

Caractérisation de la stabilité thermique des protéines par spectroscopie UV-Vis

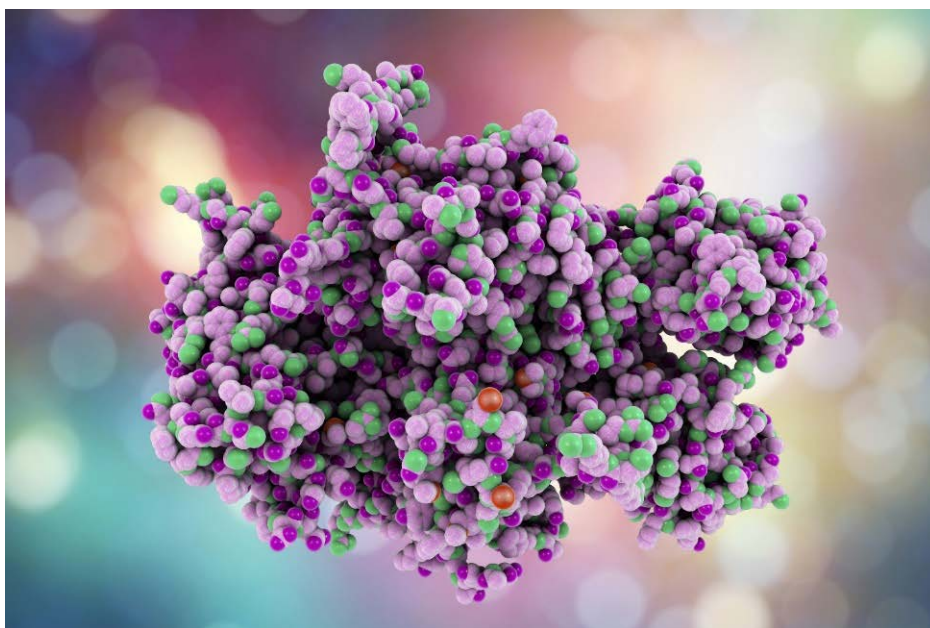
Avantages du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 à multicuve thermostatée par effet Peltier dans la recherche thérapeutique sur les protéines

Auteurs

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

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

Wesam Alwan et
Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



Résumé

La stabilité thermique des protéines est une caractéristique importante des biothérapies, car elle donne une indication des propriétés physicochimiques qui influencent la stabilité et la structure des protéines. Cette étude présente la caractérisation simple et rapide de la stabilité thermique et de la température de fusion d'une protéine à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 équipé d'un module multicuve thermostatée par effet Peltier.

Introduction

La découverte de médicaments est un processus complexe dans lequel les nouveaux médicaments potentiels et leurs effets thérapeutiques doivent être démontrés. L'identification et la caractérisation appropriées des cibles médicamenteuses sont des étapes importantes du processus de découverte de médicaments, qui peuvent faciliter l'identification de composés thérapeutiques têtes de série¹. Pour les produits thérapeutiques protéiques, la caractérisation biochimique comprend la masse moléculaire, l'homogénéité et l'hétérogénéité, la solubilité, la stabilité thermique, la composition de la séquence d'acides aminés, la structure secondaire, la structure tridimensionnelle et la modification des protéines^{2,3}.

Les données de stabilité thermique offrent une indication des propriétés physicochimiques qui influencent la stabilité et la structure des protéines. Les températures de fusion peuvent être déterminées à l'aide de diverses techniques (tableau 1) en suivant un changement dans les propriétés de l'échantillon à mesure que l'on augmente progressivement la température. Quand les protéines sont soumises à des températures élevées, leurs structures secondaire et tertiaire sont modifiées. Ces modifications structurales exposent le cœur hydrophobe et entraînent l'agrégation protéique⁴. La température à laquelle la moitié de la protéine est encore sous forme soluble est appelée température de fusion apparente (T_m), comme indiqué dans la figure 1. Cette température peut être augmentée par la fixation d'un ligand^{5,6}. Les études de stabilité thermique contribuent à la compréhension de la fixation du ligand, de la stabilité du médicament, de son cycle de vie et de ses conditions de stockage optimales, des informations utiles pour la production et la commercialisation ultérieures du médicament.

Analyse de la stabilité thermique des protéines à l'aide de la spectroscopie UV-Vis

Le tableau 1 résume les avantages et inconvénients de diverses techniques utilisées pour mesurer la stabilité thermique des protéines. La spectroscopie UV-Vis permet de surmonter de nombreuses difficultés inhérentes à l'analyse. L'UV-Vis mesure directement l'absorbance sans nécessiter de marqueur fluorescent. Les mesures peuvent être effectuées sur des quantités moindres d'échantillons et les résultats sont rapides et faciles à interpréter et à rapporter.

Cette note d'application démontre les avantages du spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 (Figure 2) dans la caractérisation de la stabilité thermique et de la reproductibilité des protéines. Le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 est doté d'une sonde de température intégrée dans la cuve qui transmet des informations au bloc Peltier et permet de réguler la température des solutions pendant les mesures. Un support multicuve à huit positions est intégré à l'instrument et utilise des éléments Peltier sans eau et refroidis à l'air pour réguler la température des échantillons entre 0 et 110 °C. Pour accroître la capacité expérimentale, chaque position de cuve de la multicuve est mesurée simultanément, permettant une analyse plus rapide que les autres techniques.

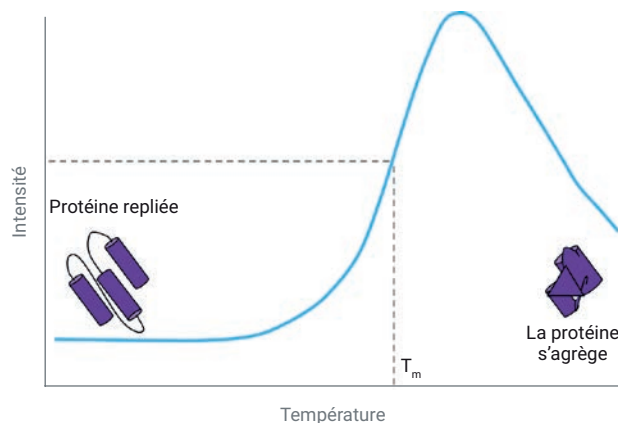


Figure 1. Réponse typique de l'intensité (ou de l'absorbance) des protéines en fonction de l'augmentation de la température.

Tableau 1. Techniques utilisées pour mesurer la stabilité thermique des protéines.

Technique	Principe	Avantages	Inconvénients
Spectroscopie de dichroïsme circulaire ^{7,8}	Mesure l'absorbance en termes d'ellipticité à l'aide d'une lumière polarisée circulaire.	– Petite quantité de matériel nécessaire – Haute sensibilité – Résolution élevée	– Chronophage – Certains tampons entraînent des interférences dans l'UV lointain
Calorimétrie différentielle à balayage ^{9,10}	Mesure un changement dans la capacité calorifique par rapport à un matériel de référence.	– Petite quantité de matériel nécessaire – Résolution élevée	– L'interprétation des résultats peut être difficile
Test de dénaturation thermique (TSA) ^{11,12}	Mesure les changements de fluorescence suite à la fixation d'un colorant fluorophore sur des molécules hydrophobes.	– Possibilité de traiter plus d'un échantillon dans un appareil de RT-PCR – Haute sensibilité – Petite quantité de matériel nécessaire	– Nécessite des sondes fluorescentes – Les sondes fluorescentes peuvent entraîner des changements de conformation – Les protéines doivent avoir une poche capable d'accueillir les sondes fluorescentes



Figure 2. Le spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 multicuve peut être utilisé simultanément pour quatre expériences de température sur huit positions de cuvette.



Figure 3. Cellule ultra-micro Agilent utilisée dans cette étude. Le faisceau focalisé extrêmement petit du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 passe à travers de petites ouvertures optiques qui sont constamment alignées et n'ont pas besoin d'être réglées.

Méthode expérimentale

Échantillons

Un échantillon de protéine disulfure isomérase d'*Escherichia coli* (EcDsbA, à l'état natif) a été fourni par La Trobe Institute for Molecular Science (LIMS), La Trobe University, Australie. Une solution de $\approx 0,6$ mg/mL d'EcDsbA a été préparée dans une solution tampon contenant 50 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA et 100 mM de phosphate de sodium. Le pH a été ajusté à 7,0. Des cellules ultra-micro Agilent en quartz de 50 μ L de volume et de 10 mm de trajet optique ont été utilisées (réf. 5062-2496, figure 3). Un tampon de phosphate pur a été utilisé comme solution de référence (blanc).

Instruments et méthode

Un spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 multicuve à effet Peltier a été piloté à l'aide du logiciel Agilent Cary UV Workstation. Les paramètres de méthode utilisés pour mesurer l'absorbance et la stabilité thermique de la protéine sont indiqués respectivement dans les tableaux 2 et 3. Pour l'analyse de la stabilité thermique, les données ont été collectées tous les 0,1 °C à l'aide d'une vitesse de montée en température de 0,1 °C/min.

Tableau 2. Paramètres de balayage de la gamme de longueurs d'onde.

Paramètre	Valeur
Instrument	Spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500
Gamme de longueurs d'onde	200 à 400 nm
Durée d'intégration du signal	0,1 s
Bande passante spectrale	2 nm
Volume d'échantillon	80 μ L ; un volume supplémentaire a été ajouté pour compenser l'évaporation

Tableau 3. Paramètres expérimentaux de la fusion thermique.

Paramètre	Valeur
Instrument	Spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500
Longueur d'onde	280 nm
Durée d'intégration du signal	2 s
Bande passante spectrale	2 nm
Intervalle de données	0,1 °C
Vitesse de montée en température	0,1 °C/min
Régulation de la température	Bloc Peltier
Gamme de température	25 à 90 °C
Taille des filtres de lissage et de dérivation	25
Intervalle de données de lissage et de dérivation	0,1 °C
Température inférieure de l'analyse	30 °C
Température supérieure de l'analyse	90 °C
Cuve	Cellule ultra-micro en quartz
Volume d'échantillon	70 μ L

Le signal a été moyenné sur 2 secondes avant l'enregistrement de chaque point de données. Une vitesse de montée en température de 0,1 °C/min a été utilisée en raison de la sensibilité de l'échantillon à l'agrégation aux vitesses de montée en température plus élevées. La température expérimentale a été réglée par le bloc Peltier du Cary 3500.

Résultats et discussion

Pour déterminer le pic d'absorption maximal de la protéine *EcDsbA*, un balayage de longueur d'onde a été effectué sur le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 à l'aide des paramètres indiqués dans le tableau 2. Lorsqu'il est équipé du module multicuve, le Cary 3500 permet de mesurer simultanément sept échantillons et une solution de référence. Cette capacité améliore la fiabilité des résultats, car les mesures sont réalisées en même temps dans des conditions identiques. S'il est nécessaire d'utiliser un petit volume d'échantillon, par exemple 70 µL, les mesures peuvent être effectuées à l'aide d'une cellule ultra-micro (Figure 3). Puisque le Cary 3500 dispose d'un faisceau petit et focalisé, il permet de réaliser des mesures exactes dans des cellules ultra-micro sans aucun préalignement. Le pic d'absorption maximal d'*EcDsbA* était de 280 nm, comme le montre la figure 4.

Pour l'analyse de la stabilité thermique de la protéine *EcDsbA*, l'absorbance à 280 nm a été suivie pendant l'augmentation de la température. La température de l'échantillon était réglée à l'aide du bloc Peltier avec une vitesse de montée en température de 0,1 °C/min, comme indiqué dans le tableau 3. Un pic est apparu avec l'augmentation de la température, indiquant une modification de l'absorbance de la protéine due à un changement dans sa structure. La courbe de fusion thermique (Figure 5) présente une transition se produisant à haute température (au-dessus de 65 °C) pour la protéine *EcDsbA*.

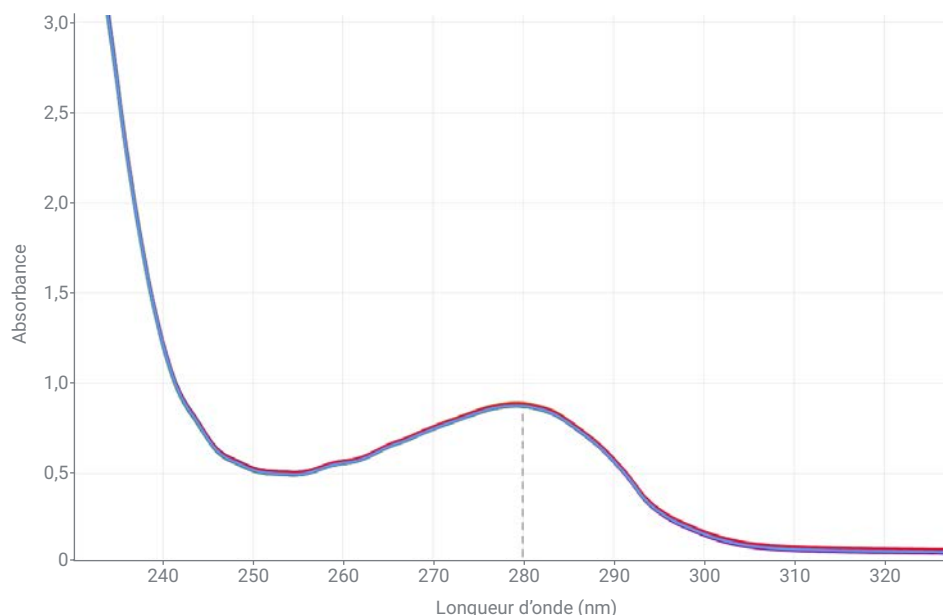


Figure 4. Balayages de la gamme de longueurs d'onde pour sept échantillons distincts de protéine *EcDsbA* (à l'état natif), présentant un pic de protéine *EcDsbA* à 280 nm. Les sept échantillons ont été mesurés simultanément à l'aide de cellules ultra-micro.

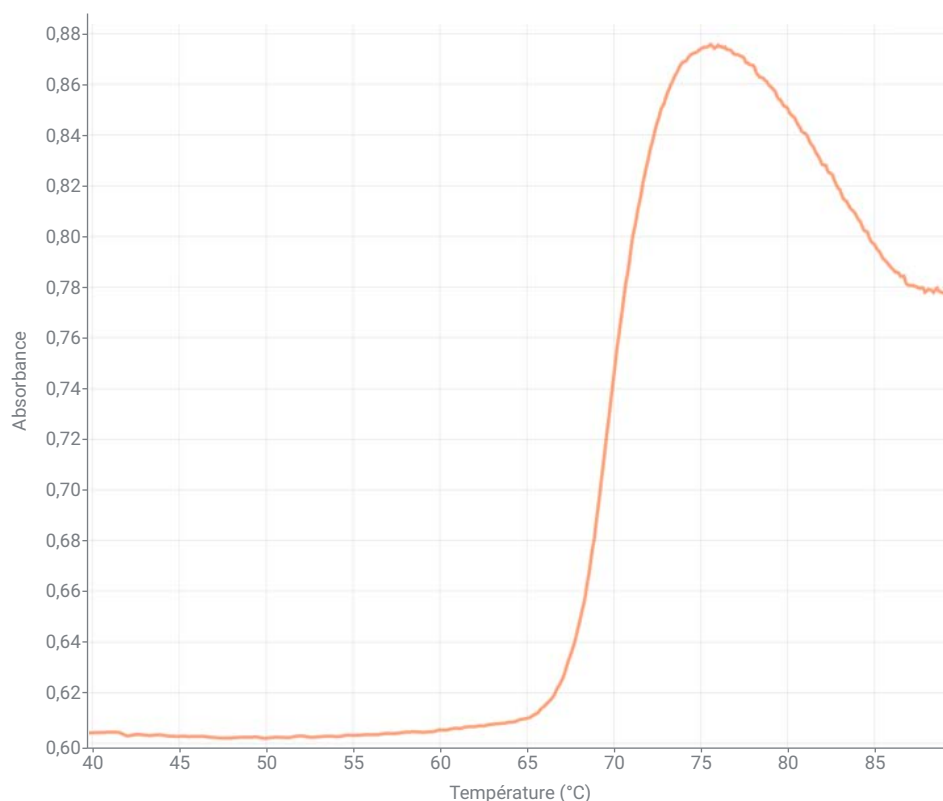


Figure 5. Courbe de fusion thermique de la protéine *EcDsbA*. Les changements d'absorbance suite à l'augmentation de la température indiquent des modifications structurales de la protéine.

Le logiciel Cary UV Workstation calcule la T_m des échantillons biologiques à l'aide de la dérivée première des données d'absorbance mesurées. La T_m peut être déterminée en sélectionnant les tailles de filtres de lissage et de dérivation appropriées ainsi que les températures supérieure et inférieure pour l'analyse. La T_m d'EcDsbA était de 69,86 °C (n = 6 ; figure 6) avec les paramètres d'analyse indiqués dans le tableau 3.

La T_m calculée pour la protéine EcDsbA à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 correspondait aux résultats obtenus précédemment à l'aide du dichroïsme circulaire, comme indiqué dans le tableau 4^{14,15}.

La précision de la mesure de la T_m d'EcDsbA par le Cary 3500 a été évaluée en effectuant une étude de reproductibilité. La solution d'échantillon de la protéine a été divisée en six portions, et chaque portion a été analysée séparément à l'aide de la cellule ultra-micro de 70 µL. La reproductibilité des résultats a été évaluée en calculant la moyenne et l'écart-type des valeurs de T_m d'EcDsbA (tableau 4). Le système UV-Vis Cary 3500 présentait une excellente précision, avec un écart-type de seulement 0,16 °C pour six mesures.

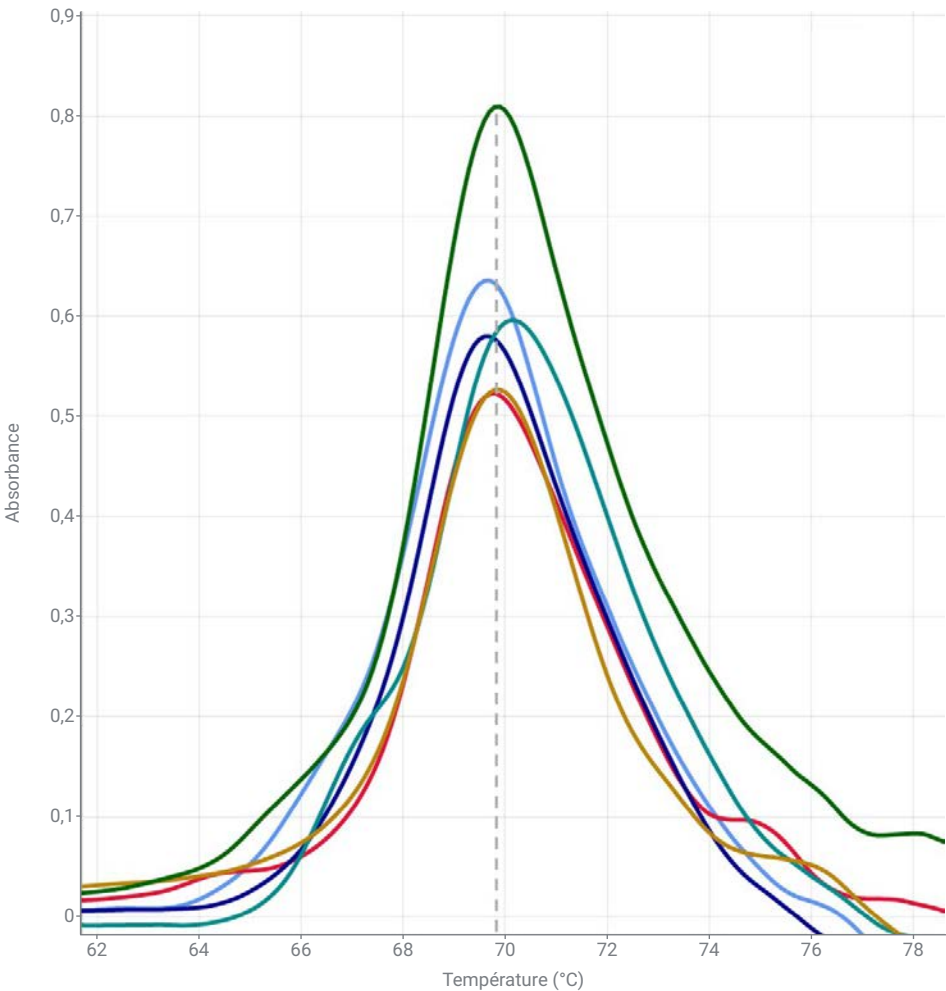


Figure 6. Courbes de la dérivée première de six échantillons distincts de protéine EcDsbA obtenues à l'aide du logiciel Agilent Cary UV Workstation (T_m = 69,86 °C, n = 6).

Tableau 4. Valeurs de T_m d'EcDsbA mesurées à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 et rapportées dans la littérature.

Technique	T_m d'EcDsbA (°C)
Spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500, réplicat 1	69,70
Spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500, réplicat 2	69,80
Spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500, réplicat 3	69,70
Spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500, réplicat 4	70,20
Spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500, réplicat 5	69,90
Spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500, réplicat 6	69,90
Moyenne	69,86
Écart-type	0,16
Littérature, 1 ^{re} valeur ¹⁴	68,55
Littérature, 2 ^e valeur ¹⁵	69,25

Conclusion

Le spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 équipé d'une multicuve thermostatée par effet Peltier a été utilisé pour déterminer la température de fusion (T_m) de six échantillons de protéine EcDsbA simultanément. Les résultats se sont avérés reproductibles, comme indiqué par l'écart-type de 0,16 °C obtenu pour six portions d'un échantillon de protéine EcDsbA. De plus, la T_m moyenne de 69,86 °C calculée à l'aide du logiciel Agilent Cary UV Workstation correspondait aux valeurs de la littérature obtenues par spectroscopie de dichroïsme circulaire. Les résultats démontrent l'exactitude, la précision et la rapidité offertes par le spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 dans les analyses de stabilité thermique des protéines.

Pour accroître davantage la productivité de la méthode, l'UV-Vis Cary 3500 permet les mesures de sept échantillons en même temps sans compromettre l'exactitude des résultats. La capacité de mesurer simultanément au moins trois réplicats de l'échantillon grâce à la conception de l'instrument se traduit par un gain de temps précieux pour les laboratoires devant effectuer des mesures de réplicats.

Le logiciel Cary UV Workstation possède des fonctions de calcul de lissage et de dérivation intégrées pour simplifier le traitement des données. En outre, ce logiciel est disponible avec des contrôles techniques en option pour assurer en toute sécurité l'acquisition, le traitement, le reporting et le stockage des données. Ces contrôles sont essentiels aux laboratoires devant respecter les directives de conformité de la réglementation 21 CFR Part 11 de la FDA, de l'EU annexe 11, du GAMP5, ainsi que de la norme ISO/CEI 17025 et de la réglementation 40 CFR Part 160 de l'EPA.

www.agilent.com

DE83250769

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 4 août 2022
5994-5086FR

Références

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**, 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**, 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**, 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)