

La microcalorimetria differenziale a scansione (DSC). Applicazioni nello studio della termostabilità delle proteine

# Applicazioni della DSC allo studio di macromolecole biologiche

- Analisi dei parametri termodinamici del processo ( $\Delta H_{cal}$ ,  $\Delta H_{vH}$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ ,  $T_m$ )
- Effetto delle condizioni sperimentali (pH, forza ionica, presenza di ligandi/cofattori)
- Cinetica e reversibilità di processi temperatura-dipendenti
- Interazioni tra macromolecole

Lipidi: transizione di fase

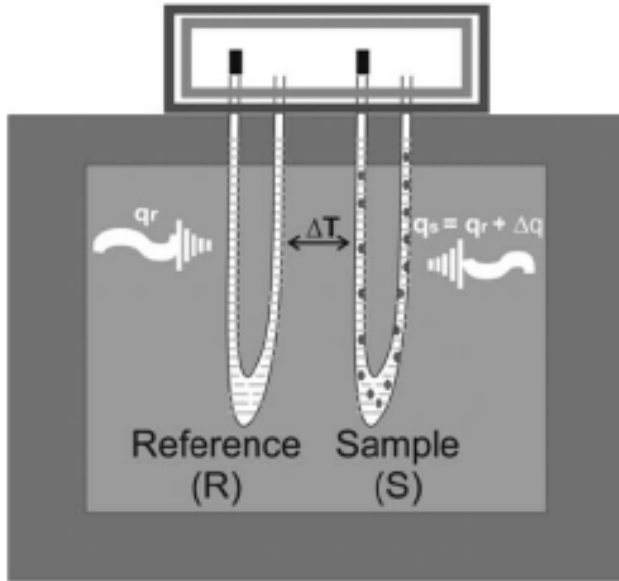
DNA/RNA: melting della doppia elica

Proteine: denaturazione

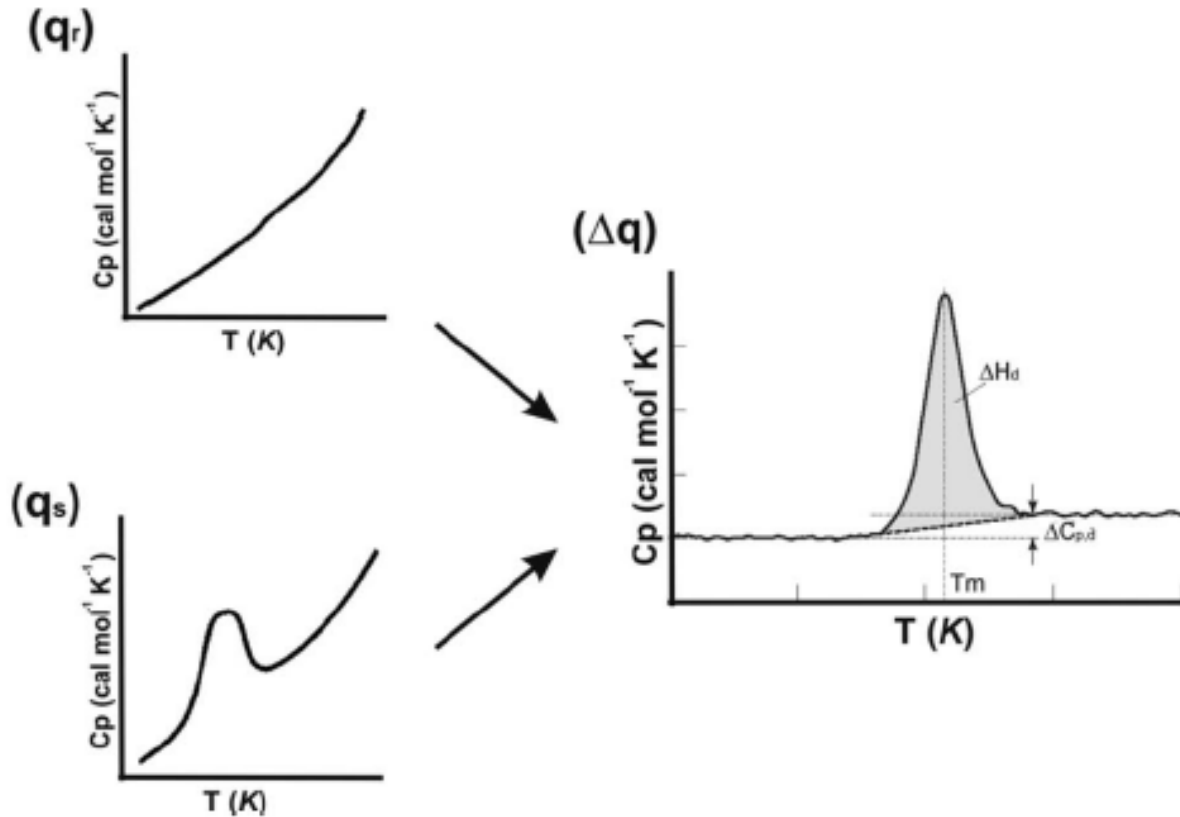
# Applicazioni della DSC allo studio delle proteine

- Effetto sui parametri termodinamici dell' unfolding di una proteina di:
  - Natura del processo di denaturazione (a due stati o multistato)
  - Presenza e interazioni tra domini o subunità
  - Condizioni sperimentali (pH, forza ionica)
  - Presenza di substrati, effettori o cofattori
  - Reazioni di oligomerizzazione e/o dissociazione
  - Interazioni proteina-proteina
  - Cinetica della denaturazione
  - Ruolo di specifici residui amminoacidici

## Schema del calorimetro



## Curva calorimettrica



Curva calorimettrica di una proteina che subisce denaturazione termica: variazione del calore specifico ( $C_p$ ) del campione in funzione della temperatura ( $T$ ).  $\Delta C_p$  è la differenza di calore specifico pre- e post-transizione in corrispondenza di  $T_{1/2}$ .

$\Delta H$  è l'area del picco e corrisponde all'entalpia della transizione.

# Parametri sperimentali che si ottengono dalle curve DSC

- $T_m$  indice della stabilità termica di una proteina
- $\Delta C_p$  indice della compattezza della struttura di una proteina, rapporti S/V  
contributo delle interazioni idrofobiche
- $\Delta H_{cal}$  caratteristica strutturale di una proteina, che dipende soprattutto dal contributo dei legami H (ed in minor misura dalle altre interazioni deboli).
- Il  $\Delta H_{cal}$  aumenta all'aumentare della T di denaturazione fino a raggiungere un valore di circa 13 cal/g a 110° C per numerose proteine globulari →  
l'intensità dell'endoterma è proporzionale alla massa della proteina (o del dominio).

# Dipendenza dalla temperatura dell'entalpia ( $\Delta H$ ) di unfolding

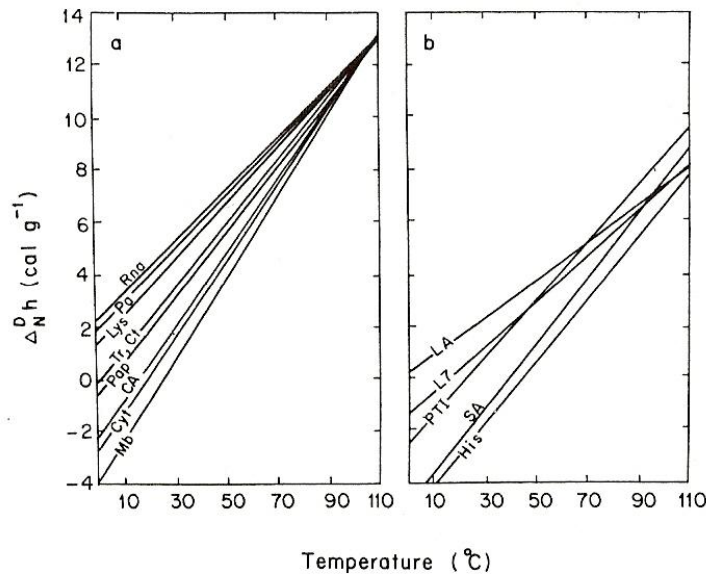


FIG. 24. Temperature dependence of specific enthalpies of unfolding  $\Delta N_h(T)$  for proteins. (a) Ribonuclease A (Rna), parvalbumin (Pa), lysozyme (Lys),  $\alpha$ -chymotrypsin (Ct),  $\beta$ -trypsin (Tr), cytochrome c (Cyt), carbonic anhydrase B (CA), metmyoglobin (Mb), and papain (Pa). (b) Serum albumin (SA), histone H1 (His), ribosomal protein L7, pancreatic trypsin inhibitor (PTI). For references, see legend to Fig. 10.

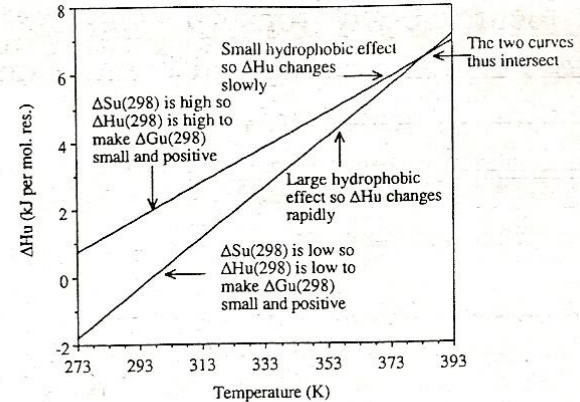


FIGURE 5: Why proteins show common values of  $\Delta H_u$  around 383 K.

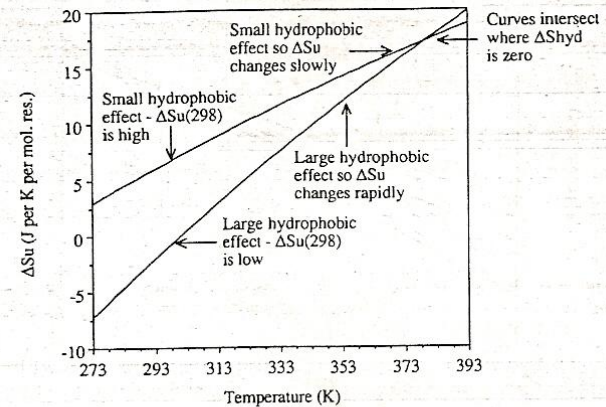


FIGURE 4: Why proteins show common values of  $\Delta S_u$  around 383 K.

# Analisi DSC di proteine globulari in funzione del pH

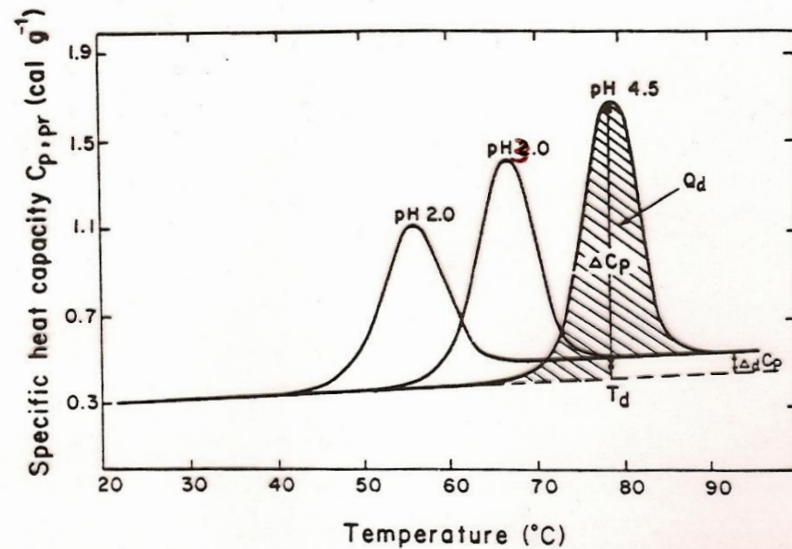


FIG. 4. Temperature dependence of partial specific heat capacity of lysozyme in solution at different pH values. From unpublished results in the author's laboratory.

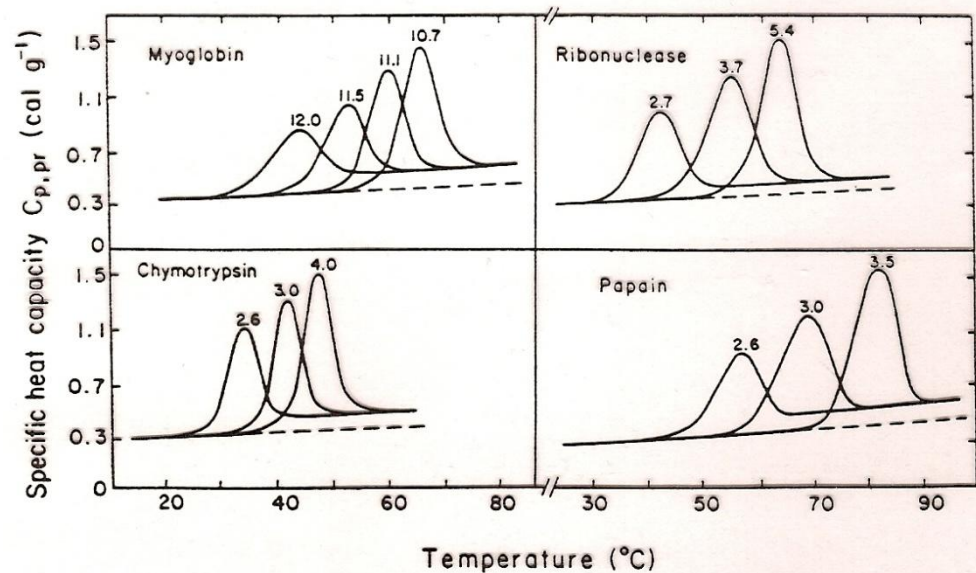


FIG. 5. Temperature dependence of partial specific heat capacity of four proteins at different pH values. Data for papain from Tiktopulo and Privalov (1978); for the other proteins from Privalov and Khechinashvili (1974a).

# Analisi termodinamica delle curve DSC

L'area della curva calorimetrica di capacità termica ( $C_p$ ) in funzione della temperatura corrisponde all'entalpia della transizione tra lo stato nativo e lo stato denaturato.

$$\Delta H_{cal} = \int_{T_b}^{T_e} C_p dT \quad \text{cal/g} \rightarrow xM_r \text{ cal/mole}$$

se stiamo osservando un equilibrio tra lo stato nativo e lo stato denaturato:

$$N \leftrightarrow D \quad \frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2}$$

è possibile definire un'entalpia di Van't Hoff ( $\Delta H_{vH}$ ) per la transizione, che è in relazione con l'entalpia calorimetrica ( $\Delta H_{cal}$ ) attraverso l'equazione:

$$\Delta H_{vH} = ART^2 \frac{C_p(T_m)}{\Delta h_{cal}}$$



# Analisi delle curve DSC

$A = 4$  per transizioni a due stati ( $N \leftrightarrow D$ )

$$\Delta H_{\text{cal}} = \Delta H_{\text{vH}}$$

transizioni a due stati

$$\Delta H_{\text{cal}} > \Delta H_{\text{vH}}$$

esistono stati intermedi  
(cooperatività intramolecolare)

$$\Delta H_{\text{cal}} < \Delta H_{\text{vH}}$$

cooperatività intermolecolare

Parametri termodinamici

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

all'equilibrio  $\Delta G = 0$

$$\Delta S_D = \frac{\Delta H_D}{T_D}$$

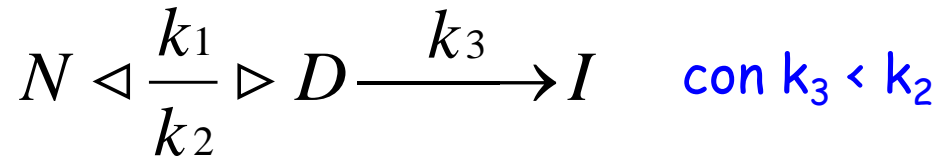
a  $T_D$   $[D] = [N]$

$$T_D = T_{\frac{1}{2}} \sim T_m$$

# Analisi delle curve DSC

L'analisi termodinamica è applicabile se la transizione è reversibile.

Transizioni irreversibili sono analizzabili solo se



Sperimentalmente  $T_m$  e forma della curva non dipendono dalla velocità di scansione (la denaturazione non è sotto controllo cinetico) e dalla concentrazione della proteina (non cambia lo stato di 'aggregazione' della proteina).

# Analisi termodinamica di curve DSC complesse con $\Delta H_{cal} > \Delta H_{vH}$

- Deconvoluzione in transizioni a due stati ( $\Delta H_{cal} = \Delta H_{vH}$ )
  - possibilità di attribuire ciascuna transizione a due stati alla denaturazione di un dominio della proteina
  - possibilità di valutare l'influenza di diversi fattori (es. pH, presenza di cofattori, effetto di sostituzioni aminoacidiche) sulla stabilità della proteina (o di un singolo dominio)

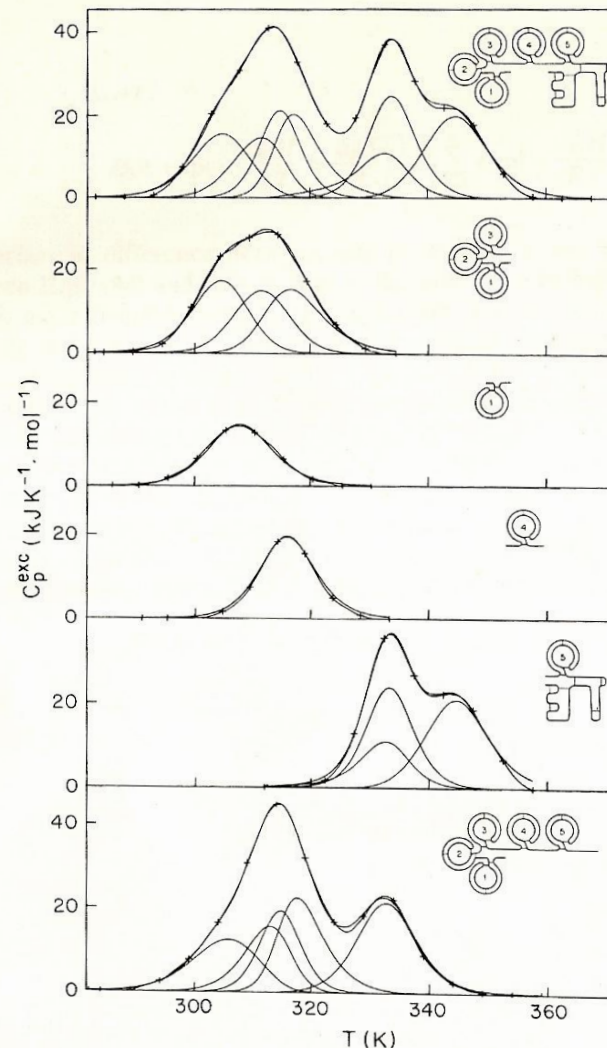
## Equazione di Gibbs-Helmholtz

$$\Delta G = \Delta H_{cal} [1 - (T/T_m)] - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T/T_m)]$$

# DSC plasminogeno

Il plasminogeno è il precursore della plasmina, una proteasi che scinde i coaguli di fibrina. La struttura multidominio del Lys79-plasminogeno (790 aa) è stata studiata utilizzando DSC e proteolisi limitata. È possibile assegnare le transizioni a due stati ai diversi domini della proteina

50 mM glicina pH 3.4



79-353

79-161

354-439

442-790

79-560

FIG. 11. Deconvolution of the excess heat capacity functions of Lys-plasminogen and its various proteolytic fragments which are given schematically in the upper right-hand corner of each panel (see for details Novokhatny *et al.*<sup>24</sup>).

# Ruolo dei metalli nella stabilità delle proteine: stabilità termica dell'azzurina

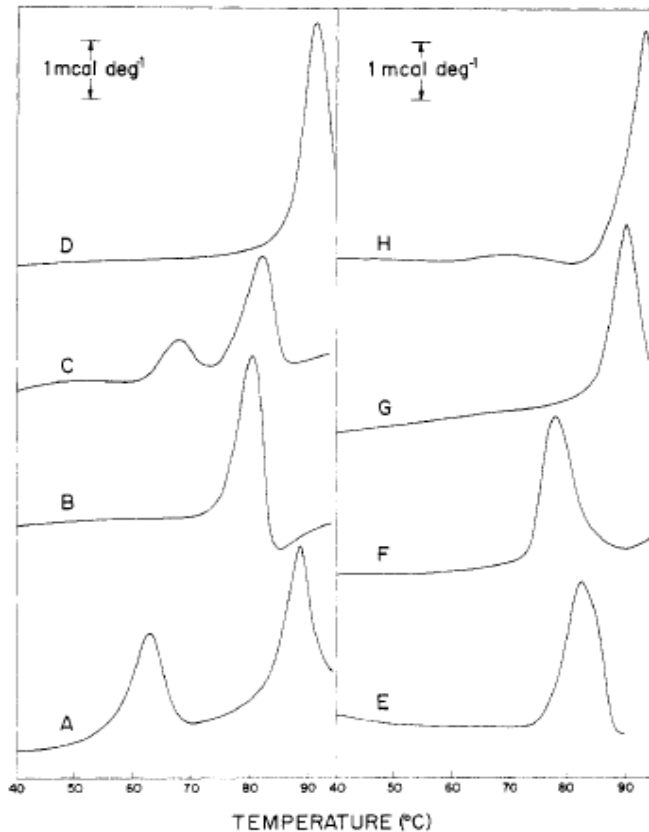


FIGURE 1: Calorimetric scans of azurin and azurin derivatives in 0.02 M pH 8 phosphate. (A) 3.06 mg mL<sup>-1</sup> apoazurin; (B) 0.75 mg mL<sup>-1</sup> Cu<sup>II</sup>Az; (C) 1.48 mg mL<sup>-1</sup> Ni<sup>II</sup>Az; (D) 1.00 mg mL<sup>-1</sup> Hg<sup>II</sup>Az; (E) 0.93 mg mL<sup>-1</sup> Co<sup>II</sup>Az; (F) 1.28 mg mL<sup>-1</sup> Ag<sup>I</sup>Az; (G) 1.40 mg mL<sup>-1</sup> Zn<sup>II</sup>Az; (H) 0.86 mg mL<sup>-1</sup> Cd<sup>II</sup>Az.



Table I: Calorimetric Data for Azurin and Azurin Derivatives<sup>a</sup>

sample	$\Delta H_d$ (cal g <sup>-1</sup> )	$T_m$ (°C)
apoazurin	4 (1)	62 (2) <sup>b</sup>
	6 (1)	86 (2) <sup>b</sup>
Cu <sup>II</sup> Az	>21	80 (2)
Co <sup>II</sup> Az	21 (2)	82 (2)
Ni <sup>II</sup> Az <sup>c</sup>	6 (1)	75 (2)
	10 (1)	90 (2)
Ni <sup>II</sup> Az <sup>d</sup>	3 (1)	68 (2)
	7 (1)	82 (2)
Zn <sup>II</sup> Az	12 (2)	90 (2)
Ag <sup>I</sup> Az	13 (2)	78 (2)
Hg <sup>II</sup> Az	23 (2)	91 (2)
Cd <sup>II</sup> Az	24 (3)	93 (2)

<sup>a</sup>Uncertainties in the estimated values are given in parentheses. <sup>b</sup>Average of nine trials. <sup>c</sup>Contains 1 equiv of excess Ni(II). <sup>d</sup>No excess Ni(II) added.

# Perché la denaturazione di una proteina è irreversibile?

- Aggregazione
- Perdita del coenzima o del cofattore dal sito attivo
- Dissociazione di proteine oligomeriche in monomeri
- Cambiamenti nella struttura primaria
  - Ossidazione di Cys, Met e Trp
  - Riduzione di ponti disolfuro
  - Modificazione di gruppi -SH da parte di metalli
  - Idrolisi di legami peptidici a basso pH in corrispondenza di residui di Asp
  - Deammidazione di Asn e Gln

# DSC Cu,Zn superossido dismutasi (SOD)

La Cu,ZnSOD è una proteina dimerica che fa parte dei meccanismi cellulari di difesa contro lo stress ossidativo. L'enzima catalizza la reazione di dismutazione del superossido ( $O_2^-$ ) ad ossigeno ( $O_2$ ) ed acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ).

La Cu,ZnSOD è altamente termostabile ( $T_m$  superiore a  $80^\circ C$ ) però la sua denaturazione è irreversibile.

Identificazione di residui amminoacidici responsabili dell'irreversibilità della denaturazione.

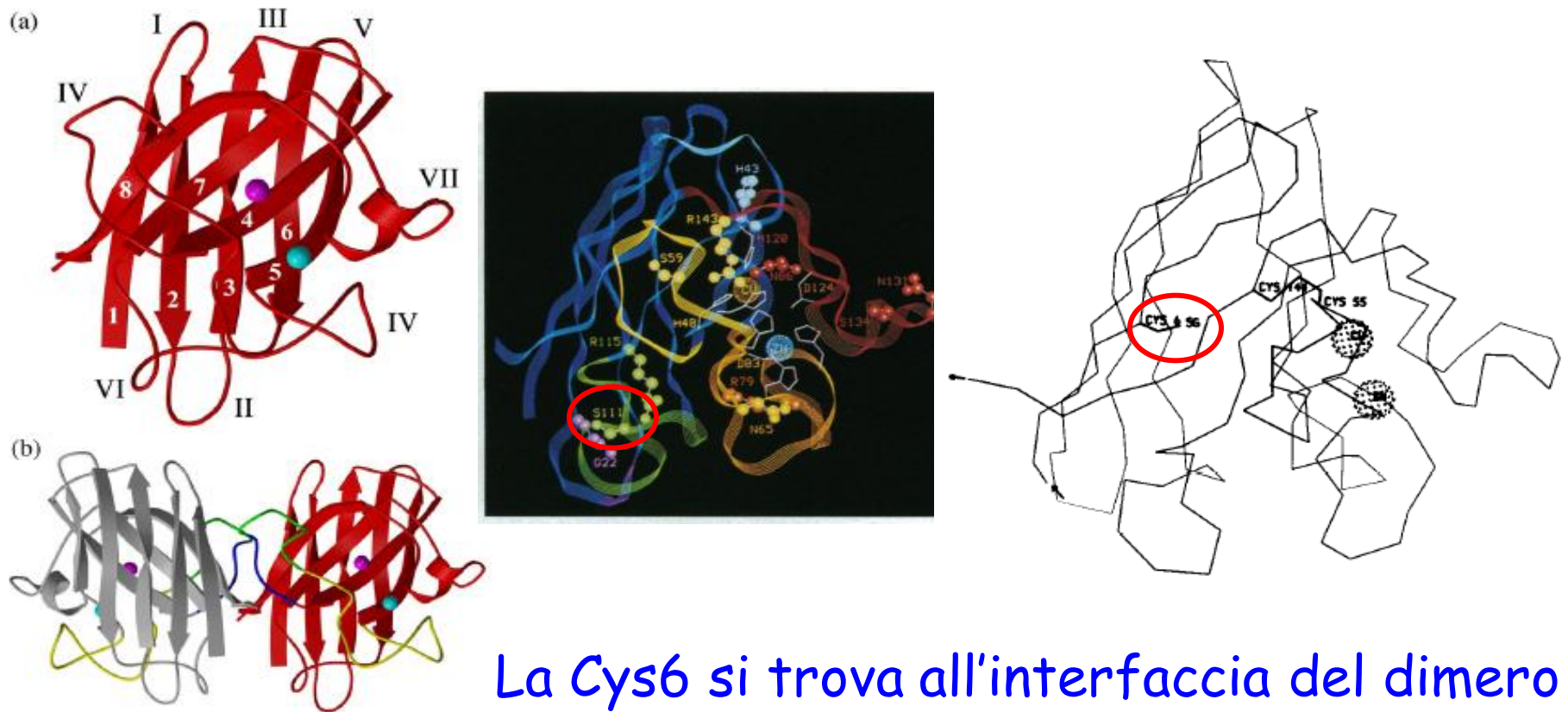
Residui di cisteina liberi Cu,ZnSOD bovina **Cys6**

Cu,ZnSOD umana **Cys6** e **Cys111**

Mutagenesi sito-specifica e analisi DSC

- valutazione termostabilità globale ( $T_m$ )
- valutazione reversibilità (scaldamento parziale e analisi  $\Delta H_{cal}$  residuo)

# Struttura della Cu,Zn superossido dismutasi (SOD)





# DSC Cu,Zn superossido dismutasi (SOD) bovina

La mutazione Cys6Ala destabilizza leggermente la proteina: la  $T_m$  è più bassa

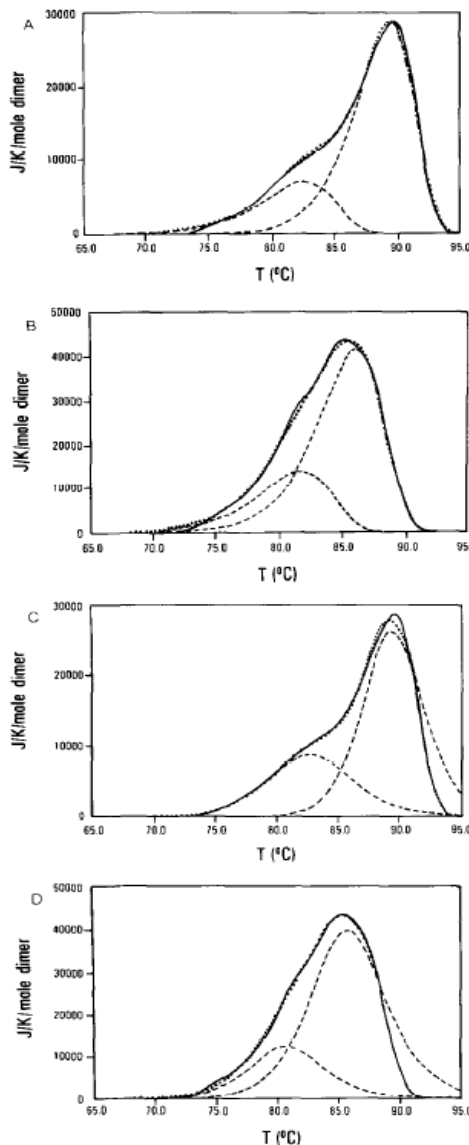


FIG. 2. The biphasic DSC profiles of thermal denaturation modelled as irreversible (A and B) and reversible (C and D) unfolding for wild-type and mutant Cys<sup>6</sup> → Ala enzymes. In each profile, the two component peaks (dashed lines) were obtained by deconvolution and summed (dotted line) to model the experimental excess specific heat measurements (solid line). Denaturation results are shown for: A, wild-type enzyme modeled irreversibly; B, the Cys<sup>6</sup> → Ala mutant modeled irreversibly; C, wild-type enzyme modeled reversibly; and D, the Cys<sup>6</sup> → Ala mutant modeled reversibly. For the two-component reversible denaturation model, the high temperature tail of each peak (beyond the peak half-height on the downslope) was excluded from the fitting. Thus, in the reversible denaturation model, the DSC data was included to 91.6 °C for wild-type enzyme and to 88.5 °C for the Cys<sup>6</sup> → Ala mutant.

TABLE I

*Thermodynamic parameters for the reversible unfolding of BSOD*

Enzyme	Component	$T_m$ °C	$\Delta H^\circ$ kcal/mol	$\Delta S^\circ$ cal/K/mol	$\Delta G^{\circ,0}$ kcal/mol
Wild-type	Minor	82.8	113	318	0.0
Wild-type	Major	89.5	161	445	0.0
Cys <sup>6</sup> → Ala	Minor	80.7	123	349	-0.75
Cys <sup>6</sup> → Ala	Major	85.8	124	347	-1.3

<sup>a</sup>  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ , and  $\Delta G$  values are given per mol of dimer.

<sup>b</sup>  $\Delta G$  values are evaluated at the appropriate  $T_m$  for wild-type BSOD.

# DSC Cu,Zn superossido dismutasi (SOD) umana

Denaturazione irreversibile descritta dalla relazione  $N \rightarrow D$  con una costante cinetica che segue l'equazione di Arrhenius.

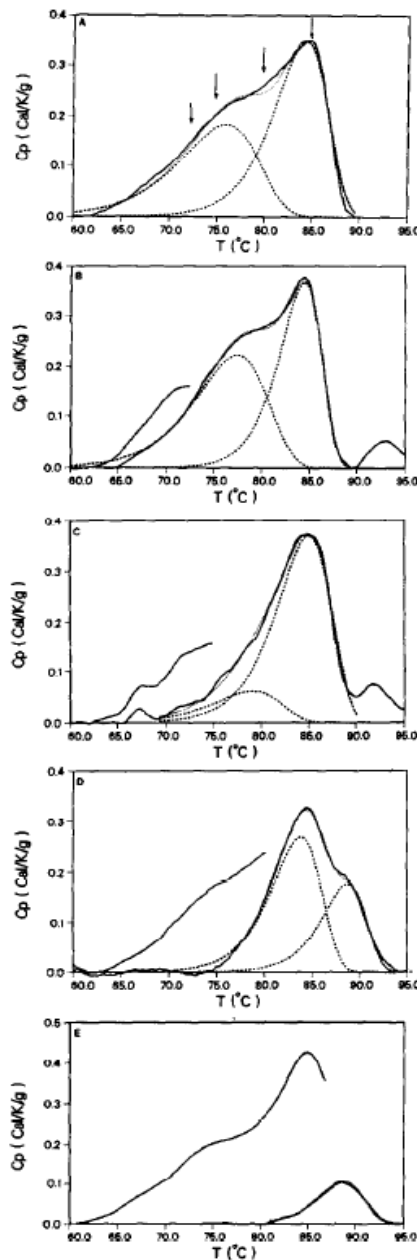


FIG. 2. DSC profiles of HSOD-WT (*panel A*) and the HSOD-WT heated to 72.5 °C (*panel B*), 75 °C (*panel C*), 80 °C (*panel D*), and 85 °C (*panel E*). Both the initial scan to these temperatures and the rescan obtained after cooling to 25 °C are shown (solid lines). The arrows in *panel A* mark the maximum temperatures reached during the initial scans. The dotted line is the best two component fit and the broken lines are the individual components for each scan.

$$\frac{df_D(t)}{dt} = k(T)[1 - f_D(t)]$$

$$k(T) = e^{A - EA/RT}$$

$$T(t) = T_0 + vt$$

$$\frac{df_D[T(t)]}{dt} = e^{A - EA/R(T_0 + vt)} (1 - f_D[T(t)])$$

$$C_p(T) = \Delta H_{cal} \left( \frac{df_D}{dT} \right)$$

# Analisi DSC dei mutanti Cys della Cu,ZnSOD umana

C6S111

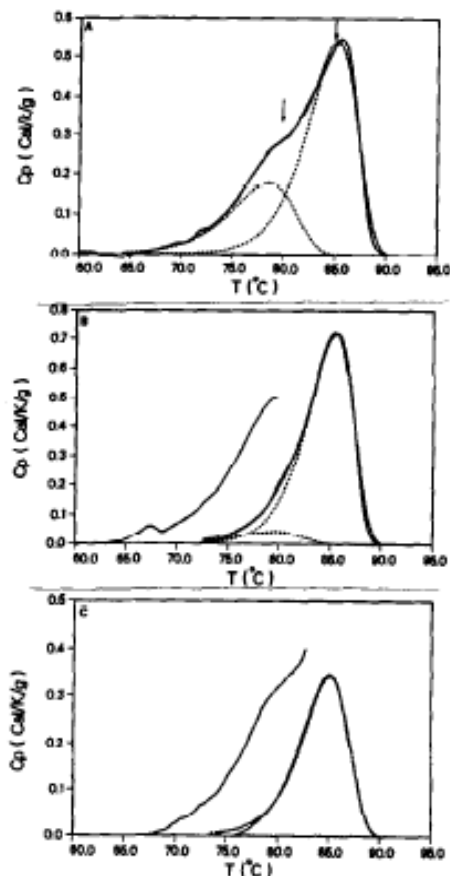


FIG. 3. DSC profiles of HSOD-C6S111 (*panel A*) and the HSOD-C6S111 heated to 80 °C (*panel B*) and 83 °C (*panel C*). Both the initial scan to these temperatures and the rescan obtained after cooling to 25 °C are shown (*solid lines*). The *arrows* mark the maximum temperatures reached during the initial scans. The *dotted line* is the best two component fit and the *broken lines* are the individual components. The fraction of component 1 in *panel c* is less than 0.001 and the curve for this component falls on the temperature axis.

A6C111

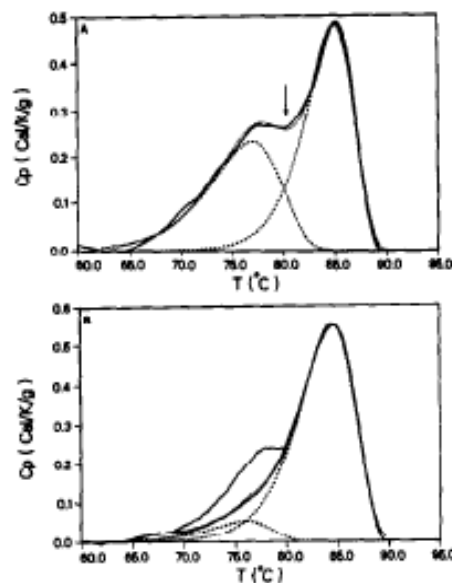


FIG. 4. DSC profiles of HSOD-A6C111 (*panel A*) and HSOD-A6C111 heated to 80 °C (*panel B*). Both the initial scan to 80 °C and the rescan obtained after cooling to 25 °C are shown in *panel B* (*solid lines*). The *arrow* marks the maximum temperature reached during the initial scans. The *dotted line* is the best two component fit, and the *broken lines* are the individual components for each scan.

A6S111

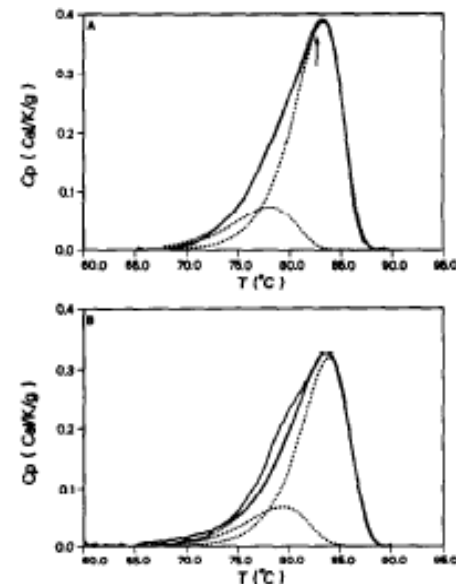


FIG. 5. DSC profiles of HSOD-A6S111 (*panel A*) and HSOD-A6S111 heated to 83 °C (*panel B*). Both the initial scan to 83 °C and the rescan obtained after cooling to 25 °C are shown (*solid lines*). The *arrow* marks the maximum temperature reached during the initial scans. The *dotted line* is the best two component fit, and the *broken lines* are the individual components for each scan.

# DSC Cu,Zn superossido dismutasi (SOD) umana

Per ottenere i parametri termodinamici è stata effettuata una deconvoluzione della curva DSC assumendo una denaturazione reversibile. La parte della curva al di sopra di 87° C viene esclusa dal fit per minimizzare l'effetto di distorsione dovuto all'irreversibilità.

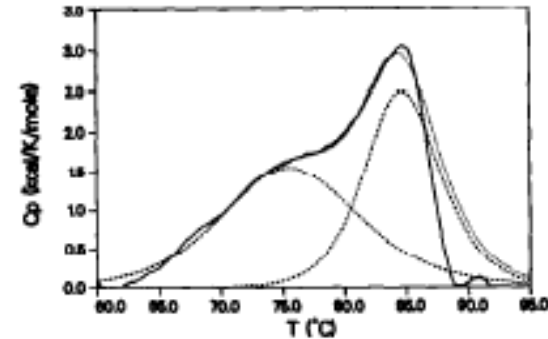


FIG. 6. DSC profile of HSOD-WT (solid line), best two component fit over the temperature range of 62.7–87.1 °C assuming reversible denaturation (dotted line), and the individual components (broken lines).

TABLE II

Thermodynamic parameters for the reversible unfolding of the wild type and mutant human SODs

$f_u$  is the fraction of each component unfolded at 70 °C.

HSOD	Component 1				Component 2			
	$T_m$	$\Delta H$ (kcal/mol dimer)	$\Delta G$ [ $T = 74.9$ °C]	$f_u$ [ $T = 70$ °C]	$T_m$	$\Delta H$ (kcal/mol dimer)	$\Delta G$ [ $T = 83.6$ °C]	$f_u$ [ $T = 70$ °C]
WT	74.9	64.14	0	0.21	83.6	159.0	0	$0.14 \times 10^{-3}$
C6S111	77.7	97.82	0.8	0.041	84.5	164.4	0.4	$0.058 \times 10^{-3}$
A6C111	75.7	61.53	0.1	0.19	84.1	210.6	0.3	$0.005 \times 10^{-3}$
A6S111	77.3	79.02	0.5	0.082	82.8	106.3	-0.2	$3.7 \times 10^{-3}$

# DSC Cu,Zn superossido dismutasi (SOD)

- La **Cys6** è il residuo che contribuisce maggiormente alla irreversibilità della denaturazione della Cu,ZnSOD.

TABLE III  
*Reversibility of unfolding of the wild type and mutant human and bovine SODs*

HSOD	$T_H$ (°C) <sup>a</sup>	Reversibility <sup>b</sup>	Fractional $\Delta H_C(T_H)$ <sup>c</sup>
WT	72.5	0.44	0.14
	75	0.24	0.23
	80	0.16	0.44
	85	0.05	0.95
C6S111	80	0.24	0.29
	83	0.26	0.48
A6C111	80	0.71	0.41
A6S111	80	0.89	0.63
BSOD-WT	84	0.36	0.23
	86	0.32	0.38
A6	84	0.52	0.45

<sup>a</sup>  $T_H$  is the initial temperature scanned to before a complete DSC profile was run.

<sup>b</sup> Fractional reversible unfolding after scanning to  $T_H$ . Defined as  $\Delta H_C(T_H)$  [2nd scan]/ $\Delta H_C(T_H)$  [1st scan].

<sup>c</sup> Fractional  $\Delta H_C$  on scanning to  $T_H$ .

# DSC tossina difterica

La tossina è costituita da due frammenti associati mediante un ponte disolfuro

frammento A     21 kDa  
frammento B     37 kDa

Il frammento A catalizza la ADP-ribosilazione del fattore di allungamento EFII e blocca la sintesi proteica. La liberazione del frammento A mediante riduzione del ponte disolfuro avverrebbe nel citosol dopo internalizzazione recettore-mediata della tossina.

## Analisi DSC

Tossina A + B	A	T <sub>m</sub> 54.5° C	$\Delta H_{cal}$ 115 kcal/mol
	B	T <sub>m</sub> 58.4° C	$\Delta H_{cal}$ 164 kcal/mol
Frammento A		T <sub>m</sub> 44.2° C	$\Delta H_{cal}$ 89 kcal/mol
Frammento B		idrofobico insolubile	
Tossina A + B	irreversibile		
Frammento A	reversibile		



# DSC tossina difterica

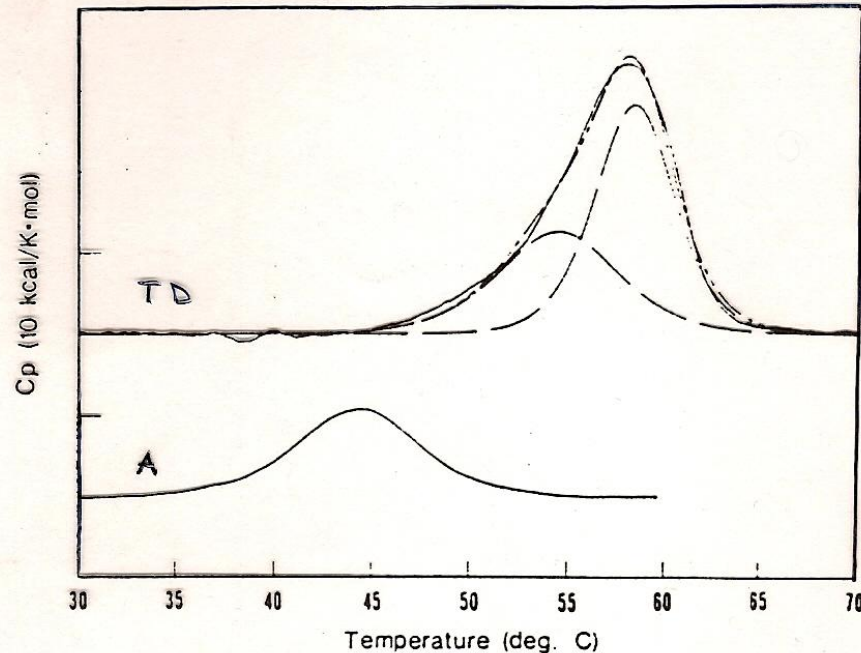


FIGURE 2: Excess heat capacity vs temperature for nucleotide-bound diphtheria toxin (upper curves) and isolated A fragment (bottom curve) at pH 8. The dashed curve is the theoretical curve calculated with the deconvolution parameters obtained for this transition (see text for details). The dotted line represents the individual contributions of the two individual transition steps to the overall curve. The dashed line is the sum of the two fitted curves. The A fragment concentration was 3.0 mg/mL.

# DSC tossina difterica

- La dipendenza dal pH del  $T_m$  della tossina A + B fornisce informazioni sul possibile meccanismo termodinamico alla base della traslocazione dall'endosoma nel citosol.

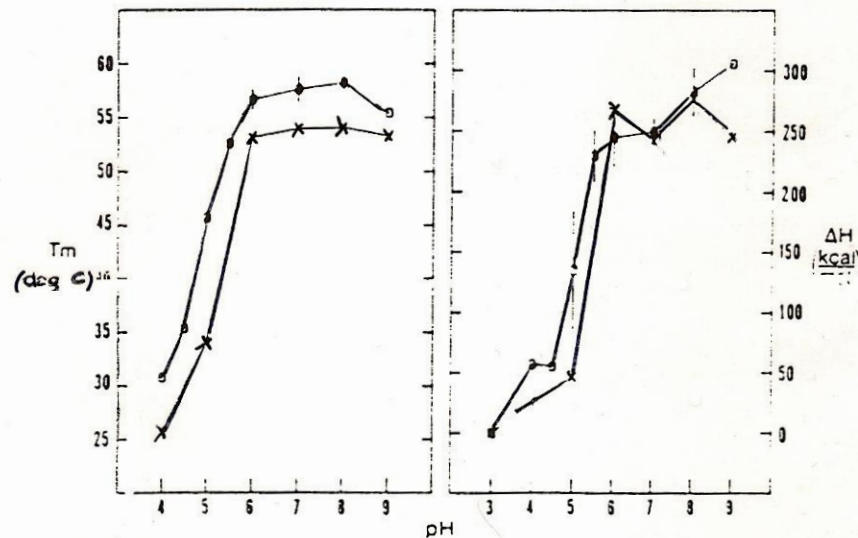
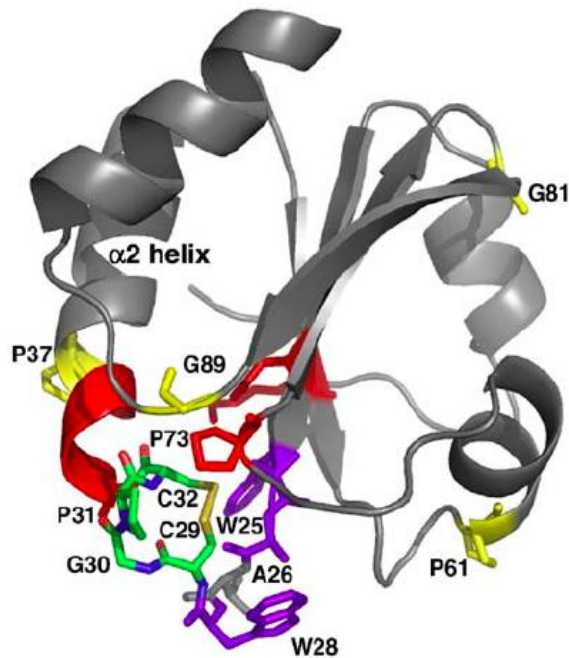


FIGURE 4: pH dependence of the  $T_m$  and enthalpy of unfolding for nucleotide-bound toxin. The conditions for high ionic strength buffers (0.2 M NaCl) are the same as for low ionic strength buffers, except that Tricine buffer was used instead of phosphate buffer at pH 6–7. The error bars are for experiments in which more than one protein preparation was used. (O) represents low ionic strength buffers, and (X) represents high ionic strength buffers.

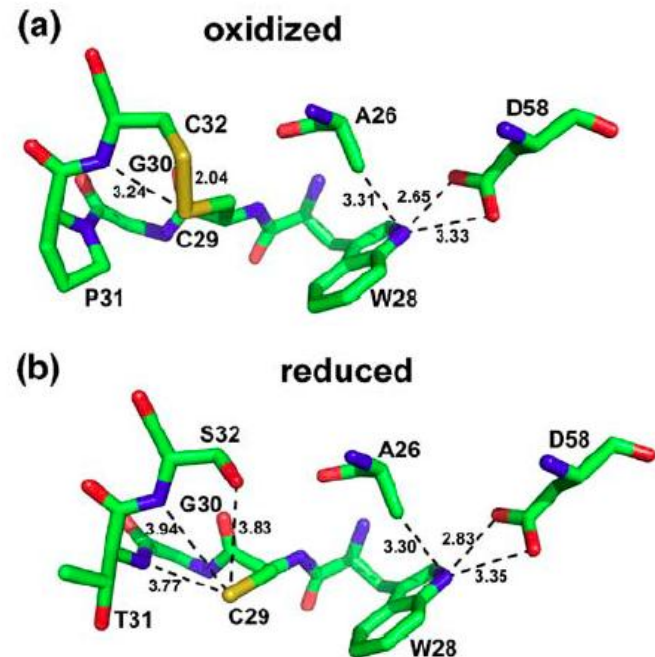


# Ruolo della Pro31 nel determinare il potere riducente della tioredossina

La tioredossina è una proteina di 12 kDa conservata dai batteri all'uomo che riduce ponti disolfuro nelle proteine. La Cys29 ha  $pK_a \approx 7$  e agisce da nucleofilo

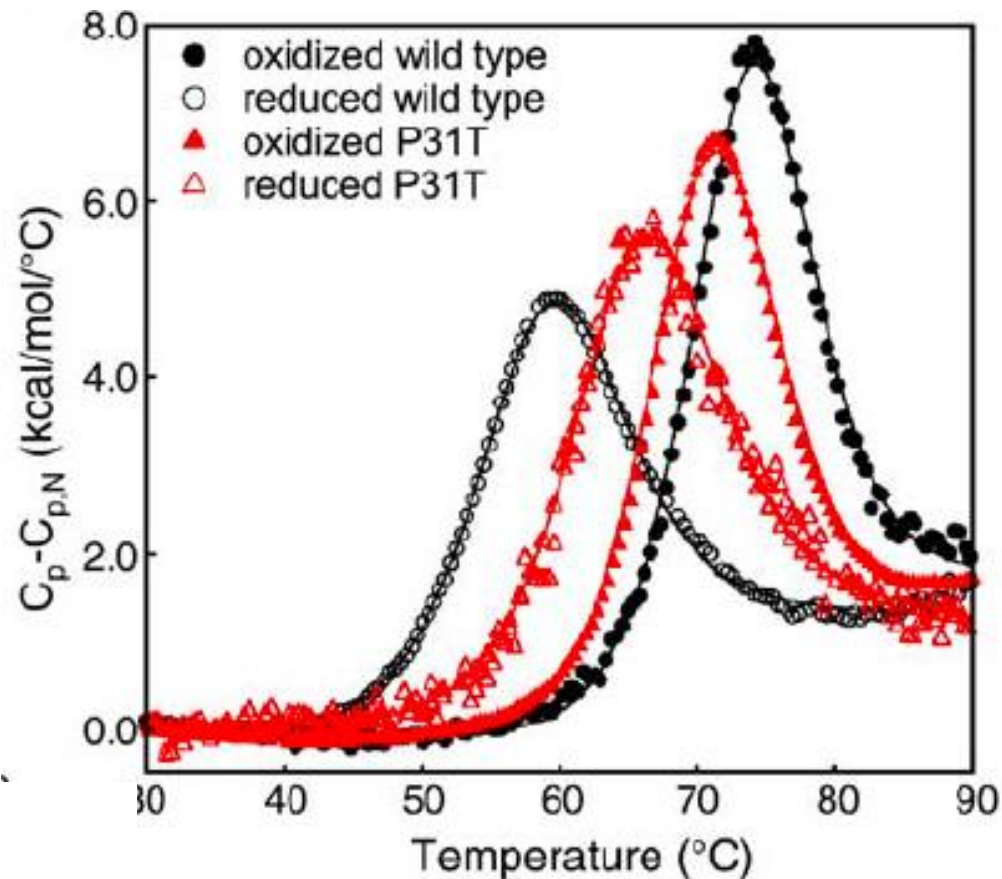


Motivo Cys-Gly-Pro-Cys nel sito attivo



Sito attivo WT e P31T-C32S

# DSC tioredossina ossidata e ridotta



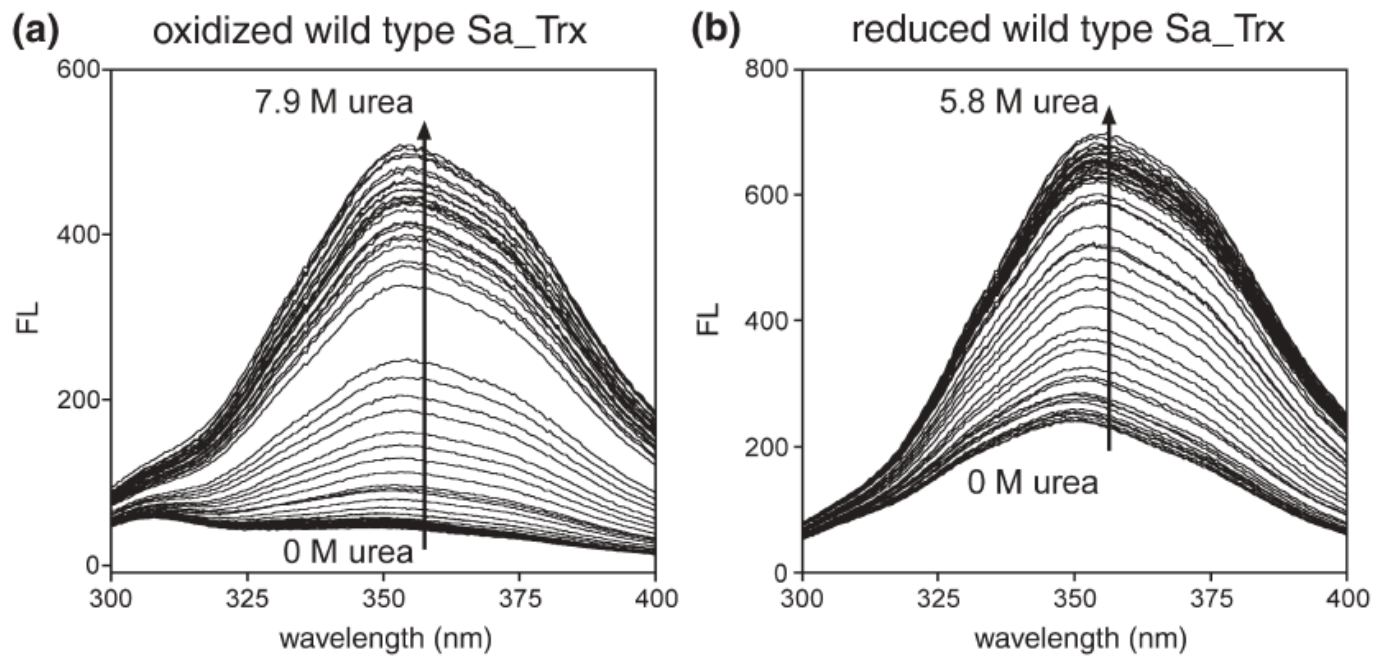
La differenza di stabilità tra TRX ossidata e ridotta è molto ampia nel WT e diminuisce nel mutante P31T

**Table 4.** Redox state dependent thermodynamic parameters of Sa\_Trx obtained from the model analysis of DSC endotherms and the fluorometric urea unfolding profiles

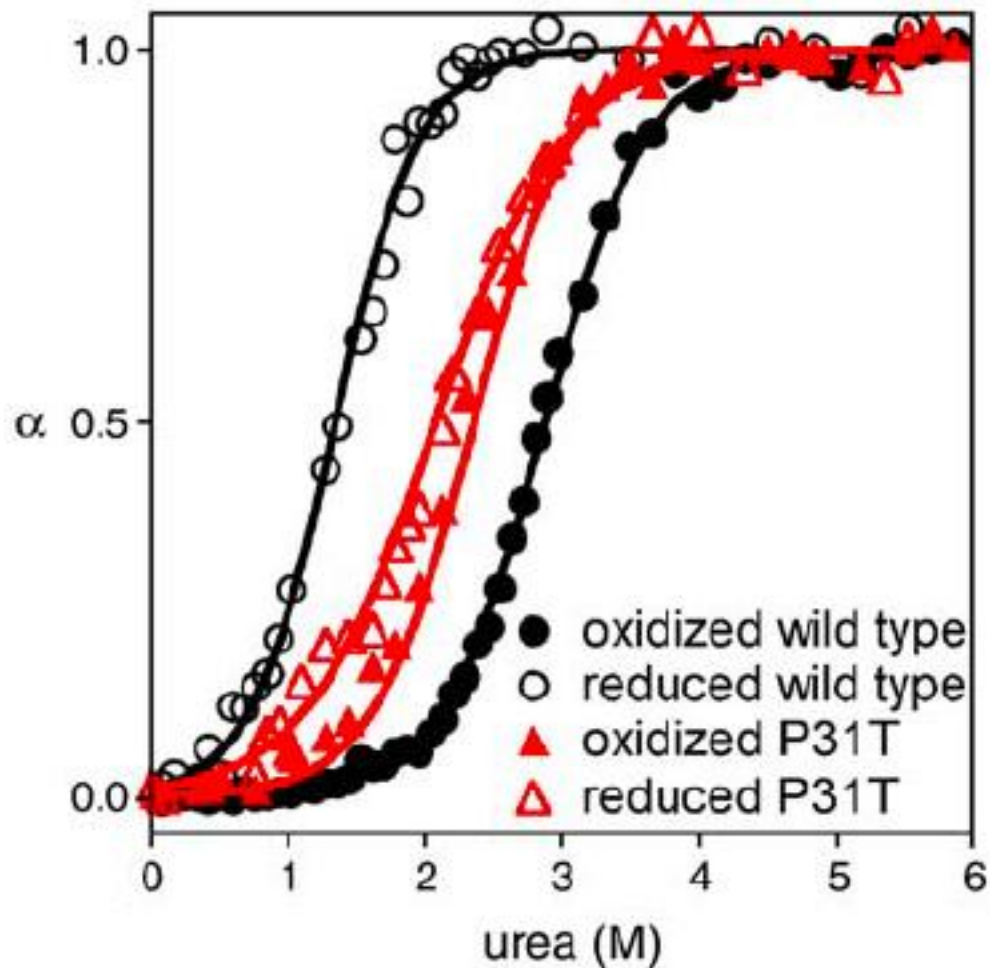
Sa_Trx variant	Redox state	$T_{1/2}$ (°C)		$\Delta C_p^\circ$ (kcal/mol/°C)		$\Delta H_{vh}$ ( $T_{1/2}$ ) (kcal/mol)		$\Delta H_c$ ( $T_{1/2}$ ) (kcal/mol)	$\Delta H_c / \Delta H_{vh}$	$\Delta(T_{1/2})_{ox/red}$ (°C)	
		DSC	Urea	DSC	Urea	DSC	Urea	DSC	DSC	DSC	Urea
Wild-type	Oxidized	73.2	74.5	1.7	1.5	77.7	71.6	72.7	0.93	15.5	18.7
	Reduced	57.6	55.7	1.9	1.9	57.2	57.6	59.3	1.02		
P31T	Oxidized	70.3	69.7	1.9	1.8	72.4	70.4	69.5	0.96	5.8	6.8
	Reduced	64.5	62.9	1.9	2.1	63.9	66.3	63.1	0.99		
Error <sup>a</sup>		±0.4		±0.1		±2.3	±3.2				



La Pro31 è importante nel mantenere la differenza di stabilità tra la forma ossidata di TRX e quella ridotta. Poiché la forma ossidata di TRX è più stabile, è favorita la reazione di riduzione dei ponti disolfuro (o del glutatione, GSH).



**Figure 7.** Fluorescence emission spectra for urea-induced unfolding of oxidized (a) and reduced (b) wild-type Sa\_Trx measured at 30 °C, pH 7.8.



**Figure 6.** Fraction of unfolding ( $\alpha$ ) of oxidized (filled symbols) and reduced (open symbols) wild-type Sa\_Trx (black) and Sa\_Trx P31T (red) at 25 °C as a function of urea concentration. The  $\alpha$  value was calculated from equation (4) with data from the fluorescence emission spectra recorded for oxidized and reduced Sa\_Trx at 356 nm and 358 nm, respectively (Figure 7).