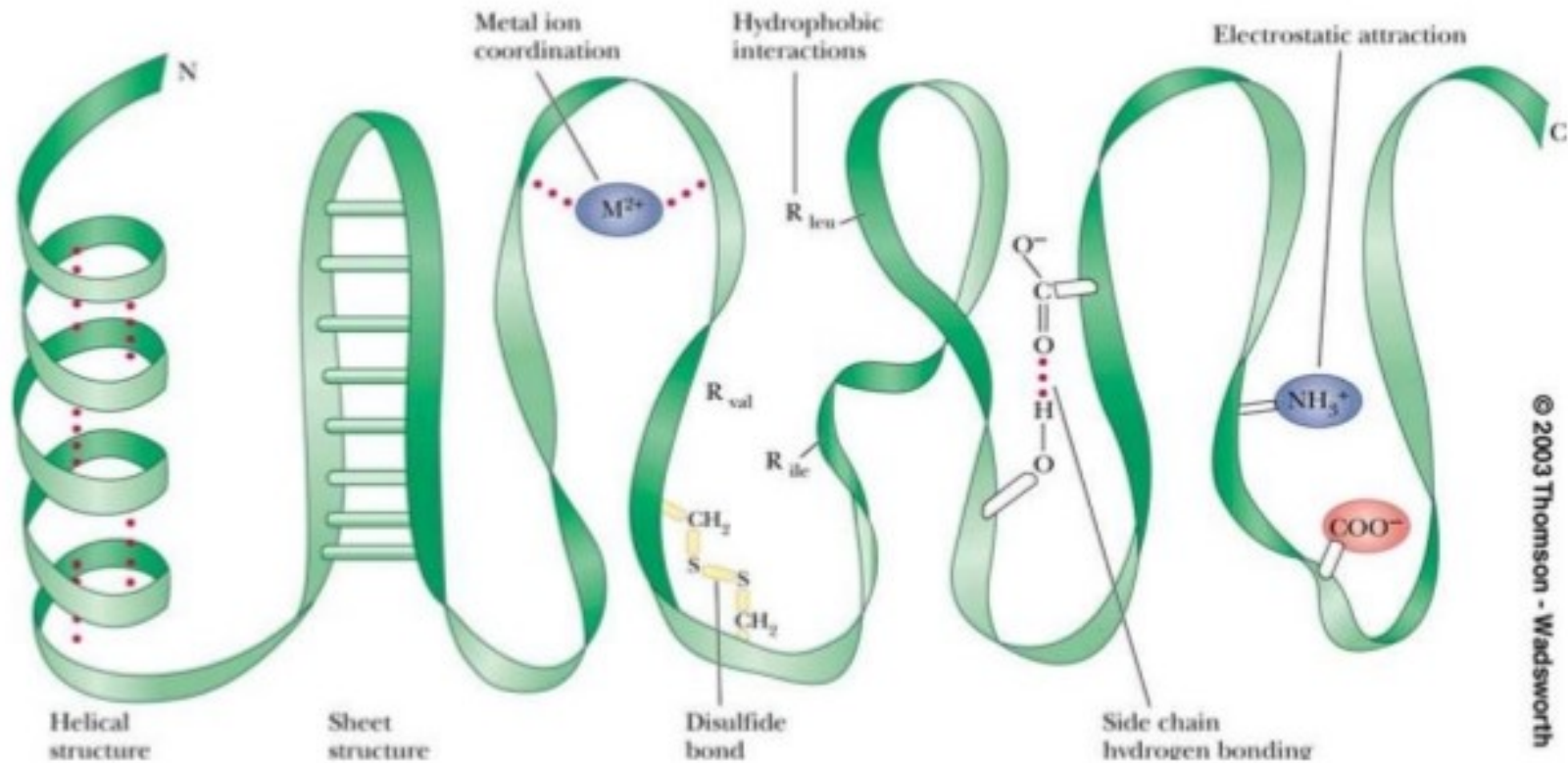


Proteine ricombinanti per studi
strutturali.

Caratterizzazione biofisica:
stabilità e cambiamenti
conformazionali

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Stabilità



© 2003 Thomson - Wadsworth

Stabilità: parametri

- Stress chimico
- Stress fisico
- Stress indotto da cicli di congelamento/scongelo

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Stabilità ed evoluzione

stretta finestra di stabilità delle proteine (fino a 5-15 kcal / mol)

La pressione evolutiva mantiene la stabilità necessaria a svolgere la sua funzione:

barnasi (PDB_ID: 1bns)

binasi (PDB_ID: 1gou): 17 differenze/110 aa

altamente sovrapponibili (RMSD=0.3).

Ogni singola mutazione: ± 1.1 kcal / mol.

La deriva neutra da una proteina all'altra mantiene la stabilità costante.

sei mutazioni stabilizzanti $\rightarrow +3,3$ kcal / mol MA stessa attività:

una pressione mantiene la stabilità al di sopra di un certo livello e non è necessario mantenere ulteriori incrementi di stabilità durante l'evoluzione.

jmb

Journal of Molecular Biology
Volume 233, Issue 2, 20 September 1993, Pages 305-312



Regular Article

Step-wise Mutation of Barnase to Binase: A Procedure for Engineering Increased Stability of Proteins and an Experimental Analysis of the Evolution of Protein Stability

Luis Serrano, Anthony G. Day, Alan R. Fersht



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Stabilità termodinamica

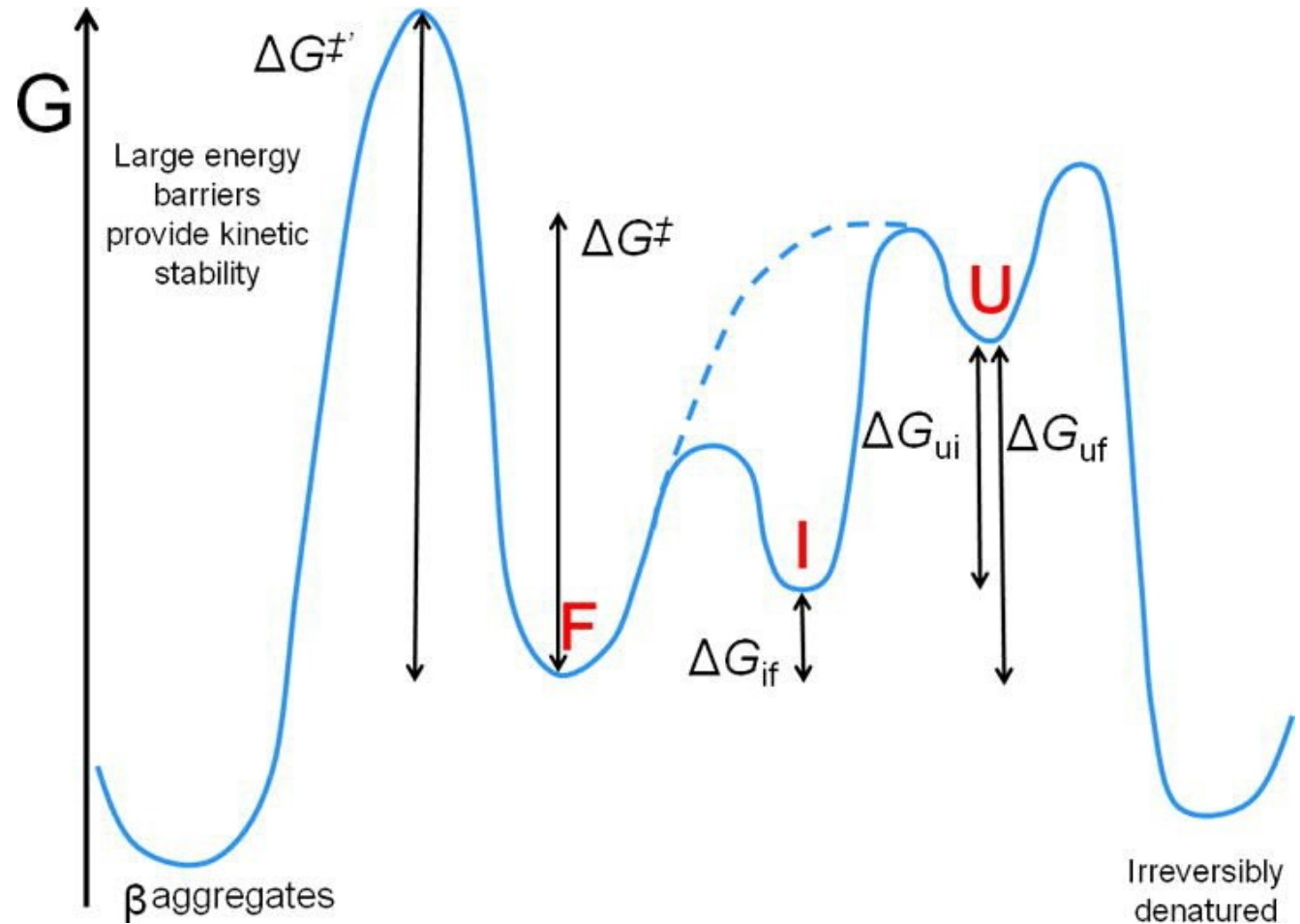
$$\Delta G_U = G_U - G_F$$

$$\Delta G_U(T) = \Delta H_U(T) - T \Delta S_U(T)$$

stabilità $\propto 1/T$

$$[F] = [U] \rightarrow \Delta G_U(T_M)$$

stabilità $\propto T_M$



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Stabilità termodinamica

$$\Delta G_U = G_U - G_F = \Delta H_U - T \Delta S_U$$

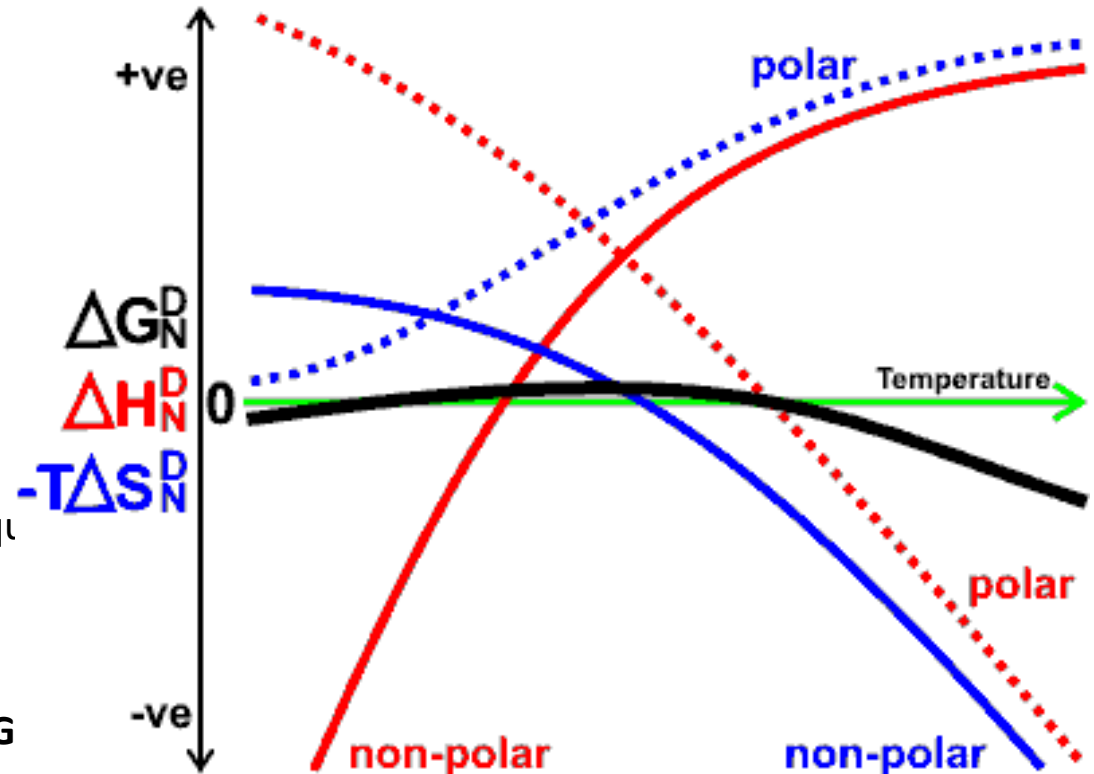
Dipendente da

- esposizione dei gruppi polari e non polari interni
- loro interazione con l'acqua
- cambiamenti nelle interazioni acqua-acqua

La denaturazione avviene solo quando ΔG

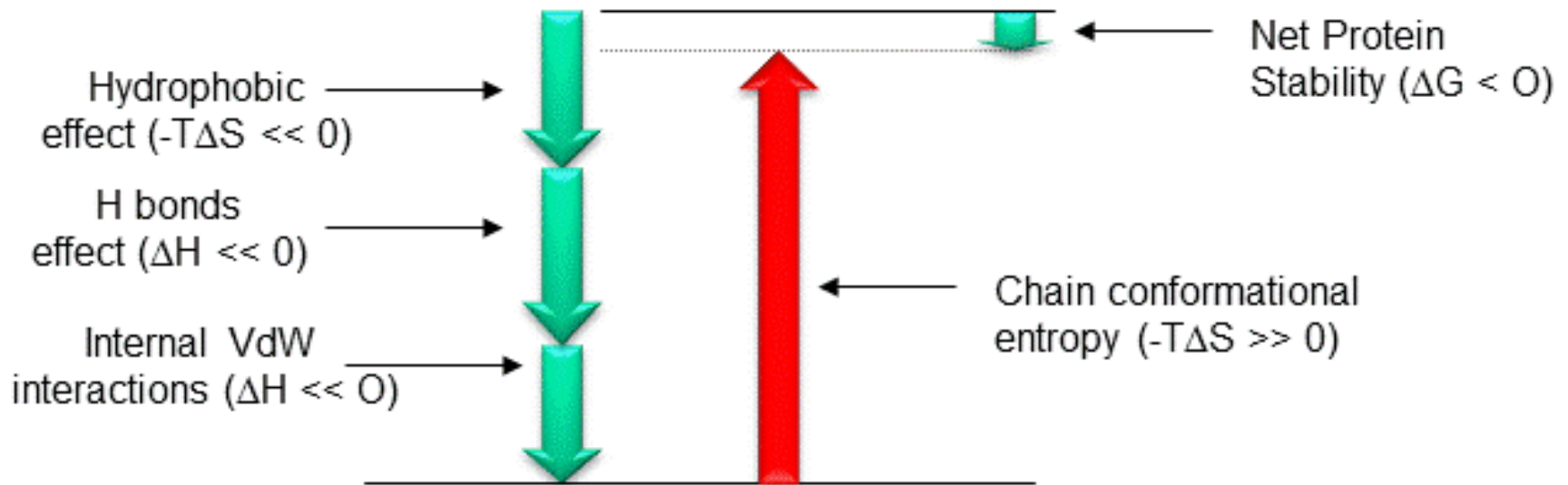
In caso di denaturazione termica,

$$\Delta H_U < 0 \text{ e } \Delta S_U < 0$$



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Stabilità termodinamica e stato conformazionale



ΔG_U = dipende dal contributo di due fattori opposti

$\Delta H_U < 0$ (favorevole) dovuta a forze attrattive non covalenti che hanno luogo quando la proteina è nativa

$\Delta S_U > 0$ (favorevole) effetto idrofobico

$\Delta S_U < 0$ (sfavorevole) libertà conformazionale limitata

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Stabilità delle proteine in soluzione

dipende da fattori

Fisici:

- T
- pH
- Pressione

Chimici

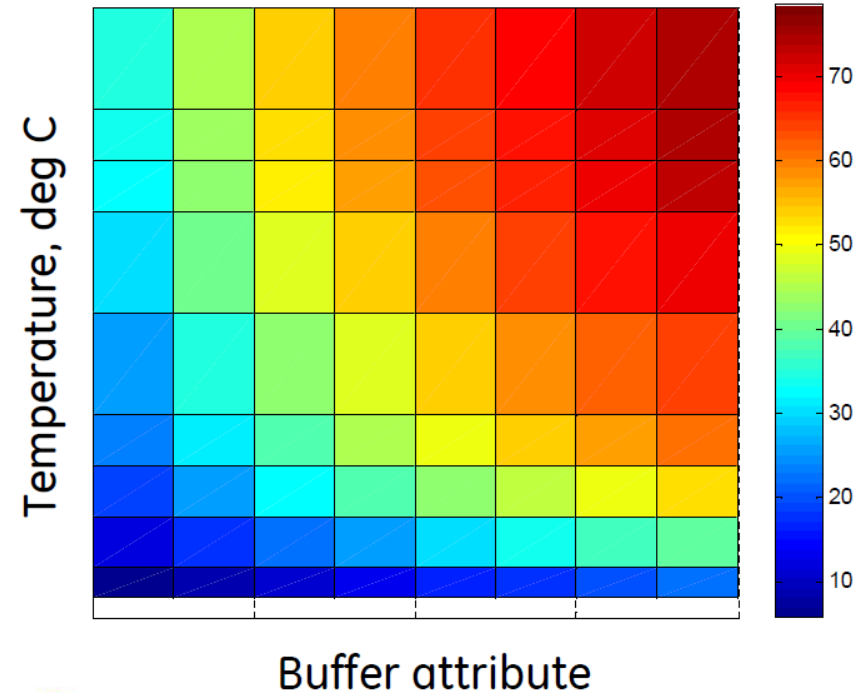
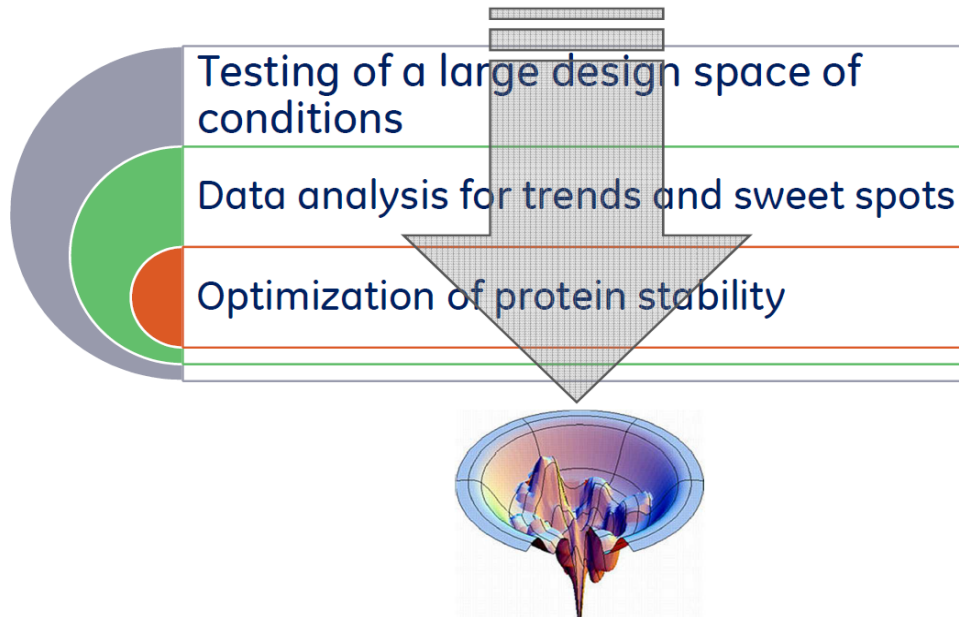
- tipo di tampone
- Sali, ioni metallici
- AA
- Osmoliti
- Zuccheri/carboidrati
- co-solventi
- Eccipienti e additivi
- Surfattanti
- Chelanti
- antiossidanti
- Ligandi specifici

ORGANISMS	Type of protein stability leading to specialised function
psychrophile	cold-adapted; cold-loving (-2 °C to ~15°C)
mesophile	grows at moderate temperatures (~15°C to ~45°C) and conditions.
thermophile	heat-loving; grows at >45°C up to ~80°C
hyperthermophile	grows at >80°C; limit so far is about 115°C
halophile	grows at high in concentrated salts (internal >1M!)
acidophile	grows under highly acidic conditions, <i>i. e.</i> , ~ pH 0-pH 2)
barophile	adapted to high pressures (<i>e.g.</i> , underwater)
extremophiles	those that grow under extreme conditions

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Ottimizzazione della Stabilità : Approcci empirici vs razionali

Il **profiling** e l'**ottimizzazione** della stabilità proteica
→ combinazione di approcci razionali e trail-and-error.



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Metodi per l'analisi della Stabilità delle proteine

METODI TRADIZIONALI

NMR

DSC (Differential Scanning Calorimetry)

CD (Circular Dichroism)

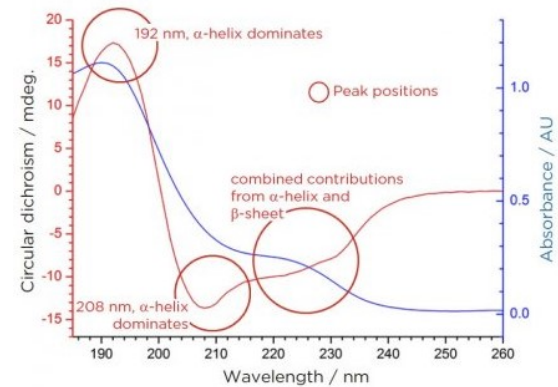
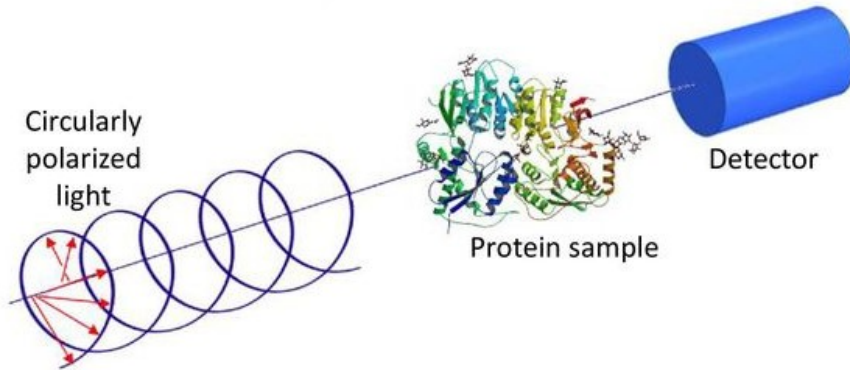
Fluorescenza intrinseca

METODI HIGH-THROUGHPUT

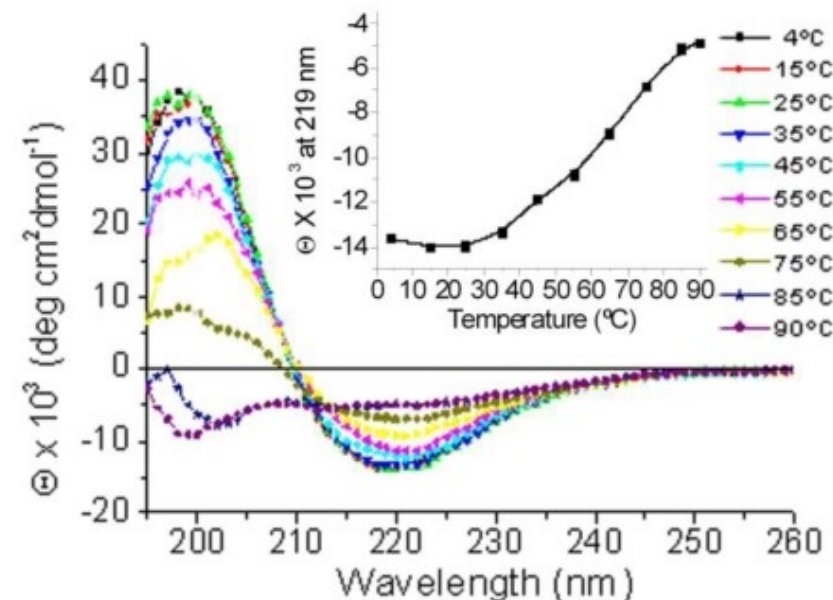
DSF (Differential Scanning Fluorimetry)

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

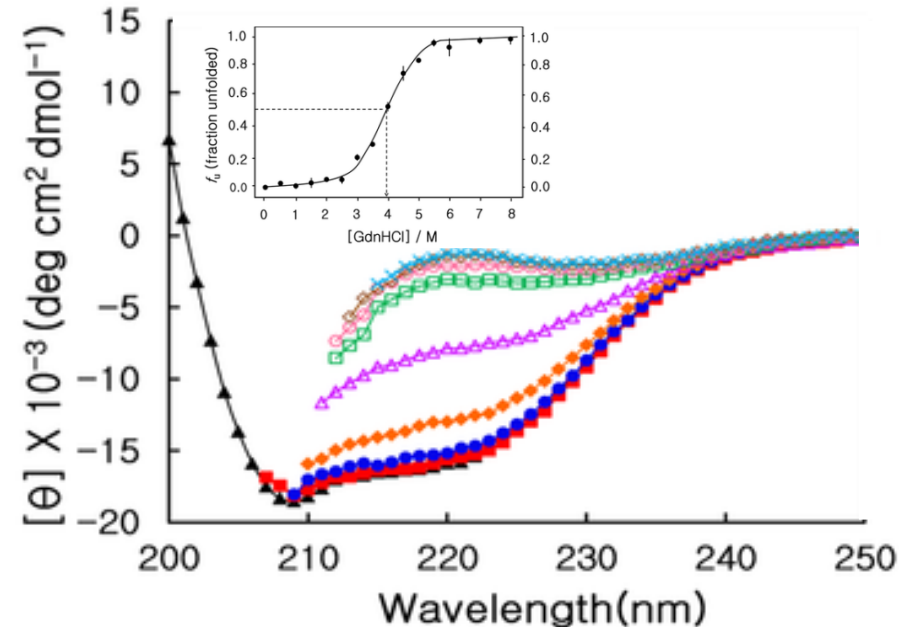
Dicroismo circolare (CD)



Stabilità termica



Stabilità chimica



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSC

La K_{eq} di una reazione viene stimata misurando le [componenti] all'equilibrio.

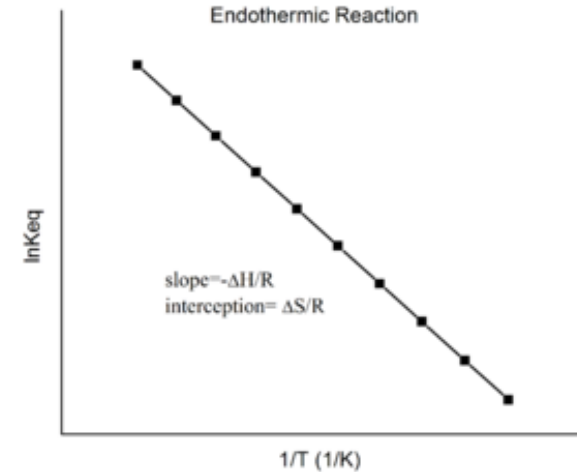
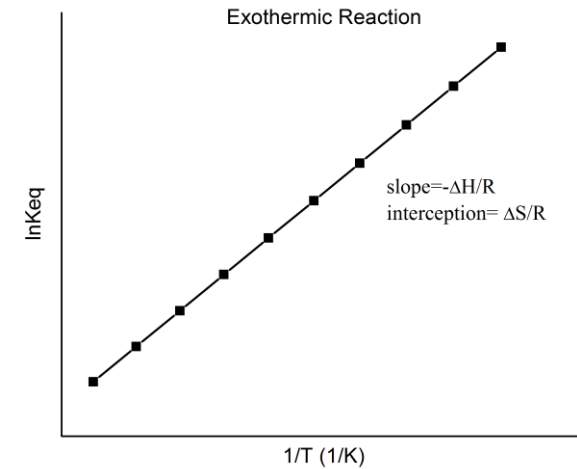
$$\text{Visto che } \Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

$$\text{Ovvero } \ln K_{eq} = (1/R) (\Delta S^0 - \Delta H^0/T)$$

misurando K_{eq} a diverse T si ottengono i valori di

ENTROPIA

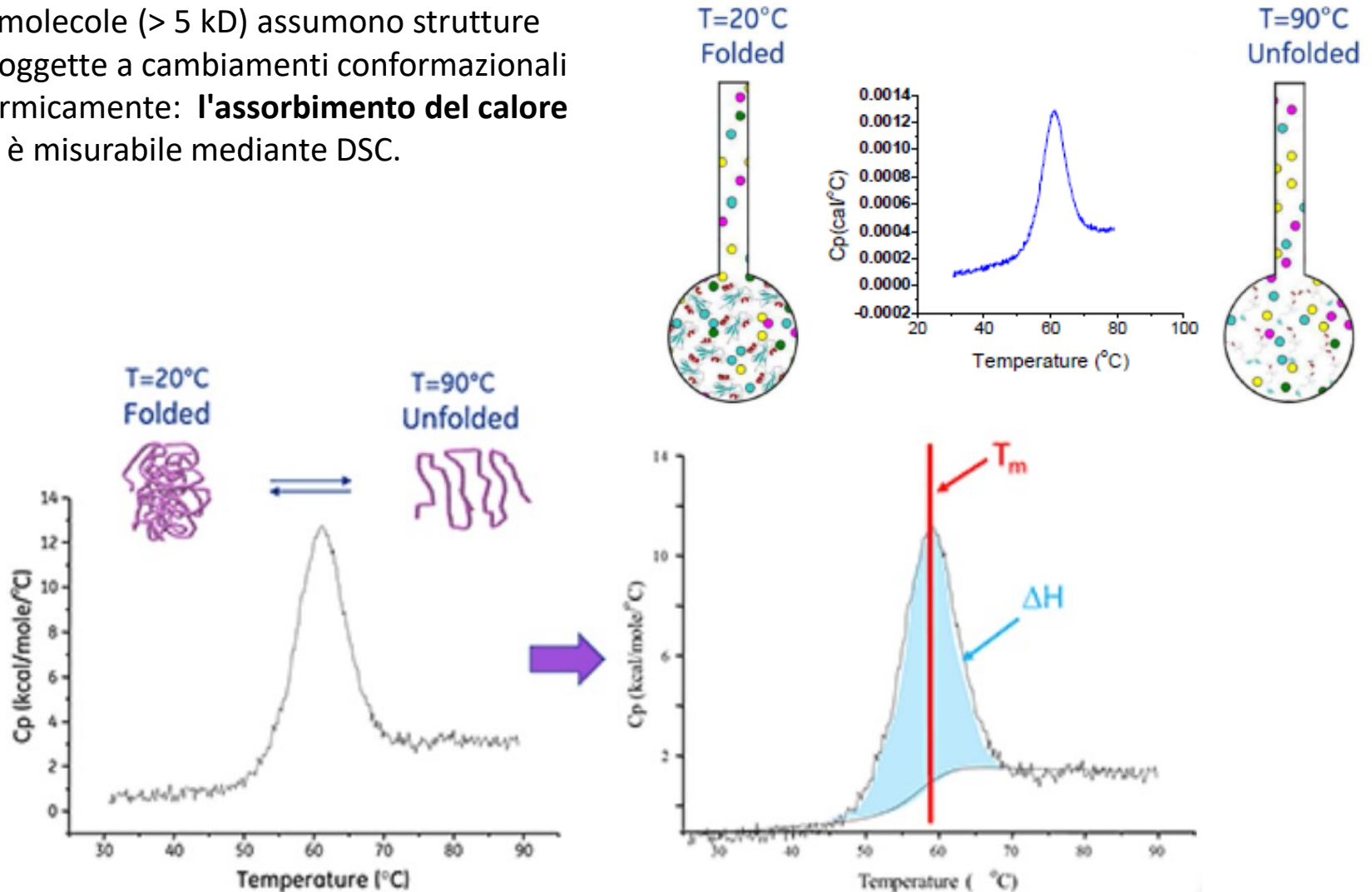
ENTALPIA



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

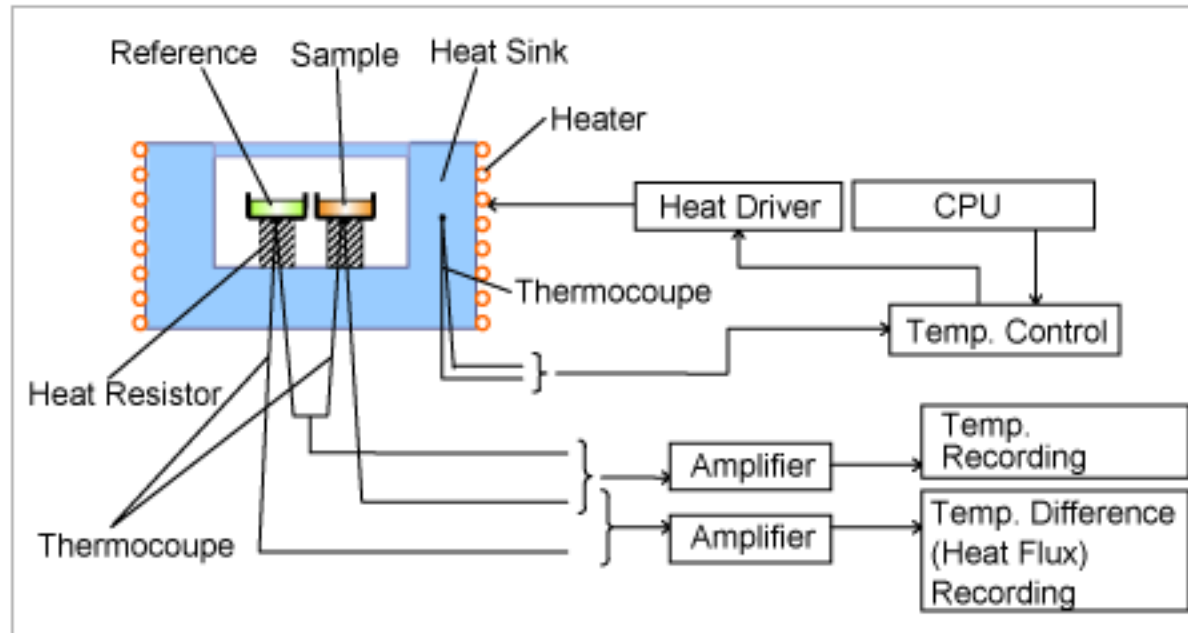
DSC

Le macromolecole (> 5 kD) assumono strutture definite soggette a cambiamenti conformazionali indotti termicamente: **l'assorbimento del calore** associato è misurabile mediante DSC.



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSC: setup



La differenza di energia fornita dipende da quanto calore viene

assorbito (processo **esotermico**)

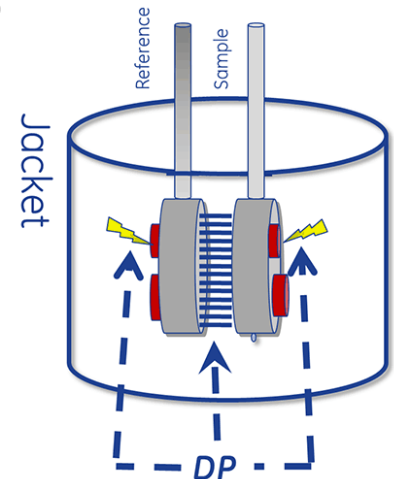
rilasciato (processo **endotermico**)

è proporzionale alla **CAPACITA' TERMICA**:

$$C_p = dq / dT$$

Se la pressione è costante

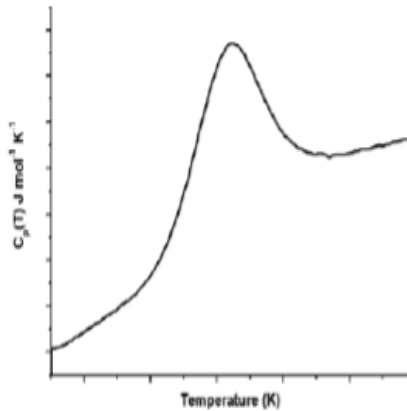
$$C_p = dH / dT$$



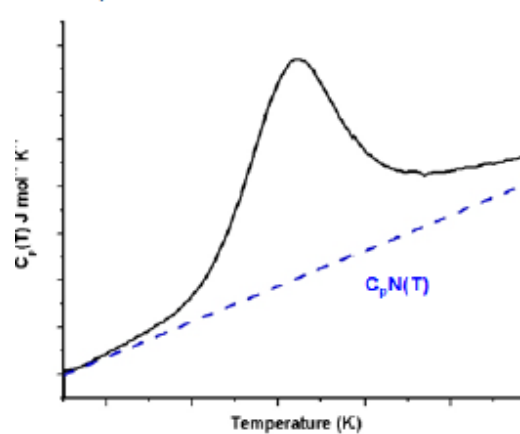
Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSC: denaturazione termica

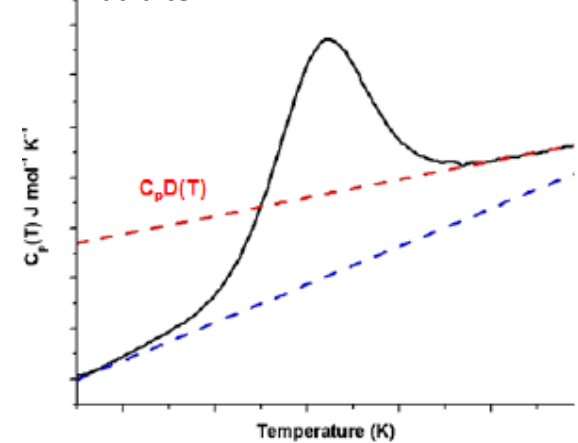
A simple DSC "endotherm":



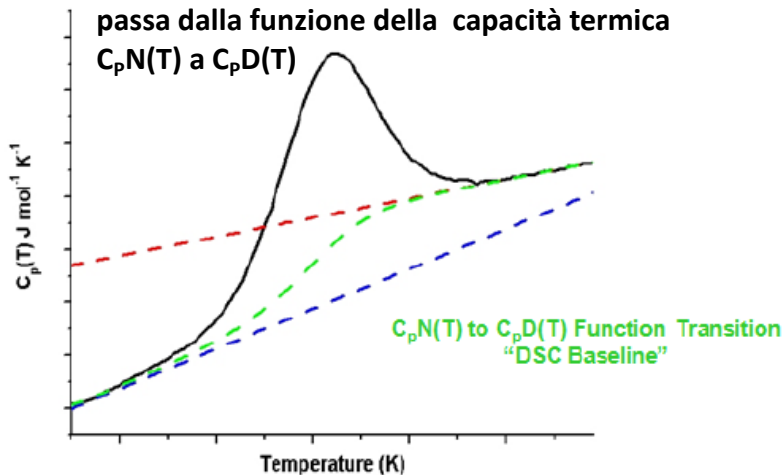
Lo stato nativo è una fase "simil solida" a basse T



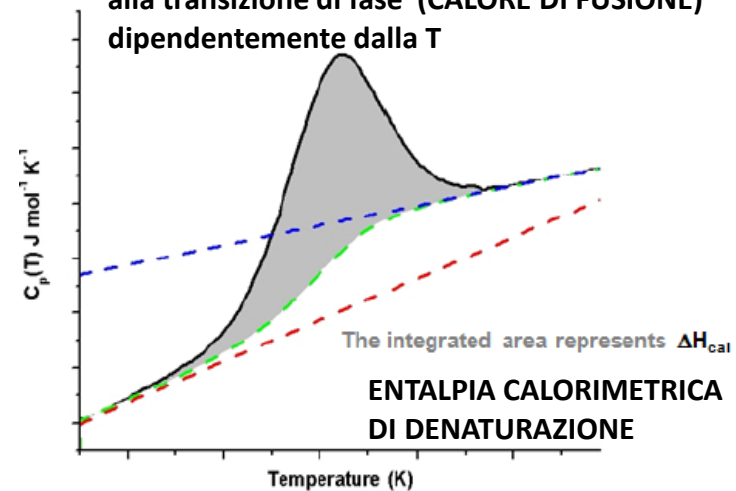
Lo stato denaturato è una fase "simil liquido" ad alte T



La transizione di fase da "simil solida" a "simil liquida" dipendentemente dalla T, il sistema passa dalla funzione della capacità termica $C_{p,N}(T)$ a $C_{p,D}(T)$

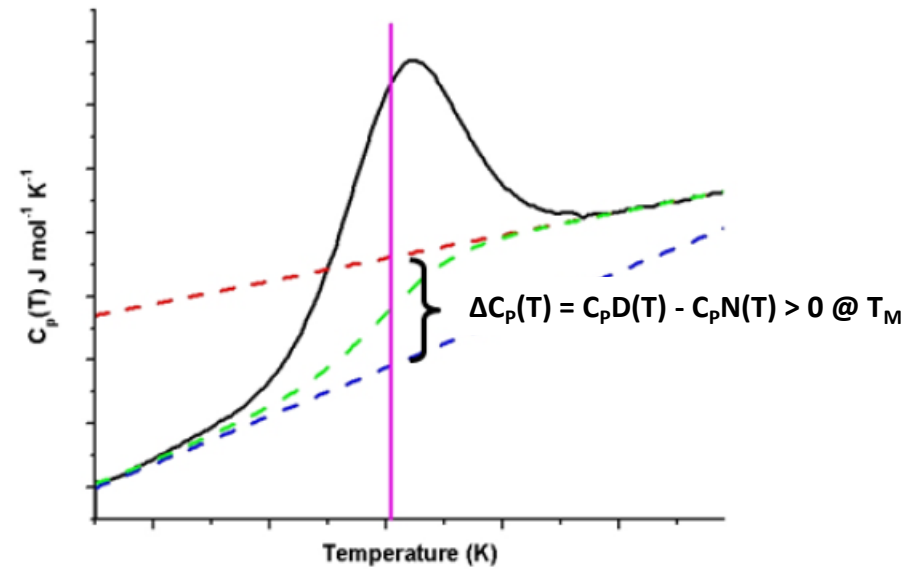
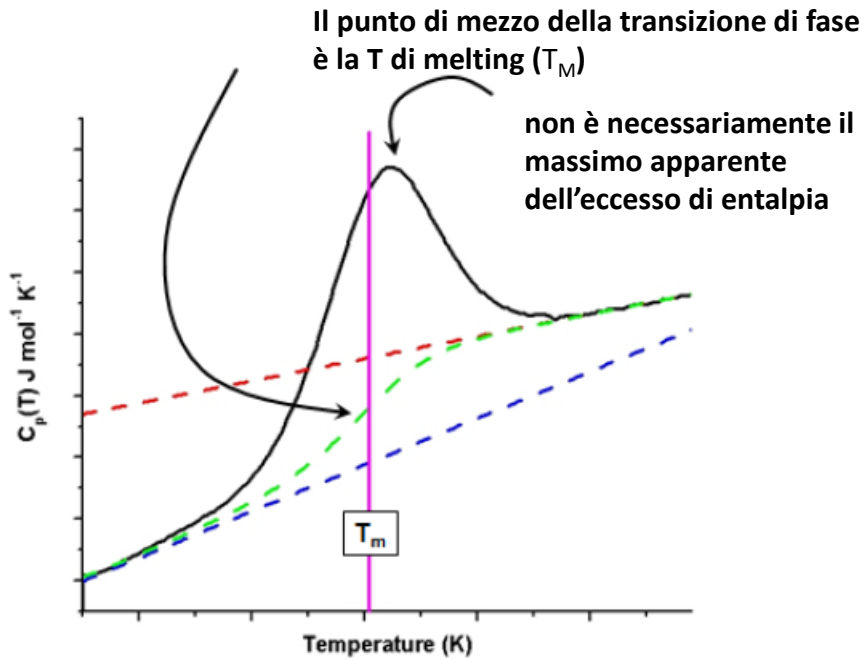


L'entalpia in "eccesso" rappresenta l'energia termica associata alla transizione di fase (CALORE DI FUSIONE) dipendentemente dalla T



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSC: denaturazione termica



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSC: TERMOGRAMMA

Fingerprint qualitativo e quantitativo del profilo della denaturazione:

parametri termodinamici

T_{onset} (inizio della transizione)

T_M (indice della stabilità termica)

$T_{1/2}$ (omogeneità della popolazione)

$\Delta C_p(T)$ (>0 per le proteine)

ΔH_{cal}

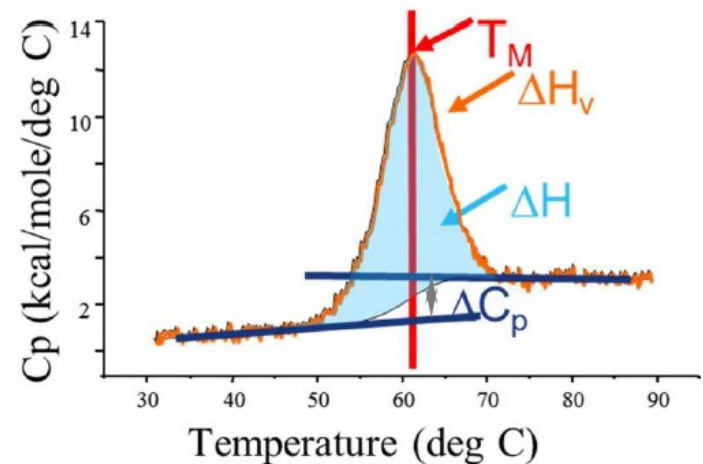
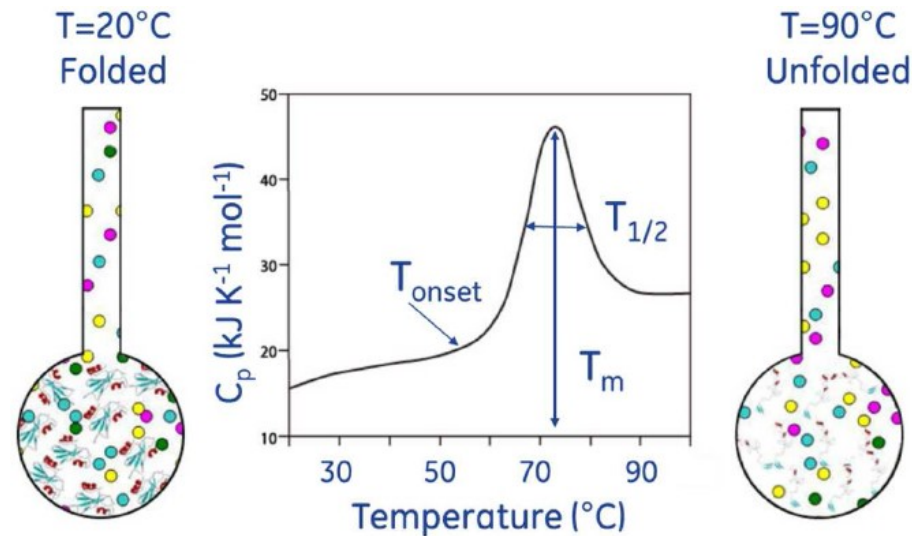
ΔH_{vH} (entalpia van't Hoff) = $A \times RT^2 \times C_p(T_M) / \Delta H_{\text{cal}}$

= ΔH_{cal} per $N \leftrightarrow D$

< ΔH_{cal} (cooperatività INTRAMOLECOLARE)

> ΔH_{cal} (cooperatività INTERMOLECOLARE)

$\Delta S_D = \Delta H_D / T_D$ quando $T_D = T_{1/2} \approx T_M$

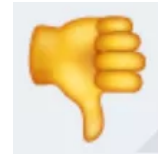


Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSC:

Applicazioni nella scoperta e lo sviluppo di nuovi farmaci:

- Selezione candidati nello sviluppo bioterapeutico
- Ottimizzazione



- Metodo generico
- Nessuna sonda ottica
- Nessuna marcatura
- anche con soluzioni torbide

DISTORSIONI NEI TERMOGRAMMI da

- 1) aggregazione
- 2) Raramente processo totalmente reversibile

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

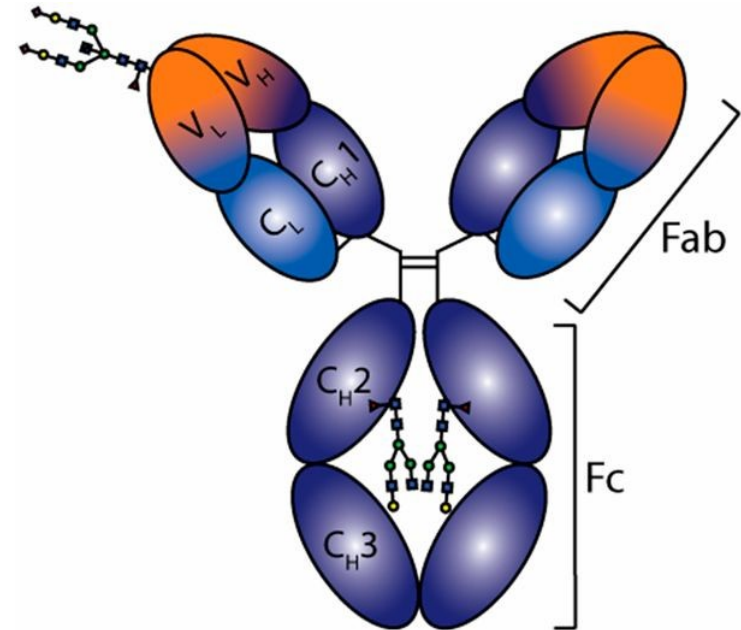
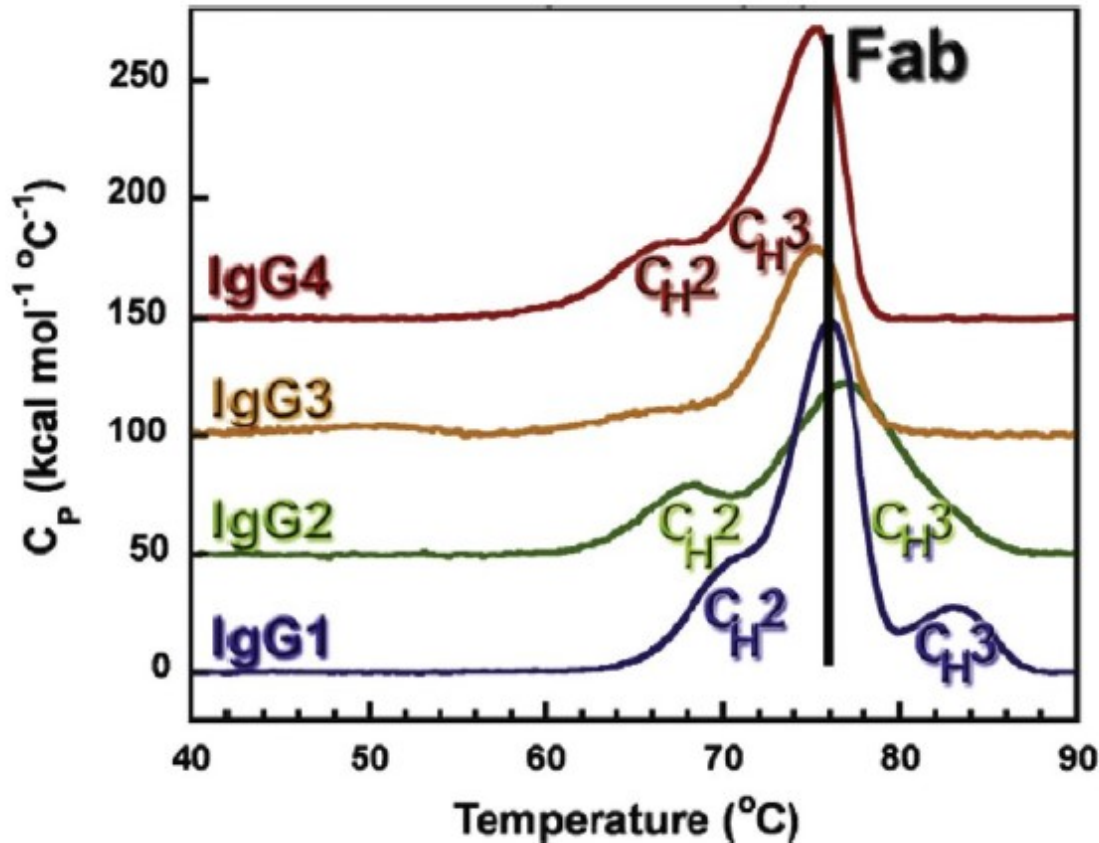
DSC: strumentazione

Auto VP-Capillary
DSC
130 μ l cell



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSC: esempi

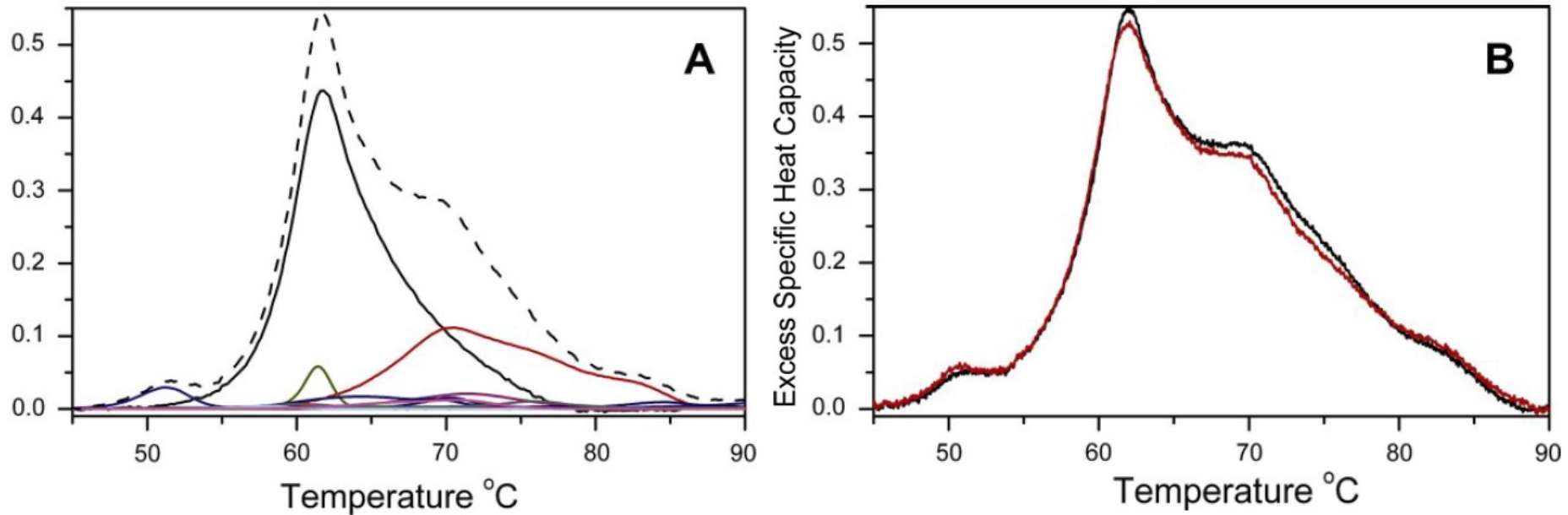


Termogrammi delle 4 sottoclassi di IgG umane.

Concentrazione 1 mg / ml. Velocità di scansione 1 $^\circ\text{C}$ /min, tampone 20mM citrato di sodio, 150mM NaCl a pH6.0.

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSC: esempi



Termogrammi di plasma umano

(A) termogramma calcolato (linea tratteggiata) ottenuto dalla somma dei contributi ponderati delle 16 proteine plasmatiche più abbondanti.

(B) Termogrammi ottenuti da proteine plasmatiche pure miscelate a concentrazioni simili a quelle medie note nel plasma normale.

La curva rossa è una miscela di HSA, IgG, fibrinogeno e transferrina. La curva nera è una miscela delle 16 proteine plasmatiche più abbondanti.

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Denaturazione a freddo

La denaturazione delle proteine causata da

- Riscaldamento
- Raffreddamento

la curva di stabilità assume $\Delta G = 0$ in due punti:

$$T_{(\text{cold})} < RT$$

$$T_{(\text{hot})} > RT$$

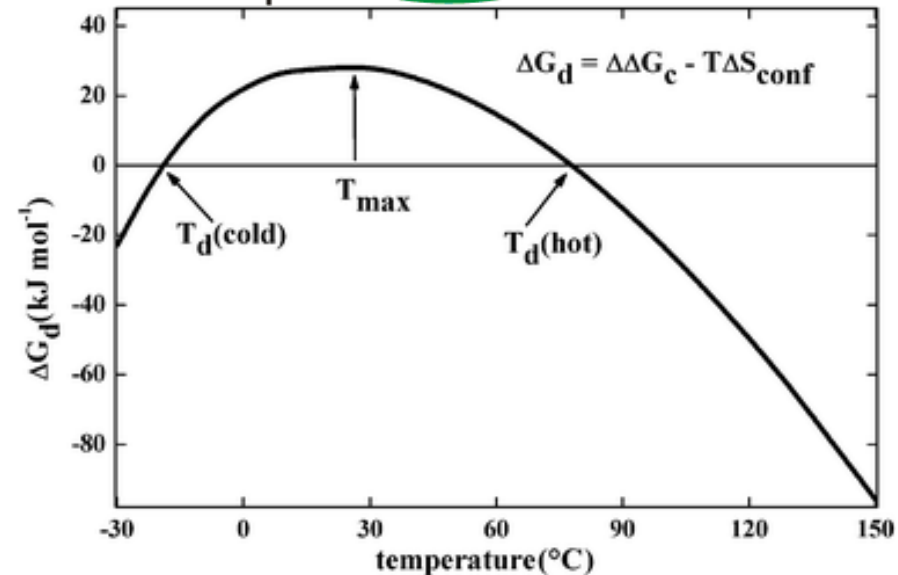
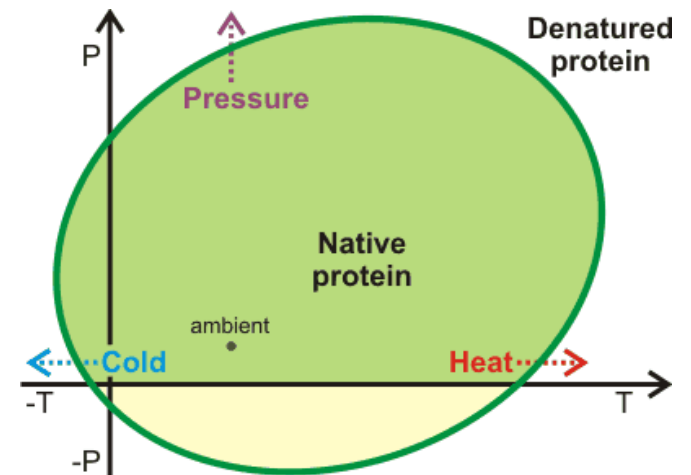
due punti di transizione.

In generale la denaturazione a freddo si verifica a $T < 0$.

Destabilizzando la proteina



complete curve di stabilità



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

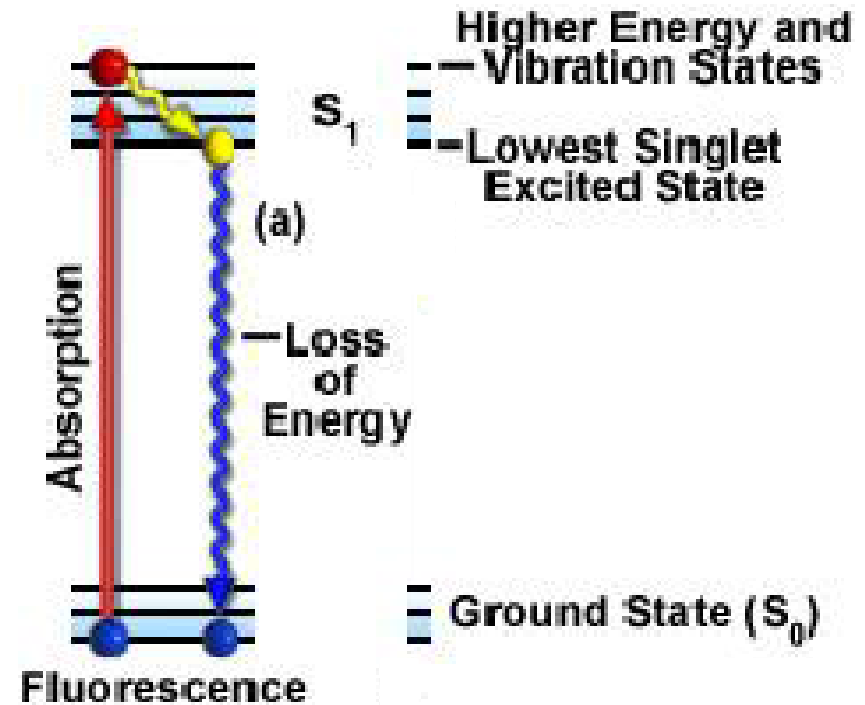
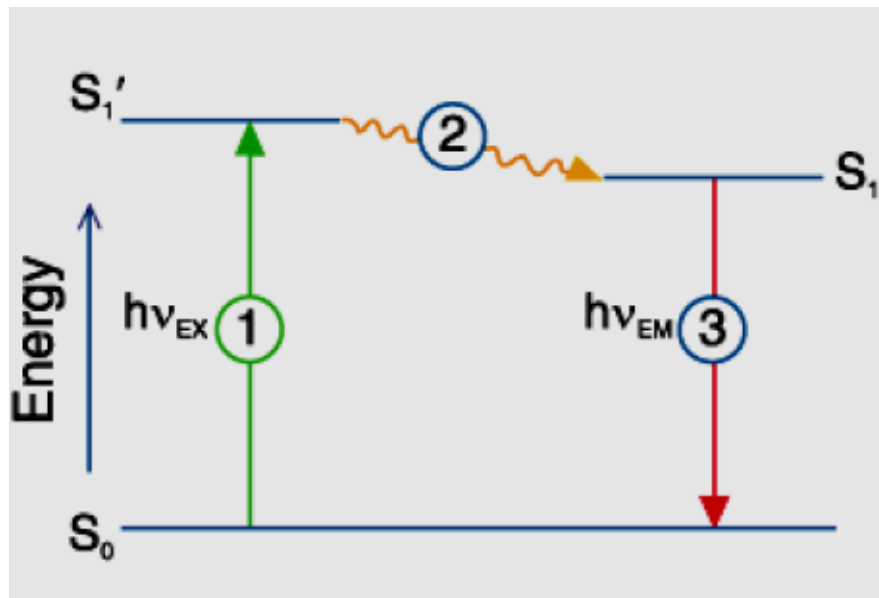
Fluorescenza intrinseca: basi

risultato di un processo in tre fasi

Fase 1: **eccitazione**

Fase 2: **durata dello stato eccitato** (1–10 ns)

Fase 3: **emissione**.



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

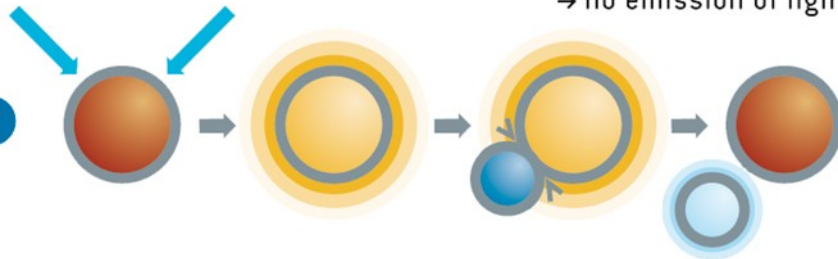
Fluorescenza intrinseca: basi

$$\text{Resa quantica} = \frac{\# \text{ fotoni emessi per fluorescenza}}{\# \text{ fotoni assorbiti}}$$

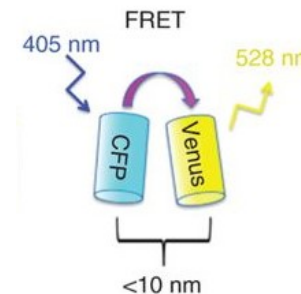
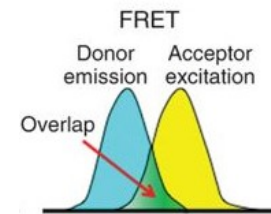
Misura l'interferenza di processi «competitori»:

1. Collisional quenching

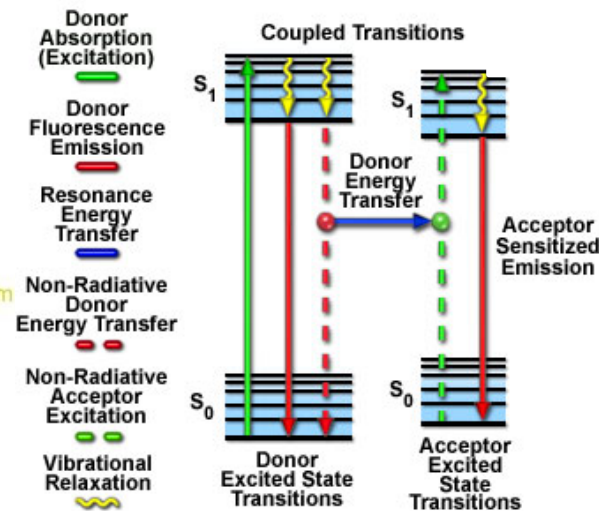
absorption of light → excited state → energy transfer by collision → no emission of light



2. FRET

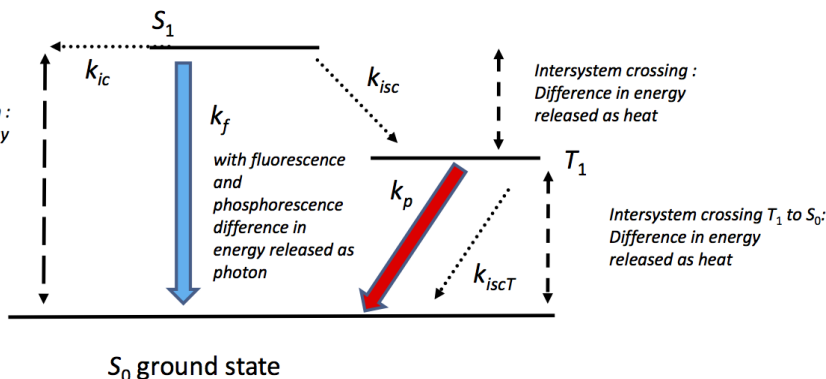


Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram



3. Inter-system crossing

energy ↑

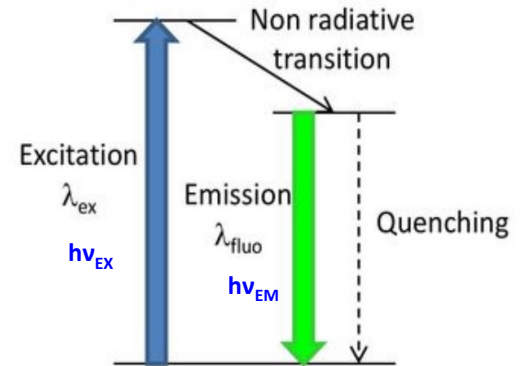
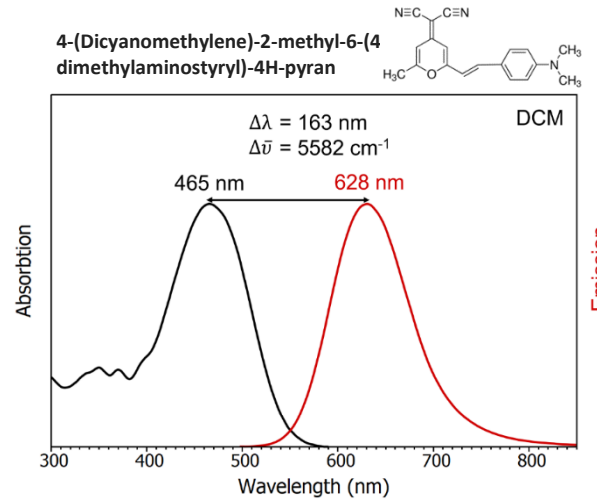
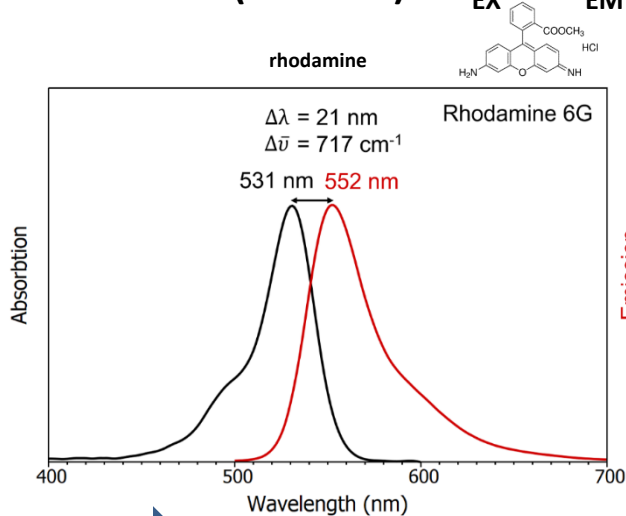


➔ EFFICIENZA

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Fluorescenza: basi

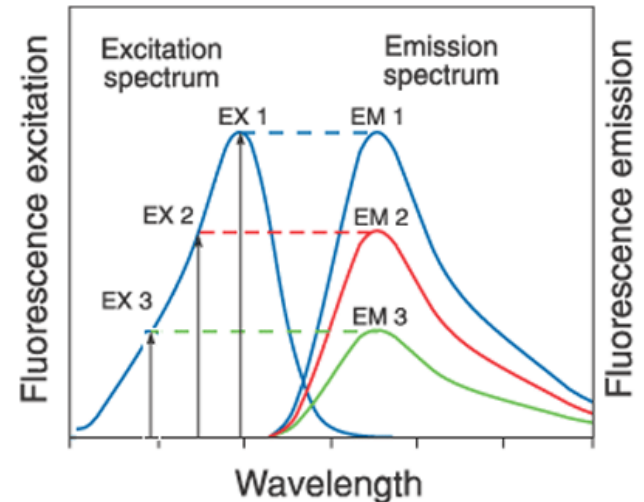
Stokes shift (red shift): $h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$



SENSIBILITA'

Per le molecole poliatomiche
 transizioni elettroniche discrete ($h\nu_{EX}$, $h\nu_{EM}$)
 → **spettri di energia** ampi:
 di eccitazione (\approx assorbimento)
 di emissione

Processo ciclico (a meno del photobleaching): migliaia di fotoni
 → **elevata sensibilità**



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Fluorescenza intrinseca

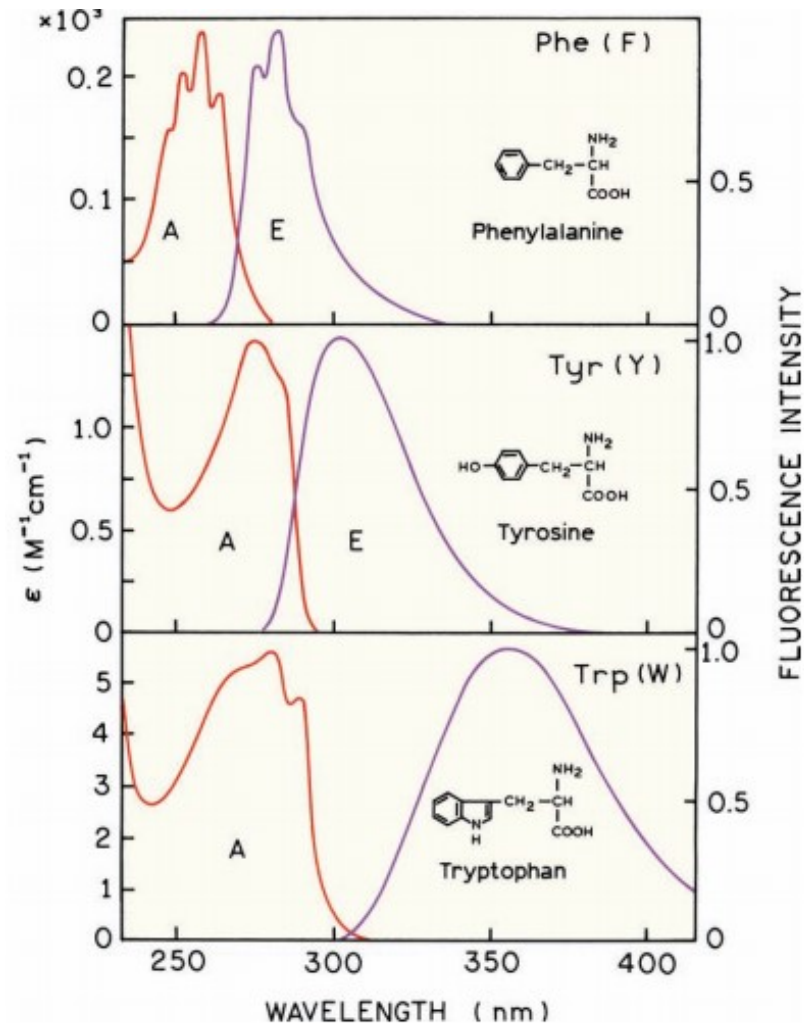
Le proteine sono le uniche biomolecole con Fluorescenza intrinseca

Table 1. Fluorescence properties of aromatic amino acids in water at neutral pH [2,15,21].

	Lifetime (τ)	Absorption		Fluorescence	
	(ns)	λ (nm)	Absorptivity (ϵ)	λ (nm)	Quantum Yield (Φ_F)
Tryptophan	3.1 (mean)	280	5600	348	0.2
Tyrosine	3.6	274	1400	303	0.14
Phenyl alanine	6.4	257	200	282	0.04

$\lambda_{\text{ex}} = 280\text{nm}$

$\lambda_{\text{ex}} = 295\text{nm}$ selettiva per Trp



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Fluorescenza intrinseca

Il micro ambiente circostante influenza

- la resa quantica
- lo stoke shift

soprattutto per **gruppo indolico del Trp**: sensibile al

- quenching collisionale
- quenching da Lys e His e in certi casi dal legame peptidico
- al tipo di rotamero
- alla polarità del solvente

Δ spettri di emissione da transizioni conformazionali, interazione con proteine/ligandi o denaturazione.

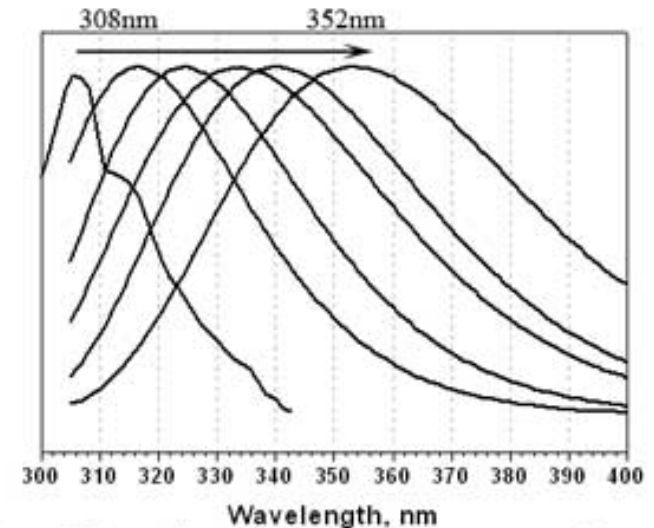
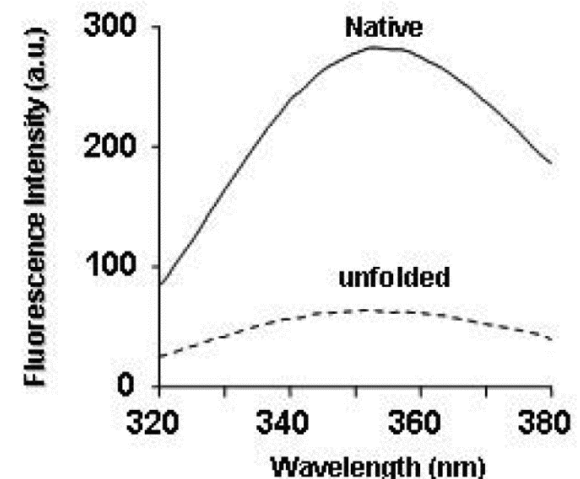


Figure 3. Examples of protein fluorescence spectra of tryptophan residues located in different environments of protein molecule.



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

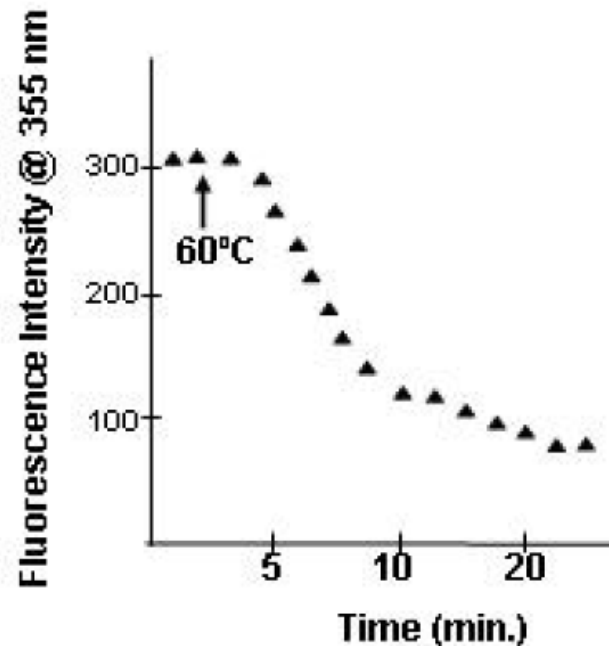
Fluorescenza intrinseca

Descrive la denaturazione monitorando:

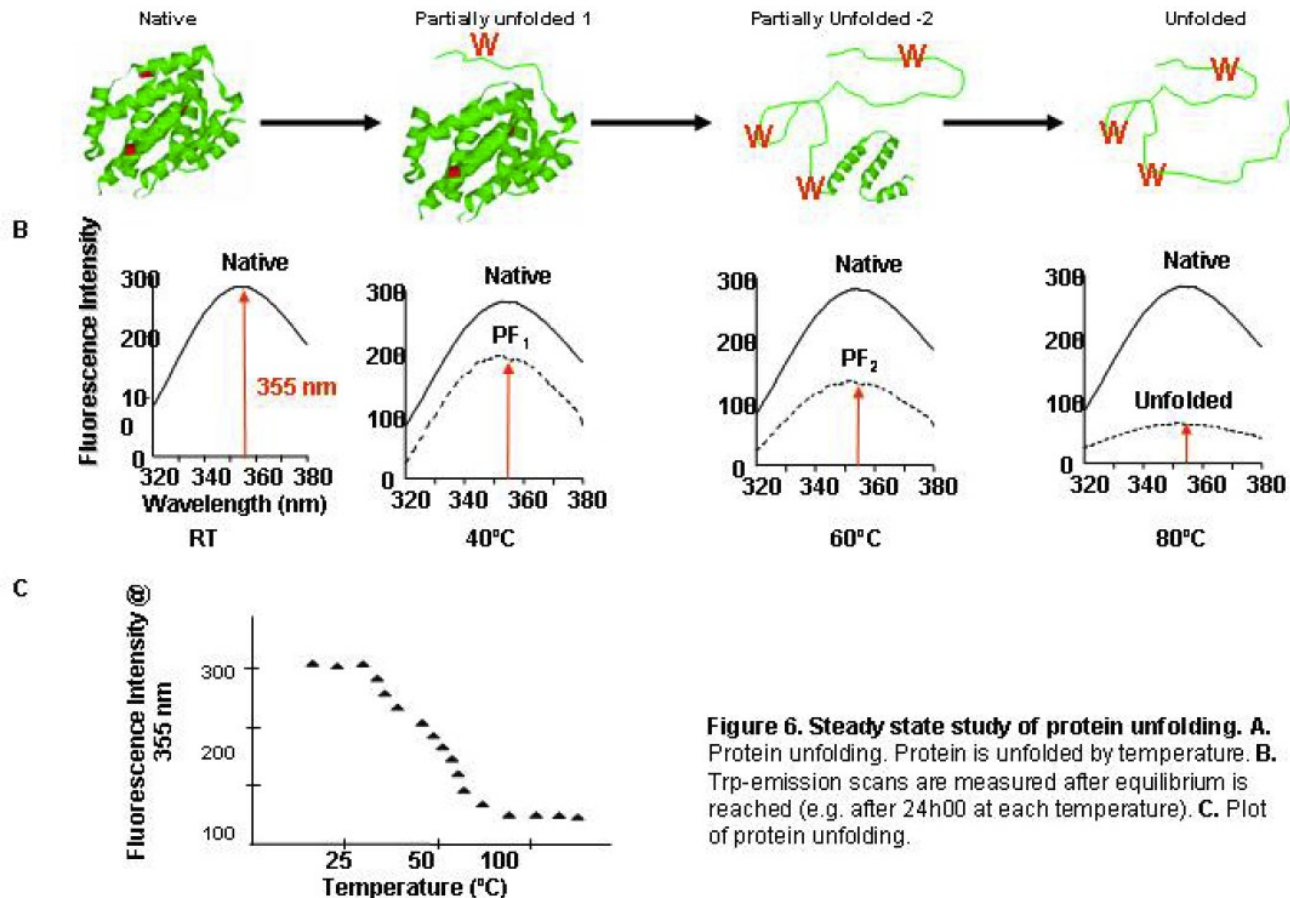
- ΔFI
- $\Delta \lambda_{em}(\text{Trp})$

STABILITA' TERMICA:

A) STUDI CINETICI:



B) STUDI allo STATO STAZIONARIO:



C

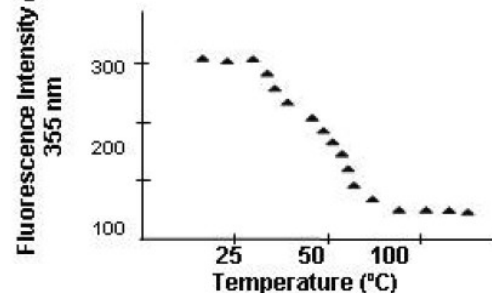
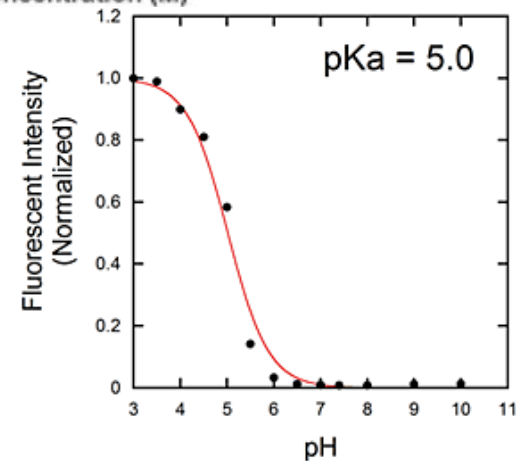
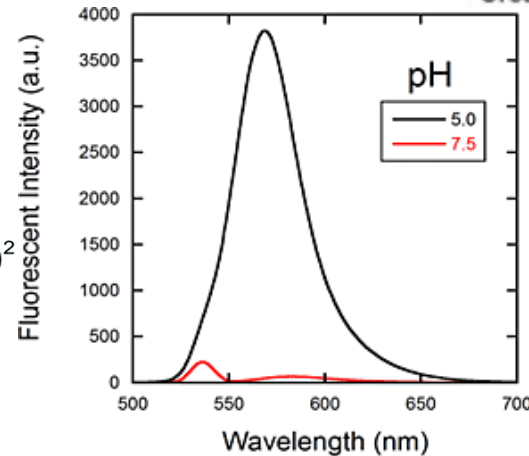
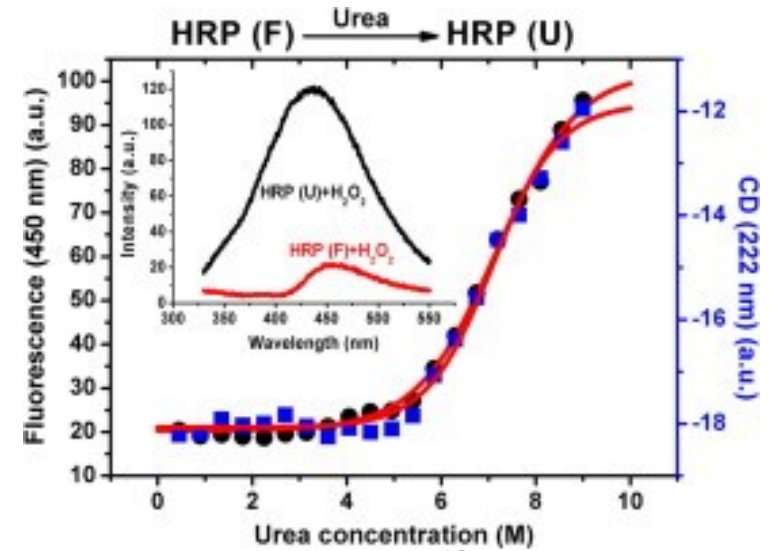
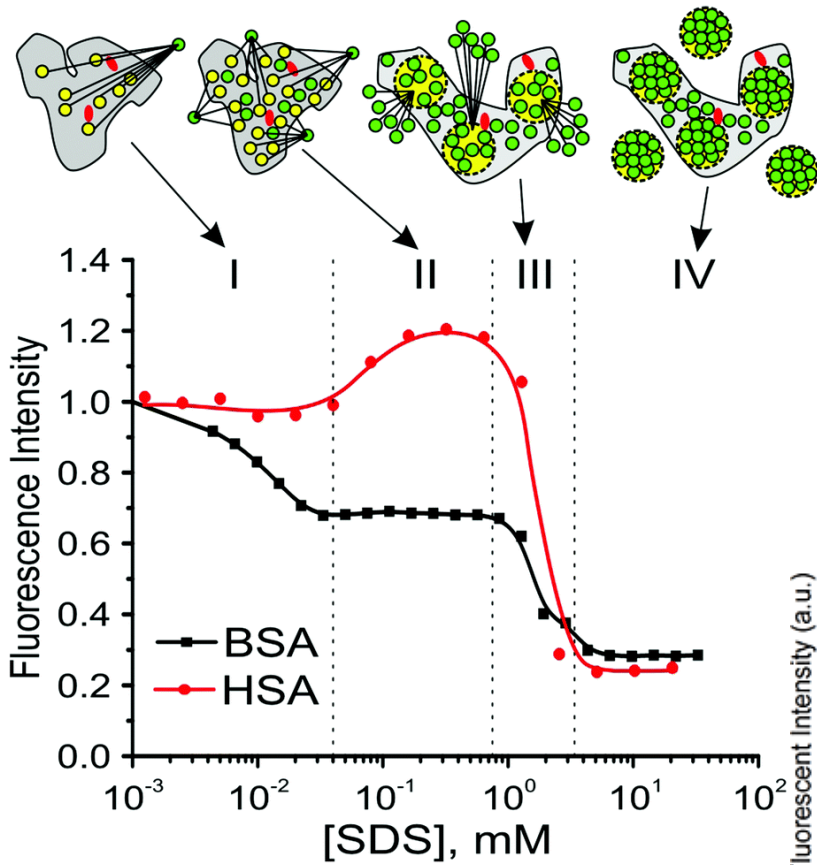


Figure 6. Steady state study of protein unfolding. A. Protein unfolding. Protein is unfolded by temperature. B. Trp-emission scans are measured after equilibrium is reached (e.g. after 24h00 at each temperature). C. Plot of protein unfolding.

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

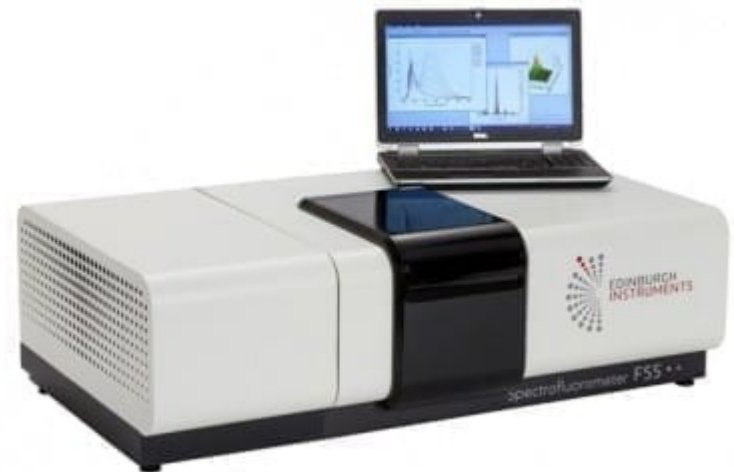
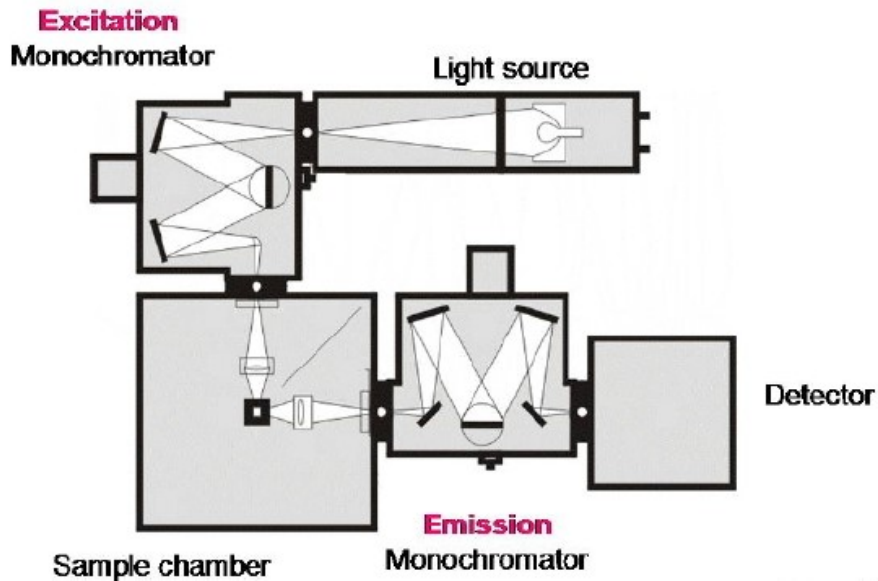
Fluorescenza intrinseca

STABILITA' CHIMICA:

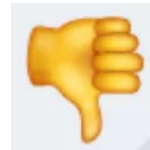


Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Fluorescenza intrinseca: strumentazione



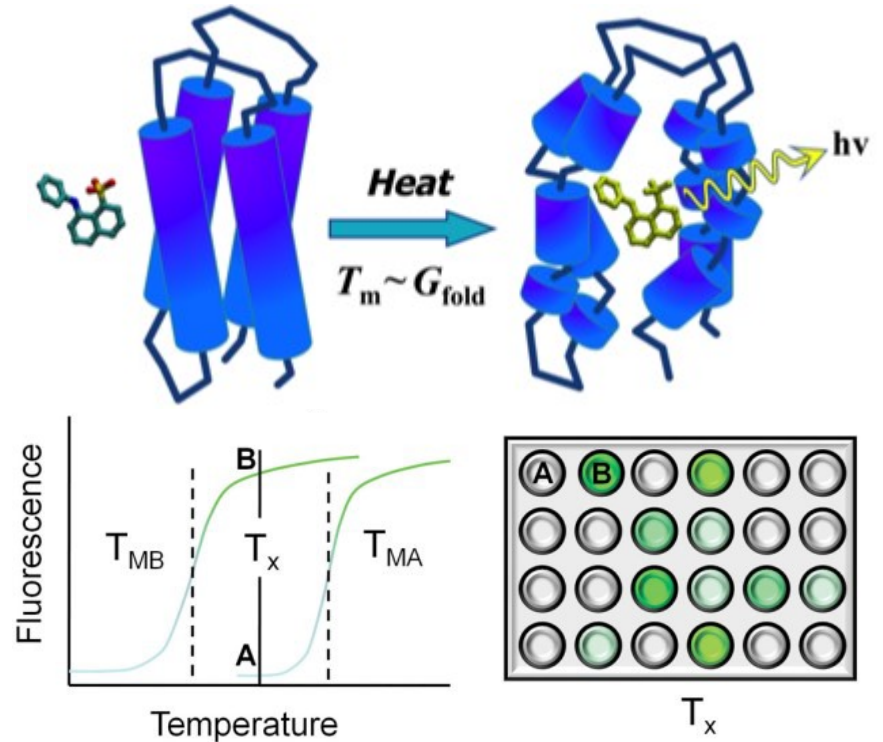
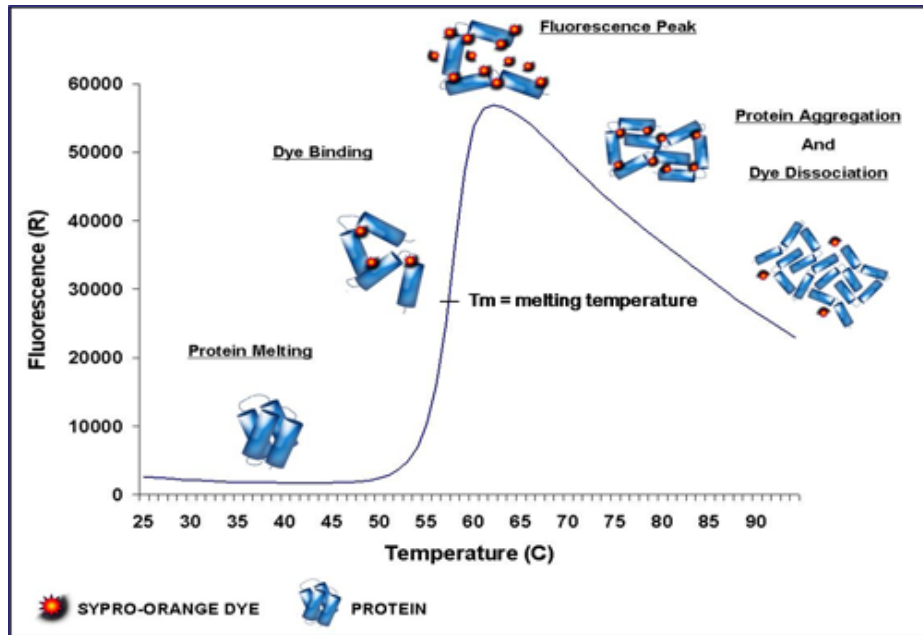
Molto sensibile
Poco campione richiesto



AA aromatici non sempre presenti

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSF: basi

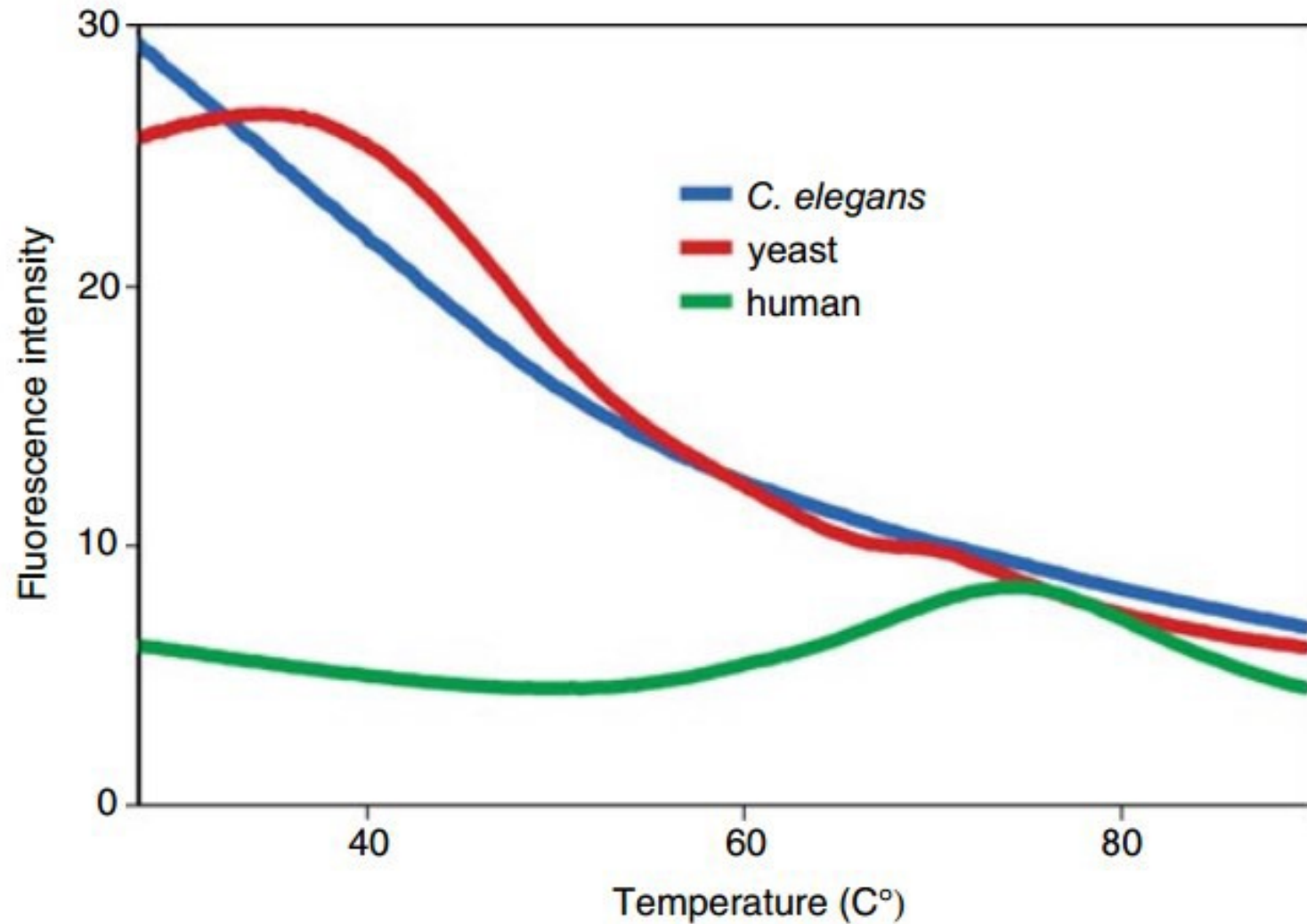


© Garland Science 2010

L'aumento della T_M indica quindi una maggiore stabilità e consente di identificare la formulazione che massimizza la stabilità della proteina.

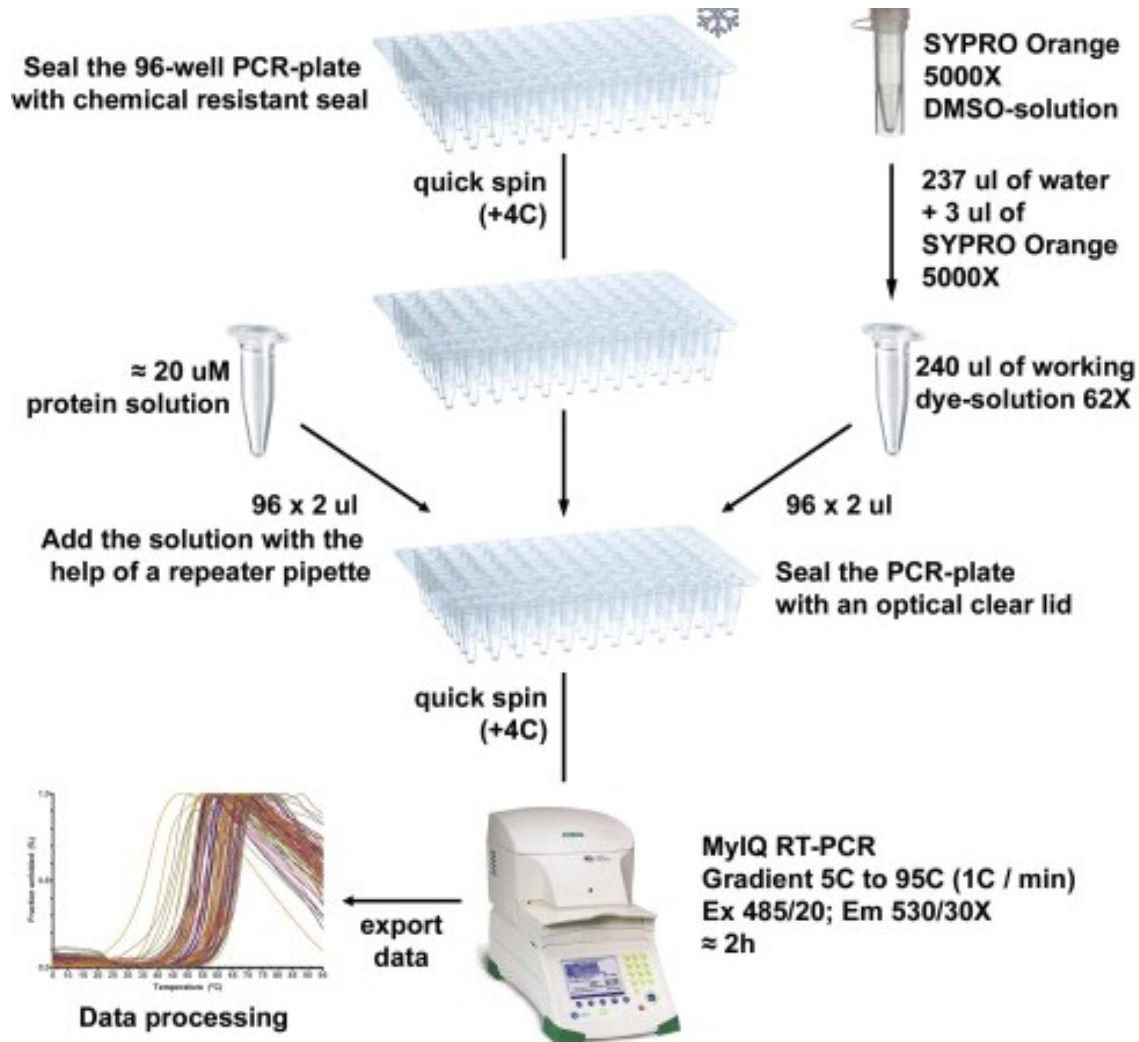
Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSF: esempi



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

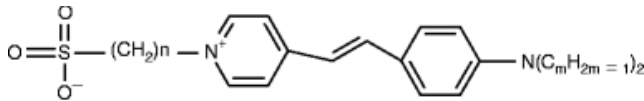
DSF: setup



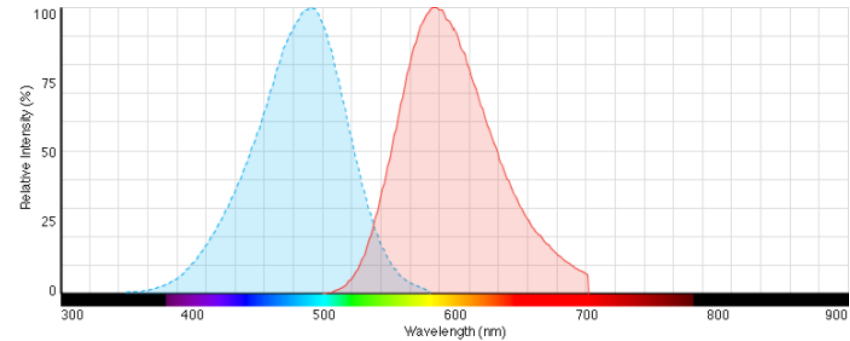
Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSF setup: Sonde fluorescenti

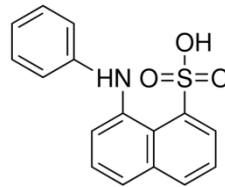
SYPRO Orange



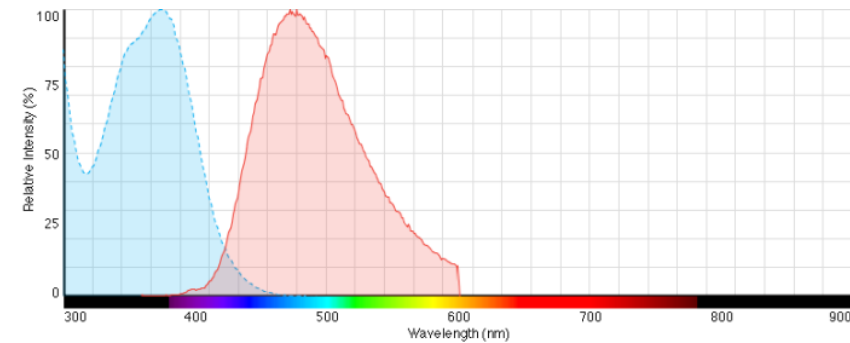
i massimi eccitazione [Ex] 472 nm
emissione [Em] 570 nm



1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid (1,8 ANS)

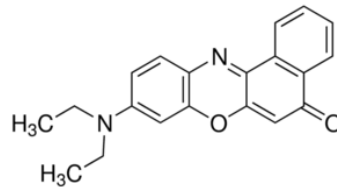


i massimi eccitazione [Ex] 380 nm
emissione [Em] 545 nm

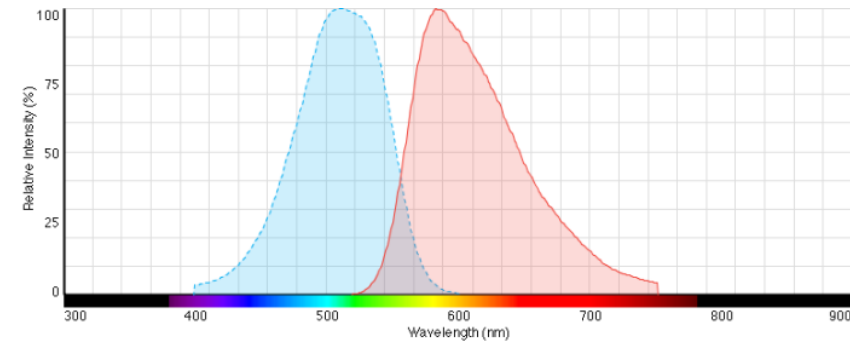


interazioni più deboli con i detergenti

Nile red



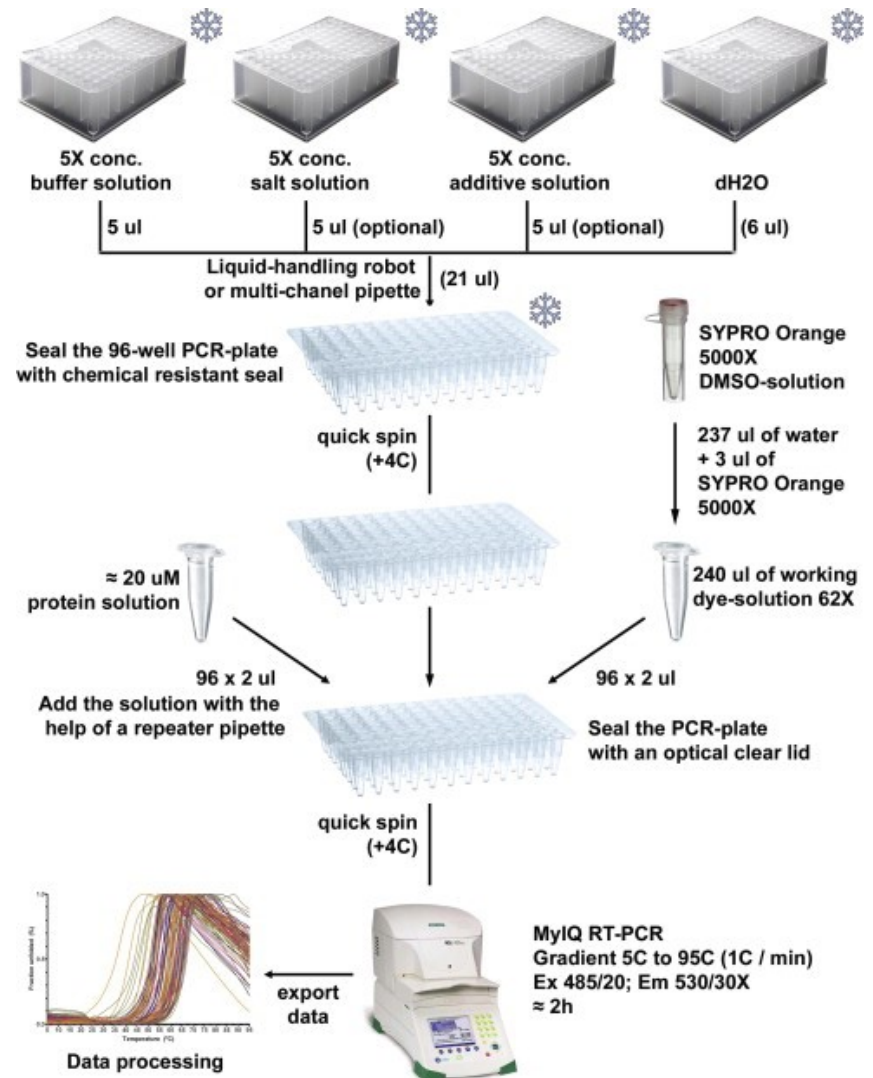
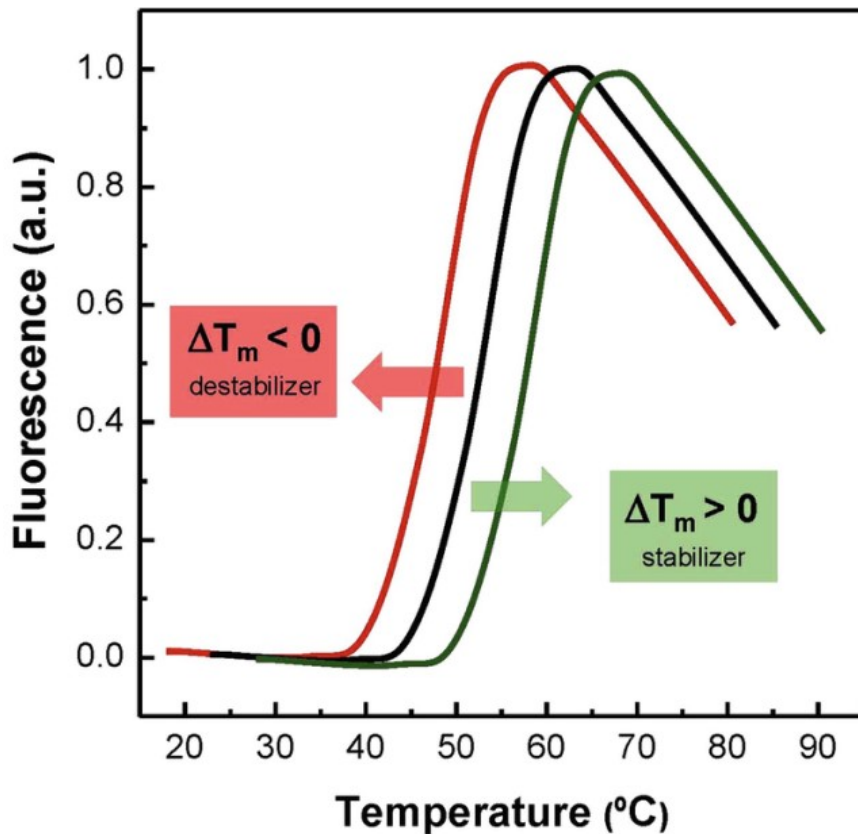
i massimi eccitazione [Ex] 550 nm
emissione [Em] 640 nm



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSF: Applicazioni

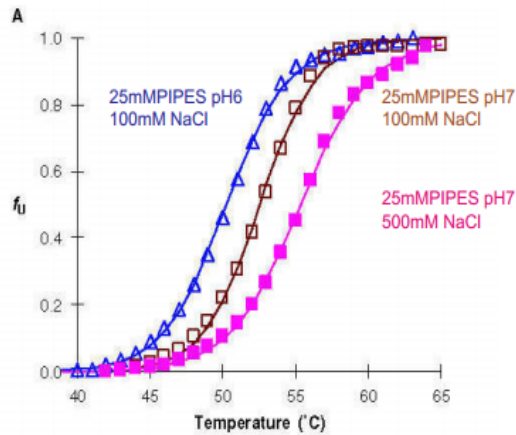
1) Ottimizzazione della formulazione



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

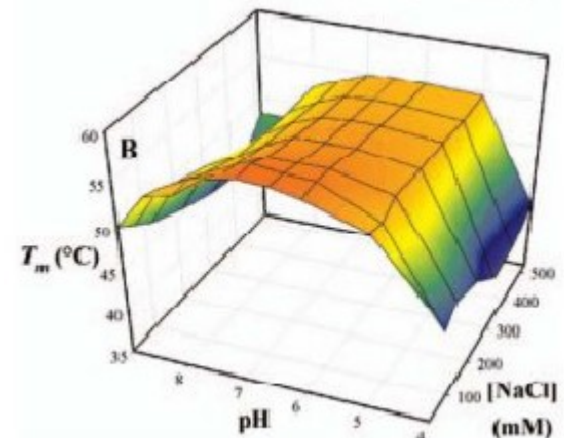
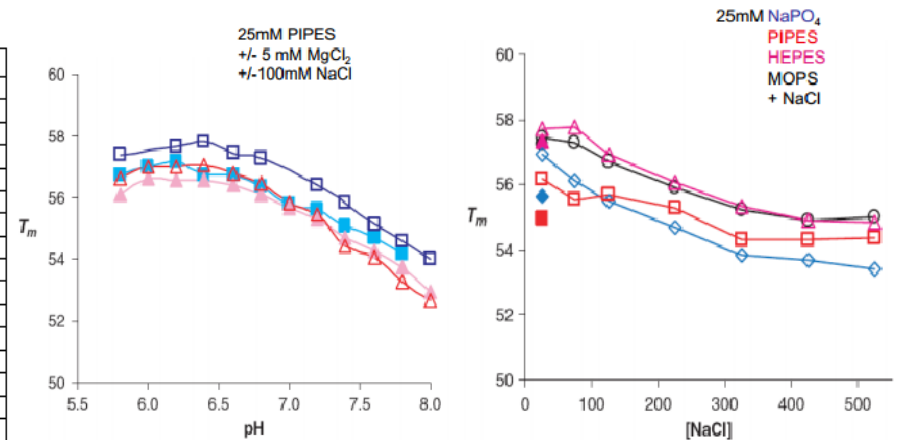
DSF: Applicazioni

1) Ottimizzazione della formulazione



pKa of buffering compounds

Compound	pKa
Maleate	2.0
Phosphate	2.15
Chloroacetate	2.88
Formate	3.75
Benzoate	4.2
Acetate	4.76
Propionate	4.86
Pyridine	5.23
Piperazine (2)	5.55
MES	6.21
Bis-Tris	6.46
ADA	6.62
PIPES	7.1
ACES	6.91
BES	7.26
MOPS	7.31
Phosphate (2)	7.2
TES	7.61
HEPES	7.66
Tris	8.06
Tricine	8.26
Bicine	8.46
TAPS	8.51
Ethanolamine	9.5
CHES	9.41
CHAPS	10.51
Methylamine	10.62
Piperidine	11.12
Phosphate (3)	12.33

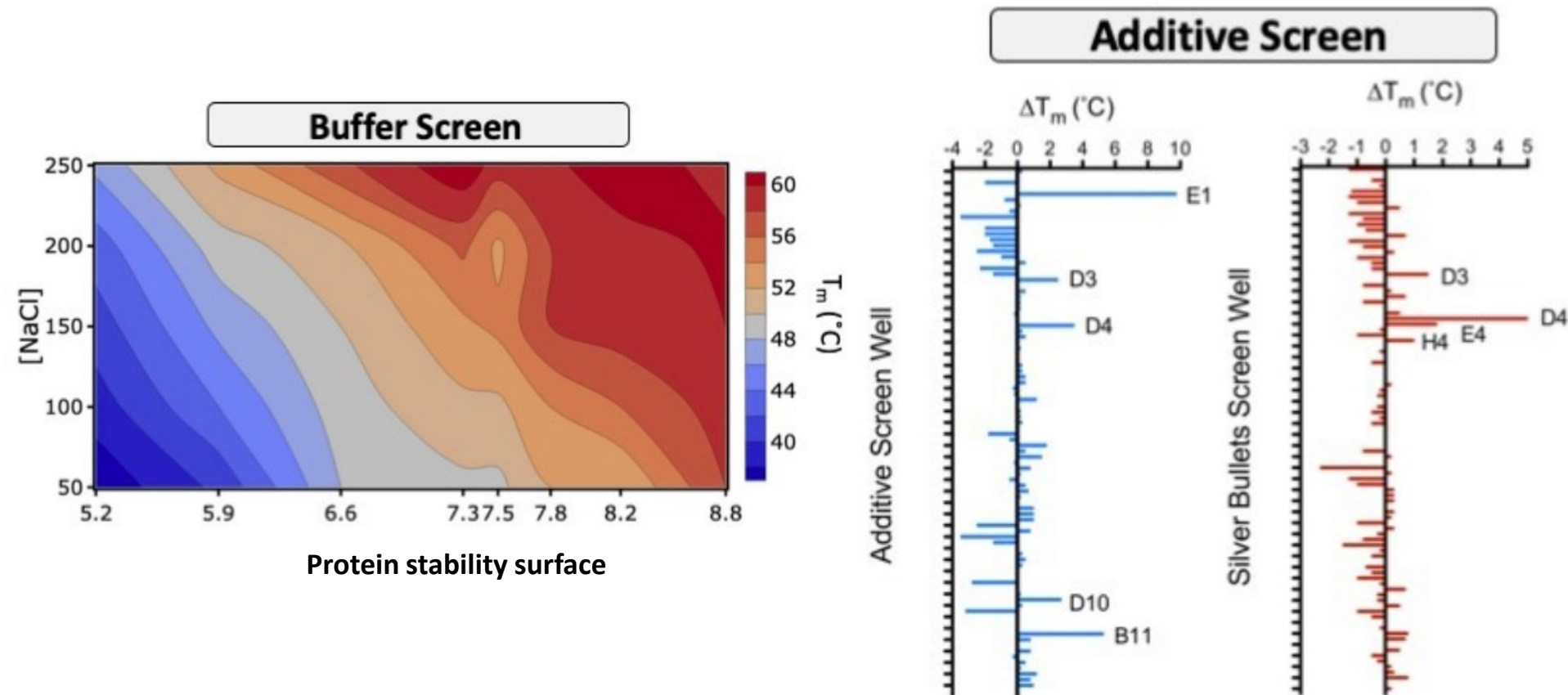


Protein stability surface

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSF: Applicazioni

1) Ottimizzazione della formulazione



Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSF: Applicazioni

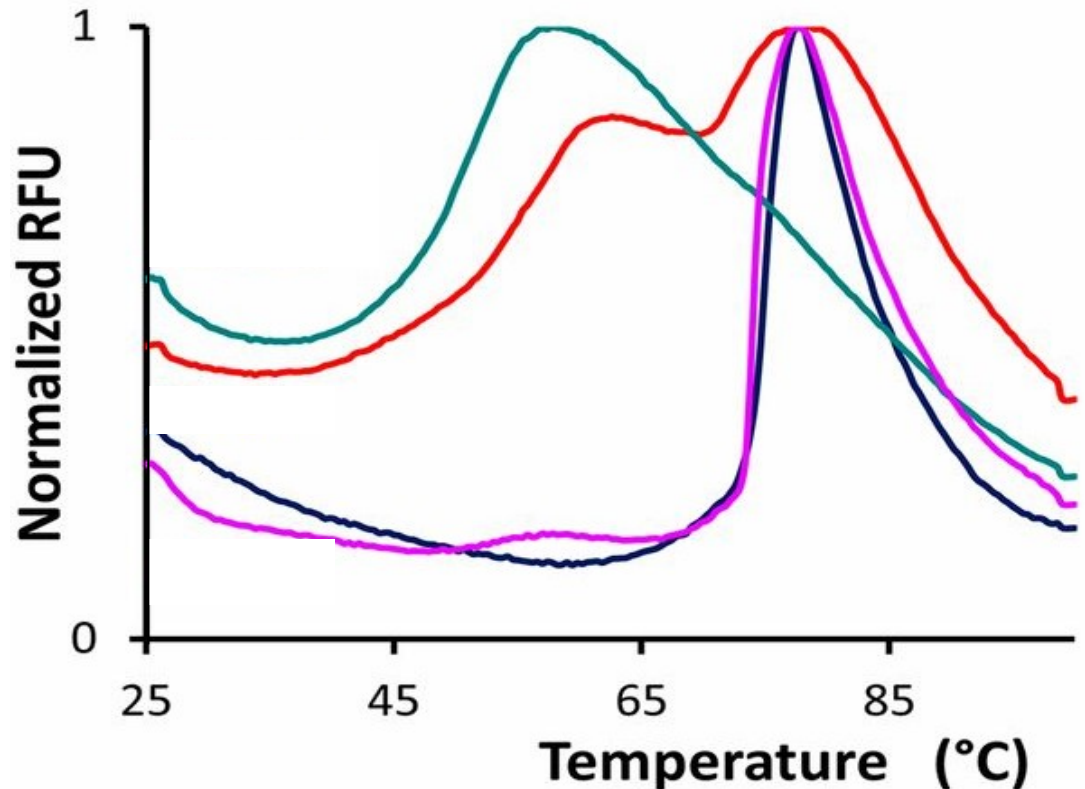
2) Ottimizzazione della cristallizzazione

In generale:

Condizioni stabilizzanti → minore aggregazione → maggiore probabilità di formazione di cristalli

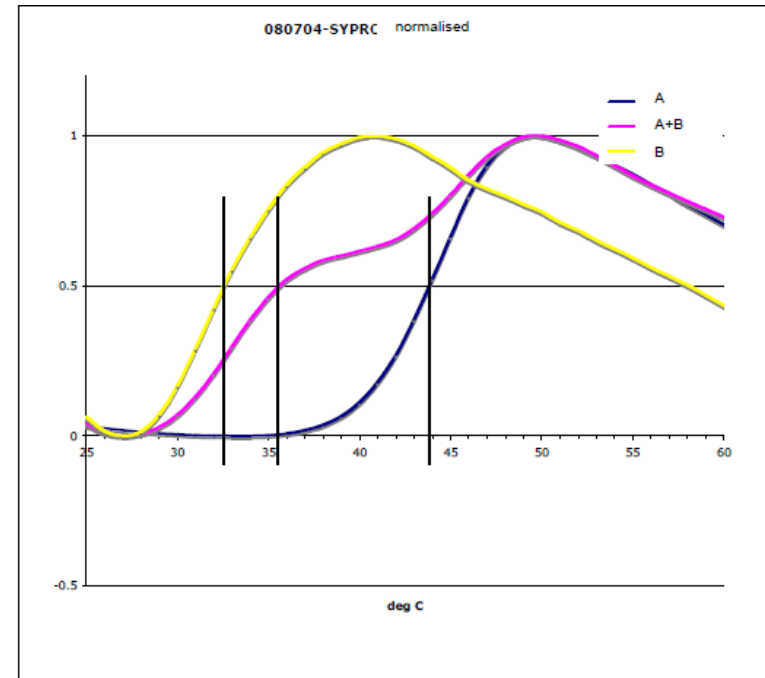
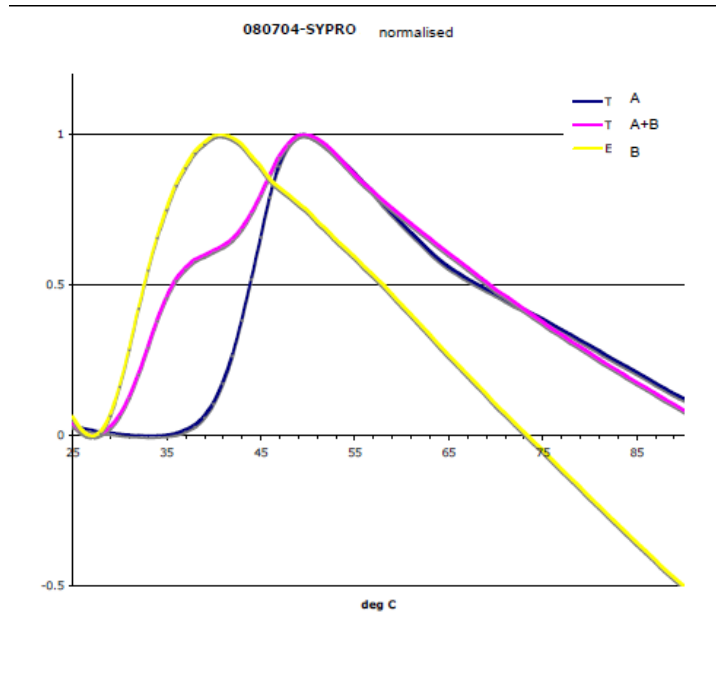
Condizioni destabilizzanti → maggiore probabilità di precipitati

SIGNIFICATIVITA' DELLA FORMA
DELLA CURVA DI MELTING

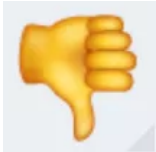


Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

DSF: Analisi dei dati



Analisi delle curve di denaturazione termica: fitting l'equazione di Boltzmann: curva sigmoideale a due stati il cui flesso corrisponde alla T_M

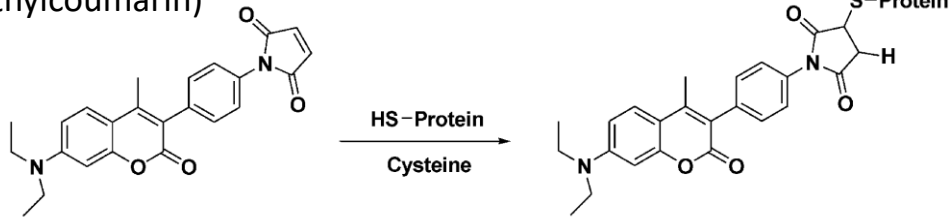


- Interferenza di composti colorati
- Risultati ambigui per proteine multi-dominio
- Poco applicabile a detergenti

Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

Fluorescent Thermal Stability Assay: basi

Colorante CPM (7-Diethylamino-3-(4'-Maleimidylphenyl)-4-Methylcoumarin)



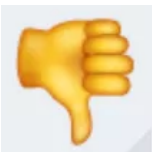
A, Non-Fluorescent

B, Fluorescent

Per proteine di membrana



Alta sensibilità
Riproducibile
Compatibile con detergenti



Presenza di Cys schermate
pH tra 6 e 8

