

STUDI DI DENATURAZIONE E RINATURAZIONE SULL'EMOCIANINA DI *CARCINUS AESTUARI*

R. Favilla[°], F. Del Signore[°], A. Mazzini[°], P. Di Muro^{*}, M. Beltramini^{*} e B. Salvato^{*}

[°]Unità INFM, Dip. Fisica, Univ. PR; ^{*}Dip. Biologia, Univ. PD

Le emocianine sono proteine trasportatrici di ossigeno in molluschi e artropodi, legandolo a 2 atomi di rame nel sito attivo. Noi abbiamo studiato la denaturazione indotta da cloruro di guanidina (GuHCl) delle 2 forme olo e apo di una subunità 5S non riassociabile (75 kD), preparata dalla proteina nativa di *Carcinus* a.. Le misure sono state effettuate mediante tecniche di spettroscopia ottica (assorbimento (ABS), fluorescenza (FLU), dicroismo circolare (CD) e diffusione della luce (LS)).

1) Denaturazione

A) Misure all'equilibrio: le curve di denaturazione permettono di valutare la stabilità della proteina, sia nei confronti dell'agente denaturante ($C_{1/2}$) che del tampone usato (ΔG_u) e la cooperatività della transizione (m):

	ΔG_u (Kcal/mole)	m (Kcal/mole/M)	$C_{1/2}$ (M)
olo:	4.8	2.9	1.7
apo:	2.8	1.2	2

(Dati ottenuti da misure di FLU in Tris 50 mM, pH 7 a 20 °C).

Misure di controllo in funzione della forza ionica (NaCl) non mostrano variazioni apprezzabili di FLU, ma apo precipita a sale >2M. L'uso di ANS come probe estrinseco suggerisce una struttura simile ad un molten globule (MG) per apo in tampone, mentre per olo solo attorno a 1.5 M GuHCl.

B) Misure cinetiche: le cinetiche di denaturazione sono bifasiche, con velocità e ampiezze crescenti con [GuHCl]. Con olo appare una fase di lag intermedia a [GuHCl] > 3M in FLU, mentre in CD (lontano UV) manca la fase veloce, suggerendo una rapida perdita di ossigeno e/o rame dal sito attivo prima della struttura II. L'andamento osservato con la forma olo è stato simulato mediante un modello cinetico a 4 specie.

2) Rinaturazione

La rinaturazione di olo è difficile da studiare, in quanto la proteina denaturata, messa in condizioni di refolding, tenda ad aggregare anche a concentrazioni molto basse (<1 μ M), mentre la forma apo nelle stesse condizioni presenta una tendenza molto minore, con maggior recupero delle proprietà spettroscopiche originali (studi ancora in corso).