

Charakterisierung der thermischen Stabilität von Proteinen mittels UV-Vis-Spektroskopie

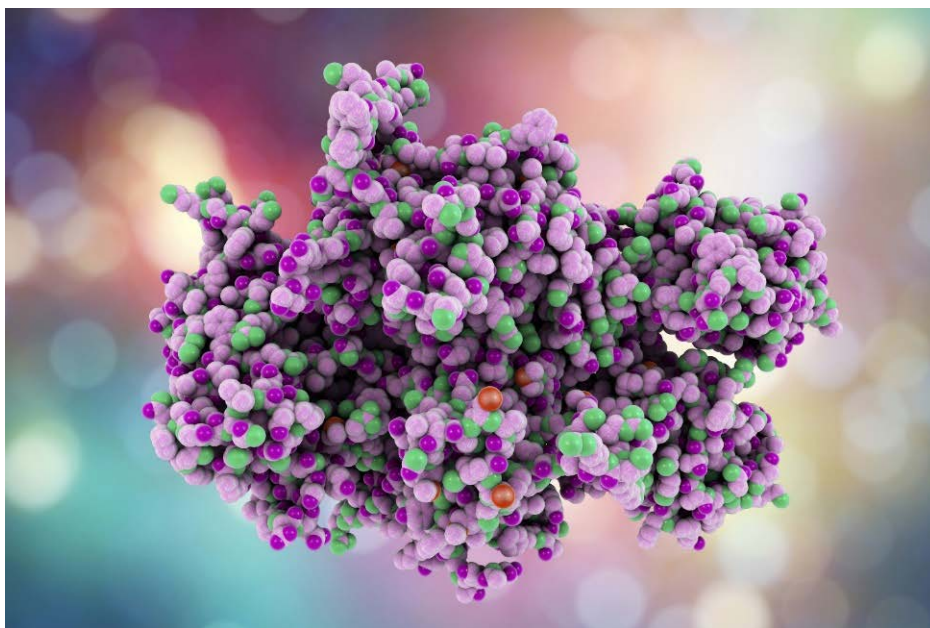
Vorteile des Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometers mit Multiküvetten-System mit Peltier-Temperatursteuerung in der Proteintherapeutika-Forschung

Autoren

Carlos Santos Martin
La Trobe Institute for
Molecular Science (LIMS),
La Trobe University,
Melbourne, Victoria 3086,
Australien

Biswaranjan Mohanty
Sydney Analytical Core
Research Facility,
The University of Sydney,
Sydney, New South Wales
2006, Australien

Wesam Alwan und
Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



Zusammenfassung

Die thermische Stabilität von Proteinen ist ein wichtiges Merkmal von Biotherapeutika, da die Daten Erkenntnisse zu den physikalischen und chemischen Eigenschaften liefern, die die Stabilität und Struktur von Proteinen beeinflussen. Diese Untersuchung zeigt die schnelle und einfache Charakterisierung der thermischen Stabilität und die Bestimmung der Schmelztemperatur von Proteinen unter Verwendung eines Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometers, das mit einem Multiküvetten-Modul mit Peltier-Temperatursteuerung ausgestattet ist.

Einleitung

Die Wirkstoffforschung ist ein facettenreicher Prozess, im Rahmen dessen mögliche neue Arzneimittel und ihre therapeutische Wirkung aufgezeigt werden müssen. Die korrekte Identifizierung und Charakterisierung von möglichen Arzneimitteln sind wichtige Schritte im Verlauf der Wirkstoffforschung, die die Identifizierung von Entwicklungskandidaten für therapeutische Zwecke vereinfachen kann.¹ Für Proteintherapeutika schließt die biochemische Charakterisierung folgende Merkmale ein: Molekulargewicht, Homogenität und Heterogenität, Löslichkeit, thermische Stabilität, Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur, dreidimensionale Struktur und Proteinmodifikation.^{2,3}

Daten zur thermischen Stabilität liefern Erkenntnisse zu physikalischen und chemischen Eigenschaften, die die Stabilität und Struktur von Proteinen beeinflussen. Schmelztemperaturen können anhand einer Reihe von Methoden bestimmt werden, mit welchen beobachtet wird, ob sich die Eigenschaften einer Probe bei allmählich ansteigender Temperatur verändern (Tabelle 1). Wenn Proteine erhöhten Temperaturen ausgesetzt sind, verändert sich ihre Sekundär- und Tertiärstruktur. Diese Strukturänderungen kehren den hydrophoben Kern nach außen und führen zu Proteinaggregation.⁴ Die Temperatur, bei der die Hälfte des Proteins noch in seiner löslichen Form vorliegt, wird als scheinbare Schmelztemperatur (T_m) bezeichnet, wie in Abbildung 1 gezeigt. Diese Temperatur kann durch die Anwesenheit eines gebundenen Liganden erhöht werden.^{5,6} Untersuchungen zur thermischen Stabilität tragen zum Verständnis der Bindung von Liganden, der Stabilität von Arzneimitteln, deren Haltbarkeit und der optimalen Lagerbedingungen bei – nützliche Informationen für die künftige Herstellung und Vermarktung des Arzneimittels.

Analyse der thermischen Stabilität von Proteinen mittels UV-Vis-Spektroskopie

Tabelle 1 fasst die Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zusammen, die für die Messung der thermischen Stabilität von Proteinen eingesetzt werden. Die UV-Vis-Spektroskopie überwindet viele Herausforderungen, die es bei dieser Analyse gibt. Sie liefert direkte Extinktionsmessungen, ohne dass Fluoreszenzmarker vorhanden sein müssen. Diese Messungen können mit geringen Probemengen durchgeführt werden, die Ergebnisse lassen sich schnell und einfach auswerten.

Diese Application Note zeigt die Vorteile des Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometers (Abbildung 2) für die Charakterisierung der thermischen Stabilität und Reproduzierbarkeit von Proteinen. Das Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer verwendet eine in die Küvette integrierte Temperatursonde, die Rückmeldung an den Peltier-Block gibt. Dadurch wird die Temperatursteuerung der Lösungen während der Messungen ermöglicht. Ein Multiküvettenhalter mit acht Positionen ist in das Gerät integriert und nutzt zur Temperatursteuerung der Proben zwischen 0 und 110 °C luftgekühlte Peltier-Blöcke ohne Verwendung von Wasser. Um eine höhere Messkapazität zu erreichen, werden alle Küvettenpositionen gleichzeitig gemessen. Dies ermöglicht im Vergleich zu anderen Methoden schnellere Analysen.

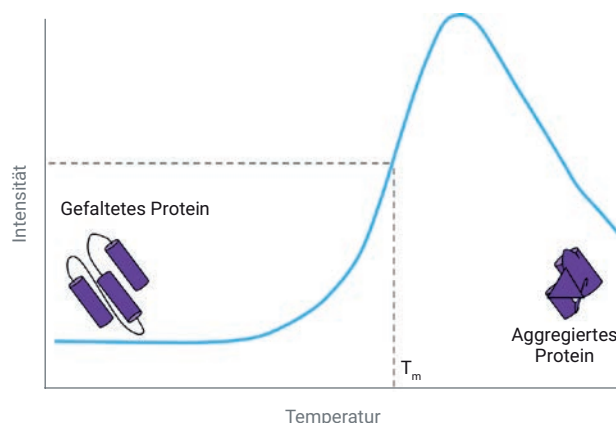


Abbildung 1: Typische Response der Intensität (oder Extinktion) eines Proteins bei ansteigender Temperatur.

Tabelle 1: Methoden zur Messung der thermischen Stabilität von Proteinen.

Methode	Prinzip	Vorteile	Nachteile
Circulardichroismus-Spektroskopie ^{7,8}	Messung der Extinktion hinsichtlich der Elliptizität mittels zirkular polarisierten Lichts.	– Geringe Materialmengen erforderlich – Hohe Empfindlichkeit – Hohe Auflösung	– Zeitaufwändig – Manche Puffer verursachen Störungen im fernen UV-Bereich
Dynamische Differenzkalorimetrie ^{9,10}	Messung der Veränderung der Wärmekapazität im Vergleich zu einem Referenzmaterial.	– Geringe Materialmengen erforderlich – Hohe Auflösung	– Interpretation der Ergebnisse kann schwierig sein
Thermal Shift Assay ^{11,12}	Messung der Veränderung der Fluoreszenz nach der Bindung eines Farbstoffs mit Fluorophor an hydrophobe Moleküle.	– Kann mehr als eine Probe in einem RT-PCR-Gerät messen – Hohe Empfindlichkeit – Geringe Materialmengen erforderlich	– Fluoreszenzsonden sind erforderlich – Fluoreszenzsonden können Konformationsänderungen verursachen – Proteine sollten eine Bindungstasche für die Fluoreszenzsonden haben



Abbildung 2: Das Agilent Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometer kann für bis zu vier gleichzeitige Temperaturexperimente in acht Küvettenpositionen verwendet werden.



Abbildung 3: In dieser Studie verwendete Ultra-Mikroküvette von Agilent. Der extrem kleine, fokussierte Strahl des Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometers passiert kleine, permanent ausgerichtete Aperturen, die keine Justierung erfordern.

Experimentelles

Proben

Eine Probe *Escherichia coli*-Disulfid-Isomerase A (*EcDsbA*, nativer Zustand) wurde vom La Trobe Institute for Molecular Science (LIMS), La Trobe University, Australien, zur Verfügung gestellt. Eine Lösung von $\approx 0,6$ mg/ml *EcDsbA* in einer Pufferlösung mit 50 mM NaCl, 1 mM EDTA und 100 mM Natriumphosphat wurde hergestellt und auf pH 7,0 eingestellt. Es wurden Agilent Ultra-Mikro-Quarzküvetten mit 50 μ l Volumen und 10 mm optischer Schichtdicke (Bestellnummer 5062-2496, Abbildung 3) verwendet. Als Referenzlösung (Blindprobe) wurde reiner Phosphatpuffer verwendet.

Geräte und Methode

Ein Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Peltier-Spektralphotometer wurde mit der Agilent Cary UV Workstation-Software gesteuert. Die Methodenparameter, die zur Messung der Proteinextinktion und der thermischen Stabilität verwendet wurden, sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst. Für die Untersuchung der thermischen Stabilität wurden Daten alle 0,1 °C unter Verwendung einer Anstiegsrate von 0,1 °C/min aufgenommen.

Tabelle 2: Parameter des Wellenlängenscans.

Parameter	Wert
Gerät	Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer
Wellenlängenbereich	200 bis 400 nm
Signalmittelungszeit	0,1 s
Spektrale Bandbreite	2 nm
Probenvolumen	80 μ l, Volumen zur Berücksichtigung der Verdampfung angepasst

Tabelle 3: Parameter der Schmelzexperimente.

Parameter	Wert
Gerät	Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer
Wellenlänge	280 nm
Signalmittelungszeit	2 s
Spektrale Bandbreite	2 nm
Datenintervall	0,1 °C
Anstiegsrate	0,1 °C/min
Temperatursteuerung	Peltier-Block
Temperaturbereich	25 bis 90 °C
Filtergröße für Glättung und Ableitung	25
Datenintervall für Glättung und Ableitung	0,1 °C
Untere Temperaturgrenze der Analyse	30 °C
Obere Temperaturgrenze der Analyse	90 °C
Küvette	Ultra-Mikroküvette aus Quarz
Probenvolumen	70 μ l

Das Signal wurde 2 Sekunden lang gemittelt, bevor jeder Datenpunkt aufgezeichnet wurde. Die Anstiegsrate von 0,1 °C/min wurde wegen der Neigung der Probe zu Aggregation bei höheren Anstiegsraten verwendet. Die Temperatur des Experiments wurde über den Peltier-Block des Cary 3500 gesteuert.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Bestimmung des Extinktionsmaximums des Proteins *EcDsbA* wurde mit Hilfe des Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometers ein Wellenlängenscan mit den in Tabelle 2 angegebenen Parametern durchgeführt. Das mit dem Multiküvetten-Modul ausgerüstete Cary 3500 kann sieben Proben und eine Referenzlösung gleichzeitig messen. Dies steigert die Zuverlässigkeit der Ergebnisse, da die Messungen zur gleichen Zeit unter identischen Bedingungen aufgenommen werden. Ist ein kleines Probenvolumen erforderlich, beispielsweise 70 µl, können die Messungen in einer Ultra-Mikroküvette (Abbildung 3) durchgeführt werden. Da das Cary 3500 einen kleinen, fokussierten Strahl hat, können mit ihm ohne vorherige Neuausrichtung genaue Messungen mit Ultra-Mikroküvetten durchgeführt werden. Das Extinktionsmaximum für *EcDsbA* lag bei 280 nm, wie in Abbildung 4 gezeigt.

Für die Analyse der thermischen Stabilität des Proteins *EcDsbA* wurde die Extinktion bei 280 nm bei ansteigender Temperatur beobachtet. Die Temperatur der Probe wurde mit Hilfe des Peltier-Blocks mit einer Anstiegsrate von 0,1 °C/min, wie in Tabelle 3 angegeben, gesteuert. Mit steigender Temperatur wurde ein Peak beobachtet, der auf eine Änderung der Extinktion des Proteins aufgrund der Änderung der Proteinstruktur hinweist. Die Schmelzkurve (Abbildung 5) zeigt einen Übergang, der für das Protein *EcDsbA* bei hoher Temperatur (über 65 °C) auftritt.

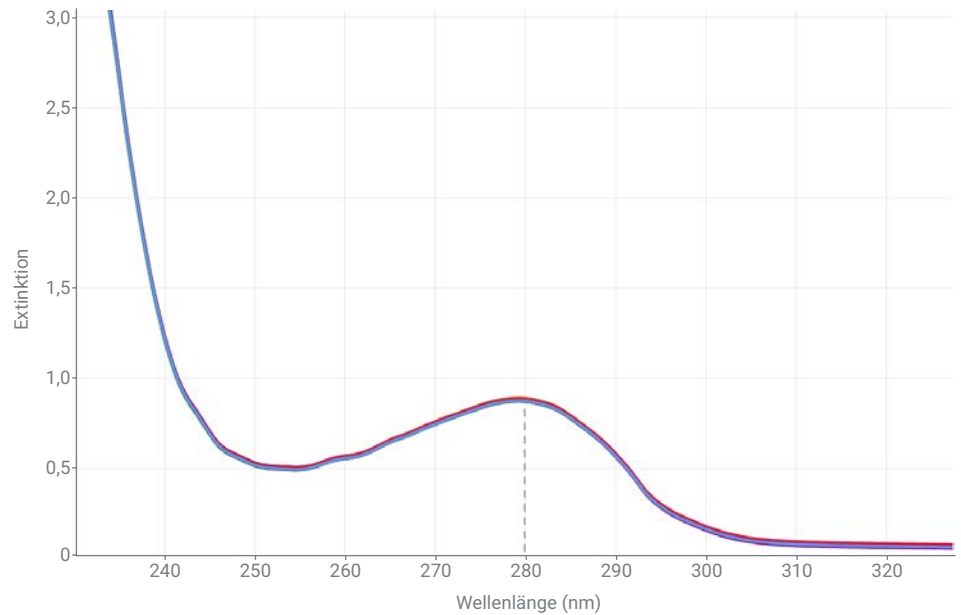


Abbildung 4: Wellenlängenscans von sieben separaten Proben des Proteins *EcDsbA* (nativer Zustand), die den Peak von *EcDsbA* bei 280 nm zeigen. Die sieben Proben wurden mit Hilfe von Ultra-Mikroküvetten gleichzeitig gemessen.

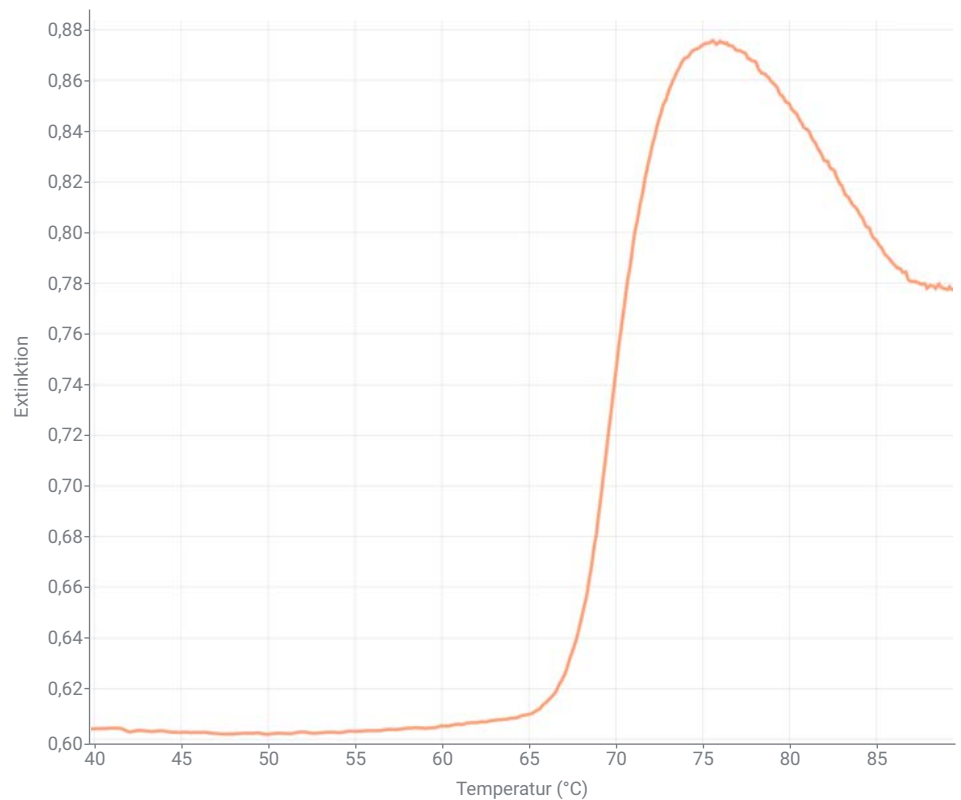


Abbildung 5: Schmelzkurve des Proteins *EcDsbA*. Veränderungen der Extinktion mit steigender Temperatur weisen auf eine Strukturveränderung des Proteins hin.

Die Cary UV Workstation-Software berechnet die Schmelztemperatur T_m biologischer Proben mit Hilfe der ersten Ableitung der gemessenen Extinktionsdaten. T_m kann durch die Auswahl geeigneter Glättungs- und Ableitungsfiltergrößen sowie der oberen und unteren Temperaturgrenze der Analyse bestimmt werden. T_m für EcDsbA lag bei 69,86 °C (n = 6; Abbildung 6); es wurden die in Tabelle 3 angegebenen Analyseparameter verwendet.

Die für das Protein EcDsbA berechnete Schmelztemperatur T_m , die unter Verwendung des Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometers erhalten wurde, stimmte mit zuvor veröffentlichten Ergebnissen, die mittels Circular dichroismus-Spektroskopie erhalten wurden,^{14,15} wie in Tabelle 4 gezeigt, überein.

Die Präzision der Messung der Schmelztemperatur T_m von EcDsbA mit dem Cary 3500 wurde in einer Reproduzierbarkeitsstudie ermittelt. Die Proteinprobe wurde in sechs Teilvolumina aufgeteilt und jedes Teilvolumen wurde separat in einer 70- μ l-Ultra-Mikroküvette analysiert. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch die Berechnung des Durchschnittswerts und der Standardabweichung für die T_m -Werte von EcDsbA ermittelt (Tabelle 4). Das Cary 3500 UV-Vis-System zeigte eine hervorragende Präzision mit einer Standardabweichung von nur 0,16 °C über die sechs Messungen hinweg.

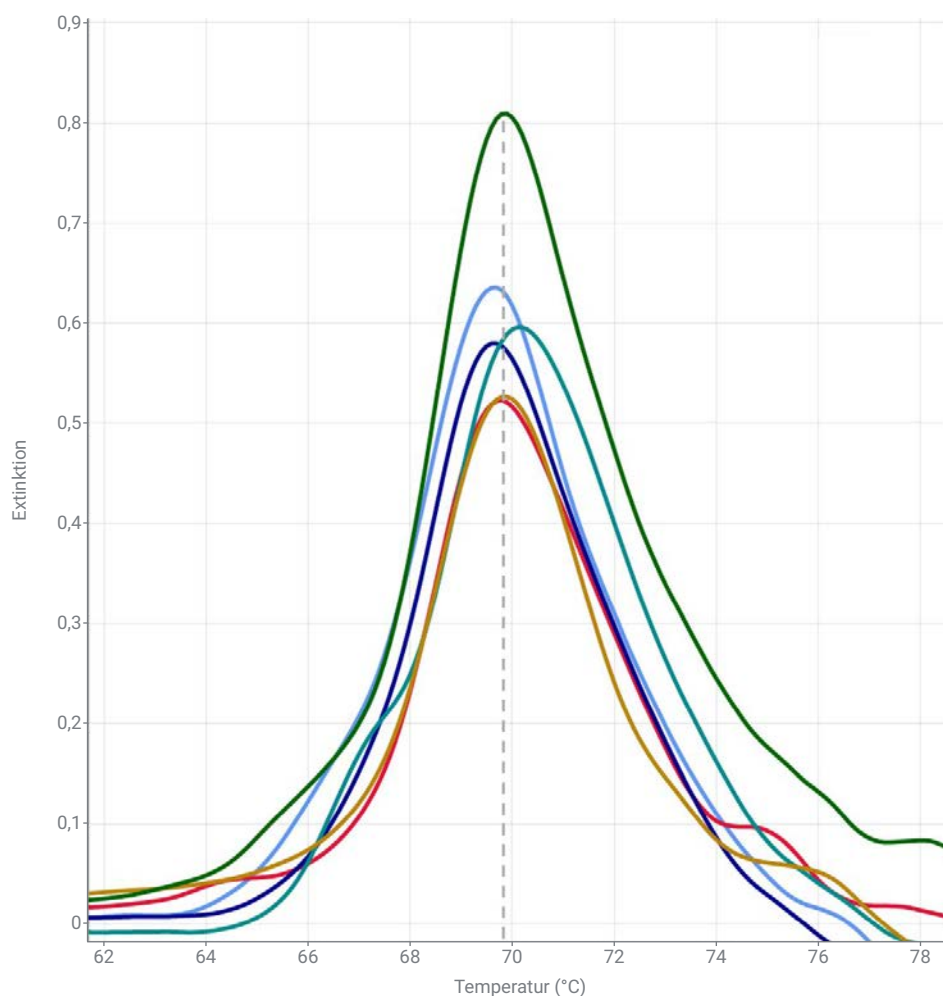


Abbildung 6: Graphen der ersten Ableitung von sechs separaten Proben des Proteins EcDsbA, erhalten unter Verwendung der Agilent Cary UV Workstation-Software (T_m = 69,86 °C, n = 6).

Tabelle 4: Mit dem Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer gemessene T_m -Werte für EcDsbA und in der Literatur veröffentlichte Werte.

Methode	T_m von EcDsbA (°C)
Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer, Replikat 1	69,70
Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer, Replikat 2	69,80
Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer, Replikat 3	69,70
Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer, Replikat 4	70,20
Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer, Replikat 5	69,90
Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer, Replikat 6	69,90
Mittelwert	69,86
Standardabweichung	0,16
Literaturwert 1 ¹⁴	68,55
Literaturwert 2 ¹⁵	69,25

Schlussfolgerung

Das Agilent Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer mit Multiküvetten-Modul mit Peltier-Temperatursteuerung wurde zur gleichzeitigen Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m) von sechs Proben des Proteins EcDsbA verwendet. Wie die Standardabweichung von 0,16 °C für die Messung von sechs Teilvolumina einer Probe des Proteins EcDsbA zeigte, waren die Ergebnisse reproduzierbar. Außerdem stimmte der durchschnittliche Wert für T_m von 69,86 °C, der von der Agilent Cary UV Workstation-Software berechnet wurde, mit Literaturwerten, die mittels Circular Dichroismus-Spektroskopie erhalten wurden, überein. Die Ergebnisse zeigen die Genauigkeit, Präzision und Geschwindigkeit des Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometers für die Analyse der thermischen Stabilität von Proteinen.

Zur weiteren Maximierung der Produktivität der Methode können mit dem Cary 3500 UV-Vis sieben Proben gleichzeitig ohne Einbußen bei der Ergebnisgenauigkeit gemessen werden. Die Möglichkeit, aufgrund des Gerätedesigns mindestens drei Replikate der Probe gleichzeitig messen zu können, stellt eine wertvolle Zeiteinsparung für Laboratorien dar, für die die Messung von Replikaten erforderlich ist.

In der Cary UV Workstation-Software gibt es integrierte Berechnungsmethoden zur Glättung und Ableitung für eine einfache Datenanalyse. Die Software verfügt zudem über optionale technische Steuerungsmöglichkeiten für die sichere Erfassung, Verarbeitung, Dokumentation und Speicherung der Daten. Diese Steuerungsmöglichkeiten sind äußerst wichtig für Laboratorien, die die Konformität mit Vorschriften gemäß 21 CFR Part 11 (US FDA), Anhang 11 (EU), GAMP5 sowie ISO/IEC 17025 und EPA 40 CFR Part 160 einhalten müssen.

www.agilent.com

DE83250769

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Gedruckt in den USA, 4. August 2022
5994-5086DEE

Literatur

1. Mohs, R. C.; Greig, N. H. Drug Discovery and Development: Role of Basic Biological Research, *Alzheimers Dement (NY)* **2017**, 11, 3(4), 651-657. doi: [10.1016/j.trci.2017.10.005](https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005)
2. Schenone, M. et al. Target Identification and Mechanism of Action in Chemical Biology and Drug Discovery, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9(4), 232-40. doi: [10.1038/nchembio.1199](https://doi.org/10.1038/nchembio.1199)
3. Gashaw, I. et al. What Makes a Good Drug Target? *Drug Discovery Today* **2012**, 17, Supplement, S24-S30. doi: [10.1016/j.drudis.2011.12.008](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.008)
4. Jahn, T. R.; Radford, S. E. Folding Versus Aggregation: Polypeptide Conformations on Competing Pathways, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 469(1), 100-17. doi: [10.1016/j.abb.2007.05.015](https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.05.015)
5. Mateus, A.; Määttä, T. A.; Savitski, M. M. Thermal Proteome Profiling: Unbiased Assessment of Protein State Through Heat-Induced Stability Changes, *Proteome Sci.* **2017**, 24, 15, 13. doi: [10.1186/s12953-017-0122-4](https://doi.org/10.1186/s12953-017-0122-4)
6. Ball, K. A. et al. An Isothermal Shift Assay for Proteome Scale Drug-Target Identification, *Commun. Biol.* **2020**, 3, 75. doi: [10.1038/s42003-020-0795-6](https://doi.org/10.1038/s42003-020-0795-6)
7. Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Collected as a Function of Temperature to Determine the Thermodynamics of Protein Unfolding and Binding Interactions, *Nat. Protoc.* **2006**, 1(6), 2527-35. doi: [10.1038/nprot.2006.204](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.204)
8. Beychok, S. Circular Dichroism of Biological Macromolecules, *Science* **1966**, 9, 154(3754), 1288-99. doi: [10.1126/science.154.3754.1288](https://doi.org/10.1126/science.154.3754.1288)
9. Abd-Elghany, M.; Thomas, M. K. A Review on Differential Scanning Calorimetry Technique and its Importance in the Field of Energetic Materials, *Physical Sciences Reviews* **2018**, 3, 4. 20170103. doi: [10.1515/psr-2017-0103](https://doi.org/10.1515/psr-2017-0103)
10. Deangelis, N. J.; Papariello, G. J. Differential Scanning Calorimetry. Advantages and Limitations for Absolute Purity Determinations, *J. Pharm. Sci.* **1968**, 57, 1868-1873. doi: [10.1002/jps.2600571109](https://doi.org/10.1002/jps.2600571109)
11. Pantoliano, M. W. et al. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery, *J. Biomol. Screen.* **2001**, 6(6), 429-40. doi: [10.1177/108705710100600609](https://doi.org/10.1177/108705710100600609)
12. Ericsson, U. B. et al. Thermofluor-Based High-Throughput Stability Optimization of Proteins for Structural Studies, *Anal. Biochem.* **2006**, 357(2), 289-98. doi: [10.1016/j.ab.2006.07.027](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.07.027)
13. Martin, J.; Bardwell, J.; Kuriyan, J. Crystal Structure of the DsbA Protein Required for Disulphide Bond Formation In Vivo, *Nature* **1993**, 365, 464-468. doi: [10.1038/365464a0](https://doi.org/10.1038/365464a0)
14. Christensen, S. et al. Structural and Biochemical Characterization of *Chlamydia trachomatis* DsbA Reveals a Cysteine-Rich and Weakly Oxidising Oxidoreductase, *PLoS One* **2016**, 28, 11 (12):e0168485. doi: [10.1371/journal.pone.0168485](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168485)
15. Heras, B. et al. *Staphylococcus aureus* DsbA Does Not Have a Destabilizing Disulfide, a New Paradigm for Bacterial Oxidative Folding. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283(7), 4261-71. doi: [10.1074/jbc.M707838200](https://doi.org/10.1074/jbc.M707838200)