

Caracterización de la estabilidad térmica de las proteínas con la espectroscopia UV-visible

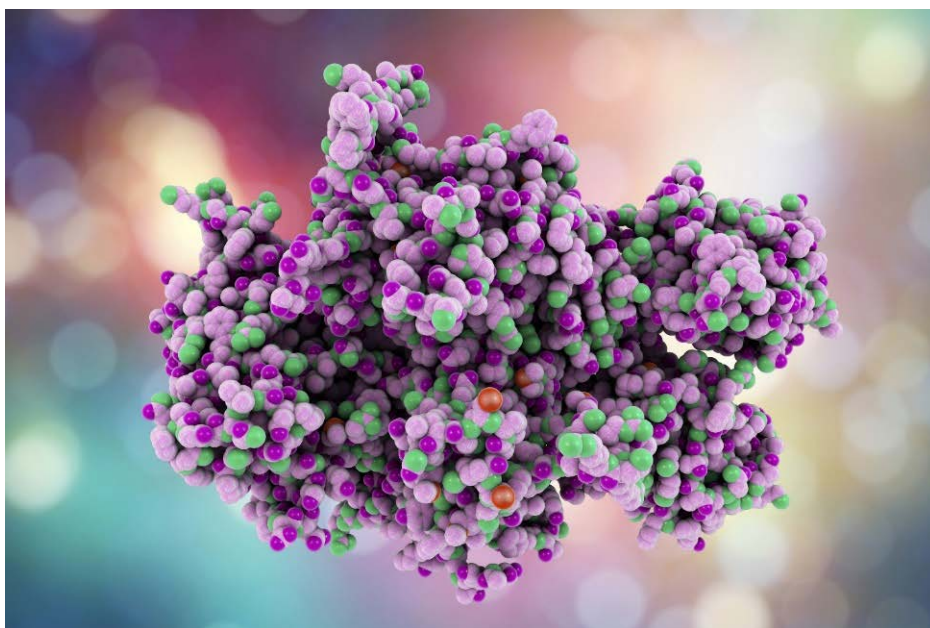
Ventajas del espectrofotómetro UV-VIS Agilent
Cary 3500 con multicelda y controlador Peltier
Agilent en la investigación de terapias con proteínas

Autores

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

Biswaranjan Mohanty
Sydney Analytical Core
Research Facility,
The University of Sydney,
Sidney, Nueva Gales del Sur
2006, Australia

Wesam Alwan y Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



Resumen

La estabilidad térmica de las proteínas es una característica importante de los productos bioterapéuticos, ya que los datos ofrecen información sobre las propiedades físicas y químicas que influyen en la estabilidad y la estructura de las proteínas. En este estudio se demuestra la caracterización sencilla y rápida de la estabilidad térmica de las proteínas y de la temperatura de fusión de una proteína mediante el espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 equipado con un módulo multicelda con controlador Peltier Agilent.

Introducción

El descubrimiento de fármacos es un proceso muy variado en el que se deben probar los nuevos posibles fármacos y sus efectos terapéuticos. La identificación y la caracterización adecuadas de los fármacos de interés son pasos esenciales en el proceso de descubrimiento de fármacos que pueden facilitar la identificación de compuestos terapéuticos principales.¹ En el caso de los productos terapéuticos con proteínas, la caracterización bioquímica abarca el peso molecular, la homogeneidad y heterogeneidad, la solubilidad, la estabilidad térmica, la composición de la secuencia de aminoácidos, la estructura secundaria, la estructura tridimensional y la modificación de las proteínas.^{2,3}

Los datos de estabilidad térmica ofrecen información sobre las propiedades físicas y químicas que influyen en la estabilidad y la estructura de las proteínas. Las temperaturas de fusión se pueden determinar mediante la supervisión de un cambio en las propiedades de la muestra a medida que se incrementa gradualmente la temperatura con diferentes métodos (Tabla 1). Cuando las proteínas se someten a temperaturas elevadas, las estructuras secundaria y terciaria cambian. Estos cambios estructurales exponen el núcleo hidrófobo y provocan la agregación de proteínas.⁴ La temperatura a la que la mitad de las proteínas se conservan en su forma soluble se conoce como la temperatura de fusión aparente (T_m), tal y como se muestra en la Figura 1. Esta temperatura se puede incrementar con la presencia de un ligando de unión.^{5,6} Los estudios sobre la estabilidad térmica contribuyen a conocer las uniones de los ligandos, la estabilidad del fármaco, la vida útil y las condiciones óptimas de almacenamiento, una información que resulta útil para la producción y la comercialización del fármaco en el futuro.

Análisis de estabilidad térmica de proteínas con espectroscopia UV-visible

En la Tabla 1 se resumen las ventajas y los inconvenientes de las diferentes técnicas que se emplean para medir la estabilidad térmica de las proteínas. La espectroscopia UV-visible es capaz de solventar ciertos problemas que supone el análisis. La UV-vis ofrece medidas de la absorbancia directas sin la necesidad de utilizar etiquetas de fluorescencia; las mediciones se pueden llevar a cabo con pequeñas cantidades de muestra y la interpretación de los resultados es sencilla y rápida, así como la elaboración de informes al respecto.

En esta nota de aplicación se demuestran las ventajas del espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 (Figura 2) a la hora de caracterizar la estabilidad térmica y la reproducibilidad de las proteínas. El espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 emplea una sonda de temperatura integrada en la cubeta que facilita información sobre el bloque Peltier, lo que permite controlar la temperatura de las soluciones durante las mediciones. Un soporte multicelda de ocho posiciones se instala en el instrumento y, mediante dispositivos Peltier sin agua y refrigerados por aire, se controla la temperatura de las muestras entre 0 y 110 °C. Para que las capacidades de experimentación sean más avanzadas, se mide cada posición de la cubeta de la multicelda de forma simultánea, lo que ofrece un análisis más rápido en comparación con otros métodos.

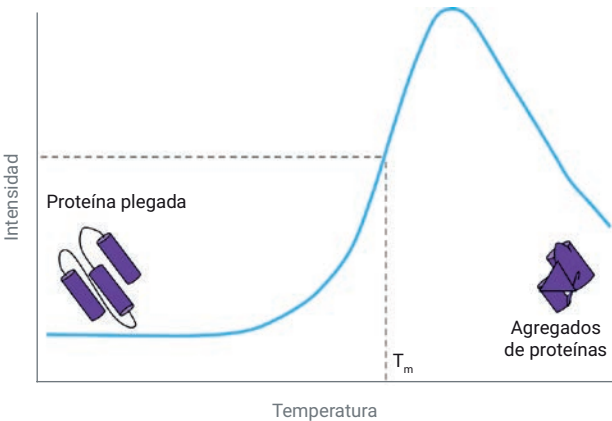


Figura 1. Respuesta típica de la intensidad de la proteína (o absorbancia) a medida que aumenta la temperatura.

Tabla 1. Técnicas utilizadas para medir la estabilidad térmica de las proteínas.

Técnica	Principio	Ventajas	Inconvenientes
Espectroscopia de dicroísmo circular ^{7,8}	Medición de la absorbancia en cuanto a elipticidad con luz polarizada circular.	– Cantidad reducida de material necesario – Elevada sensibilidad – Alta resolución	– Consume demasiado tiempo – Ciertos tampones pueden interferir en la UV lejana
Calorimetría diferencial de barrido ^{9,10}	Medición del cambio en la capacidad calorífica con respecto al material de referencia.	– Cantidad reducida de material necesario – Alta resolución	– La interpretación de los resultados puede ser compleja
Ensayo de cambios térmicos ^{11,12}	Medición de los cambios en la fluorescencia mediante la unión de un fluorocromo a las moléculas hidrófobas.	– Se pueden analizar varias muestras en una máquina de RT-PCR – Elevada sensibilidad – Cantidad reducida de material necesario	– Necesidad de contar con sondas de fluorescencia – Las sondas de fluorescencia pueden provocar cambios conformacionales – Las proteínas deben contener una cavidad para albergar las sondas de fluorescencia



Figura 2. El espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 multicelda puede servir para llevar a cabo un máximo de cuatro experimentos de temperatura en ocho posiciones de cubeta de forma simultánea.



Figura 3. En este estudio se utilizó la celda ultra micro de Agilent. El haz extremadamente pequeño y focalizado del espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 pasa a través de aberturas pequeñas y constantemente alineadas que no requieren ningún ajuste.

Experimento

Muestras

La Trobe Institute for Molecular Science (LIMS), La Trobe University, Australia, nos facilitó una muestra de isomerasa A con puentes disulfuro de *Escherichia coli* (EcDsbA, en estado natural). Se preparó una solución de $\approx 0,6$ mg/ml de EcDsbA en una disolución de tampón que contenía 50 mM de NaCl, 1 mM de EDTA y 100 mM de fosfato de sodio, ajustada a pH 7,0. Se emplearon cubetas de cuarzo Agilent de celda ultra micro, con volumen de 50 μ l y longitud de paso de luz de 10 mm (referencia 5062-2496, Figura 3). Como solución de referencia (blanco) se utilizó un tampón de fosfato puro.

Instrumentación y método

El espectrofotómetro UV/VIS Cary 3500 Multicelda Peltier se controlaba mediante el software Agilent Cary UV Workstation. En las Tablas 2 y 3, respectivamente, se muestran los parámetros del método para medir la absorbancia de la proteína y su estabilidad térmica. En el caso del estudio de análisis de la estabilidad térmica, se recogieron datos cada 0,1 °C con una velocidad de rampa de 0,1 °C/min.

Tabla 2. Parámetros de barrido del rango de longitud de onda.

Parámetro	Valor
Instrumento	Espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 3500
Rango de longitud de onda	De 200 a 400 nm
Tiempo promedio de la señal	0,1 s
Ancho de banda espectral	2 nm
Volumen de muestra	80 μ l; se añadió volumen adicional para ajustarlo por la evaporación

Tabla 3. Parámetros de experimentos de fusión térmica.

Parámetro	Valor
Instrumento	Espectrofotómetro UV-vis Agilent Cary 3500
Longitud de onda	280 nm
Tiempo promedio de la señal	2 s
Ancho de banda espectral	2 nm
Intervalo de datos	0,1 °C
Velocidad de rampa	0,1 °C/min
Control de temperatura	Bloque Peltier
Intervalo de temperatura	De 25 a 90 °C
Tamaño del filtro de suavizado y de derivada	25
Intervalo de datos de suavizado y de derivada	0,1 °C
Temperatura inferior del análisis	30 °C
Temperatura superior del análisis	90 °C
Cubeta	Cubeta de celda ultra micro de cuarzo
Volumen de muestra	70 μ l

La señal se promedió durante 2 segundos antes de registrar cada punto de datos. Se empleó la velocidad de rampa de 0,1 °C/min por la susceptibilidad de la muestra a la agregación en velocidades de rampa superiores. La temperatura del experimento se controló mediante el bloque Peltier de Cary 3500.

Resultados y comentarios

Para determinar el pico máximo de absorción de la proteína *EcDsbA*, se llevó a cabo un barrido de la longitud de onda mediante el espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 con los parámetros que aparecen en la Tabla 2. El sistema Cary 3500 estaba equipado con un módulo multicelda que permite la medición simultánea de siete muestras y una solución de referencia. Esta función incrementa la fiabilidad de los resultados, ya que las mediciones se recogen al mismo tiempo en condiciones idénticas. Si se precisa un pequeño volumen de muestra, como 70 µl, se pueden llevar a cabo las mediciones con una celda ultra micro (Figura 3). Dado que el sistema Cary 3500 cuenta con un haz pequeño y centrado, permite llevar a cabo una medición precisa con celdas ultra micro sin alineación previa. El pico máximo de absorción de *EcDsbA* se encontró a 280 nm, tal y como se muestra en la Figura 4.

En el caso del análisis de estabilidad térmica de la proteína *EcDsbA* se monitorizó la absorbancia a 280 nm a medida que aumentaba la temperatura. La temperatura de la muestra se controlaba con la temperatura del bloque Peltier con una velocidad de rampa de 0,1 °C/min, tal y como se recoge en la Tabla 3. A medida que se incrementaba la temperatura, se observaba un pico que indicaba un cambio en la absorbancia de la proteína provocado por un cambio en su estructura. El gráfico de fusión térmica (Figura 5) muestra una transición que tiene lugar a elevada temperatura (por encima de los 65 °C) en la proteína *EcDsbA*.

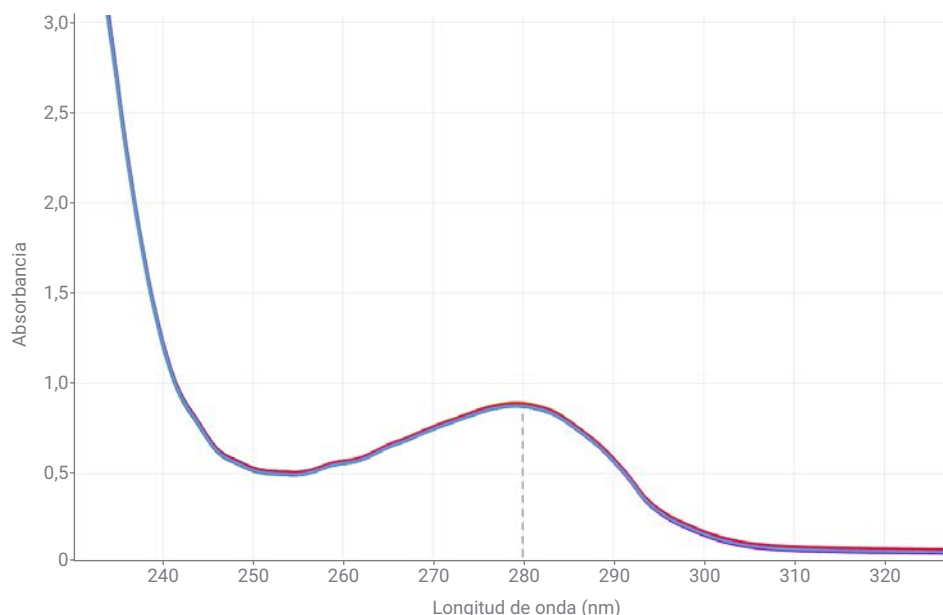


Figura 4. Barridos de rango de longitud de onda de siete muestras independientes de la proteína *EcDsbA* (en estado natural) que muestran el pico de la proteína *EcDsbA* a 280 nm. Se llevó a cabo la medición simultánea de las siete muestras mediante celdas micro ultra.

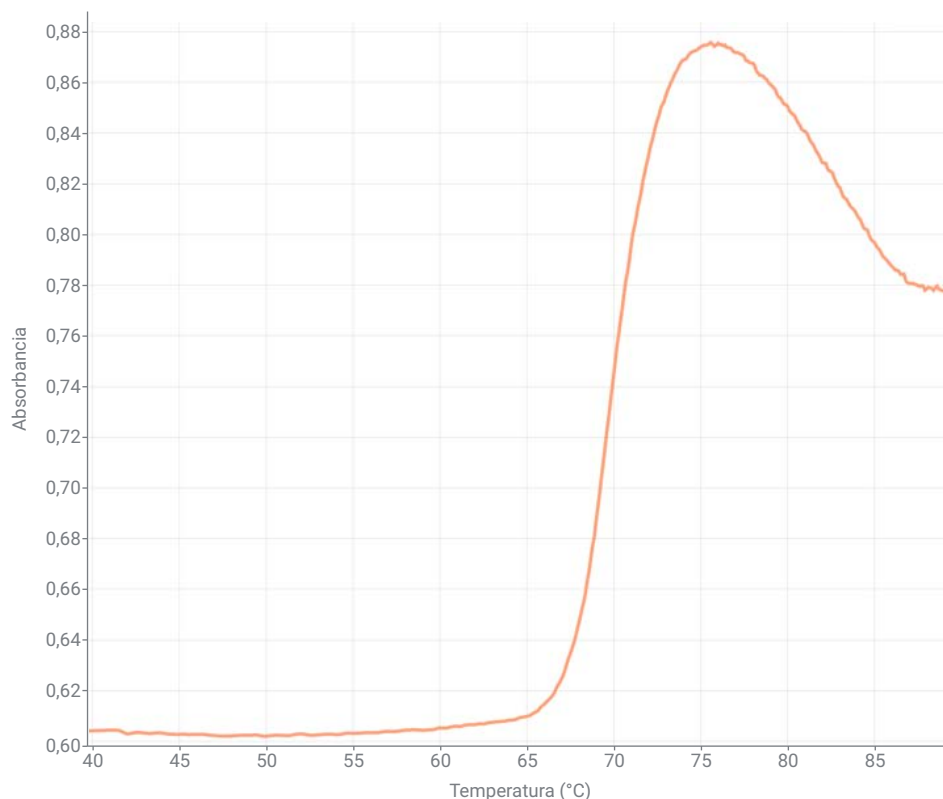


Figura 5. Gráfico de fusión térmica de la proteína *EcDsbA*. Los cambios en la absorbancia con los incrementos de temperatura indican cambios estructurales en la proteína.

El software Cary UV Workstation calcula la T_m de las muestras biológicas con la primera derivada de los datos medidos de absorbancia. T_m se puede determinar mediante la selección de los tamaños adecuados de suavizado y de filtro de derivada junto con la temperatura más alta y más baja del análisis. La T_m de EcDsbA fue 69,86 °C (n = 6; Figura 6) mediante los parámetros de análisis que se recogen en la Tabla 3.

La T_m calculada de la proteína EcDsbA que se obtuvo con el espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 coincidía con los resultados publicados anteriormente y que se habían obtenido mediante el dicróismo circular, tal y como se muestra en las Tablas 4.^{14,15}

La precisión de la medición de la T_m de EcDsbA mediante el sistema Cary 3500 se evaluó mediante un estudio de repetibilidad. La solución de muestra de la proteína se dividió en seis porciones y cada una se analizó por separado con la celda ultra micro de 70 µl. Se evaluó la reproducibilidad de los resultados calculando la media y la desviación estándar de los valores de T_m de EcDsbA (Tabla 4). El sistema UV/Vis Agilent Cary 3500 demostró una precisión excelente con una desviación estándar de tan solo 0,16 °C en las seis mediciones.

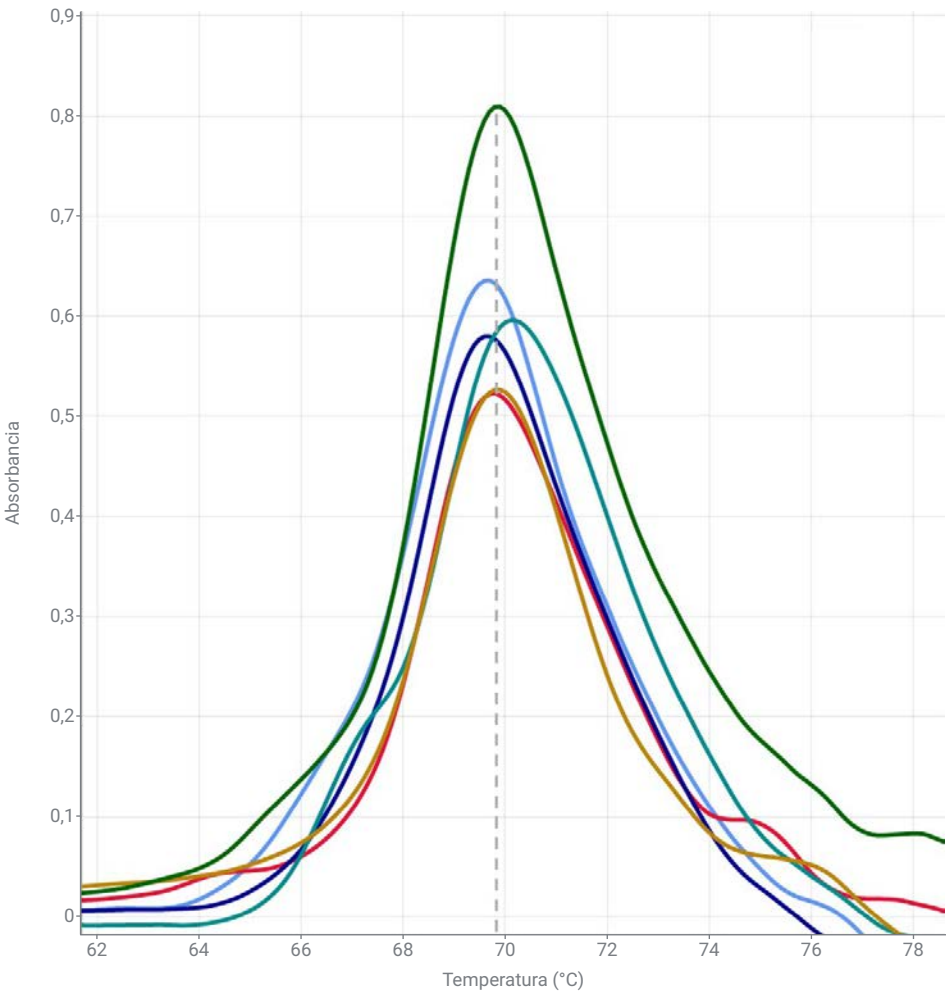


Figura 6. Gráficos de primera derivada de las seis muestras independientes de la proteína EcDsbA que se obtuvieron mediante el software Agilent Cary UV Workstation (T_m = 69,86 °C, n = 6).

Tabla 4. Valores de T_m de EcDsbA medidos mediante el espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 y que se incluyen en la documentación correspondiente.

Técnica	T_m de EcDsbA (°C)
Espectrofotómetro UV-vis Cary 3500, réplica 1	69,70
Espectrofotómetro UV-vis Cary 3500, réplica 2	69,80
Espectrofotómetro UV-vis Cary 3500, réplica 3	69,70
Espectrofotómetro UV-vis Cary 3500, réplica 4	70,20
Espectrofotómetro UV-vis Cary 3500, réplica 5	69,90
Espectrofotómetro UV-vis Cary 3500, réplica 6	69,90
Media	69,86
Desviación estándar	0,16
Valor 1 de la documentación ¹⁴	68,55
Valor 2 de la documentación ¹⁵	69,25

Conclusión

El espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 multicelda con controlador Peltier Agilent sirvió para determinar la temperatura de fusión (T_m) de seis muestras de la proteína EcDsbA de forma simultánea. Los resultados fueron reproducibles, tal y como muestra la desviación estándar de 0,16 °C que se logró en las seis porciones de una muestra de la proteína EcDsbA. Además, la T_m media de 69,86 °C calculada mediante el software Agilent Cary UV Workstation coincidía con los valores de la documentación publicada al respecto y que se había obtenido mediante la espectroscopia de dicroísmo circular. Los resultados demuestran la exactitud, la precisión y la rapidez del espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 3500 en los análisis de la estabilidad térmica de las proteínas.

Para optimizar aún más la productividad del método, el sistema UV/Vis Agilent Cary 3500 puede medir siete muestras al mismo tiempo sin poner en riesgo la precisión de los resultados. La capacidad de medir de forma simultánea al menos tres réplicas de la muestra a través del diseño de instrumentos se traduce en un ahorro de tiempo de gran valor para los laboratorios que precisan llevar a cabo mediciones de réplicas.

El software Cary UV Workstation incorpora cálculos de suavizado y de derivadas para facilitar el análisis de datos. Además, el software está disponible con controles técnicos opcionales para adquirir los datos, procesarlos, elaborar informes con ellos y almacenarlos de forma segura. Estos controles resultan cruciales para aquellos laboratorios que deben seguir las directrices de conformidad de la FDA 21 CFR Parte 11, del Anexo 11 de la UE, GAMP5, así como de ISO/IEC 17025 y EPA 40 CFR Parte 160.

www.agilent.com

DE83250769

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impreso en EE. UU., 4 de agosto de 2022
5994-5086ES

Referencias

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)