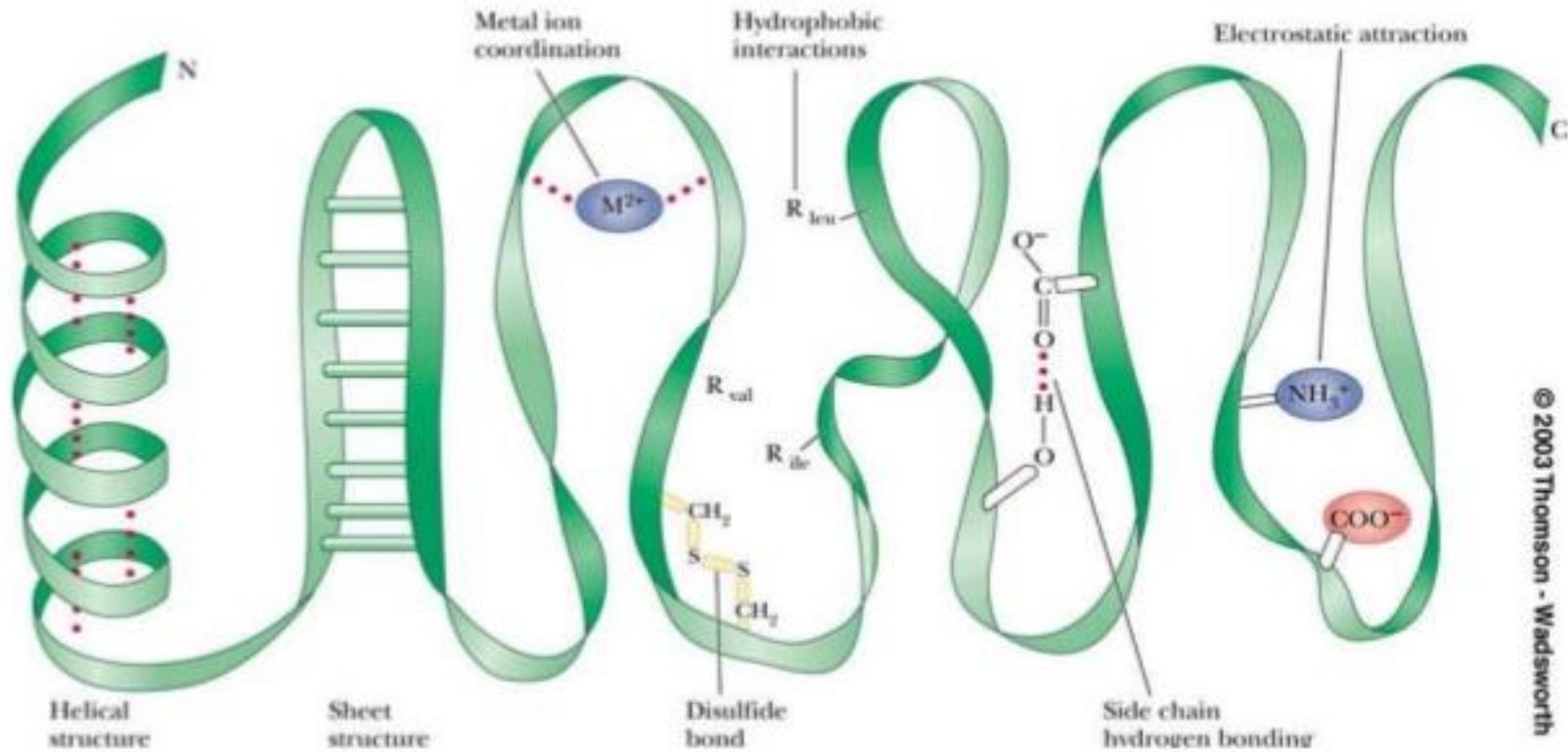


Proteine ricombinanti per studi  
strutturali.

Caratterizzazione biofisica:  
stabilità e cambiamenti  
conformazionali

# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## Stabilità



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## Stabilità ed evoluzione

**stretta finestra di stabilità** (5-15 kcal / mol)

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

**barnasi** (PDB\_ID: 1bns)

**binasi** (PDB\_ID: 1gou)

Ogni singola mutazione:  $\pm 1.1$  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

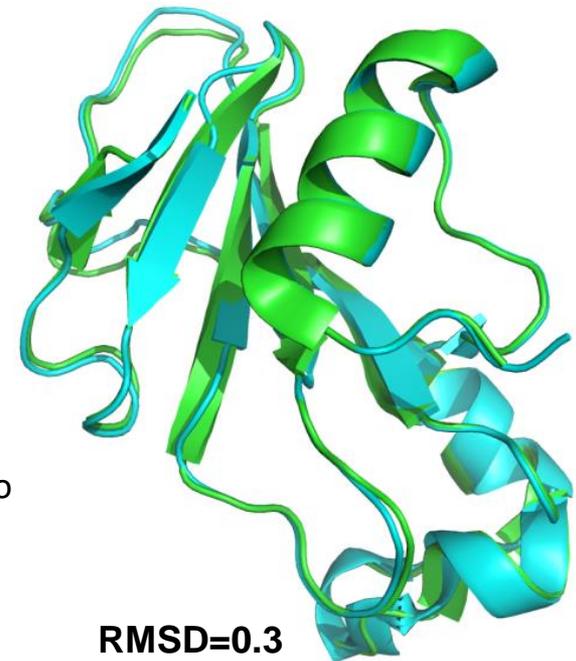
Volume 233, Issue 2, 20 September 1993, Pages 305-312



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



**RMSD=0.3**  
**17 differenze/110 aa**

# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

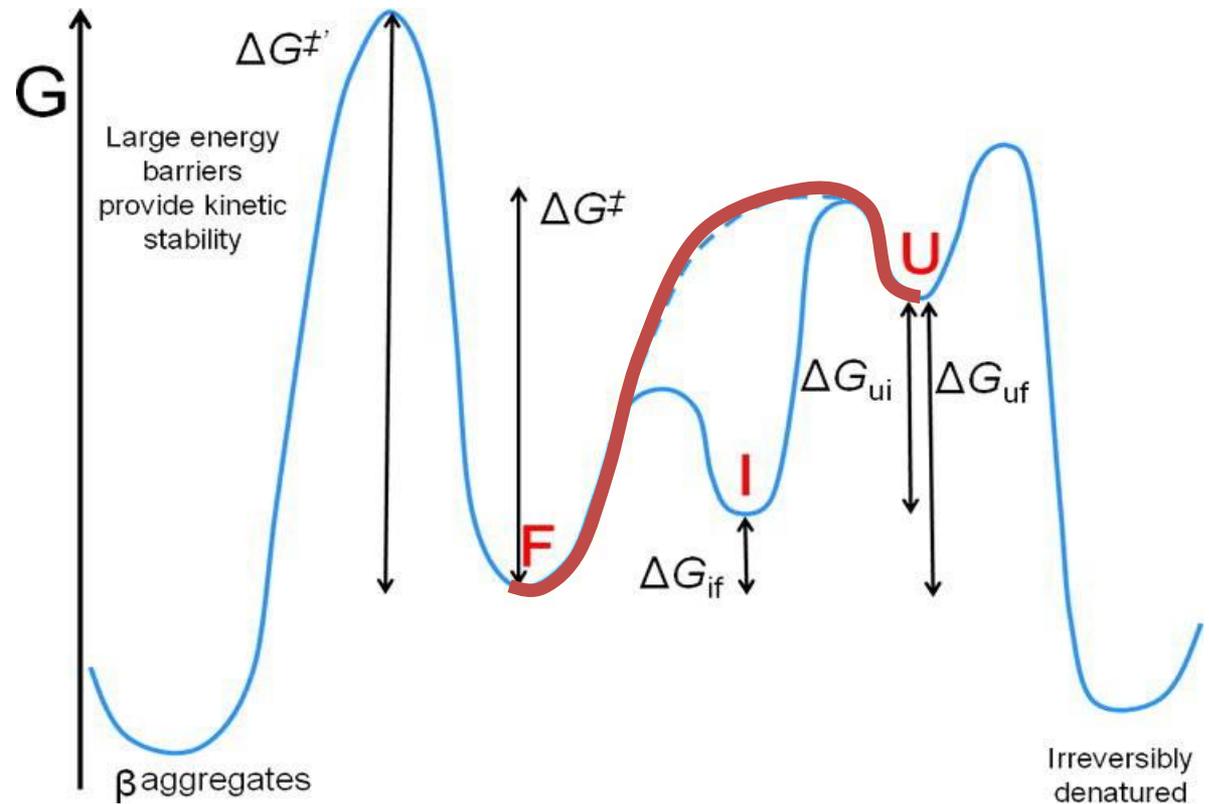
## Stabilità termodinamica



$$\Delta G_U = G_U - G_F$$

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

$$[F] = [U] \rightarrow \Delta G_U(T_M) = 0$$



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## Stabilità termodinamica

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

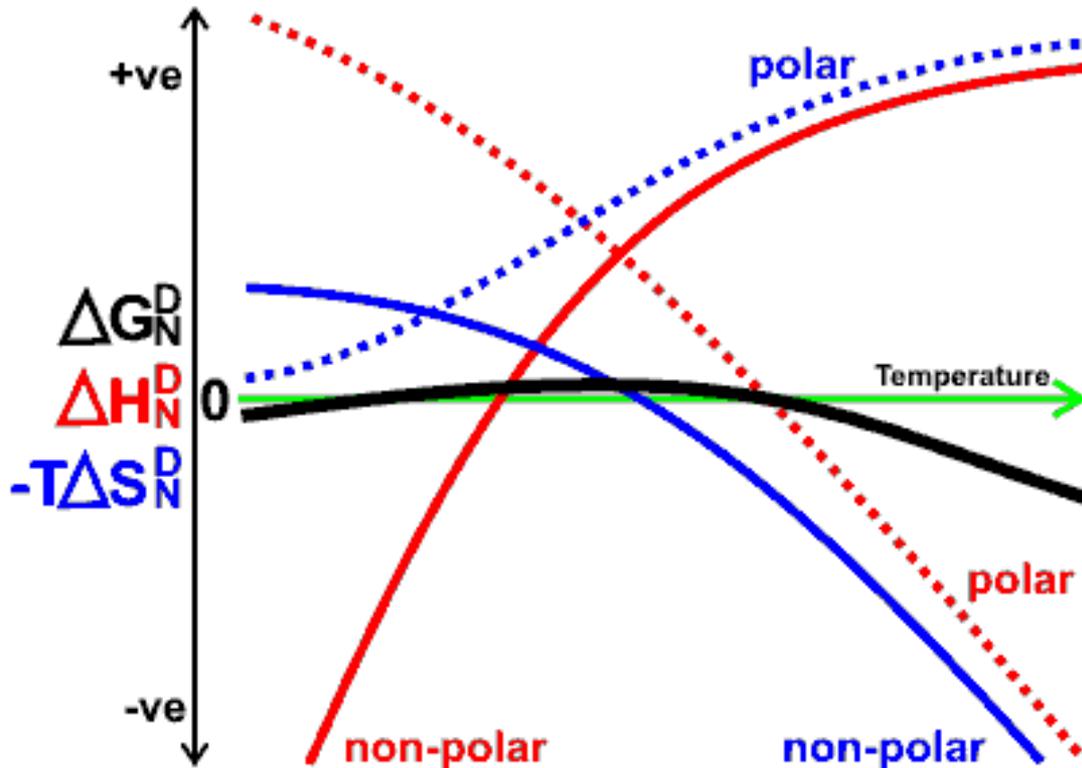
- esposizione dei gruppi polari e non polari interni
- loro interazione con l'acqua
- cambiamenti nelle interazioni acqua-acqua

La denaturazione avviene solo quando

$$\Delta G_U < 0$$

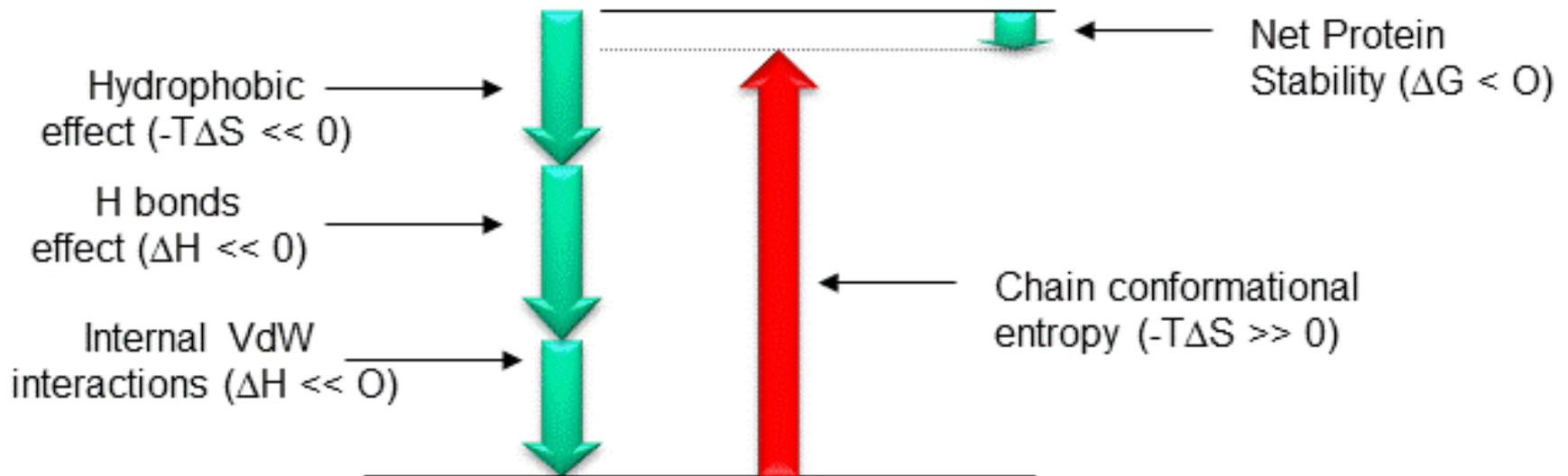
In caso di denaturazione termica,

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



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## Stabilità termodinamica e stato conformazionale



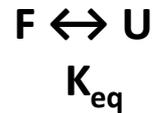
Contributo di due fattori opposti

$\Delta H_U < 0$  (favorevole) forze attrattive non covalenti

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

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

# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

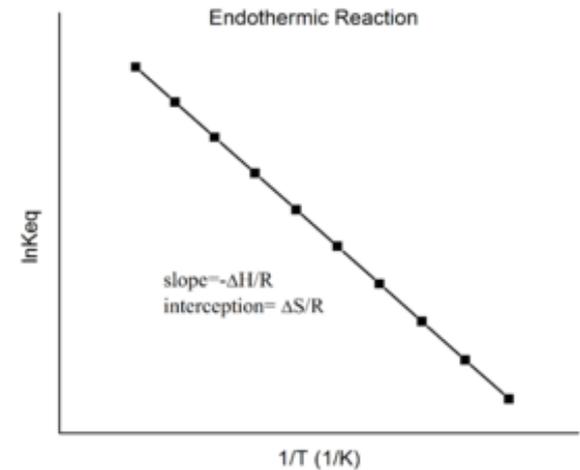
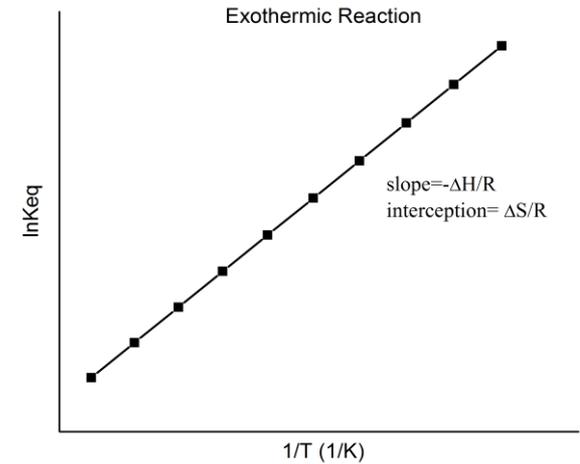


All'equilibrio:  $K_{eq} = [U] / [F]$

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

R Gas constant (1.98 cal/mol)

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



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## Stabilità delle proteine in soluzione

dipende da fattori

### Fisici:

- T
- pH
- Pressione

### Chimici

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



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## Metodi per l'analisi della Stabilità delle proteine

### METODI TRADIZIONALI

NMR

CD

FT-IR

DSC (Differential Scanning Calorimetry)

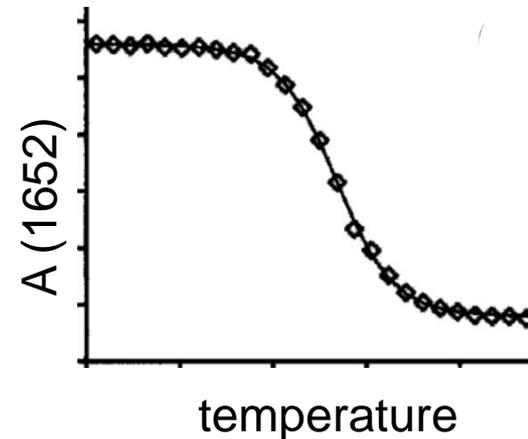
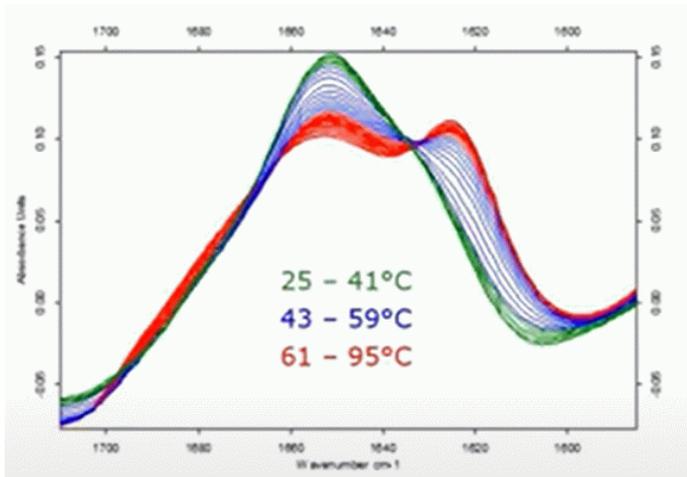
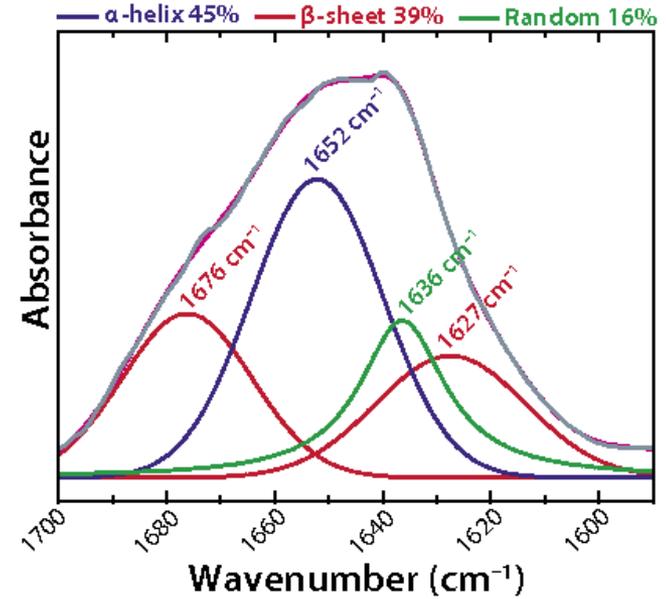
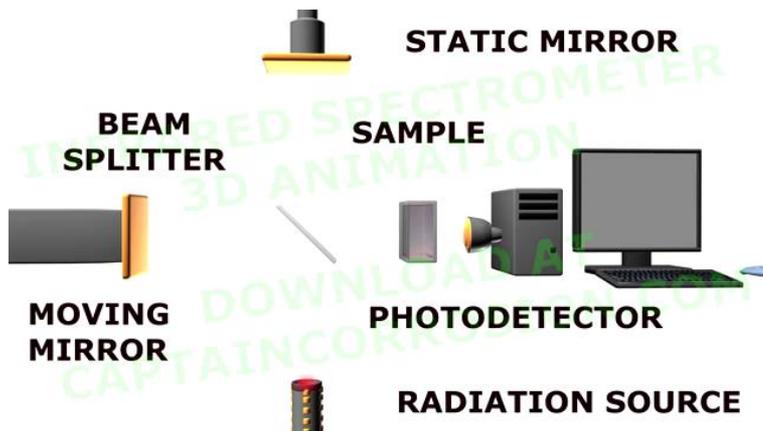
Fluorescenza intrinseca

### METODI HIGH-THROUGHPUT

DSF (Differential Scanning Fluorimetry)

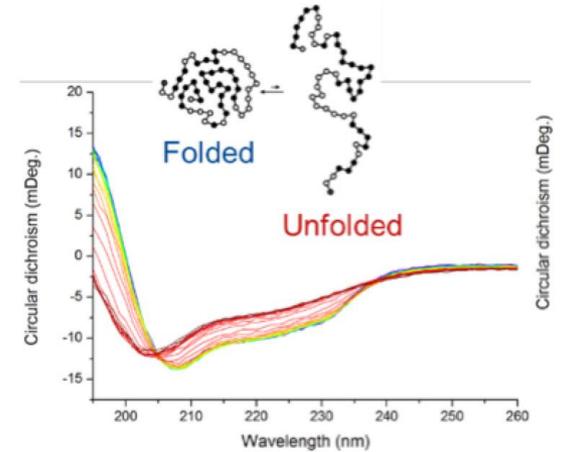
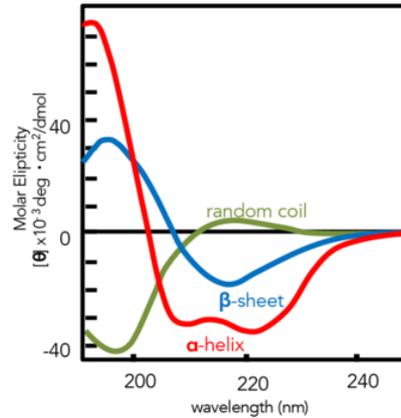
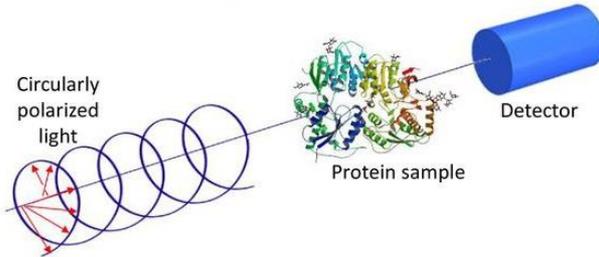
# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## Cambiamento nel contenuto delle strutture secondarie: FT-IR



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

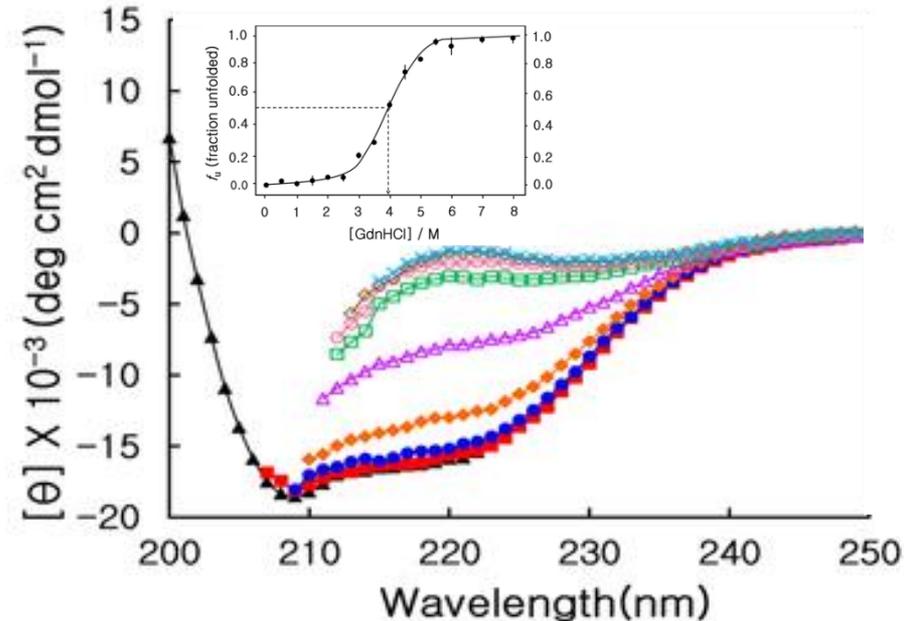
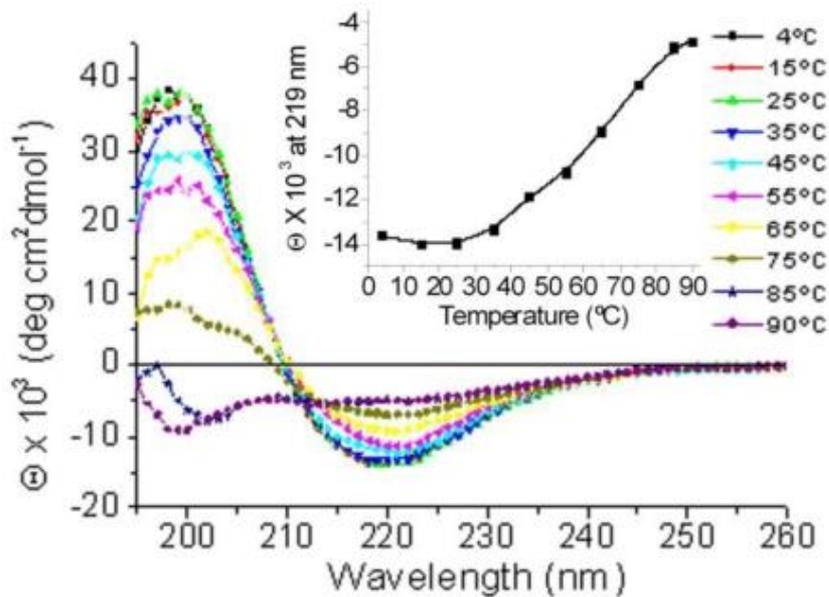
## Cambiamento nel contenuto delle strutture secondarie: CD



## STABILITA' TERMICA

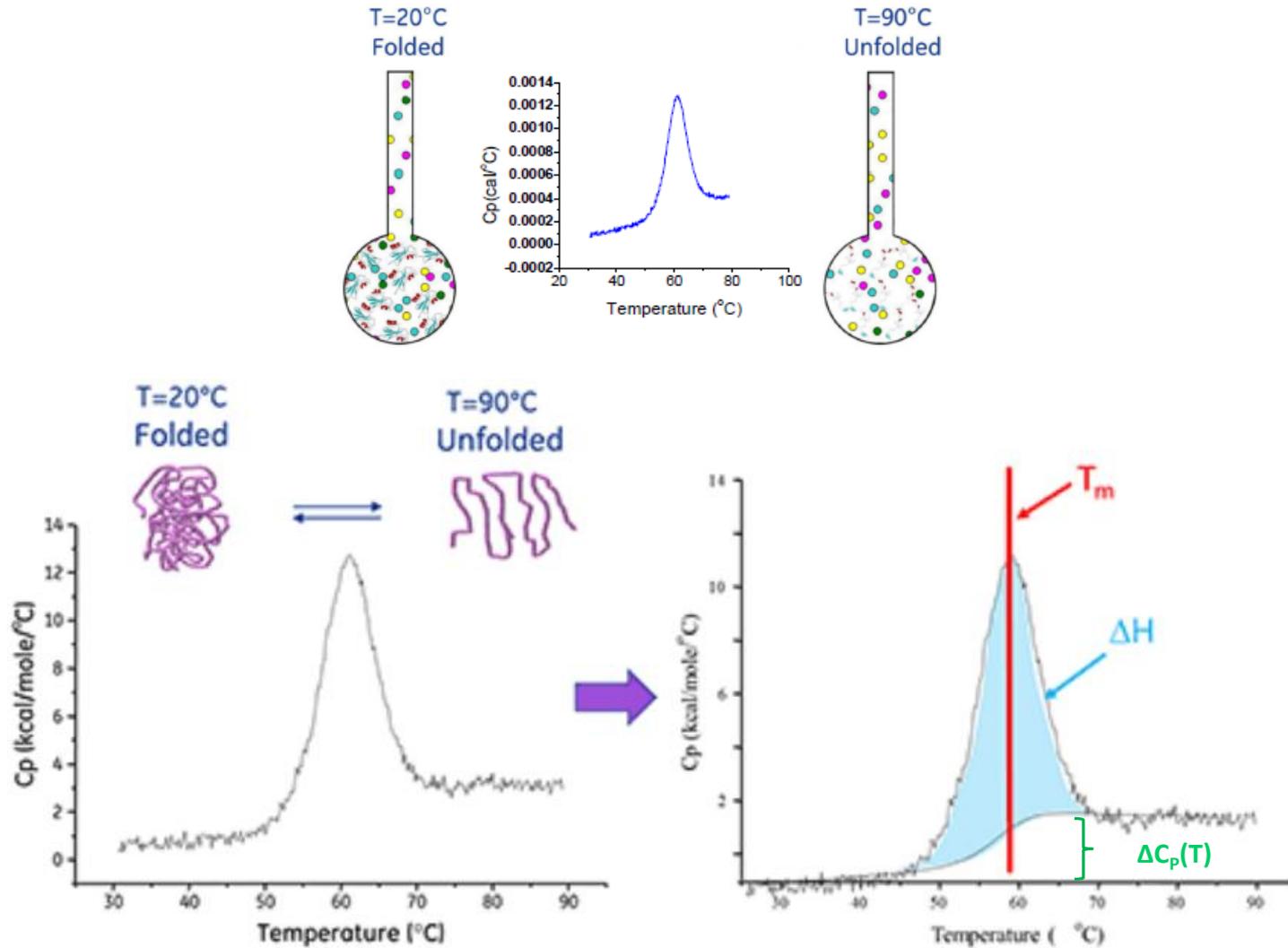
(Adapted from N. Greenfield, 1969)

## STABILITA' CHIMICA



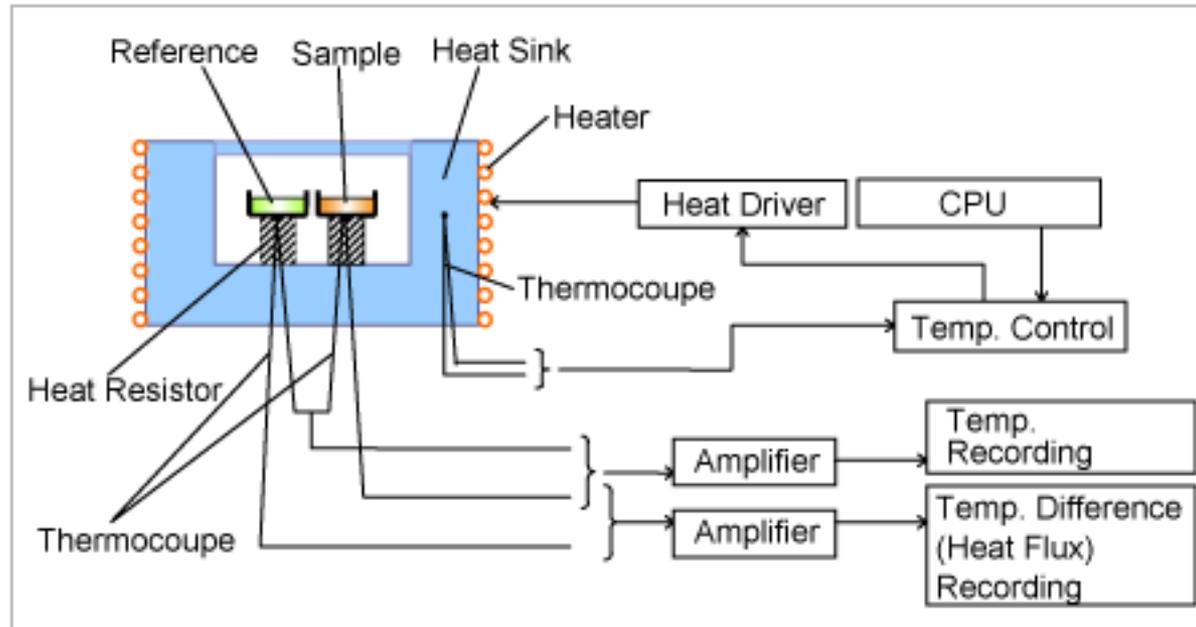
# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## DSC



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## DSC: setup



La differenza di energia fornita dipende da quanto calore viene

assorbito (processo **esotermico**)

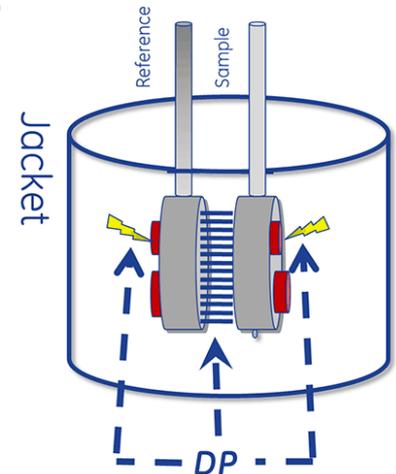
rilasciato (processo **endotermico**)

**CAPACITA' TERMICA:**

$$C_p = dq / dT$$

Se la pressione è costante

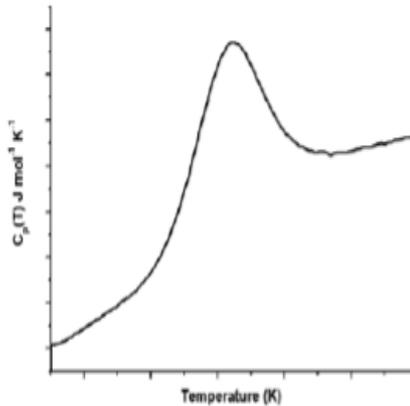
$$C_p = dH / dT$$



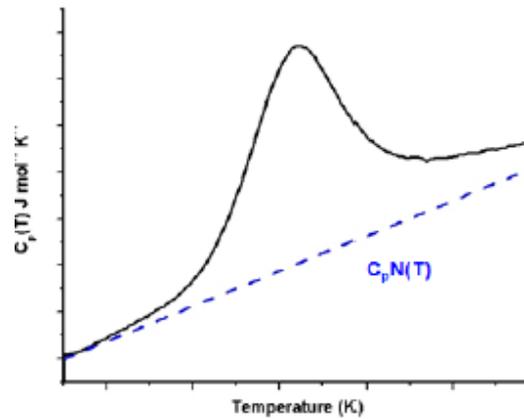
# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## DSC: denaturazione termica

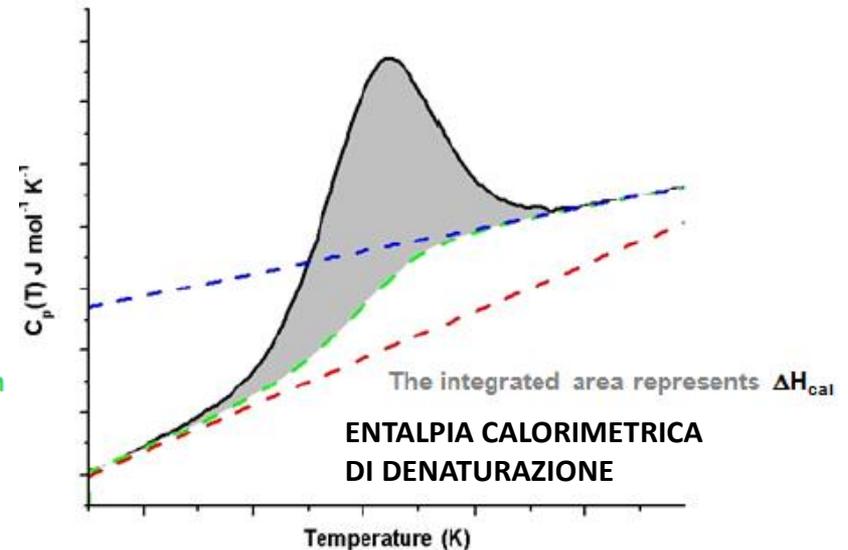
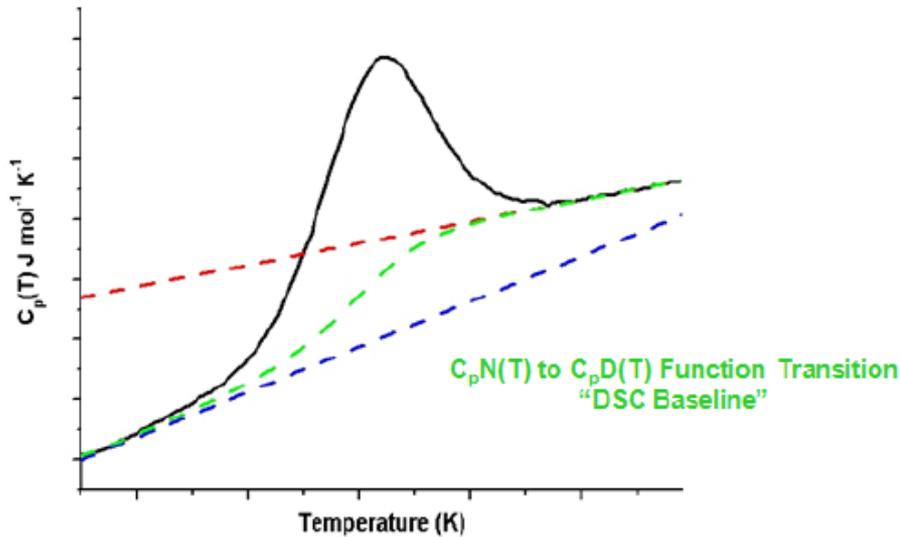
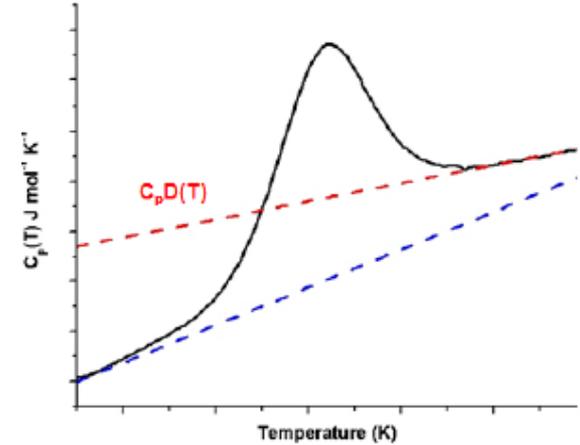
A simple DSC "endotherm":



Stato nativo: fase "simil solida" (basse T)

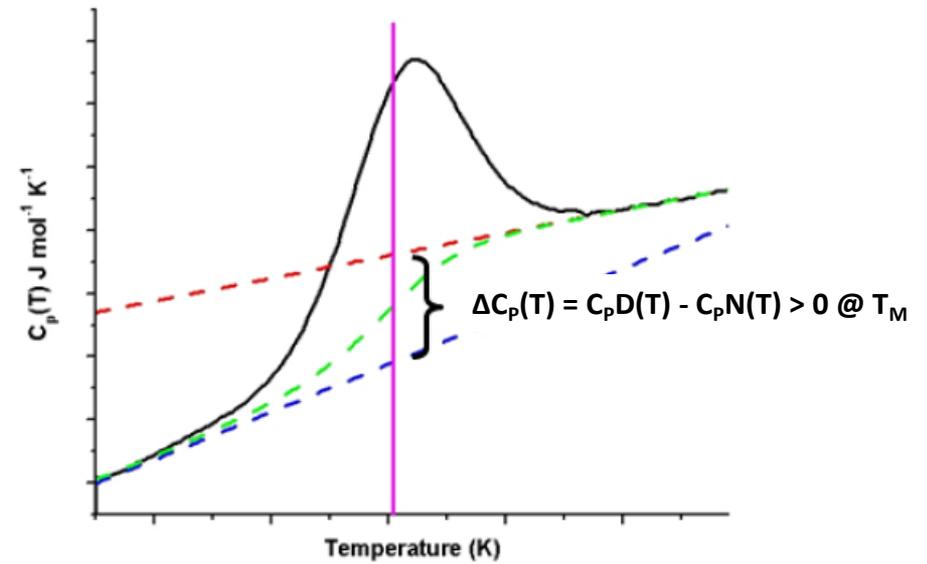
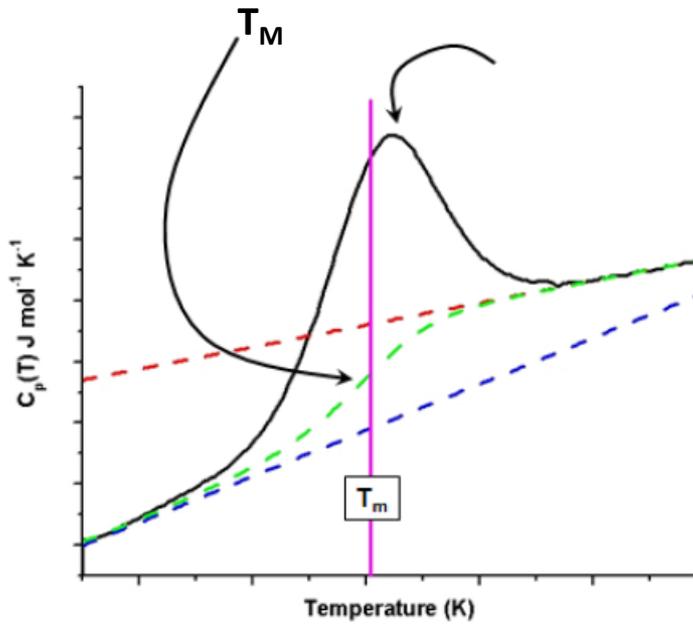


Stato denaturato: fase "simil liquido" (alte T)



# 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

$T_{onset}$

$T_M$

$T_{1/2}$

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

$\Delta H_{cal}$

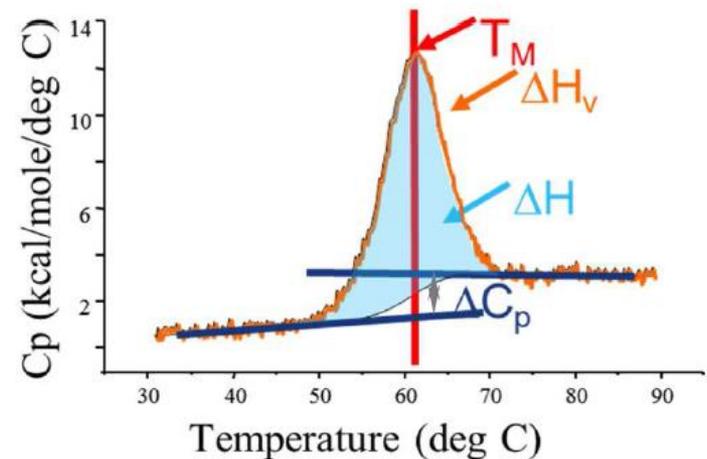
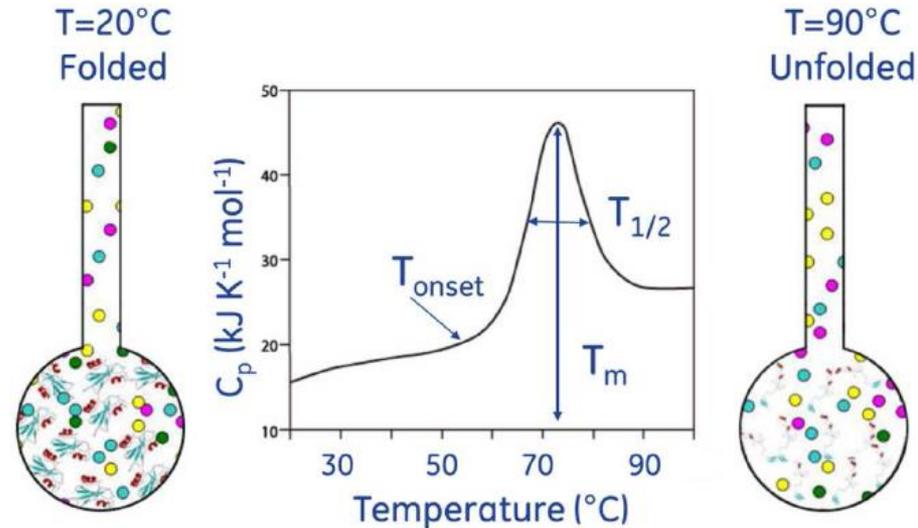
$\Delta H_{vH}$  (entalpia van't Hoff) =  $A \times RT^2 \times C_p(T_M) / \Delta H_{cal}$

=  $\Delta H_{cal}$  per  $F \leftrightarrow U$

<  $\Delta H_{cal}$  (cooperatività INTRAMOLECOLARE)

>  $\Delta H_{cal}$  (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: strumentazione

Auto VP-Capillary  
DSC  
130  $\mu$ l cell

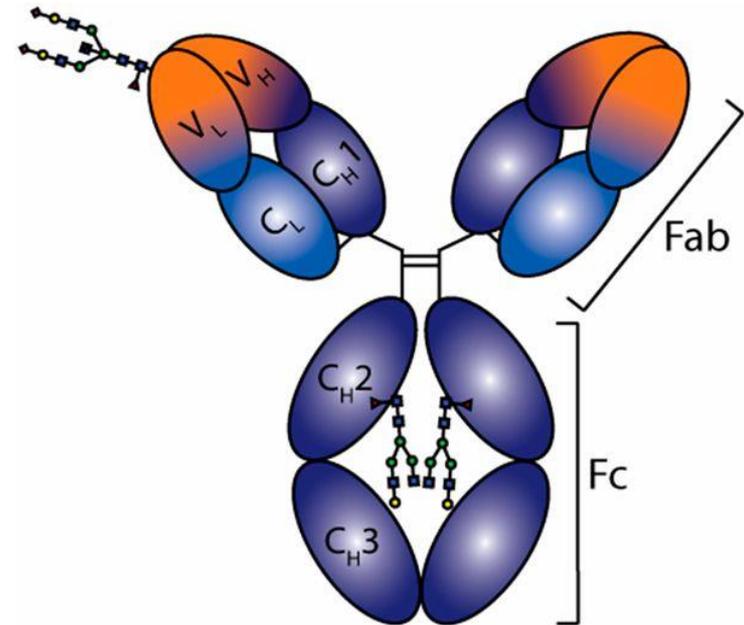
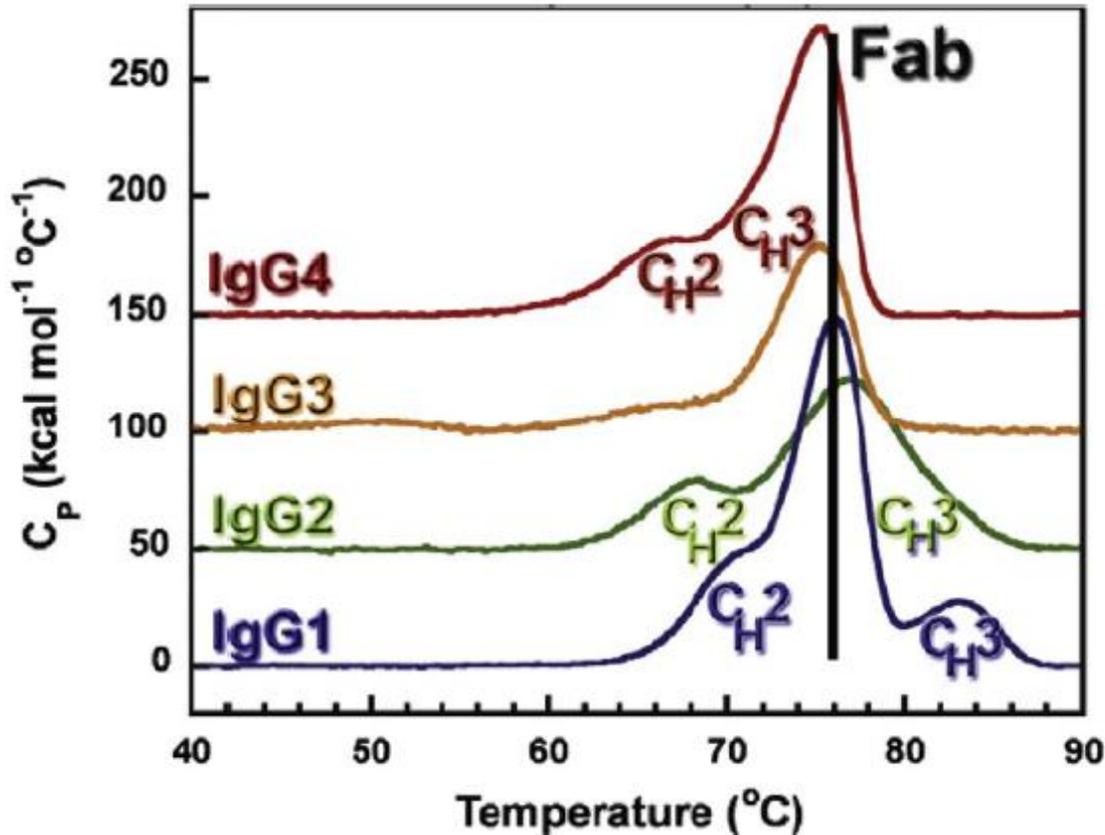


~ 50  $\mu$ g di una proteina per scansione: []

di partenza 0.1-0.2 mg/ml  
RANGE 0.02 - 10 mg/ml

# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## DSC: esempi

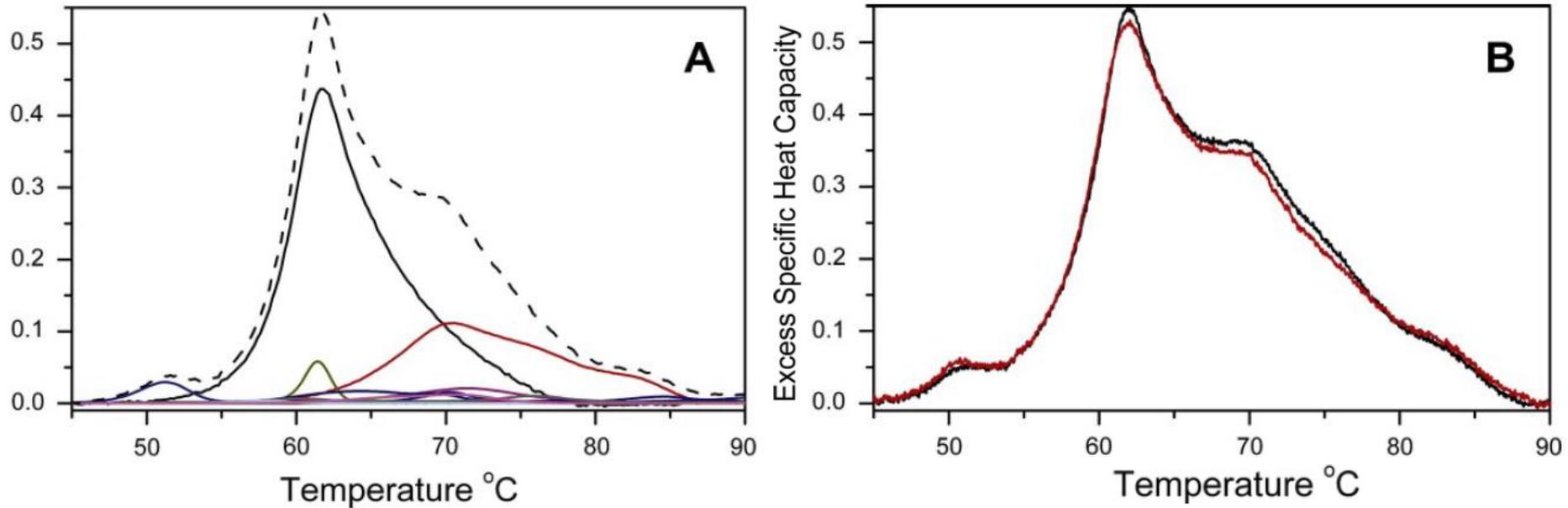


Termogrammi delle 4 sottoclassi di IgG umane.

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:

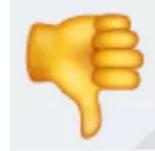
## DSC:

### Applicazioni nella scoperta e lo sviluppo di nuovi farmaci:

- Selezione candidati nello sviluppo bioterapeutico
- Ottimizzazione



- Metodo generico
- Nessuna sonda ottica/marcatura
- Anche con soluzioni torbide



DISTORSIONI NEI TERMOGRAMMI da

- 1) Aggregazione
- 2) Denaturazione non sempre totalmente reversibile

# 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:

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

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

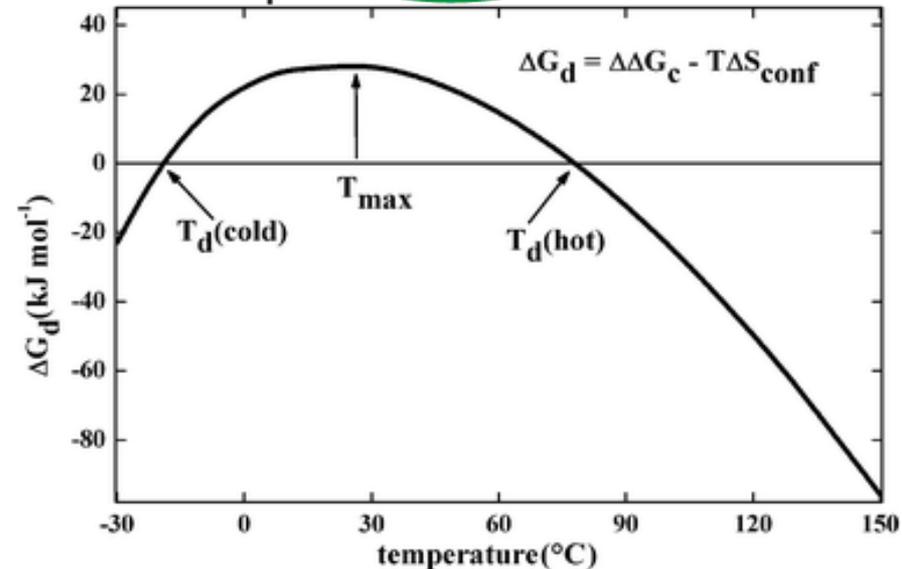
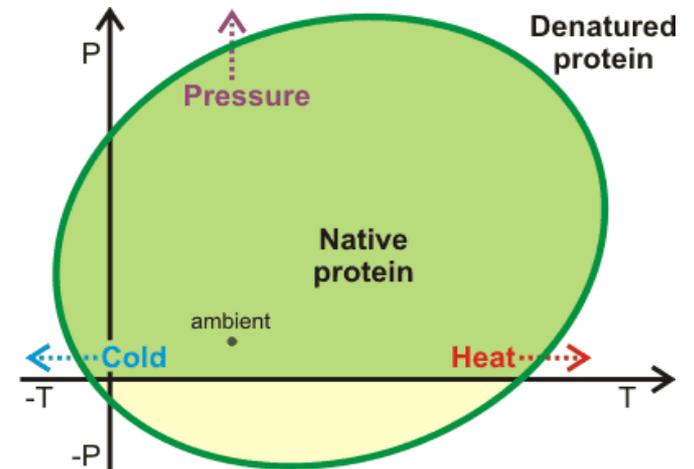
due punti di transizione

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

Destabilizzando la proteina



complete curve di stabilità



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

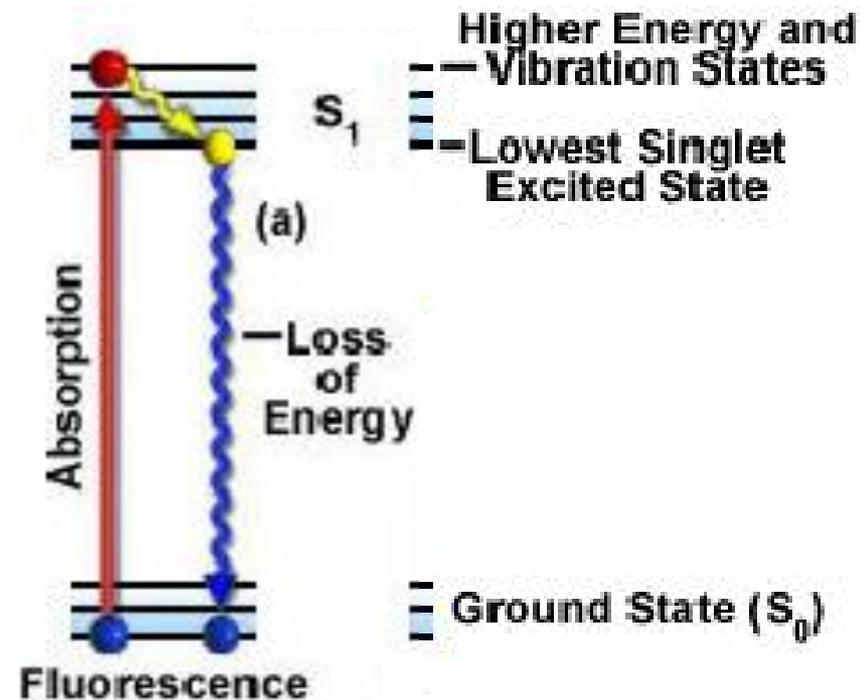
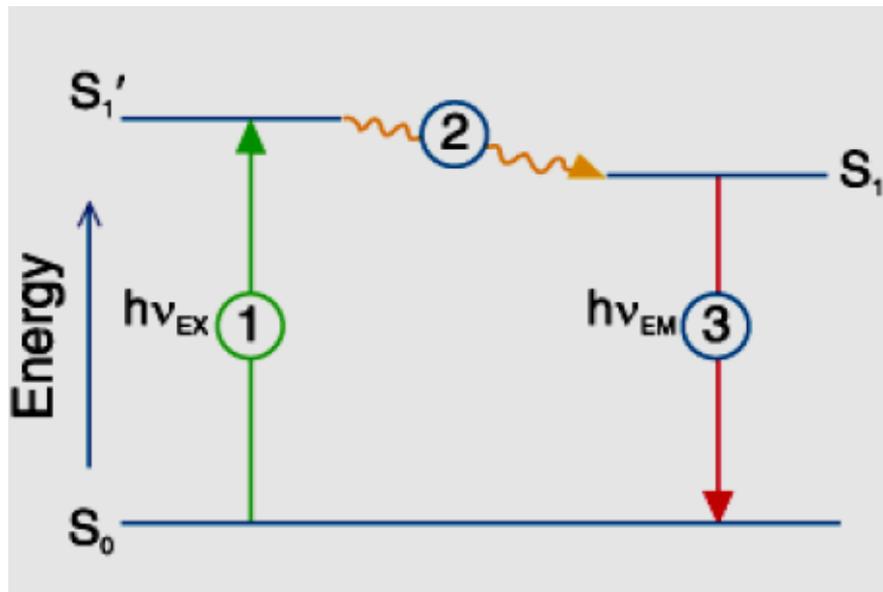
## Fluorescenza intrinseca: basi

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:

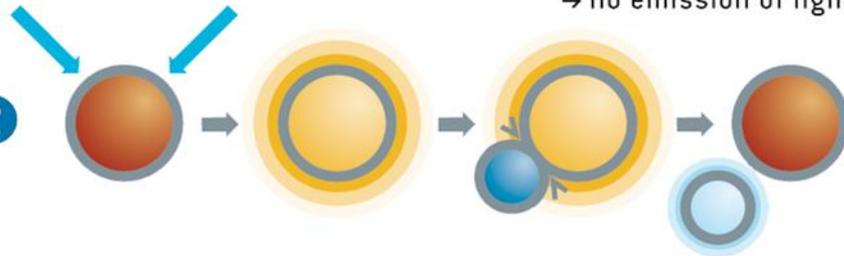
## Fluorescenza intrinseca: basi

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

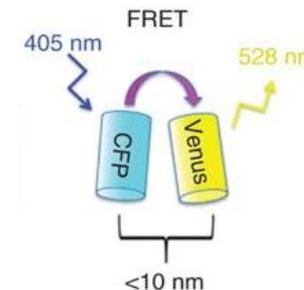
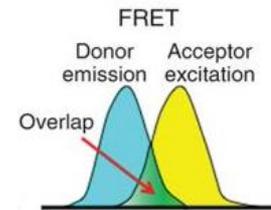
Misura l'interferenza di processi «competitori»:

### 1. Collisional quenching

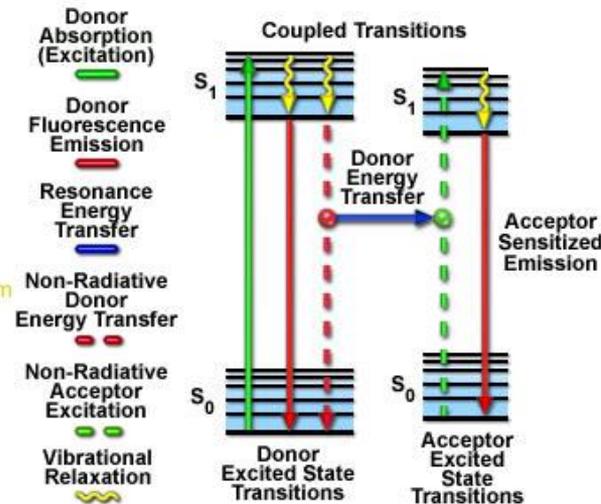
absorption of light → excited state → energy transfer by collision → no emission of light



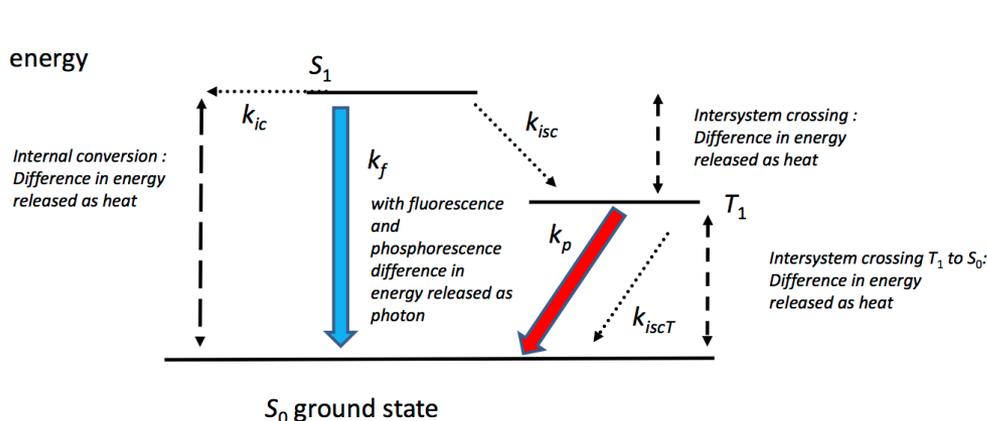
### 2. FRET



### Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram



### 3. Inter-system crossing

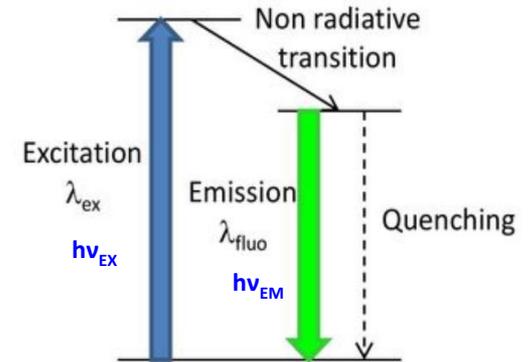
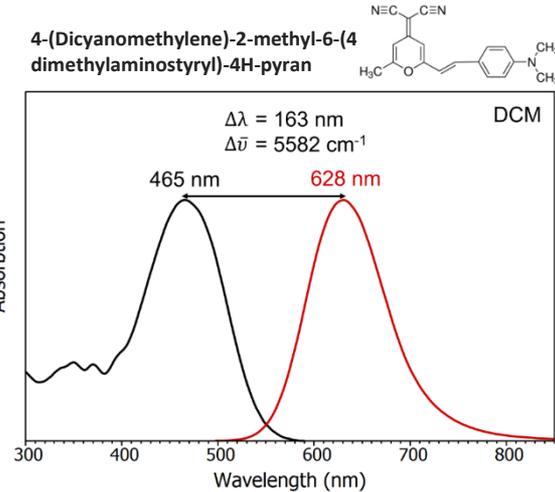
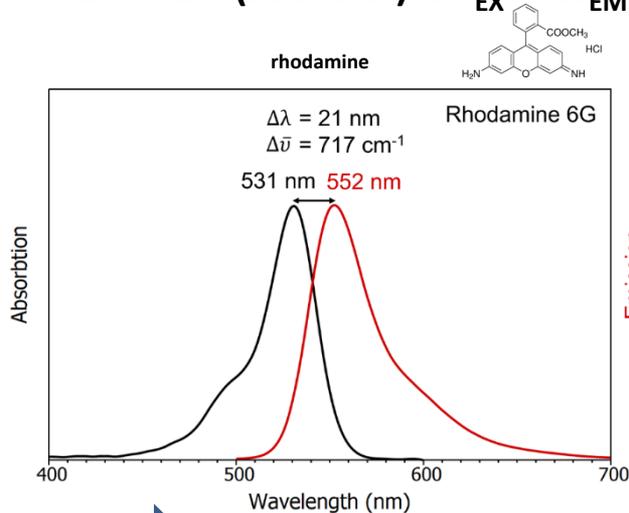


➔ EFFICIENZA

# 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 ( $h\nu_{EX}$ ,  $h\nu_{EM}$ )

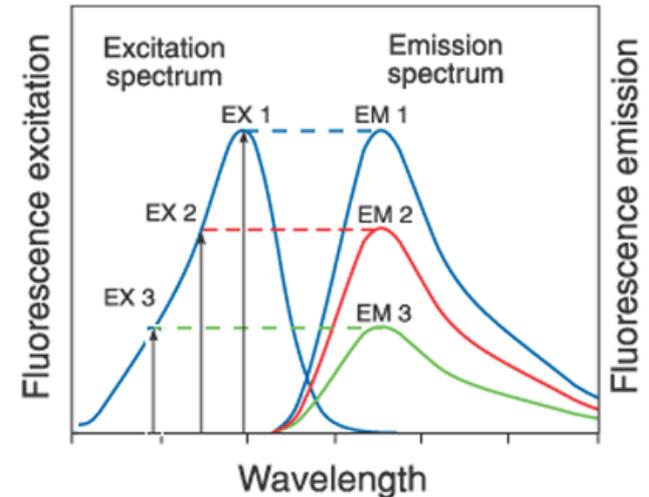
→ **spettri di energia** ampi:

**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

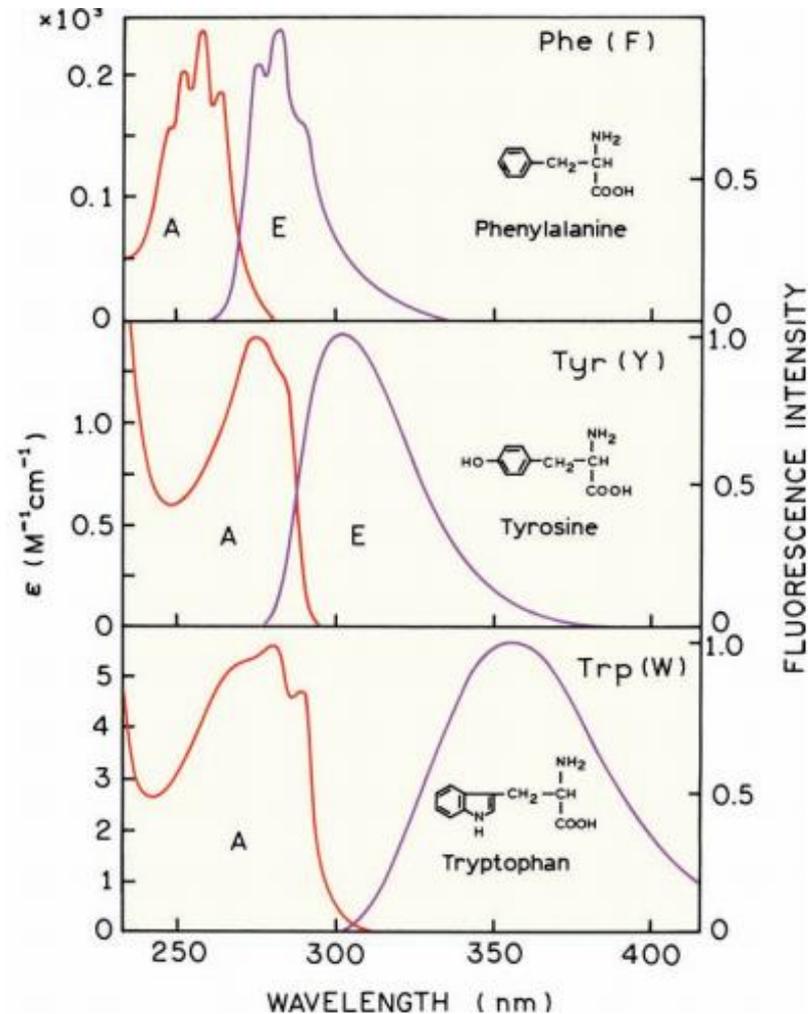
Le proteine sono le uniche biomolecole con fluorescenza intrinseca

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

	Lifetime ( $\tau$ ) (ns)	Absorption		Fluorescence	
		$\lambda$ (nm)	Absorptivity ( $\epsilon$ )	$\lambda$ (nm)	Quantum Yield ( $\Phi_F$ )
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 a

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

**$\Delta$  spettri di emissione** da transizioni conformazionali, interazione con proteine/ligandi o denaturazione.

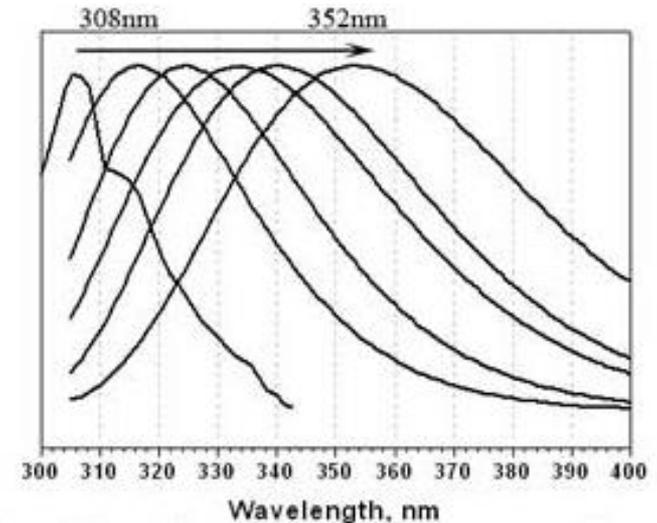
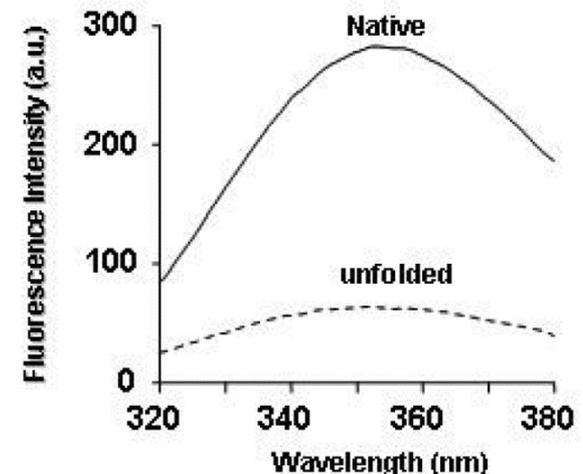


Figure 3. Examples of protein fluorescence spectra of tryptophan residues located in different environments of protein molecule.



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

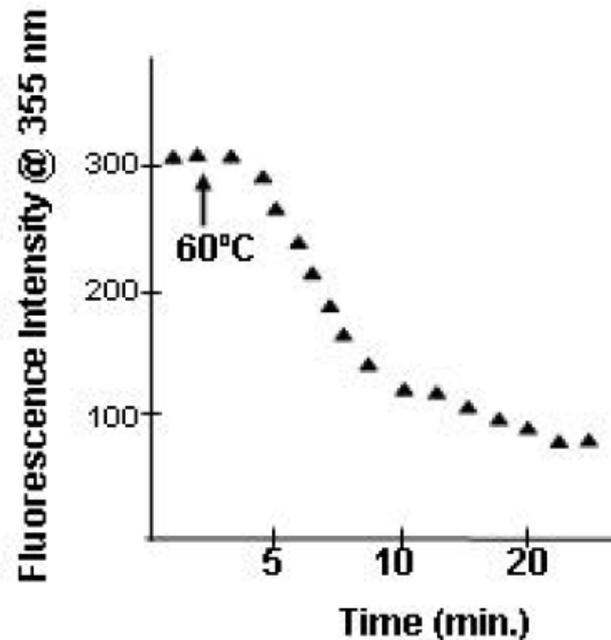
## Fluorescenza intrinseca

Descrive la denaturazione monitorando:

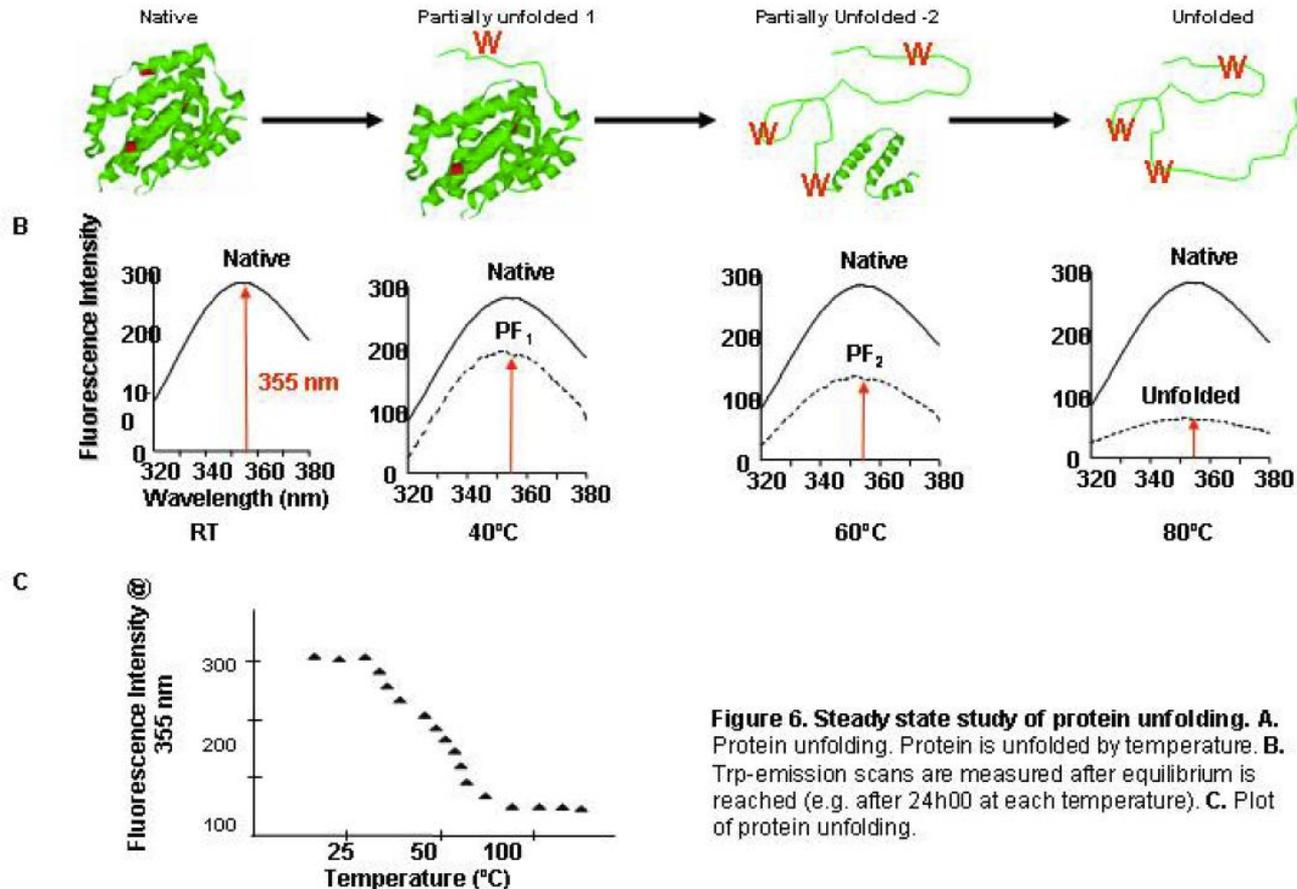
- $\Delta FI$
- $\Delta \lambda_{em}(\text{Trp})$

STABILITA' TERMICA:

A) STUDI CINETICI:



B) STUDI allo STATO STAZIONARIO:



C

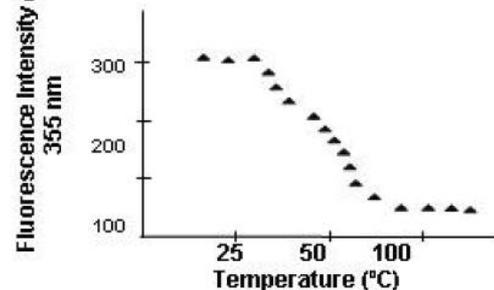
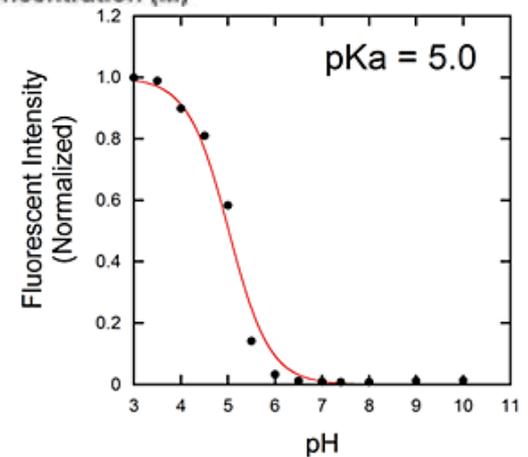
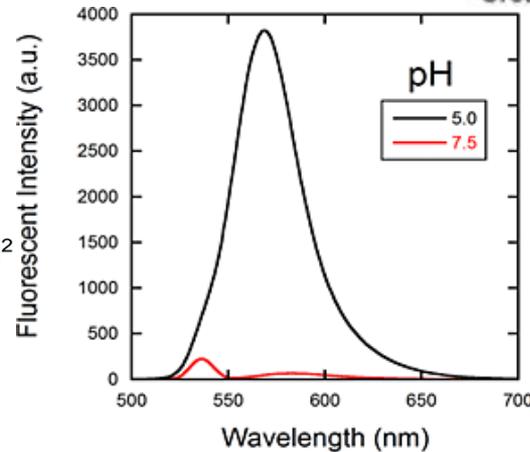
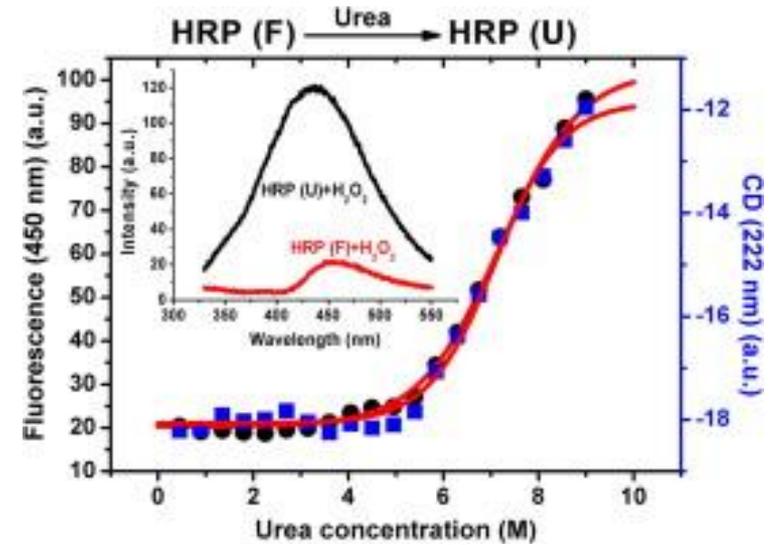
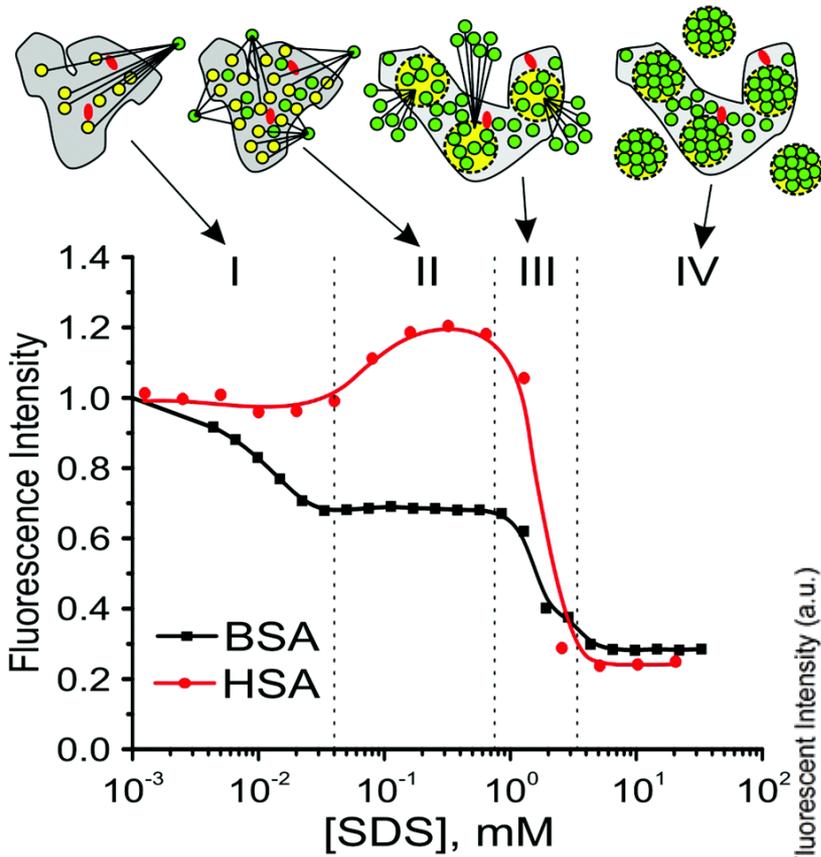


Figure 6. Steady state study of protein unfolding. A. Protein unfolding. Protein is unfolded by temperature. B. Trp-emission scans are measured after equilibrium is reached (e.g. after 24h00 at each temperature). C. Plot of protein unfolding.

# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

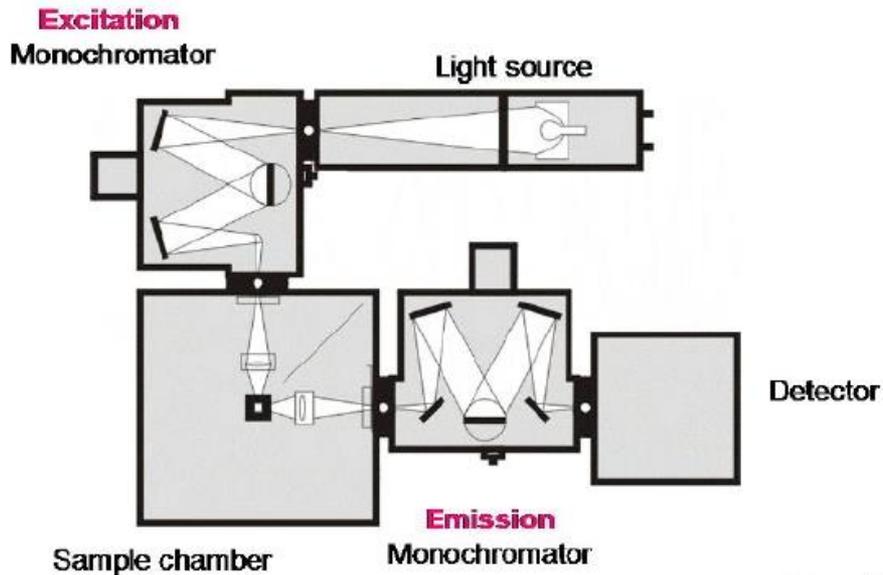
## Fluorescenza intrinseca

### STABILITA' CHIMICA/FISICA:



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## Fluorescenza intrinseca: strumentazione



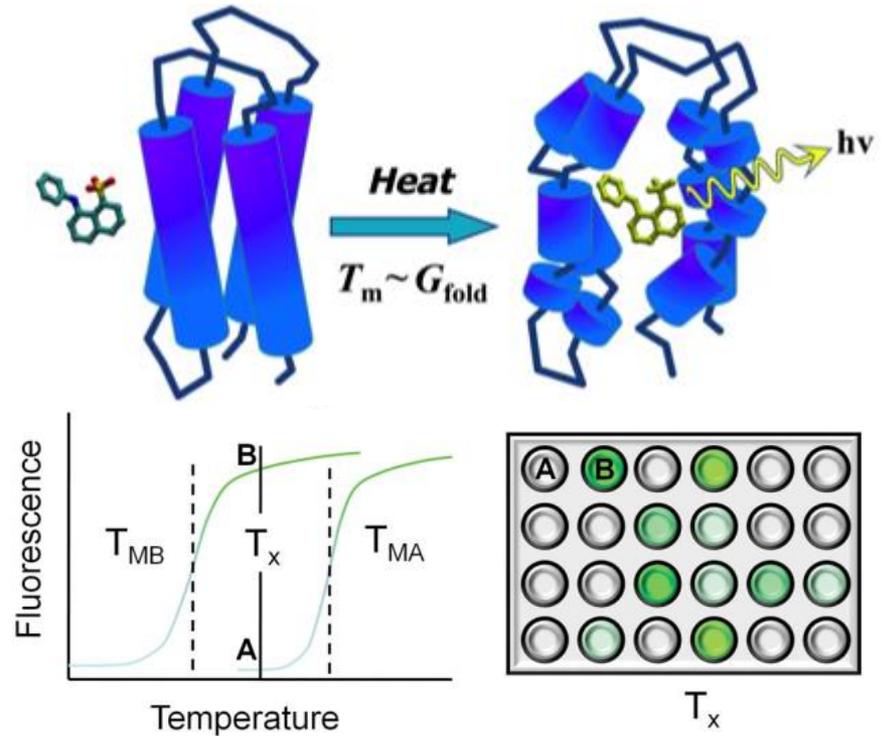
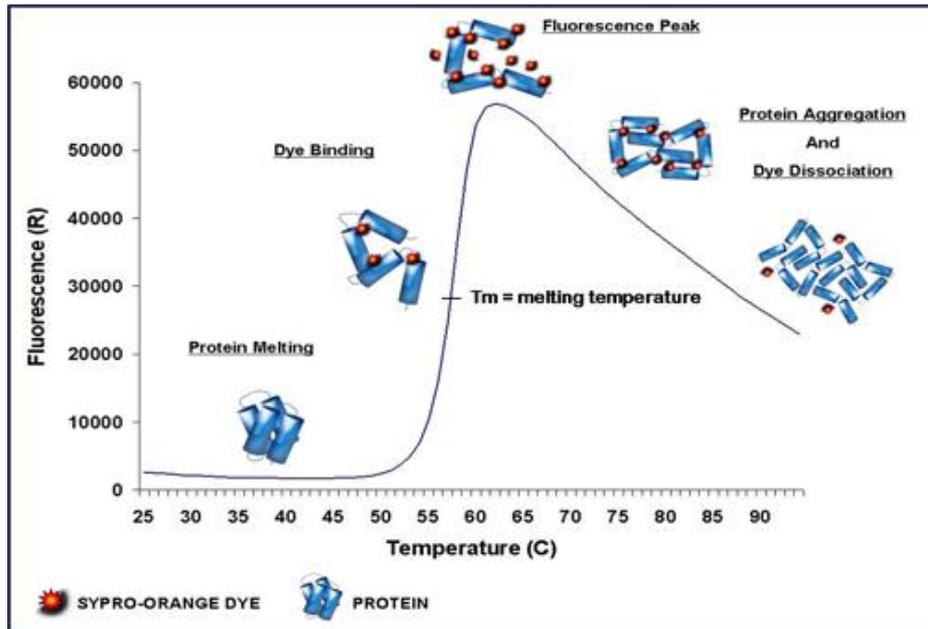
Molto sensibile  
Poco campione richiesto



AA aromatici non sempre presenti

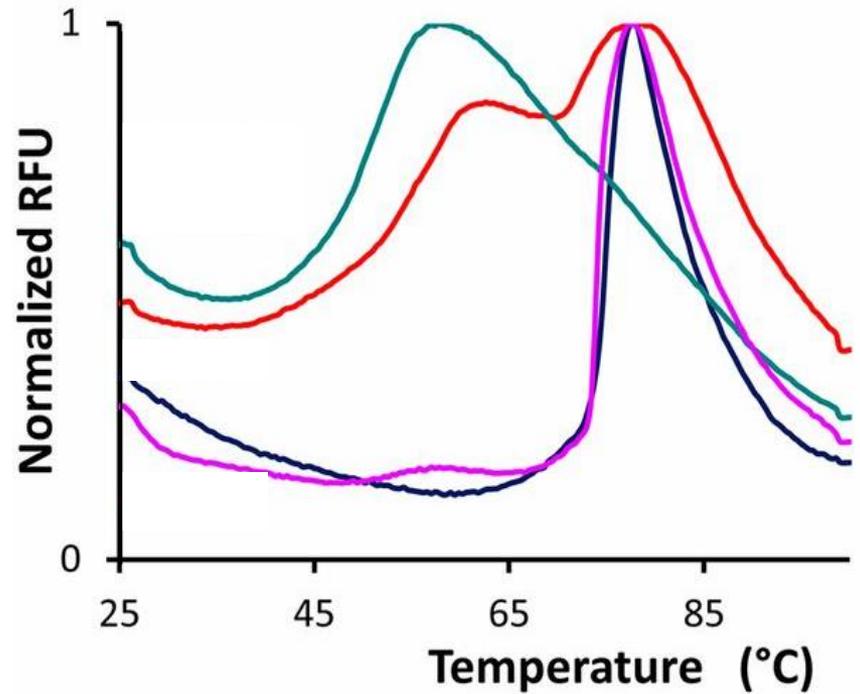
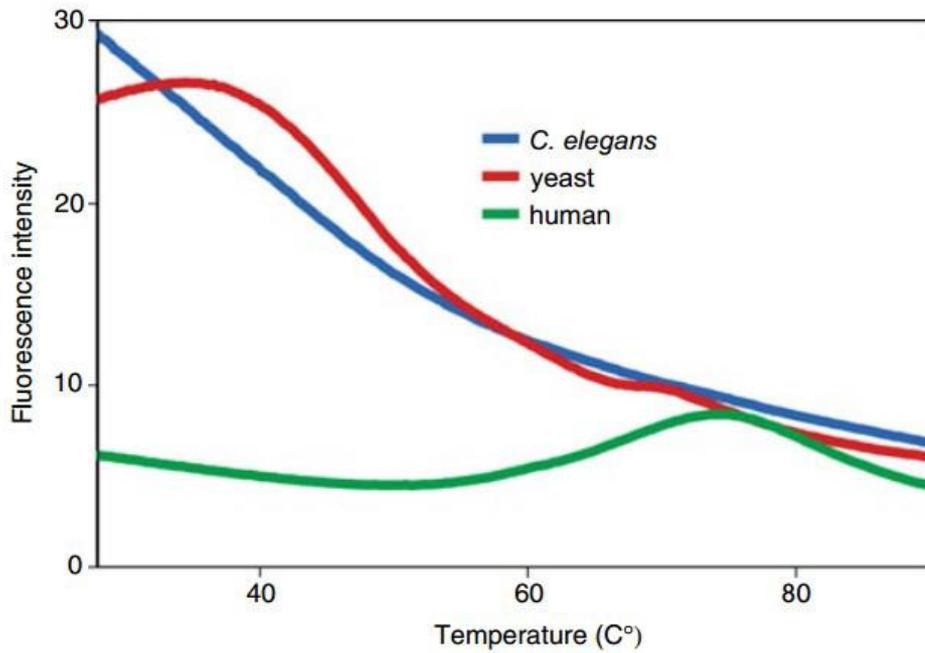
# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## DSF: basi



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

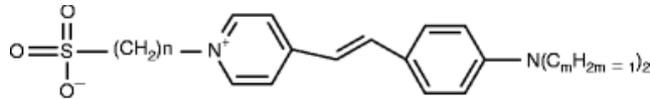
## DSF: esempi e caveat



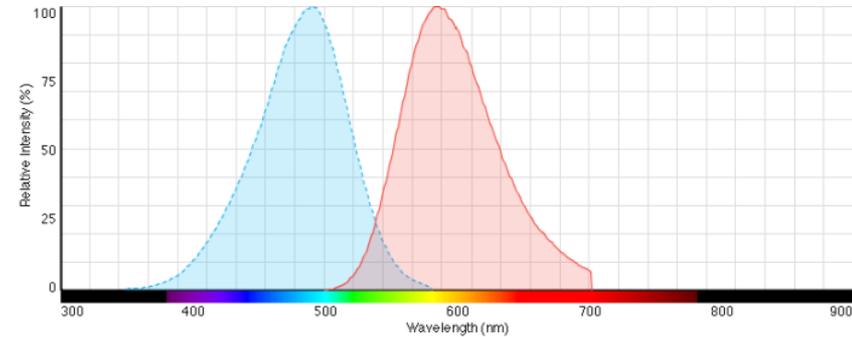
# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## DSF setup: Sonde fluorescenti

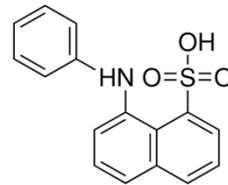
### SYPRO Orange



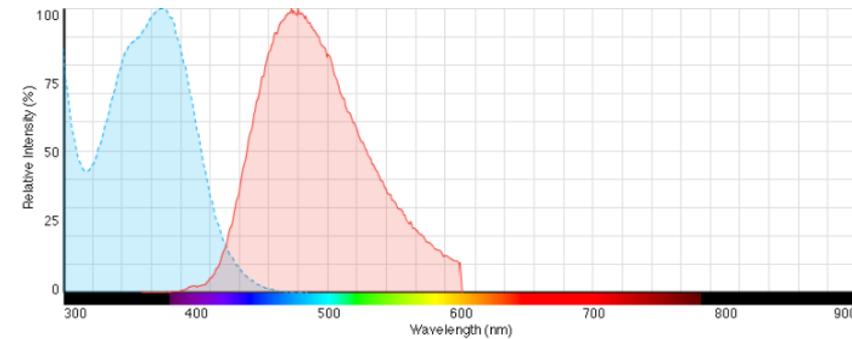
massimi eccitazione [Ex] 472 nm  
emissione [Em] 570 nm



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

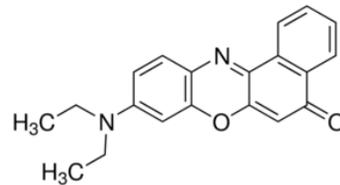


massimi eccitazione [Ex] 380 nm  
emissione [Em] 545 nm

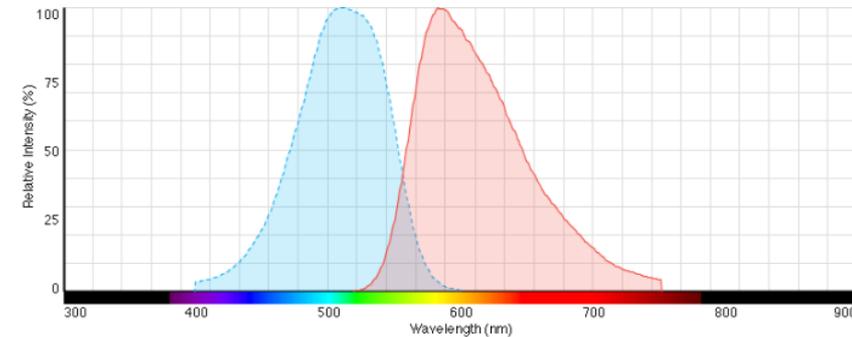


interazioni più deboli con i detergenti

### Nile red

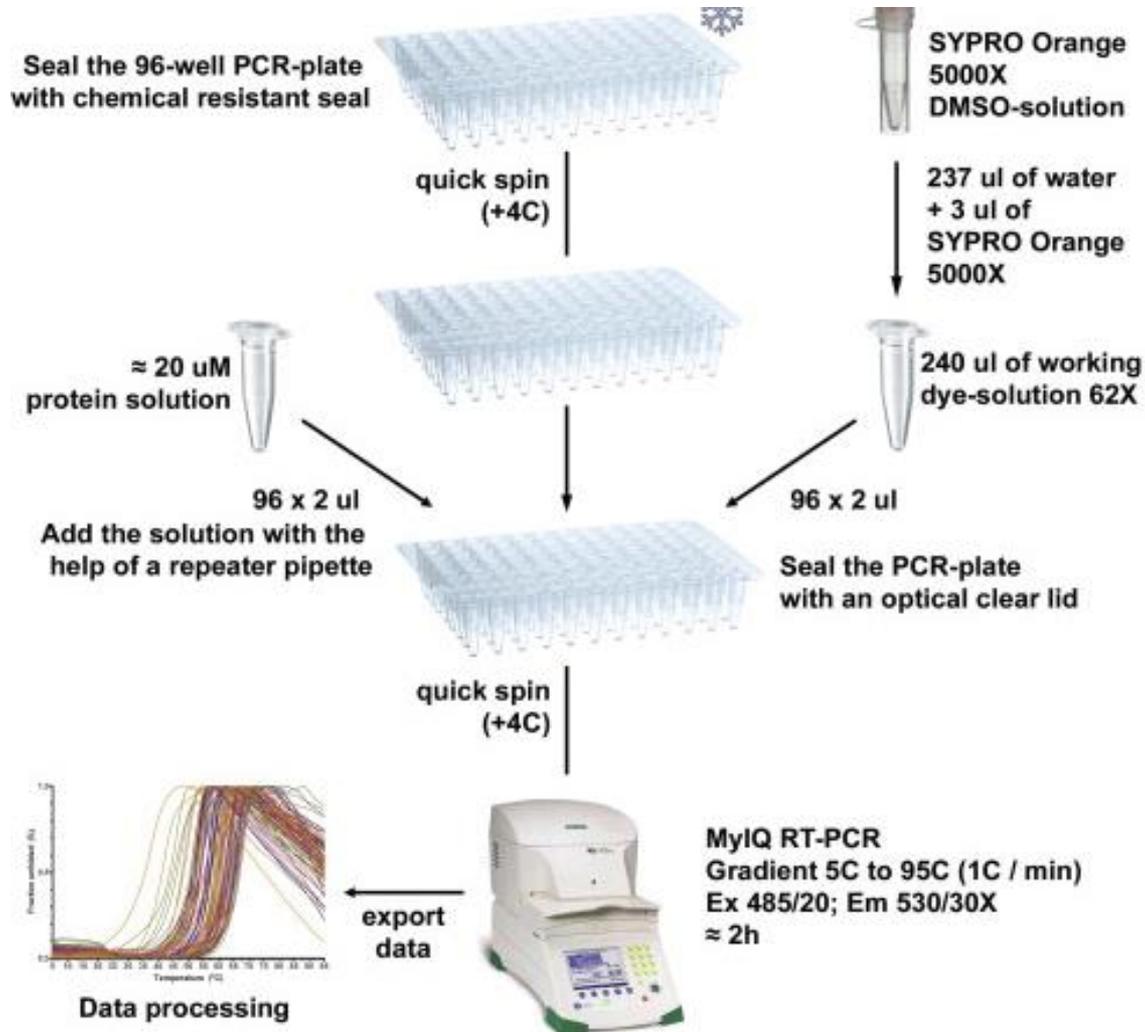


massimi eccitazione [Ex] 550 nm  
emissione [Em] 640 nm



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

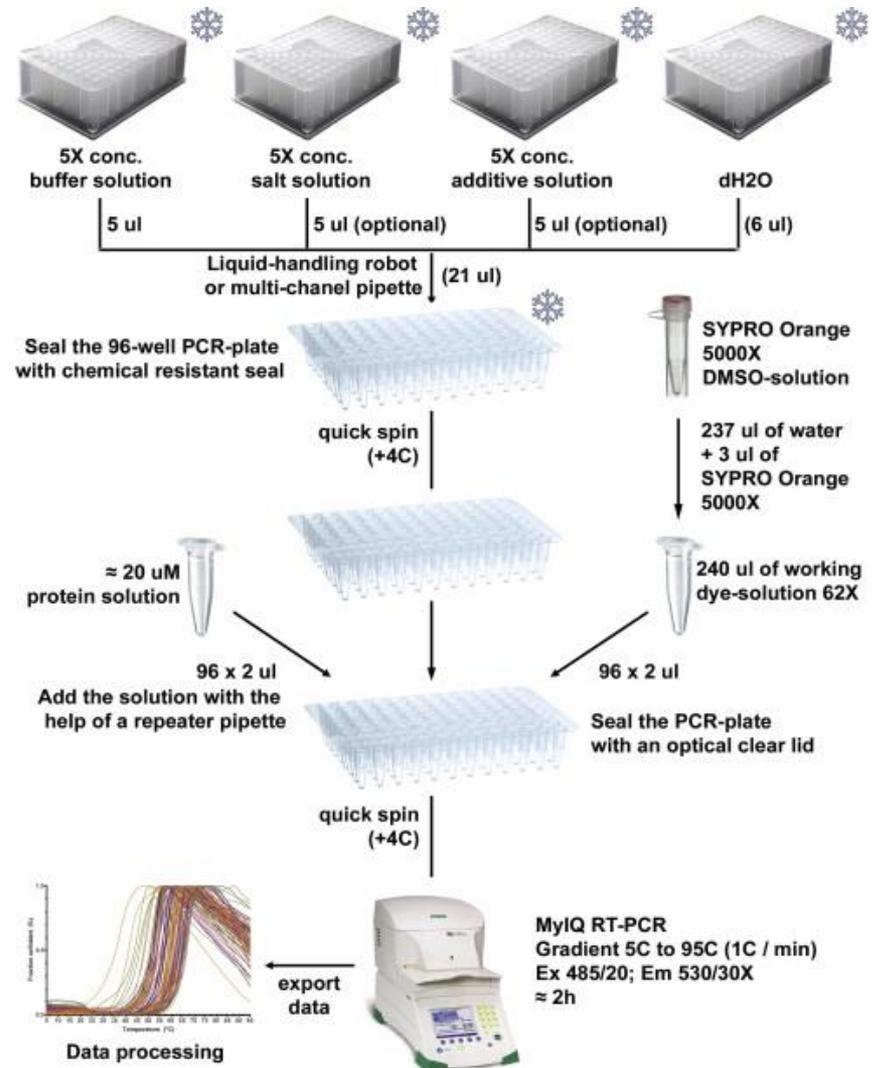
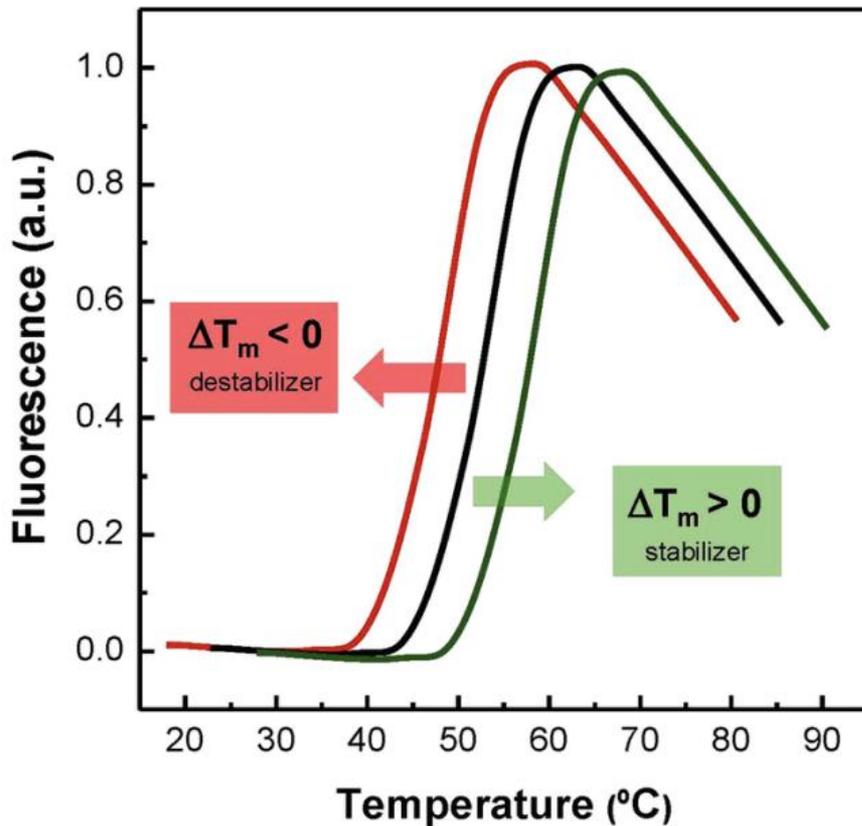
## DSF: setup



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## DSF: Applicazioni

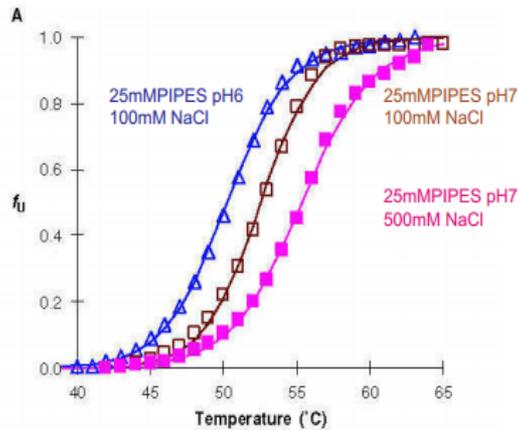
### 1) Ottimizzazione della formulazione



# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

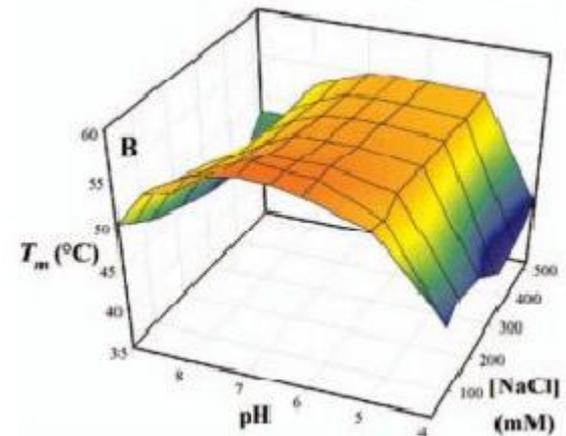
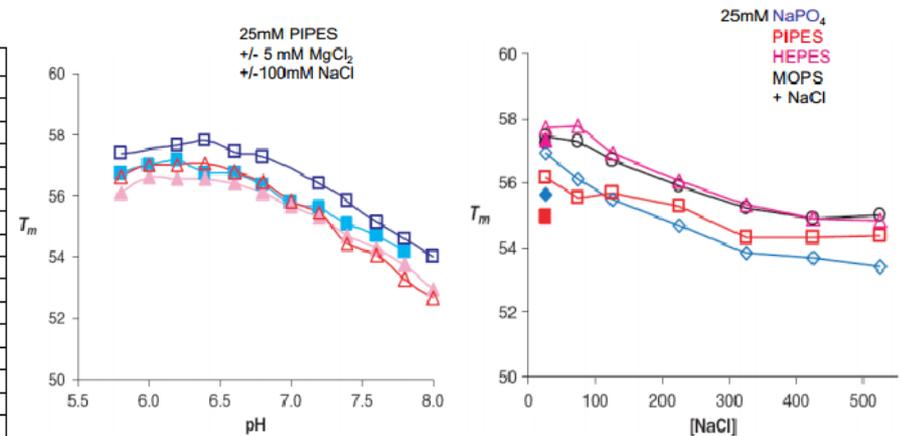
## DSF: Applicazioni

### 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

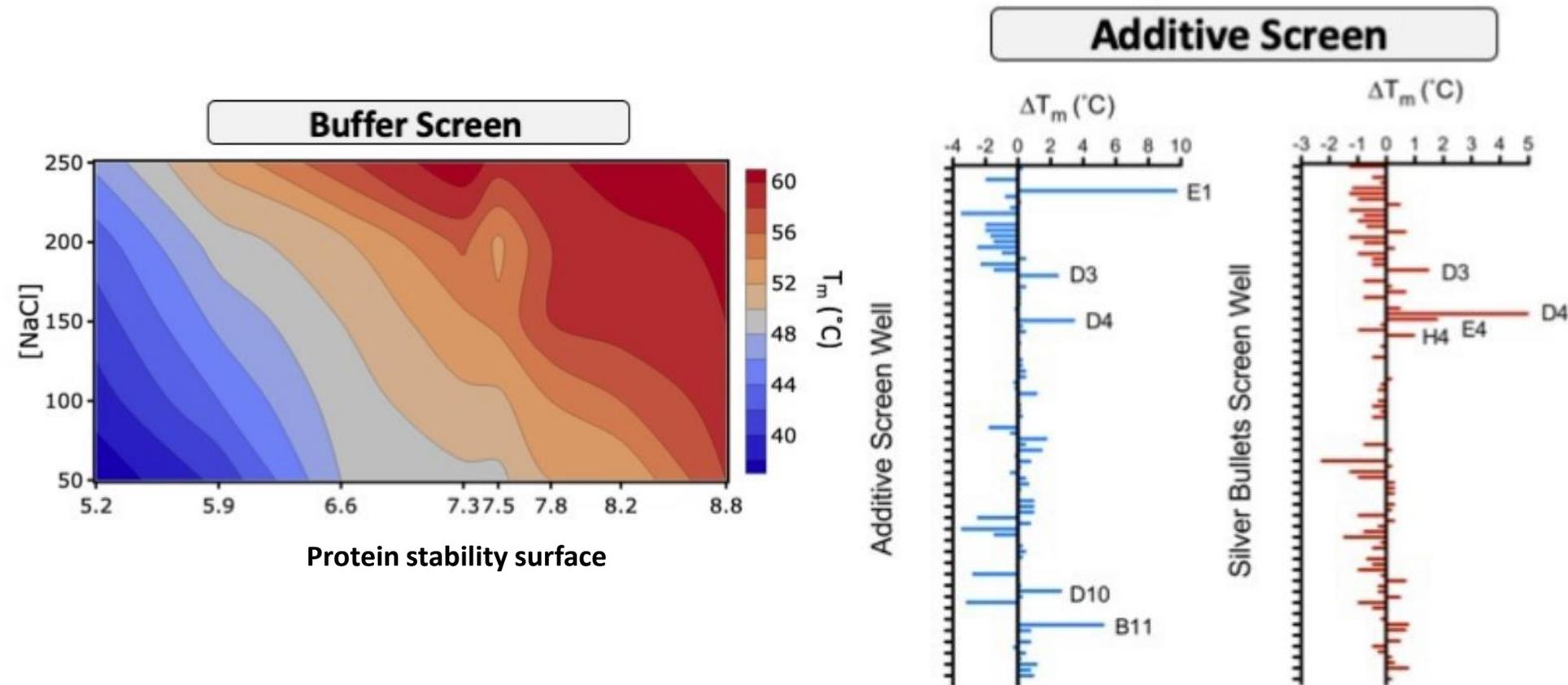


Protein stability surface

# Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

## DSF: Applicazioni

### 1) Ottimizzazione della formulazione

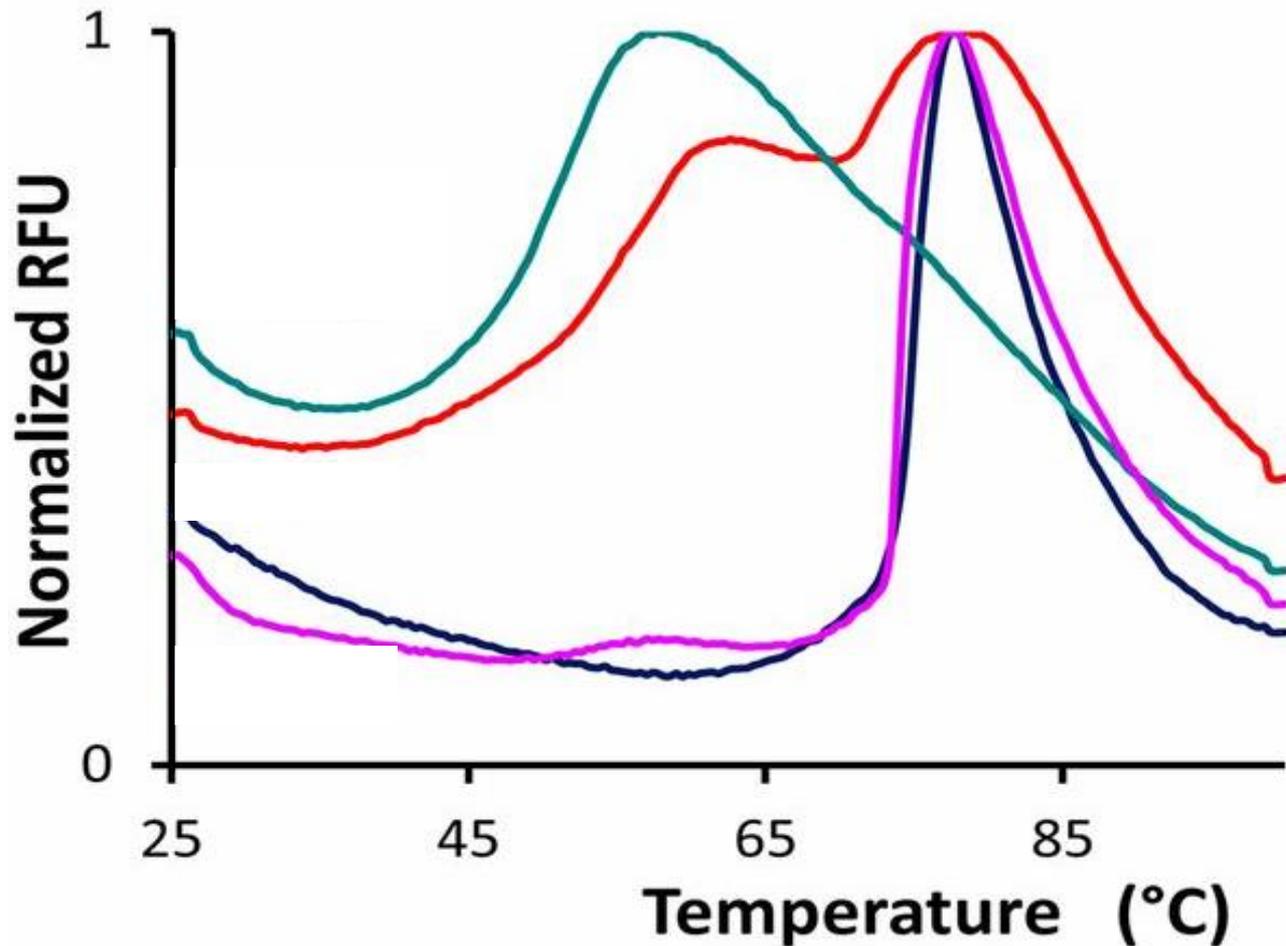


Stabilità e cambiamenti conformazionali delle proteine:

### DSF: Applicazioni

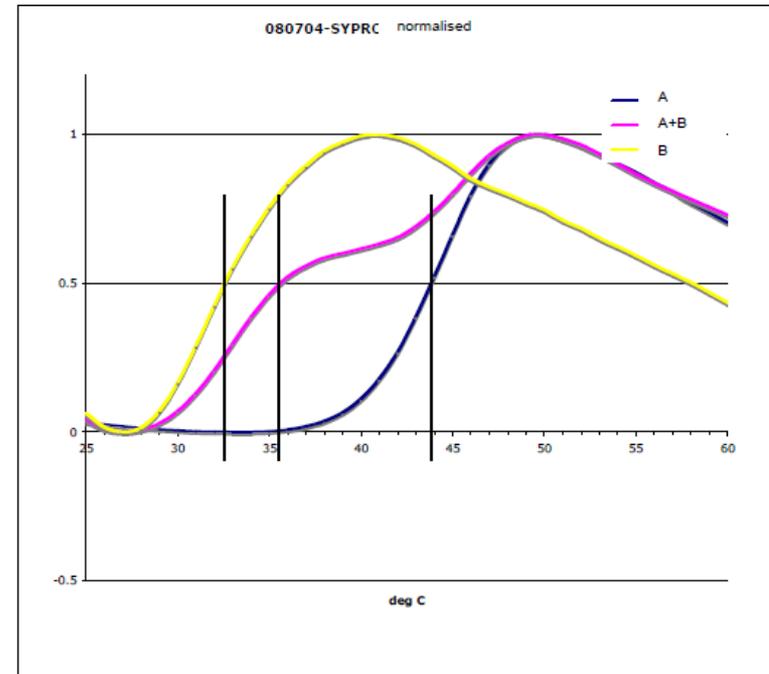
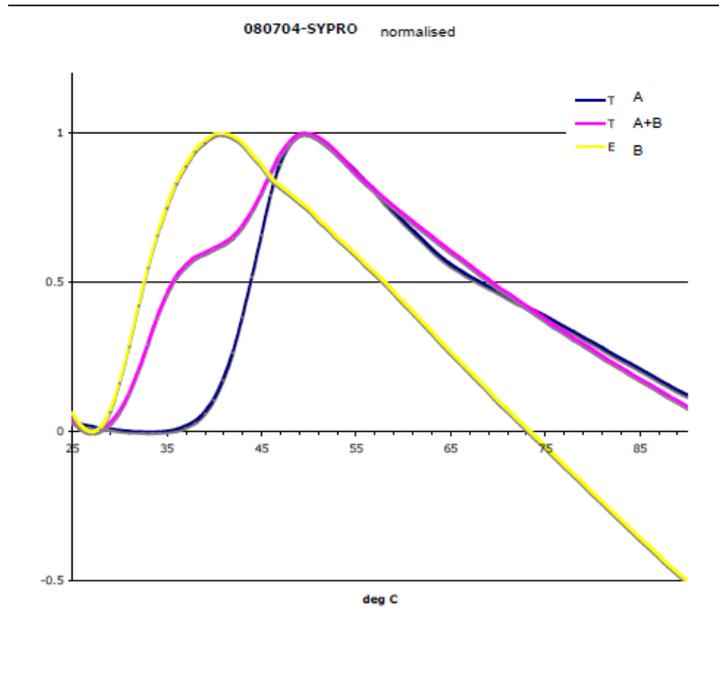
#### 2) Ottimizzazione della cristallizzazione

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

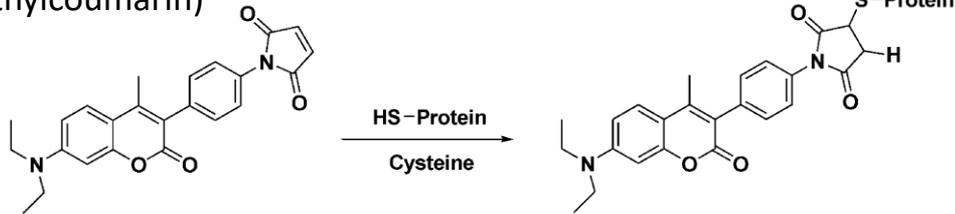


- Interferenza di composti colorati
- Risultati ambigui per proteine multi-dominio
- Poco applicabile a detergenti

# 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

