

Caratterizzazione della stabilità termica delle proteine mediante spettroscopia UV-visibile

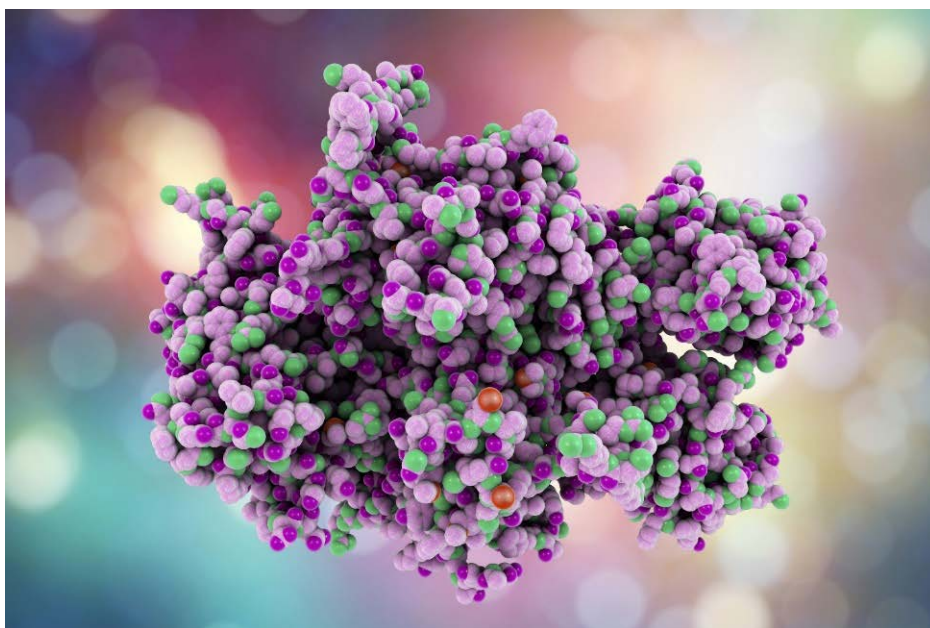
Vantaggi dello spettrofotometro UV-Vis
Agilent Cary 3500 dotato di multicella di Peltier a temperatura controllata nella ricerca di agenti terapeutici basati su proteine

Autori

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

Biswaranjan Mohanty
Sydney Analytical Core
Research Facility,
Università di Sydney, Nuovo
Galles del Sud 2006, Australia

Wesam Alwan e Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



Abstract

La stabilità termica delle proteine è un'importante caratteristica dei farmaci bioterapeutici, in quanto i dati forniscono informazioni sulle proprietà chimiche e fisiche che influenzano la stabilità e la struttura delle proteine. Nel presente studio viene descritta la rapida e semplice caratterizzazione della stabilità termica e la temperatura di fusione di una proteina, usando lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500 dotato di un modulo con multicella di Peltier a temperatura controllata.

Introduzione

Lo sviluppo di farmaci è un processo molto complesso che prevede la dimostrazione di nuovi potenziali farmaci e dei loro effetti terapeutici. La corretta identificazione e l'adeguata caratterizzazione dei target di un farmaco costituiscono passaggi importanti nel processo di sviluppo di farmaci, in grado di facilitare l'identificazione di composti terapeutici guida.¹ Nel caso di agenti terapeutici basati su proteine, la caratterizzazione biochimica include peso molecolare, omogeneità ed eterogeneità, solubilità, stabilità termica, composizione della sequenza aminoacidica, struttura secondaria, struttura tridimensionale e modificazione della proteina.^{2,3}

I dati sulla stabilità termica forniscono informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche che influenzano la stabilità e la struttura delle proteine. Le temperature di fusione possono essere determinate mediante il monitoraggio di cambiamenti nelle proprietà del campione all'aumentare graduale della temperatura, utilizzando svariate tecniche (Tabella 1). Quando le proteine sono sottoposte a temperature elevate, le strutture secondaria e terziaria cambiano. Questi cambiamenti strutturali rendono accessibile il nucleo idrofobico e portano all'aggregazione delle proteine.⁴ La temperatura alla quale metà della proteina si trova ancora nella forma solubile è nota come temperatura di fusione apparente (T_m), come mostrato nella Figura 1. La presenza di un ligando legato può portare all'aumento di tale temperatura.^{5,6} Gli studi di stabilità termica contribuiscono a comprendere la capacità di legame, la stabilità del farmaco, la durata e le condizioni di conservazione ottimali, tutte informazioni utili per la futura produzione e commercializzazione del farmaco.

Analisi di stabilità termica delle proteine mediante spettroscopia UV-Vis

Nella Tabella 1 sono riassunti i vantaggi e gli svantaggi delle varie tecniche che sono utilizzate per misurare la stabilità termica delle proteine. La spettroscopia UV-Vis è d'ausilio nel superare molte delle difficoltà legate all'analisi. La tecnica UV-Vis offre misure di assorbanza dirette senza l'impiego di marcatori fluorescenti; le misurazioni possono essere eseguite utilizzando piccole quantità di campione e i risultati sono rapidi e facili da interpretare e refertare.

La presente nota applicativa dimostra i benefici legati all'uso dello spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 (Figura 2) per la caratterizzazione della stabilità termica delle proteine e per la riproducibilità delle relative misurazioni. Lo spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 utilizza una sonda di temperatura incorporata nella cuvetta che fornisce feedback al blocco Peltier, consentendo il controllo della temperatura delle soluzioni durante le misurazioni. Un supporto multicella a otto posizioni è integrato nello strumento e utilizza dispositivi Peltier in assenza d'acqua e con raffreddamento ad aria per controllare la temperatura dei campioni da 0 a 110 °C. Allo scopo di aumentare la capacità sperimentale, tutte le posizioni della cuvetta della multicella sono misurate simultaneamente, garantendo un'analisi più rapida rispetto alle altre

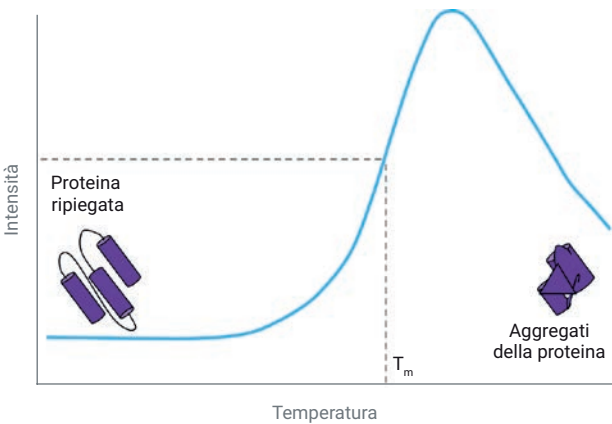


Figura 1. Tipica risposta dell'intensità della proteina (o assorbanza) all'aumentare della temperatura.

Tabella 1. Tecniche utilizzate per misurare la stabilità termica delle proteine.

Tecnica	Principio	Vantaggi	Svantaggi
Spettroscopia di dicroismo circolare ^{7,8}	Misura l'assorbanza in termini di ellitticità usando luce polarizzata circolarmente.	– Sono necessarie piccole quantità di materiale – Alta sensibilità – Alta risoluzione	– Richiede molto tempo – Alcuni tamponi causano interferenza nell'UV lontano
Calorimetria differenziale a scansione ^{9,10}	Misura il cambiamento nella capacità termica rispetto a un materiale di riferimento.	– Sono necessarie piccole quantità di materiale – Alta risoluzione	– L'interpretazione dei risultati può essere difficoltosa
Saggio di spostamento termico ^{11,12}	Misura i cambiamenti nella fluorescenza in seguito al legame di un fluorocromo a molecole idrofobiche.	– È in grado di analizzare più di un campione su uno strumento per RT-PCR – Alta sensibilità – Sono necessarie piccole quantità di materiale	– Richiede sonde fluorescenti – Le sonde fluorescenti possono causare cambiamenti nella conformazione – Le proteine devono avere una "tasca" per permettere l'interazione con le sonde fluorescenti



Figura 2. Lo spettrofotometro UV-Vis Agilent multicella Cary 3500 può essere utilizzato per massimo quattro esperimenti dipendenti dalla temperatura, in otto posizioni diverse della cuvetta, contemporaneamente.



Figura 3. Microcella ultra Agilent usata nello studio. Il fascio luminoso estremamente piccolo e focalizzato dello spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500 attraversa le piccole aperture che sono permanentemente allineate e non richiedono regolazioni.

tecniche.

Condizioni sperimentali

Campioni

Un campione di isomerasi A contenente ponti disolfuro di *Escherichia coli* (EcDsbA, stato nativo) è stato fornito da La Trobe Institute for Molecular Science (LIMS), Università La Trobe, Australia. Una soluzione di $\approx 0,6$ mg/mL di EcDsbA è stata preparata in una soluzione tampone contenente NaCl 50 mM, EDTA 1 mM e fosfato di sodio 100 mM, portata a pH 7,0. Sono state utilizzate una microcella ultra Agilent, volume 50 μ L, e cuvette di quarzo con lunghezza del percorso di 10 mm (codice 5062-2496, Figura 3). Il tampone fosfato puro è stato utilizzato come soluzione di riferimento (bianco).

Strumentazione e metodo

Uno spettrofotometro UV-Vis multicella Cary 3500 con multicella di Peltier era controllato usando il software della workstation Agilent Cary UV. I parametri del metodo utilizzati per misurare l'assorbanza e la stabilità termica della proteina sono mostrati nelle Tabelle 2 e 3, rispettivamente. Per lo studio di analisi della stabilità termica, i dati sono stati raccolti ogni 0,1 °C usando una velocità di rampa di 0,1 °C/min.

Tabella 2. Parametri di scansione di intervalli di lunghezze d'onda.

Parametro	Valore
Strumento	Spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500
Intervallo di lunghezze d'onda	Da 200 a 400 nm
Tempo per la media del segnale	0,1 s
Larghezza di banda spettrale	2 nm
Volume di campione	80 μ L, volume aggiuntivo è stato aggiunto per tener conto dell'evaporazione

Tabella 3. Parametri sperimentali per la fusione termica.

Parametro	Valore
Strumento	Spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500
Lunghezza d'onda	280 nm
Tempo per la media del segnale	2 s
Larghezza di banda spettrale	2 nm
Intervallo dati	0,1 °C
Rampa di riscaldamento	0,1 °C/min
Controllo della temperatura	Blocco Peltier
Intervallo di temperatura	Da 25 a 90 °C
Dimensioni dei filtri di smoothing e derivata	25
Intervallo dati di smoothing e derivata	0,1 °C
Temperatura inferiore dell'analisi	30 °C
Temperatura superiore dell'analisi	90 °C
Cuvetta	Cuvetta in quarzo per microcella ultra
Volume di campione	70 μ L

La media del segnale è stata calcolata per 2 secondi, prima di passare alla registrazione di ciascun punto di dati. La suscettibilità del campione all'aggregazione a velocità di rampa più elevate ha determinato la scelta della velocità di rampa di 0,1 °C/min. La temperatura sperimentale veniva controllata mediante il blocco Peltier di Cary 3500.

Risultati e discussione

Allo scopo di determinare il picco massimo di assorbimento della proteina EcDsbA, è stata eseguita una scansione delle lunghezze d'onda con lo spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 usando i parametri mostrati nella Tabella 2. Cary 3500 dotato del modulo con multicella consente la misurazione simultanea di sette campioni e di una soluzione di riferimento. Questa funzione garantisce una maggiore affidabilità dei risultati, poiché le misurazioni sono raccolte allo stesso tempo e nelle stesse condizioni. Se è richiesto un piccolo volume di campione, per esempio 70 µL, è possibile eseguire le misurazioni usando una microcella ultra (Figura 3). Il piccolo e focalizzato fascio luminoso del sistema Cary 3500 permette misurazioni accurate utilizzando microcelle ultra senza bisogno di pre-allineamento. Il picco massimo di assorbimento per EcDsbA risultava essere a 280 nm, come mostrato nella Figura 4.

Per l'analisi della stabilità termica della proteina EcDsbA, l'assorbanza a 280 nm è stata monitorata all'aumentare della temperatura. La temperatura del campione era controllata mediante la temperatura del blocco Peltier con una velocità di rampa di 0,1 °C/min, come specificato nella Tabella 3. Con l'aumento della temperatura, si è osservato un picco, indicazione di un cambiamento nell'assorbanza della proteina causato da un cambiamento nella struttura della proteina. Il grafico di fusione termica (Figura 5) mostra una transizione che si verifica ad alte temperature (sopra 65 °C) per la proteina EcDsbA.

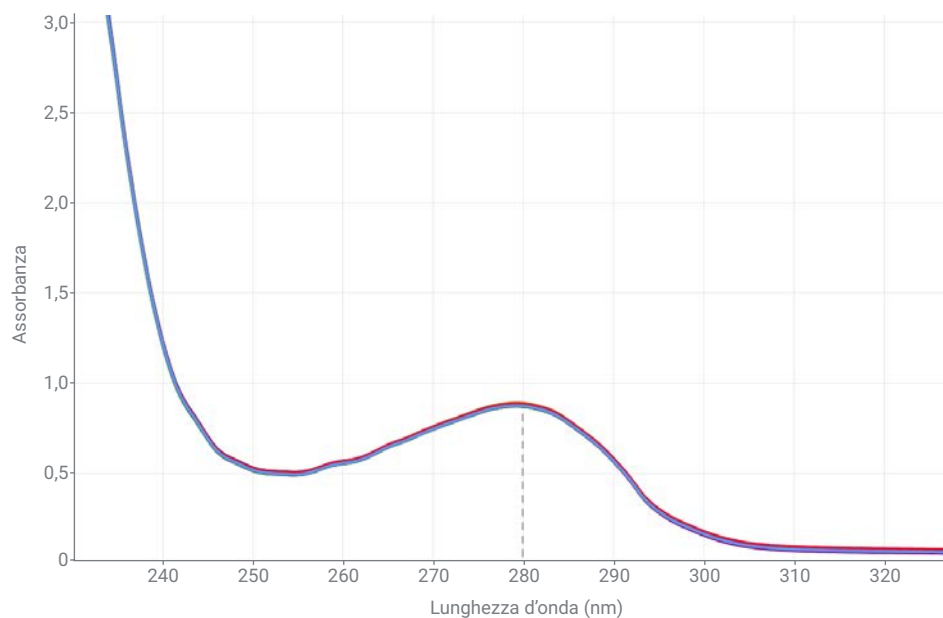


Figura 4. Scansioni di intervalli di lunghezze d'onda di sette campioni distinti della proteina EcDsbA (stato nativo), che mostrano il picco della proteina EcDsbA a 280 nm. I sette campioni sono stati misurati contemporaneamente usando le microcelle ultra.

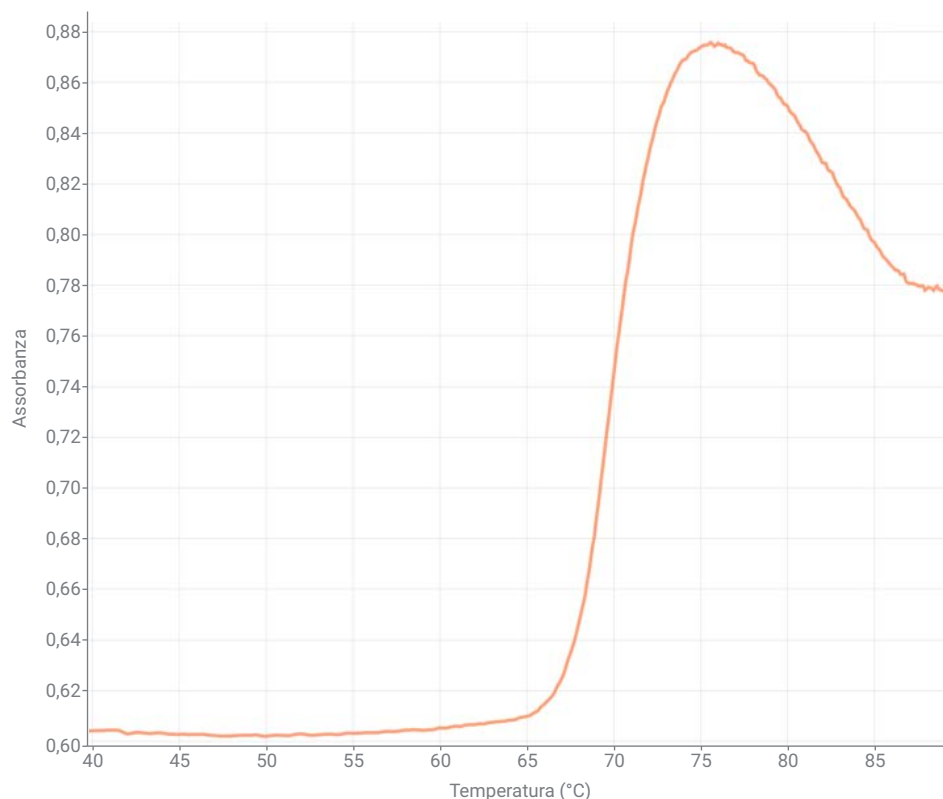


Figura 5. Grafico di fusione termica della proteina EcDsbA. Cambiamenti nell'assorbanza all'aumentare della temperatura sono indici di cambiamenti strutturali delle proteine.

Il software della workstation Cary UV calcola la T_m dei campioni biologici usando la derivata prima dei dati dell'assorbanza misurata. È possibile determinare la T_m selezionando le appropriate dimensioni dei filtri di smoothing e derivata, insieme alla temperatura superiore e inferiore per l'analisi. La T_m di EcDsbA risultava essere 69,86 °C (n = 6; Figura 6) usando i parametri di analisi mostrati nella Tabella 3.

La T_m calcolata per la proteina EcDsbA ottenuta usando lo spettrometro UV-Vis Cary 3500 concordava con i risultati riportati precedentemente, ottenuti mediante dicroismo circolare, come mostrato nella Tabella 4.^{14, 15}

La precisione della misurazione della T_m di EcDsbA con Cary 3500 è stata valutata conducendo uno studio di ripetibilità. La soluzione di campione proteico è stata suddivisa in sei porzioni e ciascuna porzione è stata analizzata separatamente usando la microcella ultra da 70 µL. La ripetibilità dei risultati è stata valutata calcolando la media e la deviazione standard dei valori di T_m di EcDsbA (Tabella 4). Il sistema UV-Vis Agilent Cary 3500 dimostrava eccellente precisione, con deviazione standard di soli 0,16 °C su sei misurazioni.

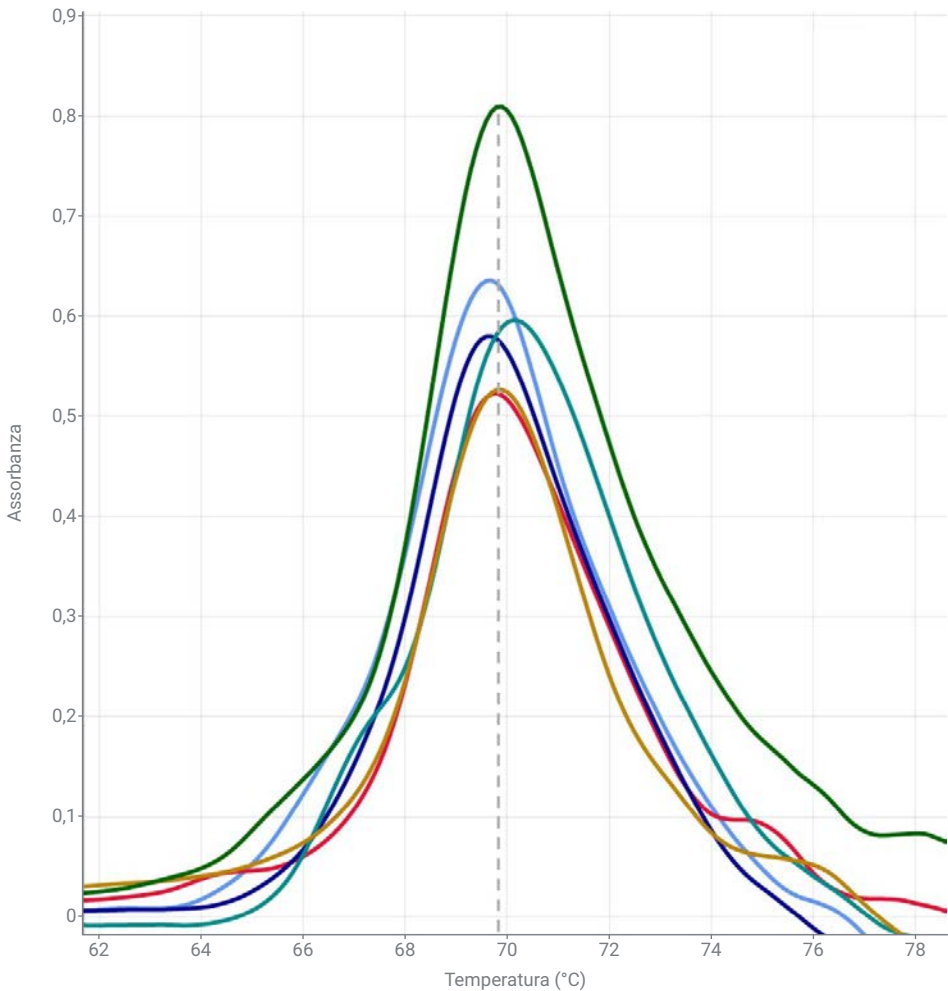


Figura 6. Grafici della derivata prima di sei campioni distinti della proteina EcDsbA ottenuti usando il software della workstation Agilent Cary UV (T_m = 69,86 °C, n = 6).

Tabella 4. Valori della T_m di EcDsbA misurata usando lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500 e riportati in letteratura.

Tecnica	T_m di EcDsbA (°C)
Spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 Replicato 1	69,70
Spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 Replicato 2	69,80
Spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 Replicato 3	69,70
Spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 Replicato 4	70,20
Spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 Replicato 5	69,90
Spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 Replicato 6	69,90
Media	69,86
Deviazione standard	0,16
Valore 1 in letteratura ¹⁴	68,55
Valore 2 in letteratura ¹⁵	69,25

Conclusione

Si è utilizzato lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500 dotato di una multicella di Peltier a temperatura controllata per determinare contemporaneamente la temperatura di fusione (T_m) di sei campioni della proteina EcDsbA. I risultati erano riproducibili, come mostrato dalla deviazione standard di 0,16 °C ottenuta per sei porzioni di un singolo campione della proteina EcDsbA. Inoltre, la T_m media di 69,86 °C calcolata usando il software della workstation Agilent Cary UV concordava con i valori presenti in letteratura ottenuti mediante spettroscopia di dicroismo circolare. I risultati dimostrano l'accuratezza, la precisione e la velocità dello spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 per le analisi di stabilità termica delle proteine.

Al fine di aumentare ulteriormente la produttività del metodo, il sistema Cary UV-Vis 3500 è in grado di misurare sette campioni allo stesso tempo senza compromettere l'accuratezza dei risultati. La capacità di misurare contemporaneamente almeno tre replicati del campione attraverso il design dell'ottica si traduce in risparmio di tempo prezioso per i laboratori che richiedono misure in replicato.

Il software della workstation Cary UV è dotato di capacità integrate di calcolo di smoothing e derivata per facilitare l'analisi dei dati. In aggiunta, il software è disponibile con controlli di natura tecnica opzionali per acquisire, processare, generare report e archiviare dati in modo sicuro. Questi controlli sono essenziali per i laboratori che devono seguire le linee guida di conformità di CFR 21 Parte 11 della FDA, Allegato 11 della UE, GAMP5, così come ISO/IEC 17025 e CFR 40 Parte 160 dell'EPA.

www.agilent.com

DE83250769

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Stampato negli Stati Uniti, 4 agosto 2022
5994-50861TE

Bibliografia

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)