

# Denaturazione delle proteine

La struttura terziaria/quaternaria di una proteina a cui è associata la funzione della proteina viene definita **STRUTTURA NATIVA** della proteina

## LA DENATURAZIONE E' UN PROCESSO REVERSIBILE

Le proteine globulari, una volta denaturate, possono **riacquistare** la loro **struttura nativa** e la loro attività biologica se vengono riportate nelle **condizioni** in cui la **conformazione attiva** è **stabile**

## RINATURAZIONE

E' la **prova** più importante a **supporto** del concetto che la **struttura terziaria** di una **proteina globulare** è determinata dalla sua sequenza amminoacidica

# Agenti denaturanti chimici e fisici

Esponendo una proteina nella sua Struttura Nativa a particolari agenti chimici o fisici detti **DENATURANTI** la struttura terziaria/quaternaria della proteina viene scompaginata con conseguente perdita della funzione.

Agenti FISICI denaturanti: CALORE

(CONGELAMENTO)

Agenti CHIMICI denaturanti : VALORI ESTREMI di pH  
( $< 4 - 5$  o  $> 9$ )

AGENTI DENATURANTI

# Denaturazione delle proteine mediante l'uso di agenti chimici

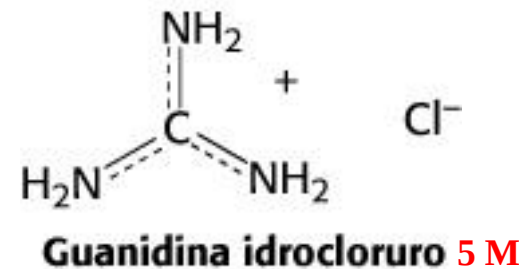
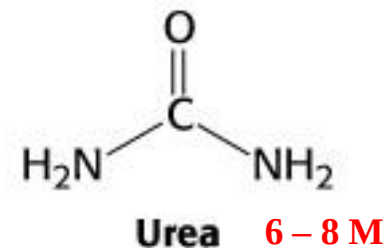
## Gli agenti caotropici

Gli agenti chimici quali **urea** e **cloruro di guanidinio** **interferiscono** nella rete di **interazioni deboli** ed **interazioni idrofobiche** responsabili della struttura nativa delle proteine.

- 1- Alterano il normale **reticolo** di **legami H** dell'**acqua**;
- 2- Interferiscono con la formazione di **gabbie di molecole d'acqua** attorno alle **catene idrofobiche**;
- 3- **Solubilizzano** il **core idrofobico** delle proteine.

Denaturano le proteine mantenendole **solubili** in **soluzione acquosa**

Gli agenti caotropici possono essere **separati** dalla **proteina** mediante **diluizione** della loro **concentrazione** consentendo la **rinaturazione** della proteina



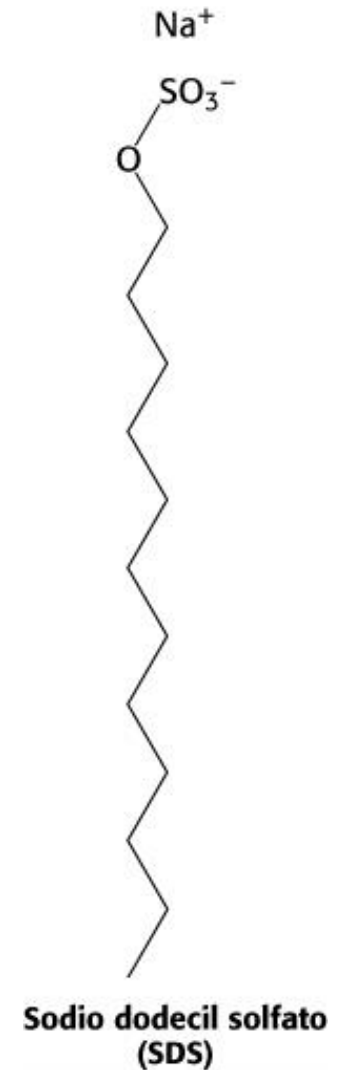
# Detergenti

Si associano ai **residui apolari** di una proteina interferendo nelle **interazioni idrofobiche** che stabilizzano la struttura nativa di una proteina

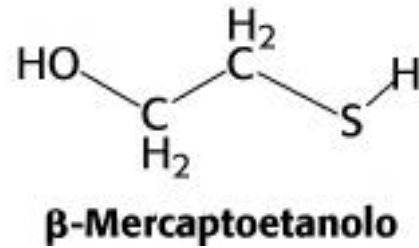
**SDS** è una molecola **anfipatica** che si lega alle proteine denaturandole e **mantenendole solubili** in **soluzione acquosa**

Il **complesso SDS-proteina** ha una **carica netta negativa** a causa dei gruppi **SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** che mascherano le cariche della proteina

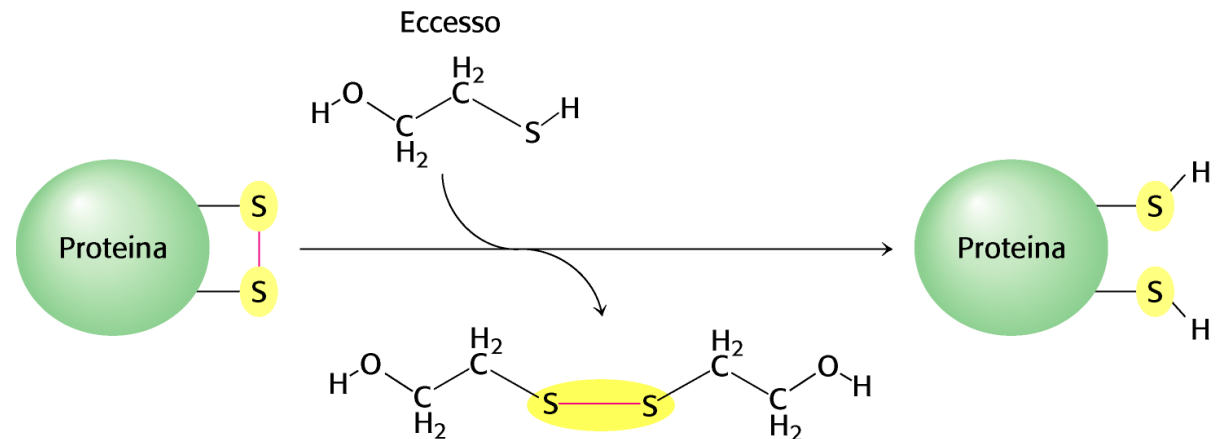
SDS **non** si **dissocia facilmente** dalle proteine



# Riduzione dei ponti disolfuro Mediante agenti chimici



Il **β-mercaptoetanolo**  
è un **agente riducente**  
capace di ridurre i **ponti**  
**disolfuro**



# Effetti della temperatura

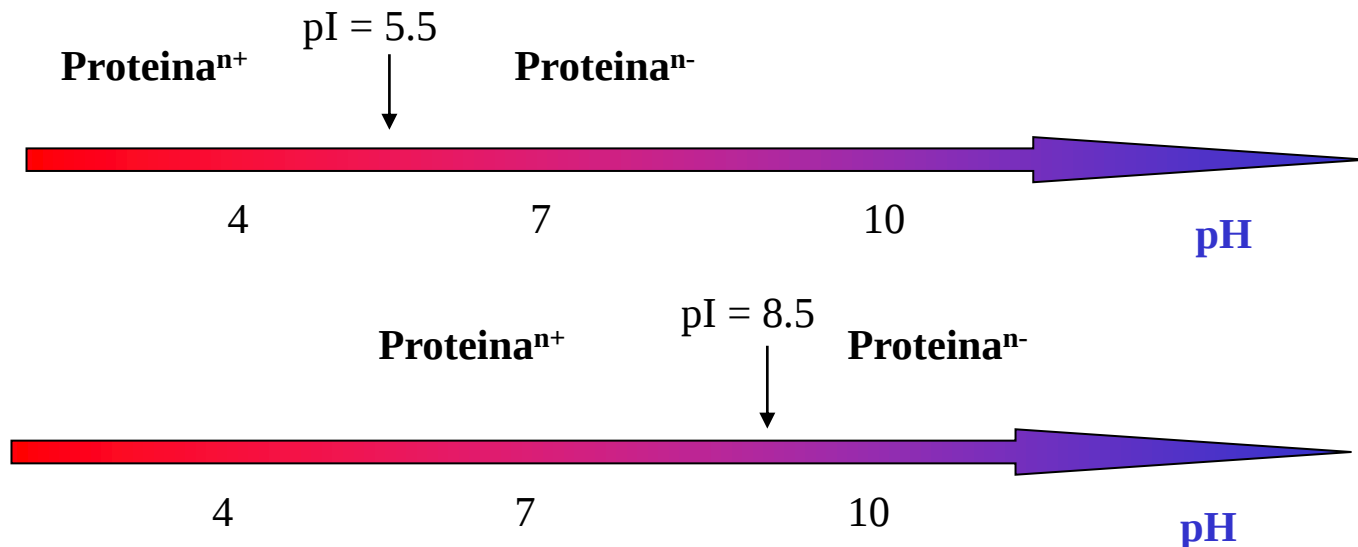
Gli estremi di temperatura causano **alterazioni conformazionali** dovute all'alterazione delle **interazioni deboli** che stabilizzano la struttura tridimensionale delle proteine

## Effetti del pH

Le variazioni del pH determinano una **variazione degli stati di ionizzazione** delle **catene laterali** degli amminoacidi, cambiando in tal modo la distribuzione delle cariche nella proteina ed **interferendo** nella formazione dei **legami deboli**

Il **punto isoelettrico (pI)** di una proteina corrisponde al valore di **pH** al quale la **carica netta** della proteina (somma delle cariche positive e negative) è pari a **zero**.

### La carica netta della proteina cambia in funzione del pH



# Il Ripiegamento e la Denaturazione delle proteine sono processi cooperativi

La denaturazione di una proteina consiste **nell'interruzione dei legami non covalenti** che stabilizzano la struttura della proteina. Se sono presenti **ponti disolfuro** è necessario **ridurli** per denaturare completamente una proteina.

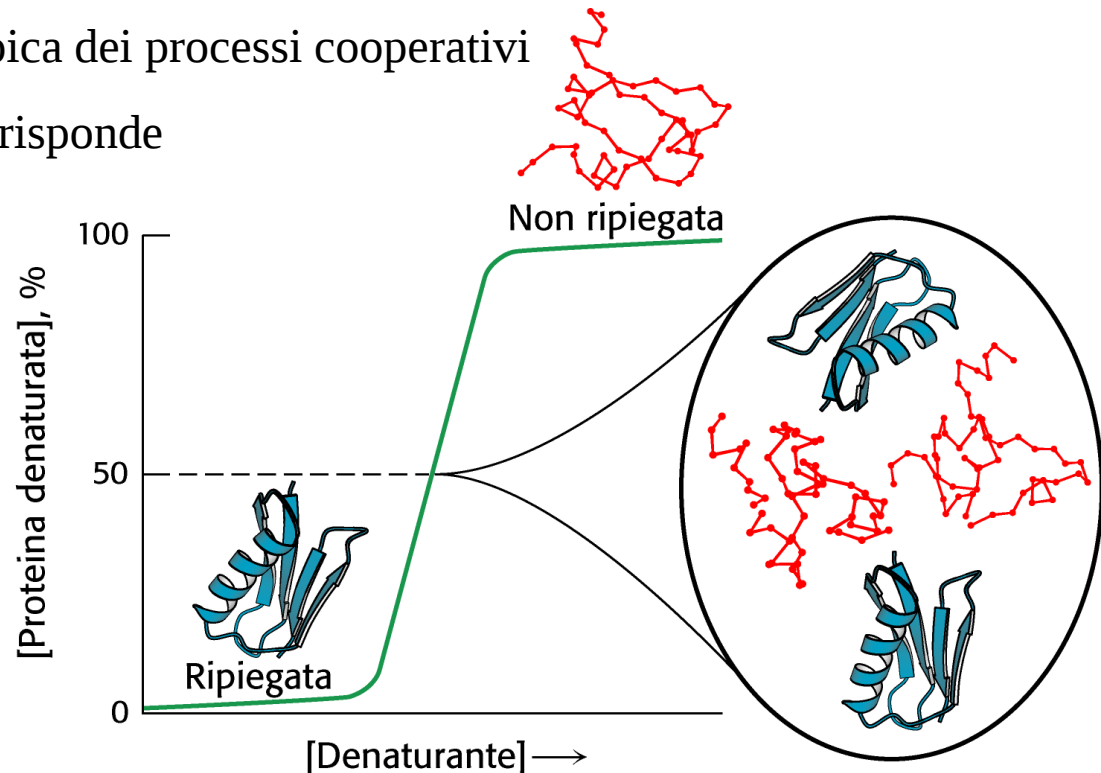
## Temperatura, pH, Forza ionica, solventi organici, agenti denaturanti

- La denaturazione di una proteina è un **fenomeno cooperativo**
- Curva con andamento **sigmoide** tipica dei processi cooperativi
- **$T_m$**  , **Temperatura di fusione**, corrisponde

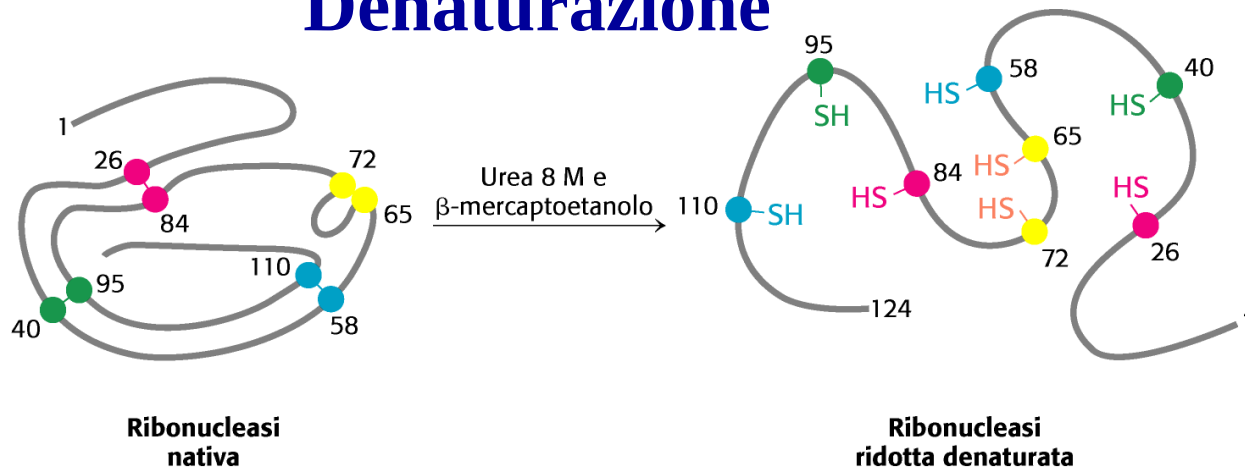
al punto di **flesso della curva**

**50% di denaturazione**

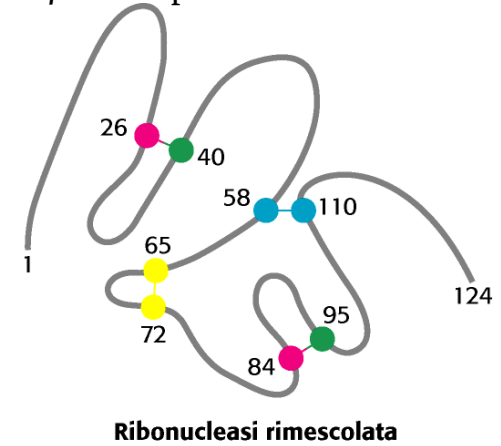
**Transizione  
netta**



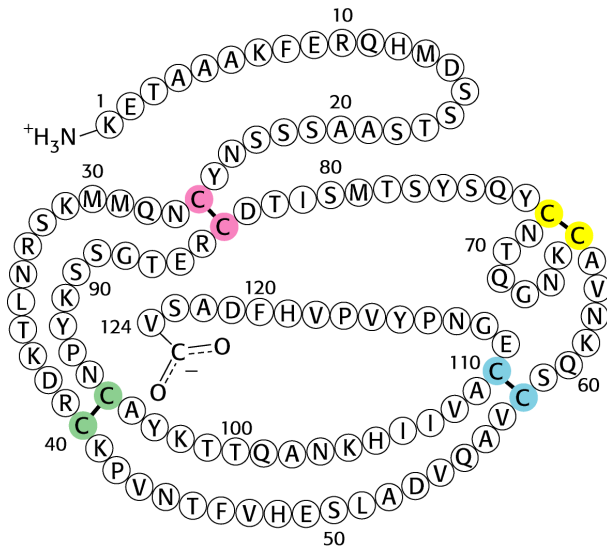
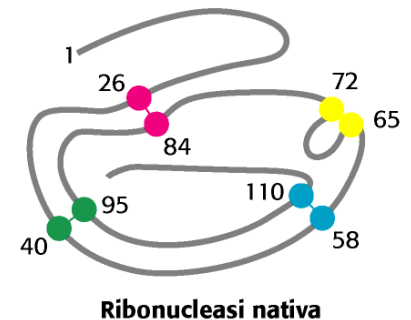
# Denaturazione



Rimozione dell'urea e del  $\beta$ -mercaptoetanolo



Tracce di  $\beta$ -mercaptoetanolo



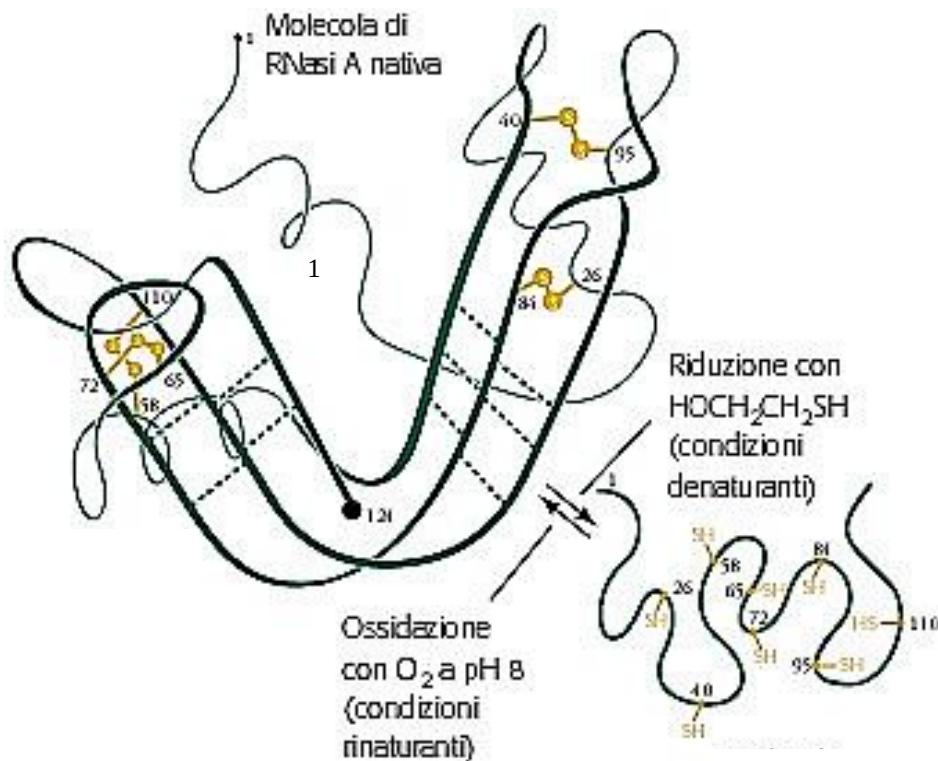
# Rinaturazione

# Denaturazione e Rinaturazione

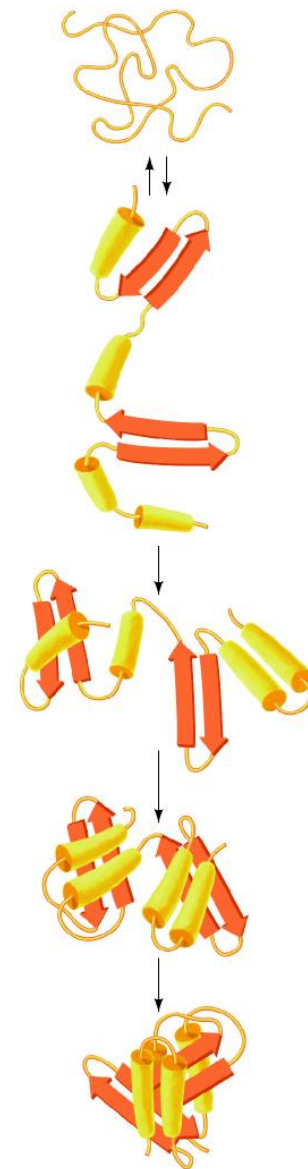
**Denaturazione riduttiva e  
rinaturazione ossidativa**

della RNasi A

**Molecola  
nativa  
ossidata**



**Molecola  
denaturata  
ridotta**



Ipotetica via di ripiegamento di  
una proteina