

Caracterização da estabilidade térmica de proteínas usando espectroscopia UV-Vis

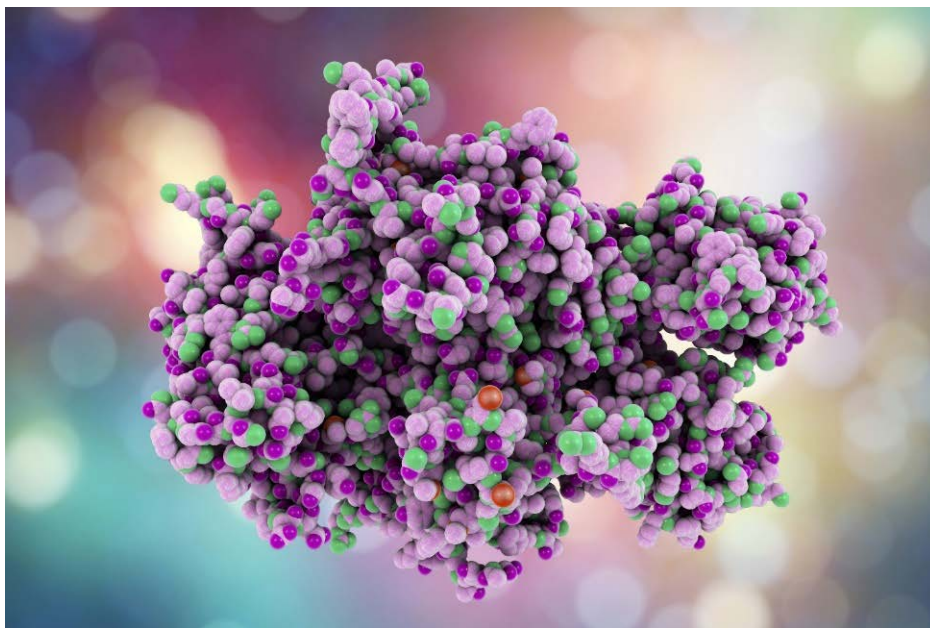
Benefícios do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 Agilent com Multicell Peltier com controle de temperatura na pesquisa terapêutica de proteínas

Autores

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

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

Wesam Alwan e Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



Resumo

A estabilidade térmica das proteínas é uma característica importante na bioterapêutica, pois fornece informações sobre as propriedades físicas e químicas que influenciam a estabilidade e a estrutura das proteínas. Este estudo demonstra a caracterização rápida e simples da estabilidade térmica de proteínas e da temperatura de fusão de uma proteína usando o espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 Agilent equipado com um módulo Multicell Peltier com controle de temperatura.

Introdução

A descoberta de novos medicamentos é um processo multifacetado que consiste na demonstração do seu potencial de uso e seus efeitos terapêuticos. A identificação e caracterização adequadas dos medicamentos-alvo são etapas importantes no processo de descoberta, pois podem facilitar a identificação de compostos terapêuticos principais.¹ Para proteínas terapêuticas, a caracterização bioquímica inclui peso molecular, homogeneidade e heterogeneidade, solubilidade, estabilidade térmica, composição da sequência de aminoácidos, estrutura secundária, estrutura tridimensional e modificação de proteínas.^{2,3}

Os dados de estabilidade térmica fornecem informações sobre as propriedades físicas e químicas que influenciam a estabilidade e a estrutura das proteínas. As temperaturas de fusão podem ser determinadas monitorando alterações nas propriedades da amostra conforme o aumento gradual da temperatura usando diversas técnicas (Tabela 1). Quando as proteínas são submetidas a temperaturas elevadas, as estruturas secundária e terciária mudam. Essas mudanças estruturais expõem o núcleo hidrofóbico e levam à agregação de proteínas.⁴ A temperatura na qual metade da proteína ainda está na sua forma solúvel é definida como a temperatura de fusão (T_m) aparente, conforme mostrado na Figura 1. Essa temperatura pode ser aumentada pela presença de um ligante.^{5,6} Os estudos de estabilidade térmica contribuem para o entendimento da interação do ligante, estabilidade do medicamento, prazo de validade e condições ideais de armazenamento, que são informações úteis para a produção e comercialização futura do medicamento.

Análise de estabilidade térmica de proteínas usando espectroscopia UV-Vis

A Tabela 1 resume as vantagens e desvantagens das diversas técnicas que são usadas para medir a estabilidade térmica das proteínas. A espectroscopia UV-Vis supera muitos dos desafios da análise. A UV-Vis fornece medições diretas por absorbância sem a necessidade de indicadores fluorescentes, as medições podem ser realizadas usando pequenas quantidades de amostra e os resultados são rápidos e fáceis de interpretar e relatar.

Esta nota de aplicação demonstra os benefícios do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 (Figura 2) para caracterizar a estabilidade térmica e reprodutibilidade de proteínas. O espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 usa uma sonda de temperatura incorporada na cubeta que fornece informações ao bloco Peltier, permitindo o controle da temperatura das soluções durante as medições. Um suporte Multicell de oito posições é integrado ao instrumento e usa dispositivos Peltier resfriados a ar e sem água para controlar a temperatura das amostras entre 0 e 110 °C. Para aumentar a capacidade experimental, cada posição de cubeta do Multicell é medida simultaneamente, proporcionando uma análise mais rápida comparado a outras técnicas.

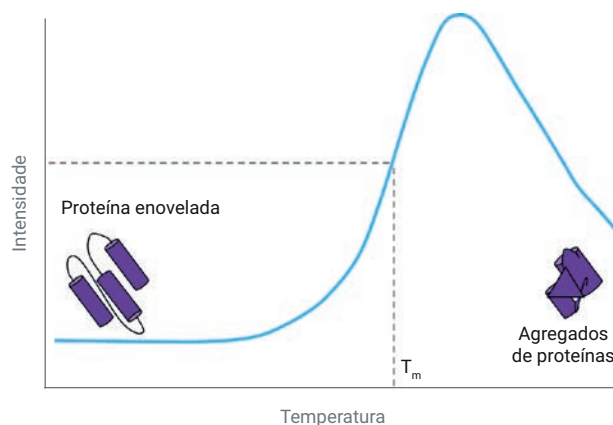


Figura 1. Resposta típica da intensidade da proteína (ou absorbância) com o aumento da temperatura.

Tabela 1. Técnicas usadas para medir a estabilidade térmica de proteínas.

Técnica	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Espectroscopia de dicroísmo circular ^{7,8}	Medir a absorbância em termos de elipticidade usando luz polarizada circular.	– Pequena quantidade de material necessária – Alta sensibilidade – Alta resolução	– Demorado – Alguns tampões causam interferência no UV distante
Calorimetria de varredura diferencial ^{9,10}	Medir alterações na capacidade térmica em relação a um material de referência.	– Pequena quantidade de material necessária – Alta resolução	– A interpretação dos resultados pode ser difícil
Ensaio de mudanças térmicas ^{11,12}	Medir alterações na fluorescência após a ligação de um corante fluoróforo a moléculas hidrofóbicas.	– Pode executar mais de uma amostra na máquina de RT-PCR – Alta sensibilidade – Pequena quantidade de material necessária	– Exige sondas fluorescentes – Sondas fluorescentes podem causar alterações conformacionais – As proteínas devem ter um local para acomodar as sondas fluorescentes



Figura 2. O espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 Multicell Agilent pode ser usado para até quatro experimentos de temperatura simultaneamente, com oito posições para cubetas.



Figura 3. Ultramicrocela Agilent usada neste estudo. O feixe extremamente pequeno e com foco do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 Agilent passa por aberturas pequenas e permanentemente alinhadas que não precisam de ajustes.

Parte experimental

Amostras

Uma amostra do dissulfeto isomerase A da *Escherichia coli* (EcDsbA, estado nativo) foi fornecida pelo La Trobe Institute for Molecular Science (LIMS), La Trobe University, Austrália. Uma solução de $\approx 0,6$ mg/mL de EcDsbA foi preparada em uma solução tampão contendo 50 mM de NaCl, 1 mM de EDTA e 100 mM de fosfato de sódio, ajustado para pH 7,0. Foram utilizadas cubetas de quartzo ultramicrocela Agilent com volume de 50 μ L e caminho óptico de 10 mm (part number 5062-2496, Figura 3). O tampão de fosfato puro foi usado como solução de referência (branco).

Instrumentação e método

Um espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 com Multicell Peltier foi controlado usando o software Agilent Cary UV Workstation. Os parâmetros do método na medição da absorbância e da estabilidade térmica da proteína são mostrados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Parâmetros de varredura da faixa de comprimento de onda.

Parâmetro	Valor
Instrumento	Espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 Agilent
Faixa de comprimento de onda	200 a 400 nm
Tempo médio do sinal	0,1 s
Largura de banda espectral	2 nm
Volume da amostra	80 μ L, foi adicionado um volume adicional para acomodar a evaporação

Tabela 3. Parâmetros experimentais de fusão térmica.

Parâmetro	Valor
Instrumento	Espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 Agilent
Comprimento de onda	280 nm
Tempo médio do sinal	2 s
Largura de banda espectral	2 nm
Intervalo de dados	0,1 °C
Taxa de aumento	0,1 °C/min
Controle de temperatura	Bloco Peltier
Faixa de temperatura	25 até 90 °C
Tamanho de filtro de suavização e derivativo	25
Intervalo de dados de suavização e derivativos	0,1 °C
Temperatura mais baixa de análise	30 °C
Temperatura mais alta de análise	90 °C
Cubeta	Cubeta de quartzo ultramicrocela
Volume da amostra	70 μ L

Para o estudo da estabilidade térmica, os dados foram coletados a cada 0,1 °C usando uma taxa de aumento de 0,1 °C/min. Foi calculada a média do sinal 2 segundos antes de cada ponto de dados ser registrado. A taxa de aumento de 0,1 °C/min foi usada devido a amostra ser suscetível à agregação em taxas de aumento elevadas. A temperatura experimental foi controlada por meio do bloco Peltier do Cary 3500.

Resultados e discussão

Para determinar o pico máximo de absorção da proteína *EcDsbA*, foi realizada uma varredura do comprimento de onda com o espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 usando os parâmetros fornecidos na Tabela 2. O Cary 3500 equipado com o módulo Multicell permite que sete amostras e uma solução de referência sejam medidas simultaneamente. Esse recurso aumenta a confiança nos resultados, pois as medições são feitas ao mesmo tempo em condições idênticas. Caso seja necessário usar um volume pequeno de amostra, por exemplo, 70 µL, as medições podem ser realizadas usando uma ultramicrocela (Figura 3). Como o sistema Cary 3500 possui um feixe pequeno e de alto foco, ele permite que sejam realizadas medições exatas usando uma ultramicrocela sem qualquer pré-alinhamento. O pico máximo de absorção da *EcDsbA* foi observado em 280 nm, conforme mostrado na Figura 4.

Para a análise de estabilidade térmica da proteína *EcDsbA*, a absorbância em 280 nm foi monitorada durante o aumento da temperatura. A temperatura da amostra foi controlada usando o bloco Peltier com uma taxa de aumento de 0,1 °C/min, conforme especificado na Tabela 3. Com o aumento da temperatura, um pico foi observado, indicando mudança na absorbância da proteína causada por uma mudança na sua estrutura. O gráfico de fusão térmica (Figura 5) mostra uma transição ocorrendo em alta temperatura (acima de 65 °C) para a proteína *EcDsbA*.

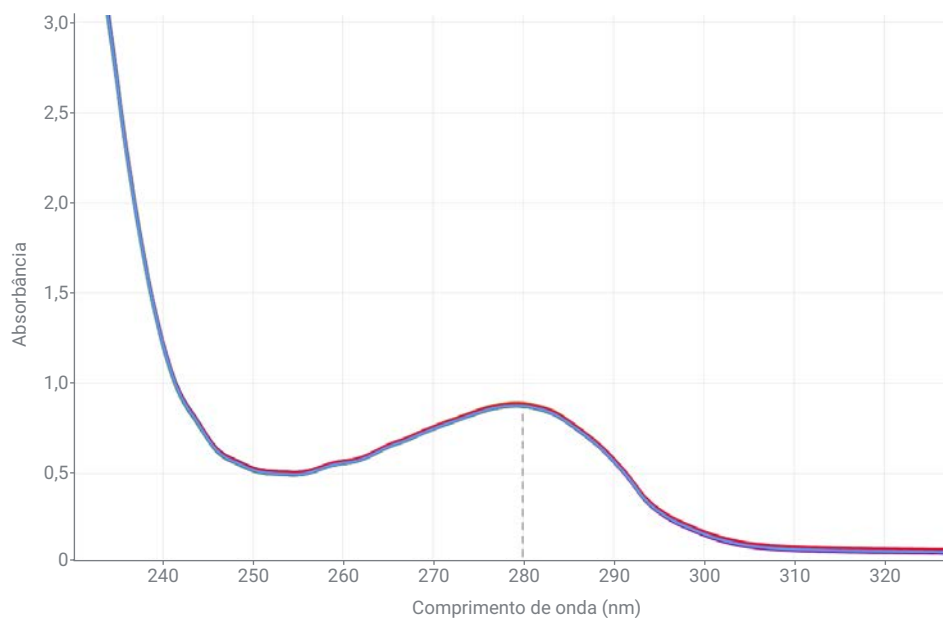


Figura 4. Varreduras da faixa de comprimento de onda para sete amostras separadas da proteína *EcDsbA* (estado nativo), mostrando o pico da proteína *EcDsbA* em 280 nm. As sete amostras foram medidas simultaneamente usando ultramicrocelas.

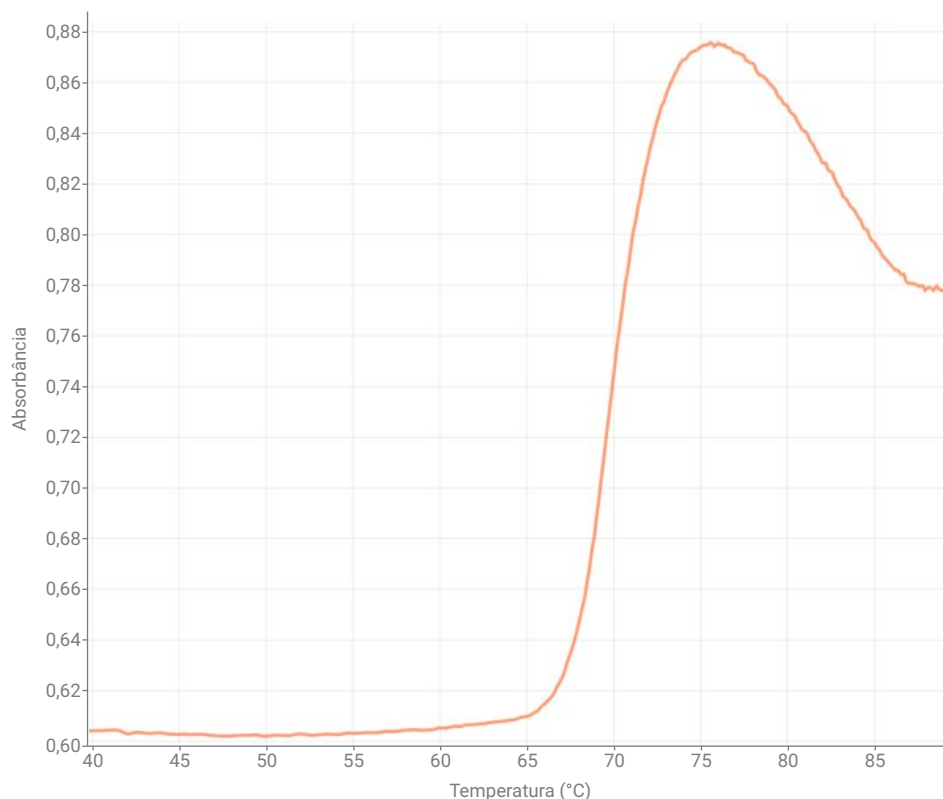


Figura 5. Gráfico de fusão térmica da proteína *EcDsbA*. Mudanças na absorbância durante o aumento da temperatura indicam mudanças estruturais na proteína.

O software Cary UV Workstation calcula a T_m de amostras biológicas usando a primeira derivada dos dados de absorbância medidos. A T_m pode ser determinada selecionando os tamanhos adequados para o filtro de suavização e derivativo em conjunto com a temperatura superior e inferior de análise. A T_m da EcDsbA foi de 69,86 °C (n = 6; Figura 6) usando os parâmetros de análise fornecidos na Tabela 3.

A T_m calculada para a proteína EcDsbA obtida usando o espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 foi semelhante aos resultados previamente relatados usando dicroísmo circular, conforme mostrado na Tabela 4.^{14, 15}

A precisão da medição da T_m da EcDsbA pelo Cary 3500 foi avaliada por um estudo de repetibilidade. A solução da amostra de proteína foi dividida em seis partes e cada parte foi analisada separadamente usando a ultramicrocela de 70 µL. A repetibilidade dos resultados foi avaliada pelo cálculo da média e do desvio padrão dos valores de T_m da EcDsbA (Tabela 4). O sistema UV-Vis Cary 3500 mostrou uma excelente precisão, com um desvio padrão de apenas 0,16 °C para as seis medições.

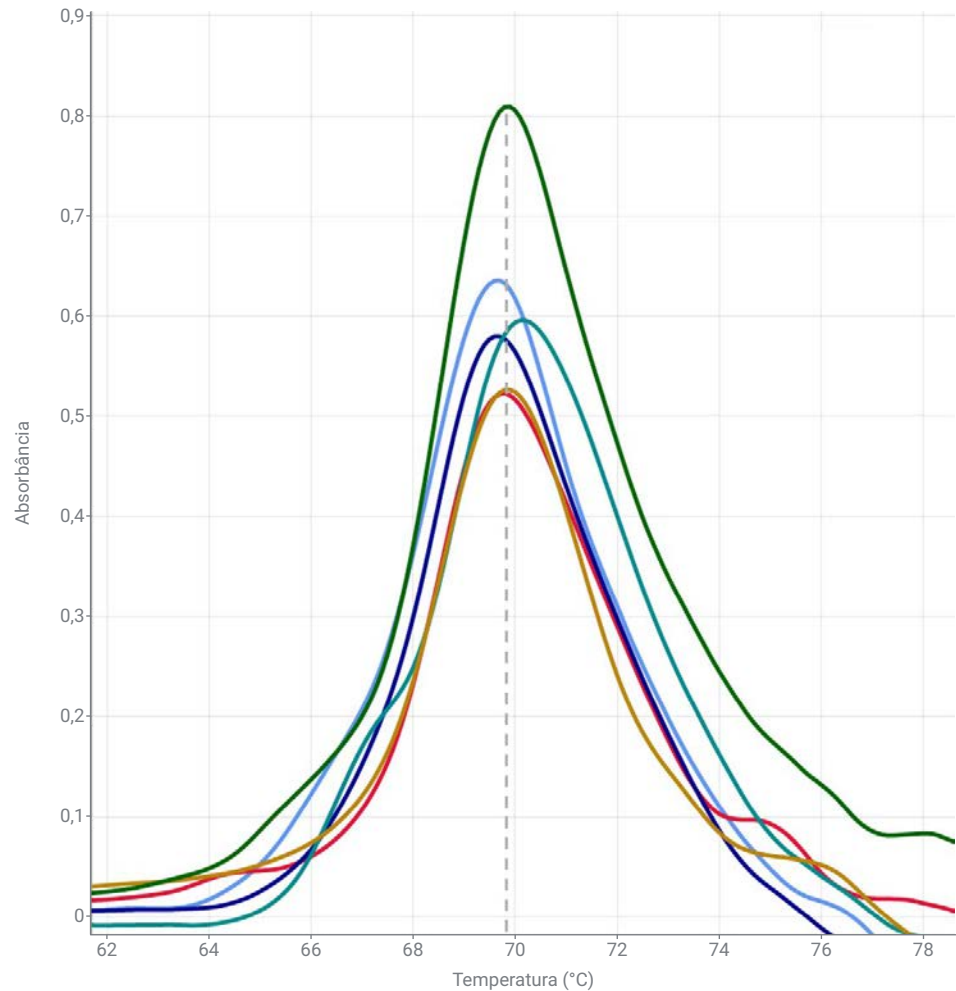


Figura 6. Gráficos da primeira derivada de seis amostras separadas da proteína EcDsbA obtidas usando o software Agilent Cary UV Workstation (T_m = 69,86 °C, n = 6).

Tabela 4. Valores de T_m da EcDsbA medidos usando o espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 Agilent e relatados na literatura.

Técnica	T_m da EcDsbA (°C)
Replicata 1 do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500	69,70
Replicata 2 do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500	69,80
Replicata 3 do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500	69,70
Replicata 4 do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500	70,20
Replicata 5 do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500	69,90
Replicata 6 do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500	69,90
Média	69,86
Desvio padrão	0,16
Valor da literatura 1 ¹⁴	68,55
Valor da literatura 2 ¹⁵	69,25

Conclusão

O espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 Agilent com Multicell Peltier com controle de temperatura foi usado na determinação da temperatura de fusão (T_m) de seis amostras de proteína EcDsbA simultaneamente. Os resultados foram reprodutíveis, conforme demonstrado pelo desvio padrão de 0,16 °C alcançado para as seis partes de uma amostra de proteína EcDsbA. Além disso, a T_m média de 69,86 °C calculada usando o software Agilent Cary UV Workstation correspondeu com os valores da literatura obtidos usando espectroscopia de dicroísmo circular. Os resultados demonstram a exatidão, precisão e velocidade do espectrofotômetro UV-Vis Cary 3500 para a análise de estabilidade térmica de proteínas.

Para maximizar ainda mais a produtividade do método, o UV-Vis Cary 3500 pode medir sete amostras ao mesmo tempo sem comprometer a exatidão dos resultados. A capacidade do instrumento de medir simultaneamente pelo menos três replicatas da amostra proporciona uma valiosa economia de tempo para laboratórios que trabalham com medições em replicata.

O software Cary UV Workstation oferece cálculos integrados de suavização e derivativos para facilitar a análise de dados. Além disso, o software está disponível com controles técnicos opcionais para adquirir, processar, reportar e armazenar dados com segurança. Esses controles são vitais para laboratórios que devem seguir as diretrizes de conformidade da FDA 21 CFR Parte 11, Anexo 11 da UE, GAMP5, bem como ISO/IEC 17025 e EPA 40 CFR Parte 160.

www.agilent.com

DE83250769

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impresso nos EUA, 4 de agosto de 2022
5994-5086PTBR

Referências

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, Suplemento, 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)