$ abgeschnittene Interferogramm kann als Produkt eines Interferogramms unendlicher Auflösung mit einer Rechteckfunktion aufgefasst werden. Die Rechteckfunktion hat die Werte Eins für $x \leq x_{max}$ und Null für $x > x_{max}$. Als Folge dessen entstehen neben der eigentlichen Bande Nebenminima und -maxima. Die Amplitude des größten Minimums macht 22% der Amplitude des Hauptmaximums aus.

Dieser störende Effekt kann umgangen werden, indem man das Interferogramm statt mit der Rechteckfunktion mit einer anderen Funktion multipliziert, die sich sanfter an Null annähert. Solche Funktionen werden Apodisationsfunktionen genannt. Weil durch die Apodisation Informationen am Ende des Interferogramms verloren gehen, ist eine Verschlechterung der Auflösung bzw. eine Linienverbreiterung die Folge. Die Apodisationsfunktionen sind darauf optimiert, dass trotz starker Unterdrückung der Nebenmaxima eine geringe Verbreiterung des Hauptmaximums resultiert.

2.2.4 Zerofilling

Wegen der endlichen Abstände der Stützpunkte des Interferogramms und des daraus berechneten Spektrums kann es vorkommen, dass schmale Banden, die zwischen den Stützstellen liegen, mit verringerter Amplitude wiedergegeben werden. Dieser Fehler kann durch folgenden Trick ausgeglichen werden. Vor der Durchführung der Fourier-Transformation werden an das Interferogramm Nullen angehängt (Zerofilling). Dies entspricht einer Näherung eines Interferogramms das bei höherer spektraler Auflösung (d.h. längerem Spiegelweg) aufgenommen wurde. Dadurch wird der Abstand zwischen den Punkten des Spektrums kleiner, allerdings ohne dass sich die spektrale Auflösung verbessert. Auf diese Weise wird zwischen den Stützpunkten des Spektrums interpoliert.

2.3 „Auflösungsverbesserung“

Die Amid I Bande von Proteinen besteht meist aus mehreren Banden, die für die verschiedenen Sekundärstrukturen charakteristisch sind. Diese Einzelkomponenten überlappen sich zu einer breiten konturlosen Bande. Daher werden Verfahren angewandt, um das Spektrum in die Einzelkomponenten aufzulösen, also um das Spektrum zu entwirren (Deconvolution). Hierbei handelt es sich nicht um eine tatsächliche nachträgliche Verbesserung der spektralen Auflösung, sondern um Methoden, die die Feinstruktur des Spektrums hervorheben. 3 Methoden werden hier vorgestellt und ihre Effekte auf eine Absorptionsbande beschrieben.

2.3.1 2. und 4. Ableitung

Es ergibt sich jeweils eine schmalere Bande, die bei der 2. Ableitung ein negatives Vorzeichen hat, bei der 4. Ableitung ein positives.

Vorteil: lässt sich fast mit jedem Programm durchführen.

Nachteil: prominente Seitenbanden mit anderem Vorzeichen, die die Interpretation bei komplizierteren Spektren erschweren.

2.3.2 Fourier Selbstdekonvolution

Man nutzt die Eigenschaft der Fouriertransformation, bzw. des Interferogramms aus, dass die Information über die Feinstruktur des Spektrums bei großen Spiegelauslenkungen registriert wird. Wenn man diesen Teil des Interferogramms stärker wichtet, ist daher die Feinstruktur im Spektrum stärker hervorgehoben, die Banden schärfer. Man macht dies, indem man das Interferogramm mit einer Exponentialfunktion multipliziert.

Vorteil: Die Banden im bearbeiteten Spektrum haben das gleiche Vorzeichen, wie im unbearbeiteten.

Nachteil: Man braucht spezielle Programme, 2 Parameter sind frei wählbar, was zu einer gewissen Subjektivität des Ergebnisses führt. Überdekonvolution mit dem Auftreten von Artefakten ist möglich. Mit der bei uns vorhandenen Software umständlich.

2.3.3 Feinstrukturverstärkung

Wenn man vom Originalspektrum eine geglättete Version des gleichen Spektrums abzieht, wird die Grobstruktur eliminiert und die Feinstruktur bleibt übrig. Die Banden werden schärfer. Zur Vermeidung von negativen Nebenbanden wird das geglättete Spektrum mit einem Faktor (< 1 , etwa 0.9) multipliziert.

Vorteil: Die Banden im bearbeiteten Spektrum haben das gleiche Vorzeichen, wie im unbearbeiteten. Lässt sich fast mit jedem Programm durchführen. „Auflösevermögen“ vergleichbar wie bei der Fourier Selbstdekonvolution.

Nachteil: Das Auftreten von Artefakten ist ebenfalls möglich.

2.4 2.4 Durchführung einer Sekundärstrukturanalyse

Die Amid I Bande wird mit obigen Verfahren bearbeitet. Man erhält ein Spektrum, in dem die Feinstruktur deutlicher hervorgehoben ist und in dem man die Position der zugrundeliegenden Einzelkomponenten des Spektrums erkennen kann. An diesen Stellen werden dann Banden angefittet und aus der Fläche der Banden die Sekundärstrukturanteile berechnet. Trotz der weiter unten aufgeführten Probleme ist die Übereinstimmung der Infrarotergebnisse mit den aus der Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Sekundärstrukturanteilen recht gut. Die maximalen Abweichungen sind etwa 15%. Zu bedenken ist auch, dass es auch bei der Analyse der Kristallstruktur bis zu 20% Abweichungen in den Sekundärstrukturanteilen gibt, je nach Definition der Kriterien für die Sekundärstrukturen. Die Infrarotspektroskopie eignet sich insbesondere dazu, β -Faltblattstrukturen zu detektieren. Circular dichroismus ist zuverlässiger, wenn α -helikale Strukturen erfasst werden sollen.

Probleme:

- Der Schluss von Bandenposition auf Sekundärstruktur ist nicht eindeutig. Dies führt insbesondere bei hochhelikalen Proteinen zu Fehlern. Die α -Helix erzeugt offensichtlich (und theoretisch nachvollziehbar) nicht nur eine Bande bei 1654 cm^{-1} sondern auch Nebenbanden bei niedrigeren Wellenzahlen. Diese wird aber in der Sekundärstrukturanalyse einem β -Faltblatt zugeordnet.
- Die Extinktionskoeffizienten der Sekundärstrukturelemente werden oft als gleich angenommen. Dies ist insbesondere falsch für die beiden Banden des β -Faltblatts. Die hochfrequente Bande bei 1684 cm^{-1} ist wesentlich schwächer als die bei 1633 cm^{-1} .
- Der Abzug der Wasserbande (H_2O) im Amid I Bereich ist nicht ganz einfach und beeinflusst die relativen Flächenanteile der angefitteten Kurven. Daher werden die Experimente oft in $^2\text{H}_2\text{O}$ durchgeführt, welches im Bereich der Amid I Bande nicht absorbiert.
- Im Bereich der Amid I Bande absorbieren auch Seitengruppen, die etwa 15-20% der Absorption ausmachen können. Ein Abzug dieses Beitrags ist problematisch, weil die Absorption der Seitenketten von ihrer Umgebung im Protein abhängt.
- Wenn man das aus dem Fit konstruierte Spektrum so bearbeitet wie das Originalspektrum, sollte natürlich das Gleiche herauskommen. Dies wird oft nicht kontrolliert.

2.5 Sekundärstrukturanteile einiger Proteine aus der Analyse der Röntgenstruktur

Protein	Helix	β -Faltblatt	Turn	Sonstiges
Myoglobin	77-88	0	7-12	7-11
Phosphoglyceratkinase	30	23	20	27
Papain	26-29	22-29	18-23	25-30
Alkoholdehydrogenase	25-29	36-40	19	12-20
Trypsin Inhibitor	21-26	26-45	16-24	13-29
Elastase	10	40-47	26-28	16-24
Chymotrypsinogen	12	49	23	16
9-Chymotrypsin	8-11	35-50	25-27	14-30
Trypsinogen	9	56		
Concanavalin	2-3	44-65	22-25	10-28

Man beachte die z.T. erheblichen Abweichungen bei den Sekundärstrukturanteilen durch unterschiedliche Definitionen der Sekundärstrukturen.

3 Quellen und Literatur

- J. L. R. Arrondo et al. (1992), Prog. Biophys. molec. Biol. 59: 23-56 (Gute Einführung in FTIR-Spektroskopie und Sekundärstrukturanalyse)
- E. Goormaghtigh et al. (1994), Subcell. Biochem. 23: 329-450 (3 sehr gut recherchierte Artikel zur Sekundärstrukturanalyse)
- W. K. Surewicz (1993) Biochemistry 32: 389-394 (Schwerpunkt auf problematischen Aspekten der Sekundärstrukturanalyse)
- M. Jackson et al. (1995), Crit. Rev. Biochem. molec. Biol. 30: 95-120 (Schwerpunkt auf problematischen Aspekten der Sekundärstrukturanalyse)

4 Fragen zur Versuchsvorbereitung

1. Was sind die unterschiedlichen Hierarchieebenen der Proteinstruktur, und welche Grundelemente der *Sekundärstruktur* kennen Sie?
2. Welche Übergänge werden in den Molekülen durch die Absorption von infraroter Strahlung angeregt?
3. Was sind die Vorteile eines Fourier-Transform-IR-Spektrometers gegenüber einem dispersiven Gerät?
4. Warum ist in FTIR-Spektrometern ein roter Laser in den Strahlengang eingekoppelt?
5. Wovon hängt die Frequenz einer Molekülschwingung ab und wie verändert sich die Frequenz einer O–H-Streckschwingung bei $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausch?
6. Warum zeigen Sekundärstrukturelemente im Amid I-Bereich charakteristische Absorptionsbanden unterschiedlicher Frequenz, obwohl immer die C=O-Streckschwingung der Peptidbindung beobachtet wird?
7. Warum sind trotz charakteristischer Amid I-Banden der einzelnen Sekundärstrukturtypen Methoden zur Auflösungsverbesserung nötig, um die Sekundärstruktur eines Proteins anhand seines IR-Absorptionsspektrums zu analysieren?

5 Versuchsdurchführung

5.1 Vorversuche

Führen Sie alle Messungen mit 32 Spiegeldurchläufen und von 4000 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} durch.

- Nehmen Sie ein Leerspektrum (d.h. ohne Probe) bei geöffneter Probenkammer auf. Diskutieren Sie die beobachteten Absorptionsbanden mit dem Assistenten.
- Nehmen Sie ein Absorptionsspektrum von H_2O und $^2\text{H}_2\text{O}$ auf. Bitte $^2\text{H}_2\text{O}$ Flasche sofort wieder verschließen!

5.2 Die Amid I Bande von Proteinen

Nehmen Sie ein Absorptionsspektrum in $^2\text{H}_2\text{O}$ auf von Papain auf (1000 Spiegeldurchläufe, Auflösung 4 cm^{-1}). Lösen Sie $2,5\text{ mg}$ Papain in $25\text{ }\mu\text{l}$ $^2\text{H}_2\text{O}$ Phosphatpuffer p^2H 7.4 . Mit dem erhaltenen Spektrum soll anschließend eine Sekundärstrukturanalyse durchgeführt werden. Machen Sie zunächst eine Basislinienkorrektur, indem Sie eine gerade Linie zwischen den Absorptionswerten bei 1600 und bei 1700 cm^{-1} einzeichnen und die Fläche darunter abziehen. Dies kann als ein näherungsweise Subtrahieren der Seitenkettenabsorptionen angesehen werden. Verwenden Sie dann die 2. Ableitung mit einem möglichst kleinen Glättungsbereich von 9 oder 13 Punkten, um die Einzelbanden aufzulösen und deren Position für den Fit zu bestimmen, und treffen Sie Zuordnungen anhand der nebenstehenden Tabelle.

$1613-1637\text{ cm}^{-1}$	β -Faltblatt
$1637-1648\text{ cm}^{-1}$	Ungeordnet
$1648-1662\text{ cm}^{-1}$	α -Helix
$1662-1682\text{ cm}^{-1}$	Schleifen
$1682-1689\text{ cm}^{-1}$	β -Faltblatt
Strukturzuordnung für Papain für Lösung in $^2\text{H}_2\text{O}$	

Anschließend wird das Spektrum gefittet und der Gesamtfit, als auch die Fitkomponenten gespeichert.¹ Integrieren Sie nun die Fitkomponenten und bestimmen Sie daraus die Sekundärstrukturanteile. Dabei wird näherungsweise angenommen, dass die Extinktionskoeffizienten für Hauptbande der verschiedenen Sekundärstrukturen gleich sind. Die hochfrequente Nebenbande der β -Faltblattstruktur soll bei diesem Verfahren ignoriert werden, weil man ansonsten den β -Flächenanteil doppelt zählen würde.

- Überprüfen Sie die Konsistenz der Analyse unter a), indem Sie vom Gesamtfit die 2. Ableitung bilden und diese mit der 2. Ableitung des Originalspektrums vergleichen.
- Diskutieren Sie Ihre Werte im Vergleich zu denen aus Röntgenstrukturanalysen (Tabelle in Abschnitt 2.5), sowie Probleme und Fehlerquellen der Sekundärstrukturanalyse mit Infrarotspektroskopie.

5.3 Testen der Feinstrukturverstärkung (FSV) anhand synthetischer Banden

Testen Sie die Möglichkeiten und Grenzen der Feinstrukturverstärkung und diskutieren Sie dies in Ihrem Protokoll. Hierfür stehen verschiedene synthetische Kurven als Komponentenspektren und Kombinationen dieser Komponentenspektren zur Verfügung (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3, Verzeichnis Prakt/Kurven). Sie sollen versuchen, die Kombinationsspektren in ihre Einzelspektren zu zerlegen. Hierzu steht Ihnen ein Opus-Makro zur Verfügung (Verzeichnis Prakt, *Fse.MTX*), in dem Sie die Zahl der Glättungspunkte und den Wichtungsfaktor variieren können.

- Testen Sie zunächst die Feinstrukturverstärkung für eine Kombination zweier Banden (K.0) (Glättung über 5 Punkte). Bestimmen Sie den optimalen Wichtungsfaktor, bei dem die Auflösung maximal, aber die Artefaktbanden minimal sind.
- Zerlegen Sie die Spektren K.1 – K.6 in die jeweiligen Komponentenspektren mit dem Wichtungsfaktor, der in a) optimale Ergebnisse lieferte.
- Überprüfen Sie den Einfluss von Rauschen und Wasserdampf auf das Ergebnis der "Auflösungsverbesserung" anhand der Kombinationsspektren KR.0 und KW.0. Die Komponentenspektren sind die gleichen wie bei K.0.

Geben Sie im Protokoll den unter a) ermittelten Wichtungsfaktor an und diskutieren Sie, inwieweit Sie die Eigenschaften der Ausgangskurven aus Tabelle 2 reproduzieren können. Beachten Sie, welchen Einfluß hierbei der Abstand der Komponentenbanden und deren Breite haben.

¹Anmerkung: Lorentzbanden erwartet man für isolierte Oszillatoren ohne Wechselwirkung mit der Umgebung. Wechselwirkt der Oszillator mit der Umgebung, ergibt sich bei einer statistischen oder fluktuierenden Orientierung der Wechselwirkungspartner eine Gausskurve. Für Sekundärstrukturelemente mit einer gewissen Variation von Bindungswinkeln und H-Brückenbindungsstärken erwartet man daher Gausskurven.

Dateiname	ν_0 / cm^{-1}	Amplitude	Halbwertsbreite / cm^{-1}	Form
G1630.0	1630	0.1	20	Gauss
G1635.0	1635	0.1	20	Gauss
G1645.0	1645	0.1	20	Gauss
G1645.1	1645	0.025	10	Gauss
G1645.2	1645	0.1	40	Gauss
G1655.0	1655	0.1	20	Gauss
L1655.0	1655	0.1	20	Lorentz
G1670.0	1670	0.1	20	Gauss
R.0	Rauschen			
W.0	Wasserdampf			

Tab.2: Spektren der Komponenten

Dateiname	Zusammensetzung	Beschreibung
K.0	G1655.0 + G1670.0	2 Banden mit 15 cm^{-1} Abstand
K.1	$0.1 \times \text{G1635.0} + \text{G1655.0} + \text{G1670.0}$	3 Banden mit 15 und 20 cm^{-1} Abstand
K.2	G1645.0 + G1655.0 + G1670.0	3 Banden mit 10 und 15 cm^{-1} Abstand
K.3	G1635.0 + G1645.0 + G1655.0 + G1670.0	4 Banden mit 10 und 15 cm^{-1} Abstand
K.4	G1635.0 + G1645.1 + G1655.0	Eine scharfe kleine Bande zwischen 2 mittelbreiten
K.5	G1635.0 + G1645.2 + G1655.0	Eine breite Bande zwischen 2 mittelbreiten
K.6	G1645.1 + G1645.2	Eine kleine scharfe Bande auf einer breiten
KR.0	G1655.0 + G1670.0 + R.0	2 Banden mit 15 cm^{-1} Abstand plus Rauschen
KW.0	G1655.0 + G1670.0 + W.0	2 Banden mit 15 cm^{-1} Abstand plus Wasserdampf

Tab.3: Kombinationen aus den Komponentenspektren

5.4 Thermisch und pH-induzierte Strukturumwandlung von Peptiden

a) Lösen Sie 2,5 mg Poly-L-Lysin in $85 \mu\text{l}$ $^2\text{H}_2\text{O}$ und zentrifugieren Sie die Probe für zwei Minuten bei 12.000 rpm. Nehmen Sie ein Spektrum bei Raumtemperatur auf. Geben Sie dann $1 \mu\text{l}$ einer 1 M NaOH-Lösung zu. Schließen Sie den Thermostaten an und erhitzen Sie die Probe mit hohem $p^2\text{H}$ von Raumtemperatur auf 50°C . Beobachten Sie dabei den Übergang von α -Helix zu intermolekularer β -Faltblattstruktur, indem Sie Absorptionsspektren in 5°C Schritten aufnehmen. Nach Erreichen einer Temperatur warten Sie vor dem Vermessen der Probe mindestens 5 Minuten, damit die Probe equilibrieren kann. Achten Sie darauf, dass die Probe möglichst gleich vermessen wird, nachdem Sie den $p^2\text{H}$ eingestellt haben, da sonst der Strukturübergang bereits stattgefunden hat.

5.5 Thermisch induzierte Strukturumwandlung des Proteins Ribonuklease A

Lösen Sie 2,5 mg Ribonuklease A in $100 \mu\text{l}$ $^2\text{H}_2\text{O}$ Phosphatpuffer $p^2\text{H}$ 7 und zentrifugieren Sie die Probe für zwei Minuten bei 12.000 rpm. Nehmen Sie Absorptionsspektren von Raumtemperatur bis 75°C in 5°C -Schritten auf. Nach Erreichen einer Temperatur warten Sie vor dem Vermessen der Probe mindestens 5 Minuten, damit die Probe equilibrieren kann. Lassen Sie die Probe anschließend wieder auf 45°C abkühlen und nehmen Sie dabei alle 10°C ein Spektrum auf. Beobachten Sie den Übergang des gefalteten Proteins zur Entfaltung und überprüfen Sie, ob die Entfaltung reversibel ist. Tragen Sie die Position der Amid I-Bande gegen die Temperatur auf und bestimmen Sie die Entfaltungstemperatur von Ribonuklease A.