

ICS 07.080

**Proteinanalytik –
Bewertungskriterien für thermische Entfaltungsmethoden (DSF und DSC);
Text Deutsch und Englisch**

Protein analysis –
Evaluation criteria for thermal unfolding methods (DSF and DSC);
Text in German and English

Analyse des protéines –
Critères d'évaluation pour les méthodes de dépliage thermique (DSF et DSC);
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 46 Seiten

Dieses Dokument wurde durch die im Vorwort genannten Verfasser erarbeitet und verabschiedet.

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen an thermisch induzierte Proteinfaltungsanalytik	8
4.1 Allgemeine Anforderungen an das Probenmaterial	8
4.2 Allgemeine Anforderung an die Detektionsgeräte	11
4.2.1 DSC	11
4.2.2 DSIF und DSEF	11
5 Beschreibung der Bewertungskriterien (Parameter) der thermisch induzierten Proteinfaltungsanalytik	12
5.1 Bewertungskriterien der DSC-Methode	12
5.2 Interpretation der Parameter der thermischen Proteindenaturierungsanalytik mittels DSC	13
5.3 Bewertungskriterien der DSF-Methode	14
5.4 Interpretation der Parameter der thermischen Proteindenaturierungsanalytik mittels DSF	15
Anhang A (informativ) Spektrale Änderungen aromatischer Aminosäuren bei DSF-Messungen . .	18
A.1 Auswertung des Wellenlängenquotienten der Fluoreszenzintensitäten oder der Fluoreszenzintensität der Einzelwellenlängen	18
A.2 Rotverschiebung und Blauverschiebung	19
Anhang B (informativ) Mehrere Entfaltungsereignisse am Beispiel eines Antikörpers	22
Literaturhinweise	23

Bilder

Bild 1 — Parameterbeurteilung der thermischen Proteindenaturierungsanalytik mittels DSC . .	14
Bild 2 — Parameterbeurteilung der thermischen Proteindenaturierungsanalytik mittels DSF . .	16
Bild A.1 — Verborgene (A links) und freigelegte (A rechts) Tryptophan-Reste in einer Domäne bei der Proteinentfaltung mit zugehörigem Quotienten-Profil (B) und Einzelwellenlängen-Profil (C)	18
Bild A.2 — Darstellung der Blauverschiebung und Rotverschiebungen während der Proteinentfaltung mit zugehöriger Fluoreszenzintensitätsänderungen bei 330 nm und 350 nm sowie Signaländerung von $F_{\frac{\lambda_{350}}{\lambda_{330}}}$	20
Bild B.1 — Struktur eines IgG-Antikörpers und ein beispielhaftes IgG-Entfaltungsprofil	22

Tabellen

Tabelle 1 — Matrix zur Optimierung der Protein- und Farbstoffkonzentration	11
--	----

Vorwort

Die Erarbeitung von DIN SPEC erfolgt in DIN SPEC-Konsortien und nicht zwingend unter Einbeziehung aller interessierten Kreise.

Das Konsortium bestand aus 5 Mitgliedern. Die vorliegende DIN SPEC wurde mit der Mehrheit der Konsortialmitglieder verabschiedet.

An dem Konsortium waren die nachfolgend genannten Konsortialmitglieder beteiligt:

- NanoTemper Technologies GmbH: Dr. Hans-Jürgen Bigus, Dr. Amit J. Gupta
- Universität Regensburg: Prof. Gernot Längst
- 2bind GmbH: Dr. Thomas Schubert, Dr. Simon Fuchs

Zu dem in der DIN SPEC behandelten Thema bestehen derzeit keine widersprechenden Normen im Deutschen Normenwerk.

DIN SPEC sind nicht Teil des Deutschen Normenwerks.

Für diese DIN SPEC wurde kein Entwurf veröffentlicht.

Trotz großer Anstrengungen zur Sicherstellung der Korrektheit, Verlässlichkeit und Präzision technischer und nicht-technischer Beschreibungen kann das DIN SPEC-Konsortium weder eine explizite noch eine implizite Gewährleistung für die Korrektheit des Dokuments übernehmen. Die Anwendung dieses Dokuments geschieht in dem Bewusstsein, dass das DIN SPEC-Konsortium für Schäden oder Verluste jeglicher Art nicht haftbar gemacht werden kann. Die Anwendung der vorliegenden DIN SPEC entbindet den Nutzer nicht von der Verantwortung für eigenes Handeln und geschieht damit auf eigene Gefahr.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Die kostenfreie Bereitstellung dieses Dokuments als PDF-Version über den Beuth WebShop wurde im Vorfeld finanziert.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Einleitung

Proteine sind essenzielle funktionelle und strukturelle Komponenten biologischer Zellen und bei allen Prozessen beteiligt die lebenden Systeme kennzeichnen: strukturelle Integrität, Energie- und Materiestoffwechsel, Informationsverarbeitung und -weiterleitung und Vermehrung sowie Abwehr von Krankheitserregern und Schadstoffen. Daher sind Proteine von großem Interesse für die industrielle und universitäre Forschung und Entwicklung (im Bereich der Biotechnologie). Es wird oft zwischen der roten, grünen und weißen Biotechnologie unterschieden. Die rote Biotechnologie beschäftigt sich mit medizinischen Anwendungen. Hier sind Proteine z. B. als Wirkstoffe und Zielstrukturen sehr wichtig bei der Entwicklung von Medikamenten gegen Viren, Krebserkrankungen oder Stoffwechselstörungen (z. B. Insulin). Die grüne Biotechnologie beschäftigt sich mit der Optimierung von Pflanzen für land-, forst- und umweltschäftliche Fragestellungen. Proteine sind z. B. für die Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel wichtig. In der weißen Biotechnologie werden die Eigenschaften von Proteinen genutzt, um industrielle Prozesse und Produkte zu optimieren. Beispielsweise können Proteine eine effizientere Textilreinigung ermöglichen oder die Frischhaltung von Backwaren verbessern. Für diese Anwendungen werden die Stabilität und Funktionalität der jeweiligen Proteine nach der Herstellung mit Standardverfahren charakterisiert und validiert, um eine vergleichbare hohe Qualität und Quantität des finalen Proteinproduktes sicherzustellen.

Die Charakterisierung leistet das Feld der Proteinbiophysik. Hier kann in zwei Ansätze zur Untersuchung der Struktur und Stabilität von Proteinen unterscheiden werden.

- 1) Das Protein wird in seinem nativ gefalteten Zustand untersucht, um Daten zur dreidimensionalen Struktur und Aktivitätsparametern des Proteins zu sammeln. Mittels strukturgebender Verfahren wie Röntgenkristallographie, nukleare magnetische Resonanzspektroskopie oder Kryoelektronenmikroskopie lässt sich ein Modell der atomaren Struktur gewinnen. Die Aktivitätsparameter und somit die Funktionalität von Proteinen lässt sich mittels kinetischer und thermodynamischer Aktivitäts- und Bindungsexperimente bestimmen.
- 2) Das gefaltete Protein wird mittels eines Temperaturgradienten oder denaturierender Chemikalien entfaltet. Durch die Entfaltung ändern sich die biophysikalischen Eigenschaften des Proteins: nichtkovalente Wechselwirkungen werden gelöst und wasserabweisende Aminosäuren werden der wässrigen Umgebung ausgesetzt. Diese Parameteränderungen lassen sich als Funktion der Temperatur vermessen. Das breite Methodenspektrum, welches zur Vermessung der thermisch induzierten Proteinentfaltung zur Verfügung steht, lässt sich in zwei Methodengruppen zusammenfassen. Mit der ersten Methodengruppe wird die die Wärmeänderung und somit die Energie mithilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (en: differential scanning calorimetry) gemessen, die bei der Proteinfaltung und Entfaltung umgewandelt wird. Mit der zweiten Methodengruppe wird die Proteinprobe einem Temperaturgradienten ausgesetzt und gleichzeitig wird die Probe mittels spektroskopischer Methoden gemessen (UV-Vis, CD, IR, Fluoreszenz). Die Differenzfluorimetrie (en: differential scanning fluorimetry) ist die meistbenutzte Methode, da sie die Messung eines hohen Probendurchsatzes mit geringen Probenmengen erlaubt und eine einfache Datenauswertung ermöglicht. Als Detektionsgrundlage genutzt werden entweder die Fluoreszenzeigenschaften der Aminosäuren (intrinsische Fluoreszenz DSIF) oder eine mit dem Protein wechselwirkende Chemikalie (extrinsische Fluoreszenz DSEF). Um eine Vergleichbarkeit zwischen DSC und DSIF bzw. DSEF zu entwickeln, werden in diesem Dokument Basiskriterien festgelegt, die die thermisch induzierte Proteinentfaltung vermessen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument definiert Proteinfaltungsparameter der Differenzkalorimetrie (DSC), intrinsischen Differenzfluorimetrie (DSIF) und extrinsischen Differenzfluorimetrie (DSEF) und gibt Anforderungen an die thermisch induzierte Proteinfaltung, relevante Detektionsgeräte sowie Bewertungskriterien an die thermische Entfaltungsanalytik.

Dieses Dokument kann für die Pufferoptimierung (als Teil der Formulierung) von Proteinen, z. B. in der Strukturbiochemie (Röntgenkristallographie, Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM), magnetische Kernresonanz (NMR, en: nuclear magnetic resonance)), verwendet werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN EN ISO 11357-1:2017-02, *Kunststoffe — Dynamische Differenz-Thermoanalyse (DSC) — Teil 1: Allgemeine Grundlagen (ISO 11357-1:2016); Deutsche Fassung EN ISO 11357-1:2016*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN EN ISO 11357-1:2017-02 und die folgenden Begriffe.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term>

— DKE-IEV: verfügbar unter <http://www.dke.de/DKE-IEV>

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Differenzfluorimetrie

DSF, en: differential scanning fluorimetry

biophysikalische Methode, die mittels Fluoreszenzspektroskopie die thermische Entfaltung von *Proteinen* (3.10) misst

3.2

intrinsische Differenzfluorimetrie

DSIF, en: intrinsic differential scanning fluorimetry

DSF (3.1), bei der die Fluoreszenzänderung von Fluorophoren detektiert wird, die im *Protein* (3.10) als Aminosäuren intrinsisch vorhanden sind (Tryptophan und Tyrosin)

3.3

extrinsische Differenzfluorimetrie

DSEF, en: extrinsic differential scanning fluorimetry

DSF (3.1), bei der die Fluoreszenzänderung von Fluorophoren detektiert wird, welche mit dem sich entfaltenden *Protein* (3.10) interagieren und dabei ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern

3.4

dynamische Differenzkalorimetrie

DSC, en: differential scanning calorimetry

Analyse der Änderung der Wärmestromdifferenz zu Probe und Referenzprobe, während diese einer Temperaturänderung unterworfen sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Es wird unterschieden zwischen:

a) Dynamische Wärmestrom-Differenzkalorimetrie (hf-DSC):

Die Wärmestromdifferenz zwischen Probe und Referenzprobe ergibt sich aus der Temperaturdifferenz zwischen Probe und Ofen sowie Referenzprobe und Ofen oder zwischen Probe und Referenzprobe.

b) Dynamische Leistungskompensations-Differenzkalorimetrie (pc-DSC):

Die Wärmestromdifferenz ergibt sich, indem die Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenzprobe elektrisch kompensiert und damit auf nahezu Null geregelt wird.

[QUELLE: DIN 51005:2021-08, 3.2.4]

3.5

Enthalpie

thermodynamische Eigenschaft eines Stoffes, definiert als die Summe seiner thermodynamischen Energie plus der Größe $p \times V$, wobei p der Druck, V das Volumen ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Wurde früher als Gesamtwärme und Wärmehalt bezeichnet.

[QUELLE: ISO 16818:2008, 3.91, modifiziert — „x“ eingefügt und „p“ anstelle von „P“ verwendet]

3.6

Extinktionskoeffizient

ε

natürlicher Logarithmus des Verhältnisses von einfallender Lichtintensität zu durchgelassener Lichtintensität, je Einheit Lichtweglänge

[QUELLE: ISO 5660-1:2015, 3.13]

3.7

Fluoreszenz

Phänomen einer selektiven Absorption von Strahlung relativ kurzer Wellenlänge (d. h. relativ hoher Energie) durch Materie mit dem Ergebnis der Emission von Strahlung mit längeren Wellenlängen (d. h. geringerer Energie), die nach Wegfall der Anregung nur sehr kurze Zeit bestehen bleibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Sonderfall der Mehrphotonenanregung kann Strahlung längerer Wellenlänge (niedrigerer Energie) Fluoreszenz mit der Wirkung von Strahlung kürzerer Wellenlänge anregen.

[QUELLE: ISO 10934:2020, 3.1.58]

3.8

Gleichgewichtskonstante

$K(T)$

Konzentrationsverhältnis zwischen dem entfalteten Protein $[D]$ und gefaltetem Protein $[N]$ als eine Funktion der Temperatur (T)

$$K(T) = \frac{[D]}{[N]}$$

3.9

spezifische Wärmekapazität bei konstantem Druck

c_p

erforderliche Wärmemenge, um die Temperatur einer Substanz der Einheitsmasse bei konstantem Druck um 1 K zu erhöhen:

$$c_p = \frac{1}{m} \times \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p$$

Dabei ist

dQ die Wärmemenge in Joule (J), die erforderlich ist, um bei konstantem Druck die Temperatur einer Substanz der Masse m , als Masse in Gramm (g) angegeben, um dT , in Kelvin angegeben, zu erhöhen;

c_p wird in Joule je Gramm und Kelvin ($J \cdot g^{-1} \cdot K^{-1}$) angegeben.

Anmerkung 1 zum Begriff: c_p darf auch in Joule je Mol und Kelvin ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$) angegeben werden, wenn die Substanzmenge m in Mol angegeben ist.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei der Analyse von Proteinen ist es erforderlich, dass die gemessene spezifische Wärmekapazität keine Wärmeänderung enthält, die auf eine chemische Reaktion oder physikalische Umwandlung zurückzuführen ist.

[QUELLE: DIN EN ISO 11357-1:2017-02, 3.6, modifiziert — „Polymere“ in Anmerkung 2 zum Begriff wurde durch „Proteine“ ersetzt und die zweite Formel entfernt.]

3.10

Protein

bioorganisches Polymer, bestehend aus verknüpften Aminosäuren

3.11

Proteindenaturierung

physikalische und/oder chemische Behandlung, die die strukturellen, funktionellen, enzymatischen oder antigenen Eigenschaften des interessierenden Proteins zerstört oder modifiziert

[QUELLE: ISO 16577:2016, 3.34]

3.12

Temperatur zu Beginn der Proteinentfaltung

T_{on}

Temperatur, bei der die *Proteindenaturierung* (3.11) beginnt

3.13

Zwei-Zustands-Proteinentfaltung

mathematisches Modell welches ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen dem gefalteten Zustand des Proteins (N = nativ) und dem ungefalteten Zustand (D = denaturiert) annimmt: $N \rightleftharpoons D$

3.14

Schmelzpunkt

T_m

Temperatur, an der die gefaltete und ungefaltete Proteinspezies zu je 50 % im Gleichgewicht vorliegen

3.15

Kooperativität der Proteinentfaltung

durch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Domänen der gefalteten Molekülkette induzierte Denaturierung einer weiteren Domäne nach Denaturierung der ersten

4 Anforderungen an thermisch induzierte Proteinfaltungsanalytik

4.1 Allgemeine Anforderungen an das Probenmaterial

Kriterien an das Probenmaterial zur Erstellung hochqualitativer Proteinentfaltungsdaten:

- a) Das Protein muss in einem partiell oder komplett gefalteten Zustand vorliegen.

ANMERKUNG Intrinsisch ungeordnete Proteine und Proteinfragmente oder ungefaltete Peptidketten werden keine Entfaltung in einem thermischen Gradienten zeigen. Ebenfalls lassen sich Proteine, die durch chemische oder physikalische Einwirkung komplett entfaltet wurden, nicht weiter in einem thermischen Gradienten entfalten.

- b) Für eine reproduzierbare quantitative Analyse muss die Proteinprobe in möglichst hoher Reinheit vorliegen. Generell lässt sich zwischen präzisen reproduzierbaren quantitativen Messungen und qualitativen Messungen unterscheiden. Für eine reproduzierbare quantitative Messung der methodenspezifischen Parameter, muss die Proteinreinheit mindestens 95 % betragen. Bei qualitativen Messungen richtet sich die Proteinreinheit nach der wissenschaftlichen Fragestellung. Die Anforderungen an die Proteinreinheit lassen sich methodenspezifisch aufgliedern:

- 1) Die DSC misst die gesamte Wärmekapazitätsänderung der eingesetzten Probe. Somit verändern alle zusätzlich vorhandenen Verunreinigungen, sowohl aus der Proteinreinigung als auch aus den Puffersubstanzen die Wärmekapazität der Probe. Wenn eine Referenzmessung mit einer Reinheit von > 95 % vorhanden ist, kann DSC benutzt werden, um die Reinheit einer Proteinprobe zu bewerten. Für die korrekte Bestimmung der molaren Wärmekapazität und somit auch der Enthalpie und des Schmelzpunkts, muss die Proteinkonzentration bekannt sein. Die Proteinkonzentration sollte mittels UV-Vis Spektroskopie bestimmt werden. Verunreinigungen durch DNA, unerwünschte Proteine und Proteinaggregate, Detergenzien sowie Lipidverunreinigungen verfälschen die mittels UV-Vis ermittelte Konzentration durch zusätzliche Absorption und Streuungseffekte.
 - 2) Die DSF mit extrinsischen Fluorophoren (DSEF) macht sich die Änderung der Hydrophobizität nach Proteinentfaltung zu nutze. Somit erzeugen alle Verunreinigungen, welche hydrophobe Wechselwirkungen mit den Fluorophoren eingehen können (Nukleinsäuren, Lipide, Detergenzien, denaturierte Proteine und Proteinaggregate) Störeinflüsse. Solche Verunreinigungen resultieren oft in einer hohen initialen Fluoreszenz. Wenn diese zu hoch ist, lässt sich das eigentliche Entfaltungssignal des zu analysierenden Proteins nicht mehr detektieren. Verunreinigungen durch Fremdproteine verfälschen zudem die Messung, da diese zusätzlichen Entfaltungssignale erzeugen können. Darüber hinaus kann auch das zu analysierende Protein im gefalteten Zustand über zugängliche hydrophobe Bereiche verfügen, wie z. B. Membranproteine oder Calcium-bindende-EF-Hand-Proteine. Auch das resultiert in einer hohen initialen Fluoreszenz und kann das Entfaltungssignal maskieren. Wie auch schon für DSC beschrieben [siehe 4.1 b) 1)], können diese Effekte bei guten Referenzdaten zur Bestimmung der Probenqualität herangezogen werden. Die Reinheit der Proteinprobe muss > 90 % sein.
 - 3) Die DSIF macht sich die Fluoreszenzeigenschaften von Tyrosin und Tryptophan zu nutze. Für eine reproduzierbare quantitative Bestimmung der Schmelzparameter muss eine Proteinreinheit von > 90 % vorhanden sein. Wenn der Schmelzpunkt durch Referenzdaten bekannt ist, können allerdings auch Proben vermessen werden, die größere Verunreinigungen aufweisen, solange das zu vermessende Protein ein klar identifizierbares Signal zeigt. Dafür muss die Menge des Proteins in der Mischfraktion > 70 % sein. Kleinere Verunreinigungen durch Aggregate oder entfaltete Proteine beeinflussen das Entfaltungssignal des zu messenden Proteins nicht. Allerdings können diese als Aggregationskeim dienen und dadurch die Stabilität des zu messenden Proteins beeinflussen.
- c) Eine optimal an die Methode angepasste Proteinkonzentration muss gewählt werden. Wenn die Proteinkonzentration zu niedrig ist, ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei der jeweiligen Messung zu gering. Die anschließende Parameterschätzung mittels nichtlinearer Anpassung der jeweiligen mathematischen Modelle an die Daten, wird dadurch sehr breite Konfidenzintervalle und deshalb eine schlechte Statistik liefern. Erhöhungen der Proteinmenge wirken sich somit positiv auf das Signal-Rausch-Verhältnis aus. Bei der DSF können zu hohe Proteinkonzentrationen die Lichteindringtiefe in die Probe vermindern, sodass

nicht mehr das gesamte Protein der Probe angeregt wird. Außerdem weisen die meisten Proteinproben ein Konzentrationsmaximum auf, an dem die Proteine noch löslich sind. Werden die Proben darüber hinaus aufkonzentriert, können sich Aggregate oder Präzipitate bilden.

- 1) Im Folgenden sind die empfohlenen Proteinkonzentrationen und Mengen methoden- und probenabhängig aufgeführt:

— DSC:

minimale Proteinmenge: 0,1 mg/ml;

maximale Proteinmenge: 100 mg/ml;

nötiges Probenvolumen: 2 ml für Einzelmessung;

— DSEF:

minimale Proteinmenge: 0,1 mg/ml;

maximale Proteinmenge: 0,5 mg/ml;

nötiges Probenvolumen: 45 µl für Einzelmessung;

— DSIF:

minimale Proteinmenge: 5 µg/ml;

maximale Proteinmenge: 250 mg/ml;

nötiges Probenvolumen: 10 µl für Einzelmessung.

- 2) Zur Optimierung der Proteinkonzentration für die DSEF muss eine Matrixsuche mit verschiedenen eingesetzten Proteinkonzentrationen gegen verschiedenen Farbstoffkonzentrationen verwendet werden (siehe Tabelle 1).
- 3) Die optimale Messbedingung produziert eine eindeutige Entfaltungskurve ohne Hintergrundrauschen. Wenn die Proteinstabilität mit zunehmender Farbstoffkonzentration abnimmt oder zunimmt, muss die niedrigste Farbstoffkonzentration eingesetzt werden, welche gut auswertbare Messergebnisse produziert (d. h. nicht verrauscht, eindeutige Übergänge). Wenn eine optimale Konzentration gefunden wurde, muss diese der Endkonzentration in den späteren Messbedingungen entsprechen. Es muss beim Ansetzen der Testbedingungen sichergestellt werden, dass die Proteinprobe kurzzeitig in der Farbstofflösung vorinkubiert wird, da diese DMSO enthält und die Proteinprobe denaturieren oder oxidieren kann. Idealerweise sollte das Protein erst direkt vor der Messung mit dem Farbstoff gemischt werden. Falls die Proteinkonzentration unbekannt ist, muss eine Verdünnungsreihe [siehe 4.1 c) 4) für DSIF] der Proteinstammlösung getestet werden.
- 4) Die benötigte Proteinmenge für DSIF-Messungen ist abhängig von der Tryptophan- und Tyrosinmenge des zu messenden Proteins (und somit vom Extinktionskoeffizienten des Proteins). Um die optimalen Proteinkonzentrationen zu identifizieren sollten drei Testansätze in Duplikaten mit den folgenden Proteinkonzentrationen gemessen werden: 1 µM, 2 µM, 5 µM. Die LED-Anregungsintensität muss dabei auf die Hälfte bis zu zwei Drittel der maximal möglichen Intensität eingestellt werden ohne Sättigung zu erreichen. Die Intensität erhöht sich normalerweise nach Entfaltung des Proteins noch einmal. Die optimale Konzentration ist dabei die geringste, mit der sich Kurven mit eindeutigen Schmelzübergängen messen lassen. Falls die Kurven stark verrauscht sind, muss die Konzentration in 10-µM-Schritten erhöht werden. Falls die Proteinkonzentration unbekannt ist, muss eine 1 : 10 Verdünnungsreihe über drei bis vier Schritte im jeweiligen Puffer auf ein Endvolumen von 40 µl vorgenommen werden und jede Bedingung als Triplikat getestet werden (je Kapillare 10 µl). Wenn eine optimale Konzentration gefunden

den wurde, muss diese der Endkonzentration in den späteren Messbedingungen entsprechen. Für Formulierungsansätze oder Additivensuche muss somit eine Proteinstammlösung vorbereitet werden, die dann mit den jeweiligen Puffern oder Chemikalien verdünnt wird.

- d) Der Puffer, in dem die Proteinprobe gelagert und gemessen wird, sollte mit der jeweiligen Methode kompatibel sein. Für eine hohe Datenqualität sollten alle verwendeten Puffer gefiltert und bei 4 °C gelagert werden. Da die Löslichkeit von Gasen in Flüssigkeiten mit zunehmender Temperatur abnimmt, können Puffer während der Messung entgasen, was zur Bildung von Luftbläschen führt. Deshalb müssen die Proben und Puffer vor der DSC zusätzlich unter Vakuum entgast werden. Falls es zu Gasbläschenbildung bei der DSEF oder DSIF kommt, können die Puffer vor der Messung für 15 min in einem Ultraschallbad entgast werden (den Deckel dafür leicht öffnen).
- e) Jede Pufferkapazität ist temperaturabhängig. Für die meisten Puffer ist diese Temperaturabhängigkeit vernachlässigbar klein, außer bei Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) und anderen Aminpuffern. Bei zunehmender Temperatur nimmt der pH-Wert der Tris-Pufferlösung ab, sodass diese Puffer für alle thermischen Denaturierungsexperimente vermieden werden sollten. Metallionen sind wichtige Kofaktoren in vielen Proteinen. Einige Puffersubstanzen können Metallionen chelatieren (z. B. Ca^{2+} wird durch die Phosphatreste in Phosphatpuffern chelatiert und bildet mit Carbonationen unlösliches Calciumcarbonat). Die Ionen stehen dann nicht mehr in Lösung zu Verfügung oder können sogar zusammen mit der Puffersubstanz präzipitieren. Die Kompatibilität von Puffersubstanz und verwendeten Metallionen sollte deshalb immer überprüft werden. Für viele Proteinlösungen muss ein reduzierendes Agens verwendet werden, um Proteinoxidation (Disulfidbrücken usw.) zu vermeiden. Ein häufiges Reduktionsmittel ist DTT (Dithiothreitol), welches aber leicht oxidiert und daher sehr instabil ist. Für DSC-Messungen muss DTT ganz vermieden werden, da es zusätzliche Wärmesignale aufgrund der oxidierenden Eigenschaften liefert. Als Alternativen sollten Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) oder β -Mercaptoethanol verwendet werden. Für DSEF- und DSIF-Experimente sollte DTT vor jeder Messung immer frisch angesetzt werden. Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung ist zu beachten, dass oxidiertes DTT ebenfalls Licht bei 280 nm absorbiert und somit die Proteinkonzentrationsmessung verfälscht.
- f) Generelle Empfehlungen zur Proteinbehandlung und Qualitätskontrolle:
 - 1) Das Protein sollte möglichst frisch produziert und aufgereinigt sein und möglichst wenige Einfrier-/Auftauzyklen durchlaufen haben, bzw. nur für kurze Zeiten (wenige Tage) bei 4 °C gelagert worden sein. Außerdem sollten vorhandene Tags [Histidin (His), Streptavidin (Strep), Glutathione S Transferase (GST), Maltosebindepotein (MBP) usw.] vorher, wenn möglich, durch Proteasen entfernt werden, da diese die Stabilität beeinflussen können oder bei größeren Tags falsch-positive Signale liefern (MBP, GST). Für Pufferoptimierung sollte die Puffer- und Salzkonzentration nicht höher als 200 mM betragen.
 - 2) Die Qualität der Proteinprobe sollte durch komplementäre Methoden validiert werden. Dafür bieten sich die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Native-Polyacrylamidgelelektrophorese und analytische Größenausschlusschromatografie sowie Massenspektrometrie an. Für die exakte Proteinquantifizierung von Proteinproben großer Reinheit sollte UV-Vis Spektroskopie verwendet werden. Alternativ bieten sich die kolorimetrischen Analysemethoden Bradford, Lowry oder Biuret zur Proteinquantifizierung an, wenn größere Verunreinigungen vorhanden sind.

Tabelle 1 — Matrix zur Optimierung der Protein- und Farbstoffkonzentration

	Protein μM					
		0	0,5	5	25	50
Multiplikator der Farbstoffmenge je 25 μl Endvolumen	1×					
	2,5×					
	5×					
	10×					
	20×					
ANMERKUNG Jedes freie Feld entspricht einer Kombination aus Proteinmenge und gewählter multiplizierter Farbstoffmenge, die zu einem finalen Volumen von 25 μl gemischt und dann gemessen wird, um ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen und destabilisierende Effekte durch zu hohe Farbstoffkonzentrationen zu minimieren.						

4.2 Allgemeine Anforderung an die Detektionsgeräte

4.2.1 DSC

Das Gerät sollte für biochemische Anwendungen konzipiert sein. Mithilfe des Gerätes sollten der Temperaturmittelpunkt (T_m), die Enthalpie der Entfaltung (ΔH) und die Wärmekapazitätsänderung (Δc_p) bestimmt werden können.

Die Messzelle sollte aus Tantal bestehen, da dieses inert gegen die meisten Chemikalien ist, welche bei der Proteinanalyse benutzt werden.

Das nötige Probenvolumen sollte möglichst gering sein (z. B. 130 μl für Geräte mit Kapillarzellen). Proteinkonzentrationsbereiche von 0,01 mg/ml bis 10 mg/ml sollten vermessen werden können. Das Rauschen sollte $< 0,05 \mu\text{cal/K}$ sein.

Die Basislinien-Wiederholbarkeit sollte 1 $\mu\text{cal/K}$ betragen.

Die Reaktionszeit des Gerätes sollte nicht langsamer als 5 s sein.

Bei Wiederholungen von Experimenten mit stabilen Puffern sollte der Fehler $< 0,2 \mu\text{cal/K}$ sein. Die Reproduzierbarkeit des Gerätes sollte folgende statistischen Anforderungen erfüllen: $< 0,1 \text{ K}$ Standardabweichung für den T_m -Wert und $< 5 \%$ relative Standardabweichung für ΔH .

Mehrfache Rückkopplungsmodi sollten für den Temperatenausgleich zwischen Probensonde und Referenzsonde auswählbar sein. Für die Proteinanalytik geeignete Temperaturbereiche der Hitzerrampe von 2 °C bis 130 °C müssen messbar sein.

Die maximale Heizrate sollte $\geq 240 \text{ K/h}$ sein.

Mit dem Gerät sollte es möglich sein, reverse Messungen durchzuführen, die die Rückfaltung des Proteins nach thermischer Entfaltung während der anschließenden Abkühlphase untersuchen.

4.2.2 DSIF und DSEF

Die Anforderungen für DSIF und DSEF Geräte sind analog und werden in diesem Unterabschnitt beschrieben. Für beide Anwendungen muss bei Temperaturerhöhung eine Fluoreszenzänderung gemessen werden können. Für DSIF, werden die intrinsischen Fluorophore Tryptophan und Tyrosin vermessen und für DSEF wer-

den extrinsische Fluorophore vermessen, welche mit der zu messenden Probe beginnend mit der Entfaltung interagieren und dabei ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern.

Die folgende Beschreibung konzentriert sich auf die Vermessung intrinsischer Fluorophore. Allerdings ändern sich bei der Vermessung extrinsischer Fluorophore (je nach Typ) nur die anzuregenden und zu messenden Wellenlängen.

Um das Protein zu entfalten, muss die Temperatur gleichmäßig erhöht werden (sogenannte „lineare Heizrampe“), von einer definierten Anfangstemperatur bis zu einer definierten Endtemperatur. Die Proben müssen über einen Temperaturbereich von etwa 15 °C bis 95 °C geheizt werden können, da die meisten Proteine in diesem Bereich entfalten. Für thermostabilere Proteine muss der Temperaturbereich auf bis zu 110 °C erweiterbar sein.

Die lineare Heizrampe muss genau sein, um verlässliche Ergebnisse zu liefern (Genauigkeit des Temperaturkontroll-Elements $\pm 0,2$ °C bei 52 °C, und Präzision der Temperatur $\pm 0,1$ °C).

Die Heizrampe muss unterschiedlich steil einstellbar sein (zwischen 0,1 K/min und 7 K/min).

Die Fluoreszenz muss im Bereich von 280 nm $\pm$ 10 nm mit einer Licht emittierenden Diode (LED) angeregt werden, und in einem Bereich mit 20 nm Breite um die zentrale Wellenlängen 330 nm und 350 nm detektiert werden können. Die Analyse benutzt den Quotienten der Emissionssignale mit dem 350-nm-Signal als Zähler und dem 330-nm-Signal als Nenner. Dieser Quotient ist spezifisch für das Proteinentfaltungssignal und die Messung ist dadurch weitgehend unabhängig von verwendeten Puffersubstanzen und Hintergrundfluoreszenzsignalen.

DSIF macht sich Fluoreszenz zu Nutze und die auszulesenden optischen Signale können mittels geeigneter Anregungslichtquellen und modernen Photoelektronenvervielfacher im Detektor amplifiziert werden. Zusätzlich erlauben moderne Optiken eine starke Verringerung des Auszulesenden Messbereiches, sodass sogar geringe Probenvolumina in Glaskapillaren gemessen werden können. Das Volumen der zu messenden Probe kann somit auf 10 μ l verringert werden. Da die Kapillare auf dem Heizelement liegt und einen sehr geringen Durchmesser hat, ist sie während des gesamten Heizvorganges im Gleichgewicht mit der Umgebung, wodurch eine präzise Messung sichergestellt wird (die Temperatur des Messpunktes entspricht der Temperatur der Kapillare).

Ein Konzentrationsbereich von nM- bis mM-typischer Proteine, wie z. B. Antikörper, muss abgedeckt sein.

Nach einer Messung muss der Nutzer automatisch die Temperatur des Schmelzübergangs (Wendepunkt oder T_m) und die Temperatur des Entfaltungsbeginns (T_{on}) der Probe erhalten. Auch mehrere Schmelzübergänge in einer Probe müssen detektiert werden können, da komplexere Protein oft mehrere Entfaltungsereignisse zeigen.

Die erzielten Ergebnisse müssen reproduzierbar sein (z. B. Abweichungen für den Wendepunkt zwischen Proben im gleichen Messdurchlauf; relative Standardabweichung bzw. Variationskoeffizient).

Die Methode muss mindestens eine Datenpunktdichte von 10 Datenpunkten je K liefern.

5 Beschreibung der Bewertungskriterien (Parameter) der thermisch induzierten Proteinfaltungsanalytik

5.1 Bewertungskriterien der DSC-Methode

Nach erfolgreicher Datenanalyse unter Voraussetzung einer reversiblen Entfaltungsreaktion lassen sich folgende Parameter direkt aus der Messung ableiten:

a) Schmelzpunkt (T_m):

- Der Schmelzpunkt (T_m ; m = Mittelpunkt) ist die Temperatur an dem die gefaltete und ungefaltete Proteinspezies zu je 50 % im Gleichgewicht vorliegt.

- Je höher der T_m , desto stabiler ist ein Protein.

b) Temperatur zu Beginn der Proteinentfaltung (T_{on}):

- Der Beginn der Proteinentfaltung (T_{on}) lässt sich zur Beurteilung der Stabilität und Packung der Proteinstruktur heranziehen.
- Ein niedriger T_{on} -Wert bedeutet, dass die Proteinstruktur schon durch niedrige Energiezufuhr beginnt aufzufalten und somit wenige intramolekulare Wechselwirkungen aufweist.
- Wenn T_{on} und T_m nahe beieinanderliegen, ist die Stabilität zwar gering, aber die Struktur des Proteins ist dicht gepackt, sodass ein kooperativer Schmelzübergang erfolgt.
- Wenn T_{on} und T_m sich stark unterscheiden, ist die Kooperativität der Proteinentfaltung gering. Proteinomänen falten unabhängig voneinander auf.

c) Kalorimetrische Enthalpie (ΔH_{cal}):

- ΔH_{cal} ist die Energie, die zur Entfaltung der Proteinprobe benötigt wird.
- ΔH_{cal} entspricht der Fläche unter der DSC-Messkurve (Thermogramm).
- Falls eine Referenzmessung zur Verfügung steht, kann ΔH_{cal} zur Abschätzung der aktiven Proteinfraction (Anteil des Proteins in aktiver Konformation) in einer gegebenen Formulierung benutzt werden.

5.2 Interpretation der Parameter der thermischen Proteindenaturierungsanalytik mittels DSC

Bild 1 zeigt die grundlegenden Parameter der thermischen Proteindenaturierungsanalytik mittels DSC; für eine genauere Beschreibung kann DIN 51005:2021-08, Bild B.1, herangezogen werden. Im Folgenden wird die Beurteilung der einzelnen Parameter erklärt:

a) Temperatur zu Beginn der Proteinentfaltung (T_{on}):

- Je niedriger T_{on} , desto weniger Wärmeenergie ist für den Beginn der Entfaltung nötig.
- Je höher T_{on} , desto stabiler ist das Protein.

b) Maximum der Endotherme bzw. Schmelzpunkt (T_m):

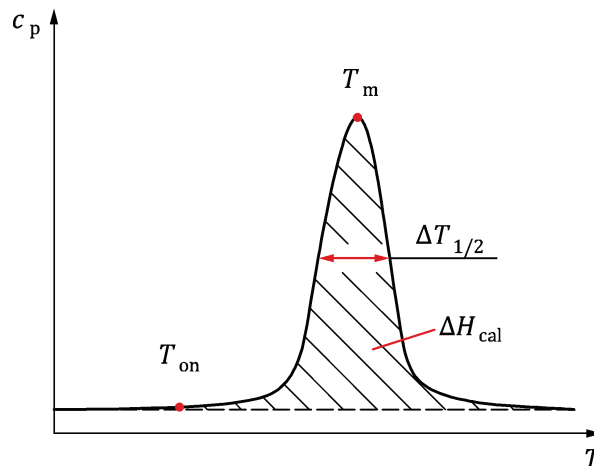
- T_m ist der Punkt, wo die Endotherme ihr lokales Maximum besitzt.
- T_m ist der Wendepunkt, welcher einen Faltungszustandsübergang während der Proteinentfaltungsreaktion markiert.
- Je höher die Temperatur am Wendepunkt, desto stabiler ist das Protein.
- Mehrere Wendepunkte sind ein Indiz für mehrere Faltungsübergänge.

c) Kalorimetrische Enthalpie ΔH_{cal} :

- ΔH_{cal} ist die Energie, die zur Entfaltung der Proteinprobe benötigt wird.
- Je größer ΔH_{cal} , desto mehr Energie wird zur Entfaltung benötigt.

d) Halbe Kurvenbreite der Endotherme ($\Delta T_{1/2}$):

- $\Delta T_{1/2}$ ist die Breite der X-Werte (in K) bei halber Kurvenhöhe, gemessen von der Basislinie.
- Je schmaler $\Delta T_{1/2}$, desto dichter gepackt ist die Proteinstruktur.
- Je schmaler $\Delta T_{1/2}$, desto kooperativer entfaltet die Proteinprobe.



Legende

- c_p spezifische Wärmekapazität bei konstantem Druck, in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
 ΔH_{cal} kalorimetrische Enthalpie, in J
 T Temperatur, in K
 T_{on} Temperatur zu Beginn der Proteinentfaltung, in K
 $\Delta T_{1/2}$ halbe Kurvenbreitebreite der Endotherme, in K
 T_m Maximum der Endotherme bzw. Schmelzpunkt, in K

Bild 1 — Parameterbeurteilung der thermischen Proteindenaturierungsanalytik mittels DSC

Bild 1 zeigt die Endotherme einer einstufigen Proteinentfaltung. Aus dieser Darstellung sind T_{on} , ΔH_{cal} nach Bestimmung der Basislinie und Integration der Kurve und T_m zu bestimmen. Anhand der halben Kurvenbreitebreite der Endotherme ($\Delta T_{1/2}$) kann ein Eindruck zur Kooperativität der Proteinentfaltung gewonnen werden.

5.3 Bewertungskriterien der DSF-Methode

Nach erfolgreicher Datenanalyse lassen sich folgende Parameter direkt aus der Messung ableiten:

a) Wendepunkt des Schmelzüberganges (T_m):

- Der Wendepunkt des Schmelzüberganges (T_m) ist der wichtigste Parameter der sich aus einem DSIF-Experiment gewinnen lässt. Je höher T_m ist, desto mehr Energie ist für die Entfaltung des Proteins nötig und umso stabiler ist somit das Protein.
- Wenn mehrere Wendepunkte gemessen werden, entfalten Bereiche in einem Protein unabhängig voneinander. Es lassen sich somit ebenfalls Informationen zur relativen Anzahl der intramolekularen Wechselwirkungen und zum Packungsgrad eines Proteins gewinnen.
- Durch Vergleich der T_m lässt sich die Proteinestabilität in Testlösungen optimieren.

b) Temperatur zu Beginn der Proteinentfaltung (T_{on}):

- T_{on} lässt sich zur Beurteilung der Stabilität und Packung der Proteinstruktur heranziehen