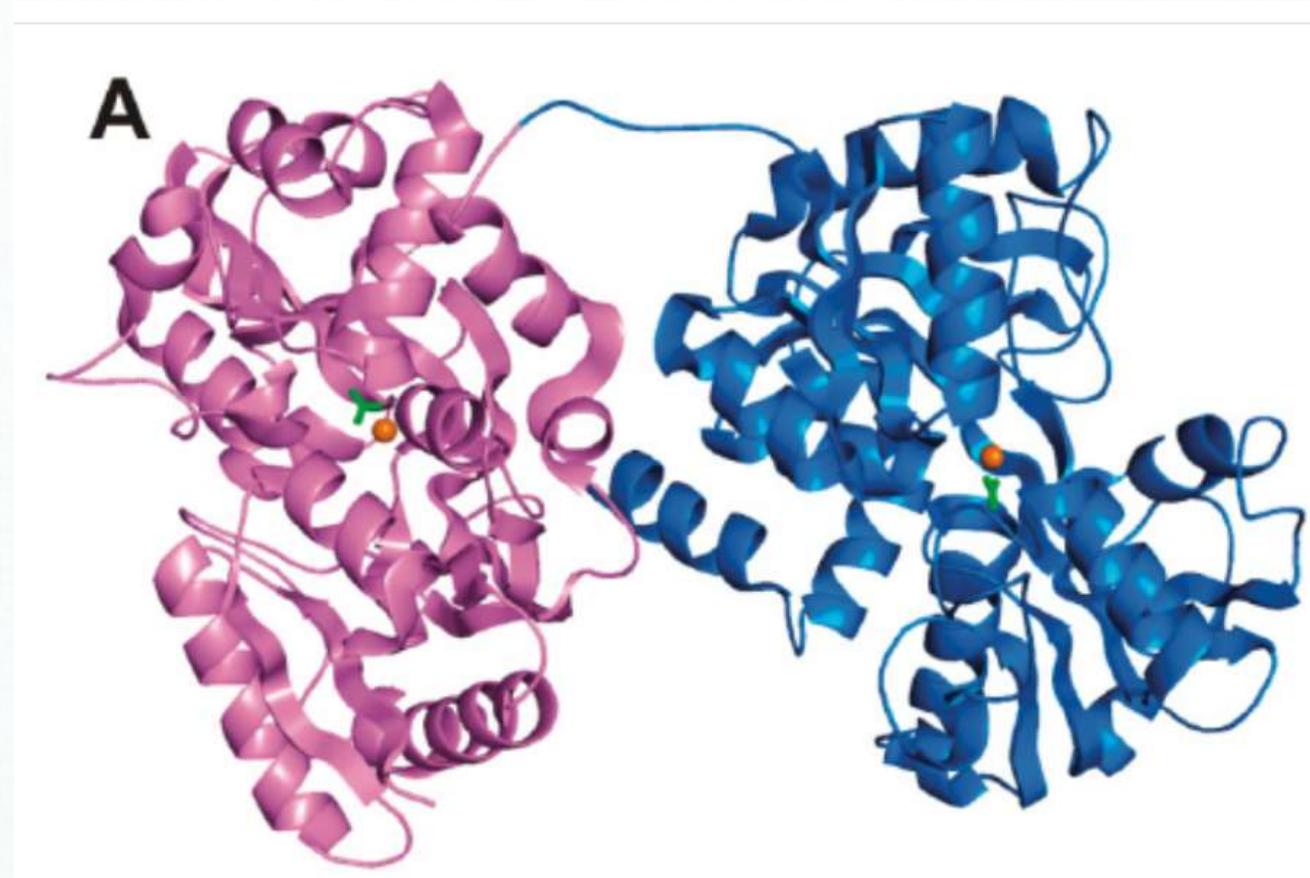


PROTEINE –NANOPARTICELLE ATTIVE NEGLI ORGANISMI VIVENTI

PROF. GABRIELLA TORDI, ANNA SANETTI, GIANPIERO GIANNETTI
SCUOLA DEL RE A.S. 2021/2022

ovotransferrina



STRUTTURA E ATTIVITÀ NELLE PROTEINE

UNA PROTEINA NELLA SUA CONFORMAZIONE 3D FISIOLÓGICA È DETTA NATIVA

TALE CONFORMAZIONE 3D È STRETTAMENTE CORRELATA ALLA SUA ATTIVITÀ

BIOLOGICA

SE PERDE LA SUA CONFORMAZIONE NATIVA È DETTA DENATURATA

LA DENATURAZIONE PUÒ INDURRE LA **PERDITA DELLA FUNZIONE BIOLOGICA**

Denaturazione	effetto
Denaturazione con etanolo	L'etanolo diminuisce la polarità del mezzo in cui si trova la proteina. Compete con l'acqua per le interazioni idrofile con i gruppi R polari degli aminoacidi i quali si spostano verso l'interno della proteina, modificando la conformazione della proteina
Denaturazione con urea	Interazione indiretta: l'urea si sostituisce alle molecole di acqua nell'interazione con i gruppi R degli aa Interazione diretta: l'urea forma legami a H con i legami peptidici, ciò indebolisce i legami e le interazioni intermolecolari, indebolendo le strutture secondarie e terziarie
Denaturazione con NaCl	Altera la forza ionica ed altera ed indebolisce i legami secondari
Denaturazione con Acidi e basi	I ponti salini presenti nelle proteine dovuti alla combinazione di legami a idrogeno e interazioni elettrostatiche tra l'anione RCOO^- e lo ione ammonio RNH_3^+ contribuiscono alla struttura di una proteina. La presenza di acidi o di basi rompe i ponti salini con conseguente denaturazione
Denaturazione meccanica	Rottura meccanica dei legami deboli



IL NOSTRO OBIETTIVO È STATO QUELLO DI

**INDURRE DENATURAZIONI CHIMICHE E MECCANICHE
CHE POTESSERO MODIFICARE UNA FUNZIONE SPECIFICA DI UNA PROTEINA**

*PROTEINE A BASSO COSTO E DI FACILE REPERIBILITÀ SONO STATE LE PROTEINE
DELL'UOVO*

IN PARTICOLARE DELL'ALBUME



LE PROTEINE DELL'ALBUME

SONO RAGGRUPPABILI IN TRE CLASSI PRINCIPALI

- **ALBUMINE** (OVALBUMINE A 1 E A 2, CONALBUMINA);
- GLICOPROTEINE (OVOMUCOIDE E OVOMUCINA);
- GLOBULINE(G 1 -LISOZIMA, G 2, G 3).

SONO INTERESSANTI PERCHÈ

LE PROTEINE DELL'ALBUME SONO ALTAMENTE FUNZIONALI
POICHÈ POSSIEDONO ATTIVITÀ BIOLOGICHE TRA CUI
ANTIMICROBICA, ANTIOSSIDANTE, **CHELANTE DEI METALLI**,
ANTIIPERTENSIVA ED IMMUNOMODULANTE

CONTENUTO PROTEICO DELL'ALBUME D'UOVO

Proteina	%	Funzione
Ovoalbumina	54	Nutriente , coagulante, blocca gli enzimi digestivi
Conalbumina o ovotransferrina	13	Potere coagulante e fissazione del ferro e flavoproteina
ovomucoide	11	Blocca gli enzimi digestivi, in particolare la tripsina
Ovoglobulina	8	Potere montante (schiumogeno)
Lisozima	3,5	Digerisce la parete batterica, potere montante
Ovomucina	1,5	Responsabile dell'albume denso, stabilizza la schiuma, azione antivirale
Flavoproteina	0,8	Lega e trasporta la riboflavina dal sangue all'uovo
Avidina	0,05	Lega la biotina impedendone l'assorbimento intestinale
Altre proteine	8,15	

ALBUMINE

- LE ALBUMINE SONO LE PROTEINE PIÙ NOTE E PIÙ FACILMENTE ACCESSIBILI; ESSENDO MOLTO DIFFUSE SOPRATTUTTO NEL REGNO ANIMALE
- NEL ALCUNE LORO PROPRIETÀ CARATTERISTICHE SONO: LA SOLUBILITÀ IN ACQUA, LA COAGULABILITÀ COL CALORE E LA POSSIBILITÀ DI DAR LUOGO PER SCISSIONE A TUTTI GLI AMINOACIDI, SONO QUINDI PROTEINE COMPLETE E DI ALTO VALORE BIOLOGICO
 - LE PRINCIPALI ALBUMINE ANIMALI SONO: LE OVOALBUMINE (O ALBUMINA DELL'UOVO) E LA SIEROALBUMINA, LATTOALBUMINA (O ALBUMINA DEL LATTE)
- UNA CARATTERISTICA DELLE ALBUMINE ANIMALI È DI AVERE UN **ALTO CONTENUTO DI ZOLFO**, ED UNA NOTEVOLE PERCENTUALE DI AMINOACIDI CISTINA E METIONINA

Caratteristiche delle albumine di combinarsi con alcuni metalli

- Sia per formare i cosiddetti **albuminati** cioè Sali di metalli
Le sostanze albuminoidi, quando vengono a contatto coi sali dei metalli pesanti, danno origine a composti la cui azione tossica viene molto diminuita. Queste ultime, somministrate in sospensione acquosa negli avvelenamenti determinati da tali metalli pesanti funzionano adunque come **antidoti**
- Sia per formare dei **complessi chelati con ferro o rame**. Anche tale azione chelante viene utilizzata contro le intossicazioni da metalli pesanti come il ferro

conalbumina o ovotransferrina

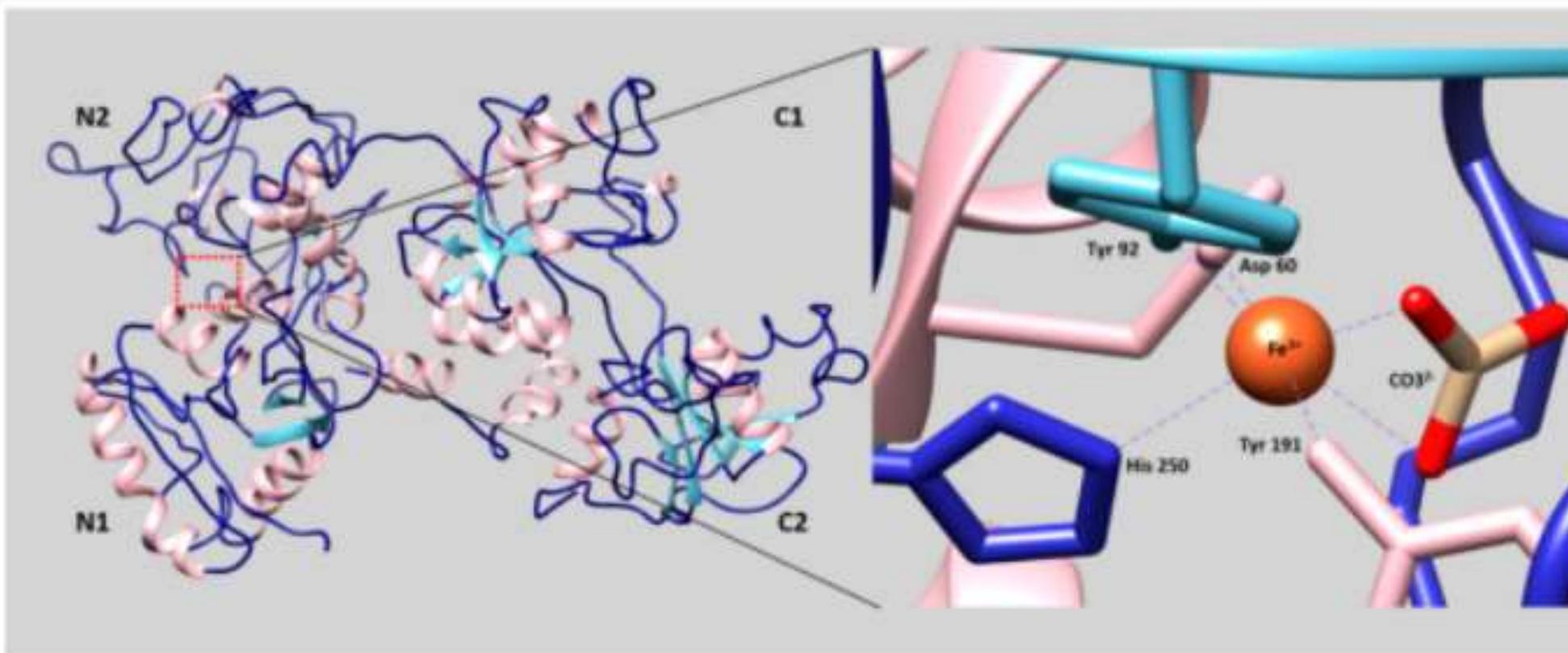
- È una proteina presente nell'albume con proprietà antivirali, antibatteriche, antiossidanti e antinfiammatorie, ha applicazioni industriali e farmaceutiche.
- **La conalbumina ha la proprietà di fissare il ferro**, formando un **complesso di colore rosa**, analogamente alla siderofillina, cui si riavvicina anche per le caratteristiche immunologiche
- Può essere integrata al latte bovino destinato ai neonati, per migliorarne il contenuto di ferro e le proprietà antibatteriche, ed è uno degli ingredienti degli integratori del ferro

L'attività antimicrobica è associata alla sua capacità chelante in quanto riduce la quantità di metalli disponibili nel mezzo necessari come cofattori nelle reazioni enzimatiche svolte dai batteri.

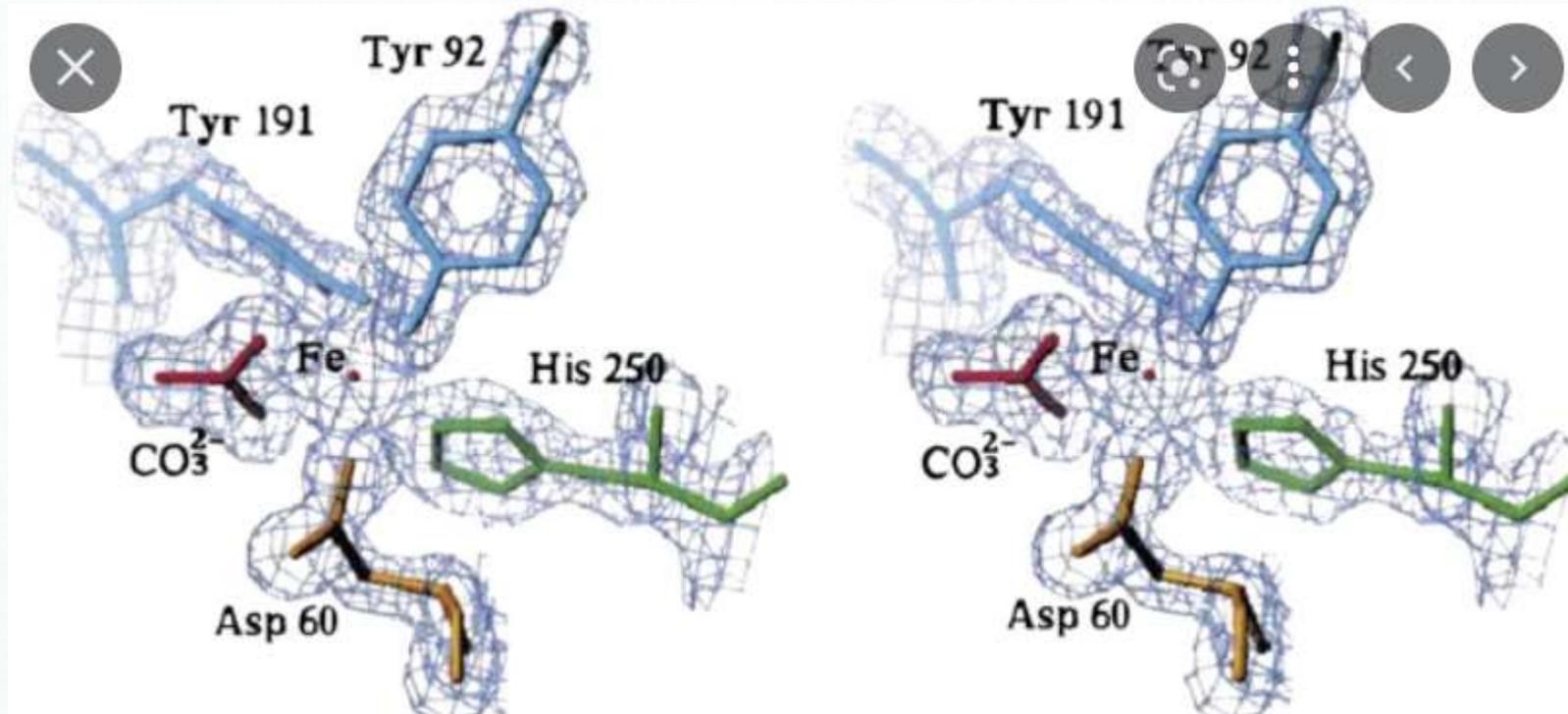
- Rappresenta il 13% dell'albume totale su base secca
- il suo punto isoelettrico è 6,1,
- ha un peso molecolare di 76.000 da
- ed è una glicoproteina che forma complessi con Fe (capacità chelante)
- è costituita da un'unica catena polipeptidica di 686 residui proteici

Struttura dell'ovotransferrina

Figura 1. Rappresentazione della struttura terziaria dell'ovotransferrina. I sottodomini di ciascun lobo sono indicati da N1, N2, C1 e C2. A sinistra, un ingrandimento del sito di legame del lobo N mostra il legame del ferro con i suoi sei leganti. Le immagini sono state prodotte utilizzando il pacchetto chimera UCSF [45] dalla struttura terziaria dell'ovotransferrina (ID PDB: 1AIV) [42].



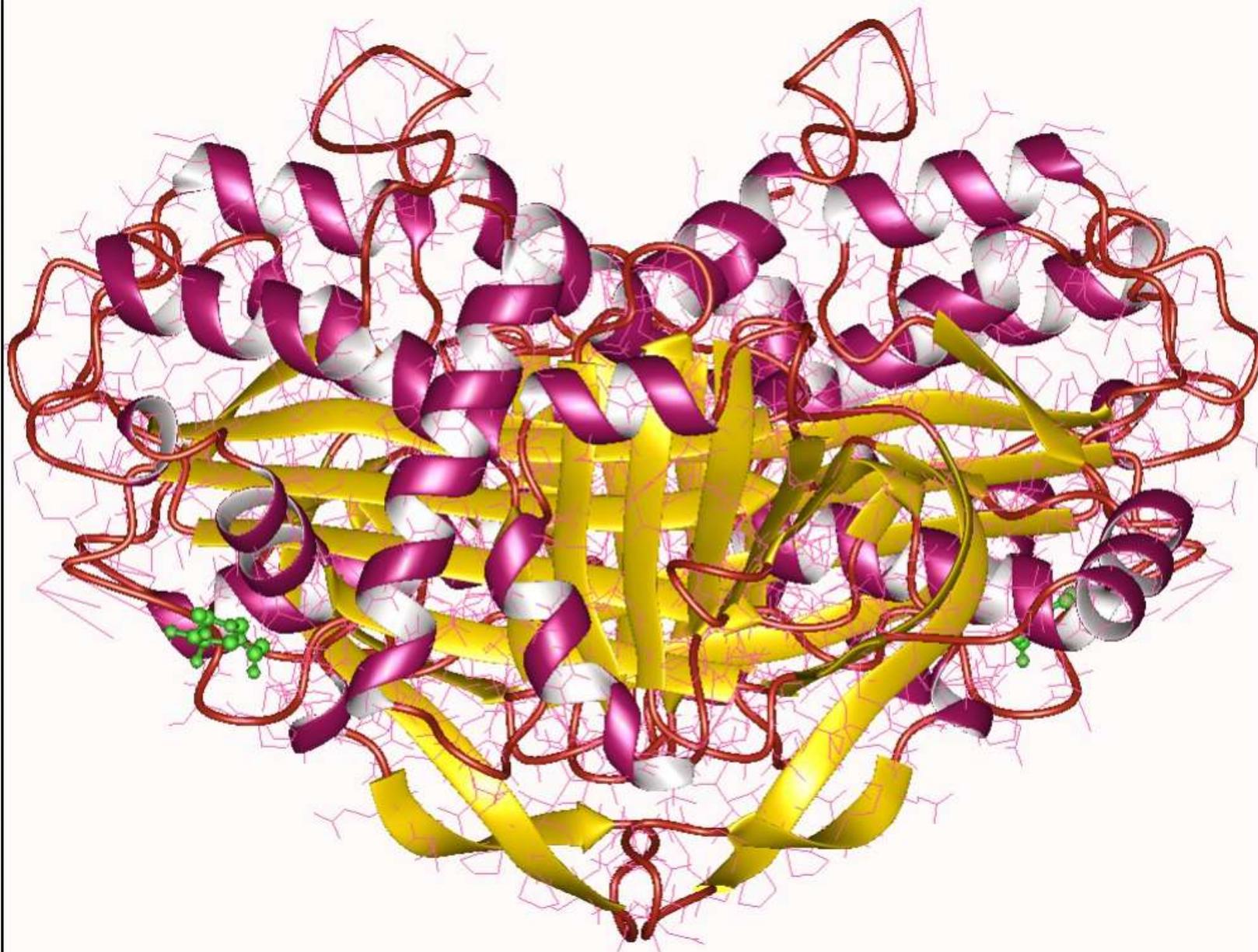
Il sito di legame del ferro dei lobi N e C dell'ovotransferrina



Struttura dell'ovoalbumina

Nei casi speciali di intossicazione per metalli pesanti (come il ferro) si possono amministrare dosi di ovoalbumina, che per la presenza di **ioni solfidrici cattura gli ioni dei metalli pesanti**.

La sua coagulazione dopo il processo di assorbimento previene quello dei metalli nel tratto gastrointestinale evitando l'avvelenamento



Lavoro sperimentale

Si è concentrato sull'evidenza sperimentale che l'albume è una soluzione di nanoparticelle sia con **l'effetto Tyndall** sia con la **luminescenza**

E sulla **denaturazione chimica e fisica** che evidenzi come l'attività biologica di una proteina sia strettamente correlata alla sua struttura nativa sia come tale attività possa essere modulata dall'esterno

METODI

Campioni di 3ml:

- Albume
- Albume diluito (1:1)

Saggi di attività proteica chelante:

- cloruro ferrico 0,5M (0,5ml)
- nitrato rameico 0,2M (0,5ml)

Alterazioni ambientali con aggiunte di:

- NaCl (mg)
- Urea
- Alcol etilico (0,5 ml)
- NaOH 1M (fino a pH=14)
- HCl 1M (fino a pH=2)
- aceto commerciale (fino a pH=6)

Azione meccanica con frusta manuale

Risultati

Prima fase sperimentale

Caratterizzazione dell'albume

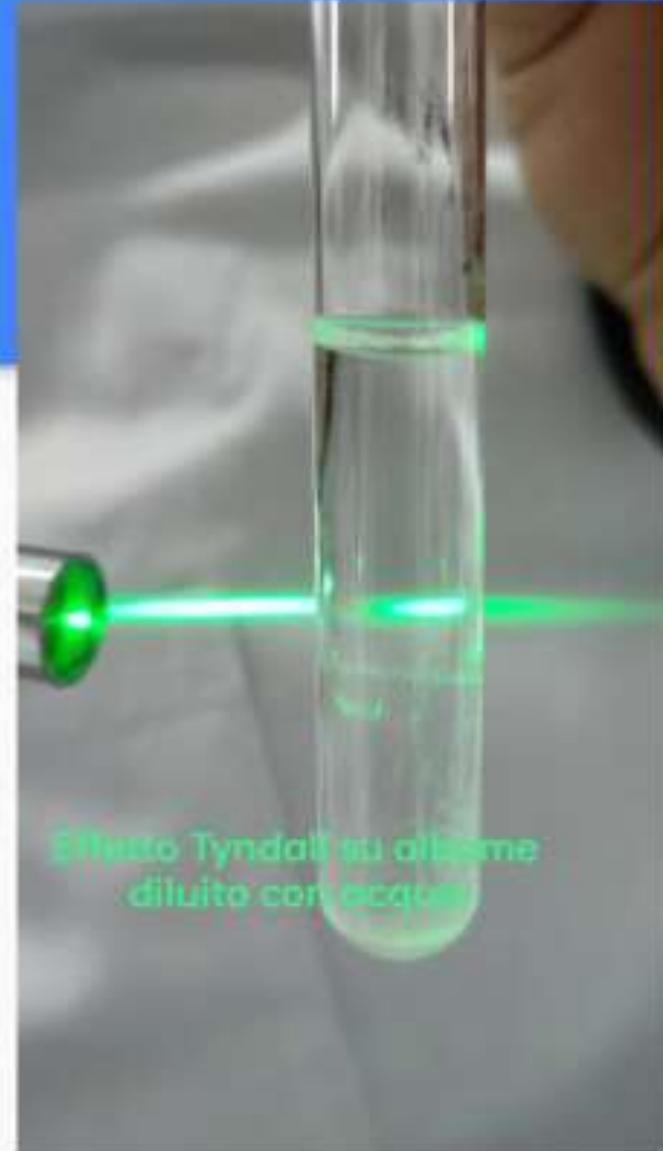




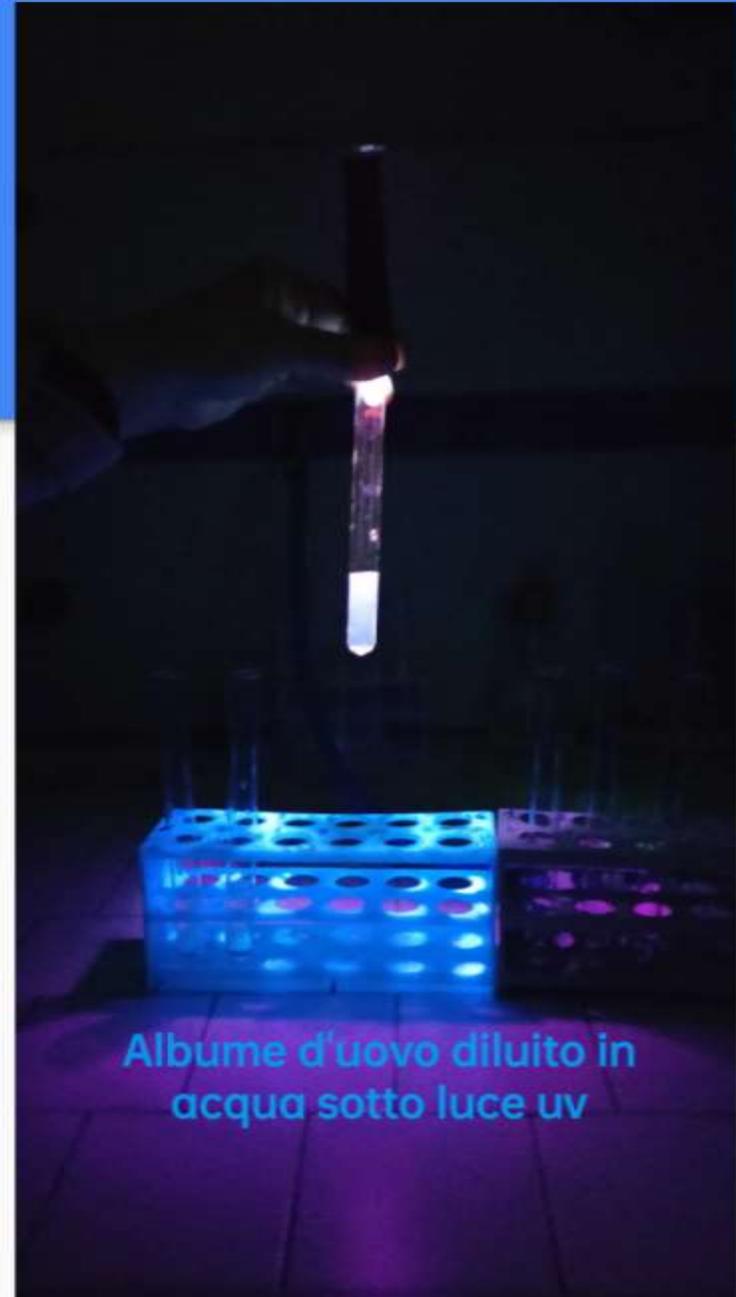
Effetto Tyndall e Luminescenza Campioni casalinghi



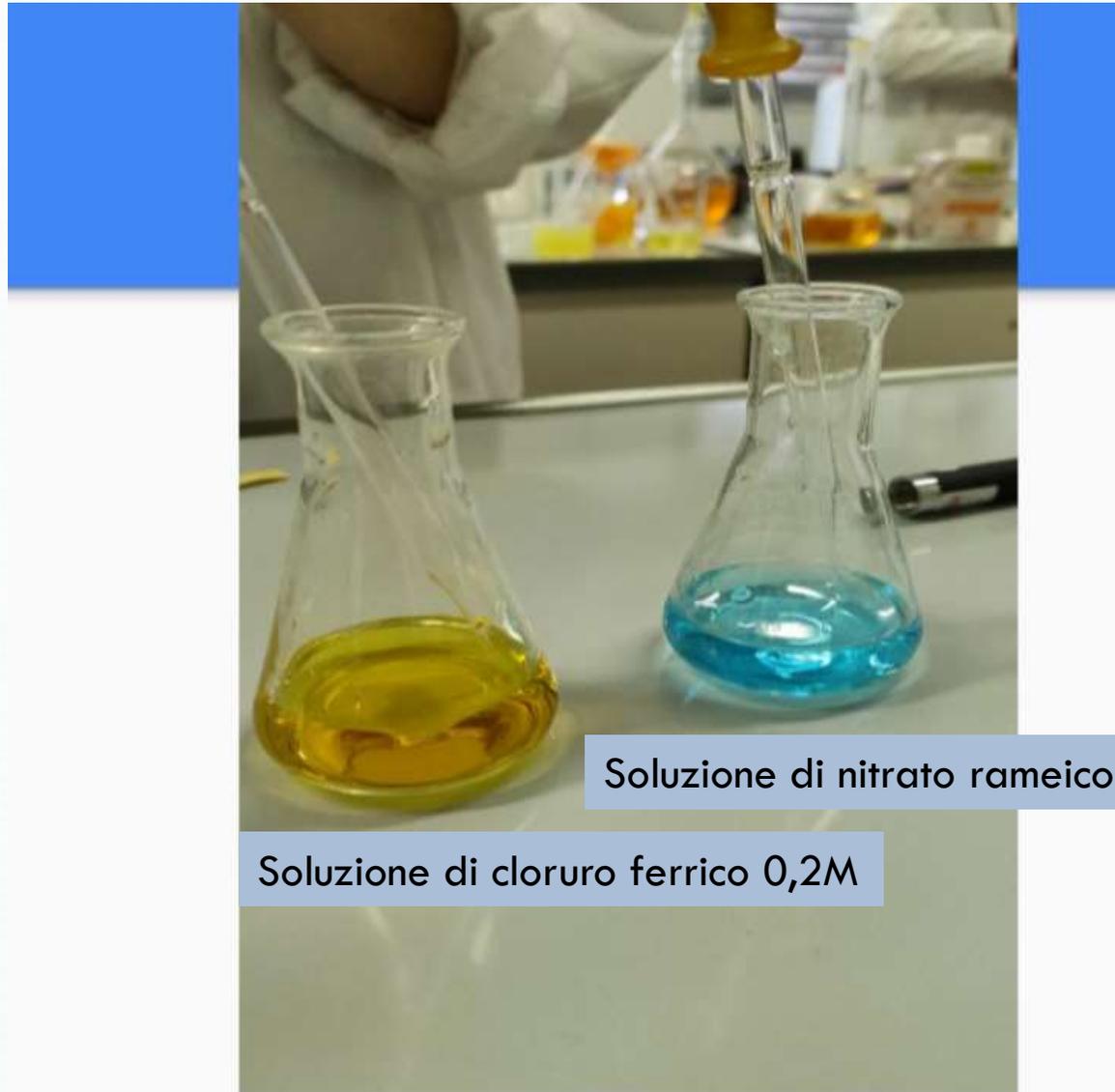
Effetto Tyndall campioni in laboratorio



Luminescenza di Campioni in labortrio



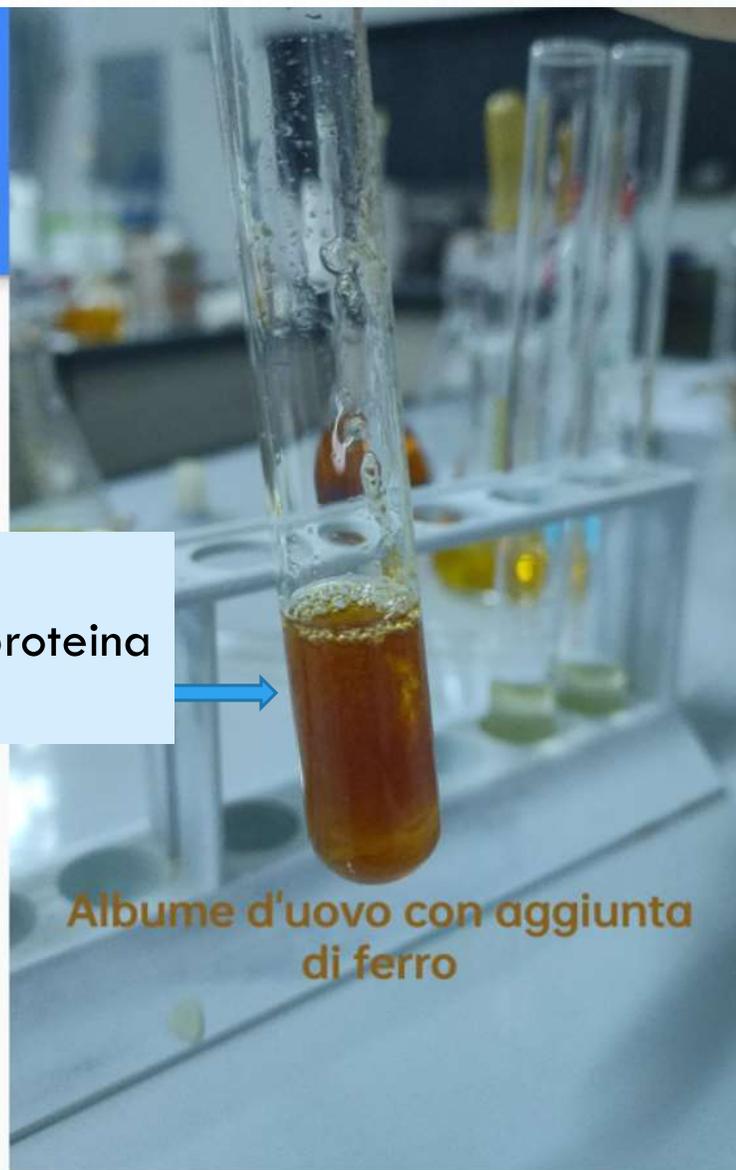
Preparazione di soluzioni di metalli pesanti



Soluzione di nitrato rameico 0,2M

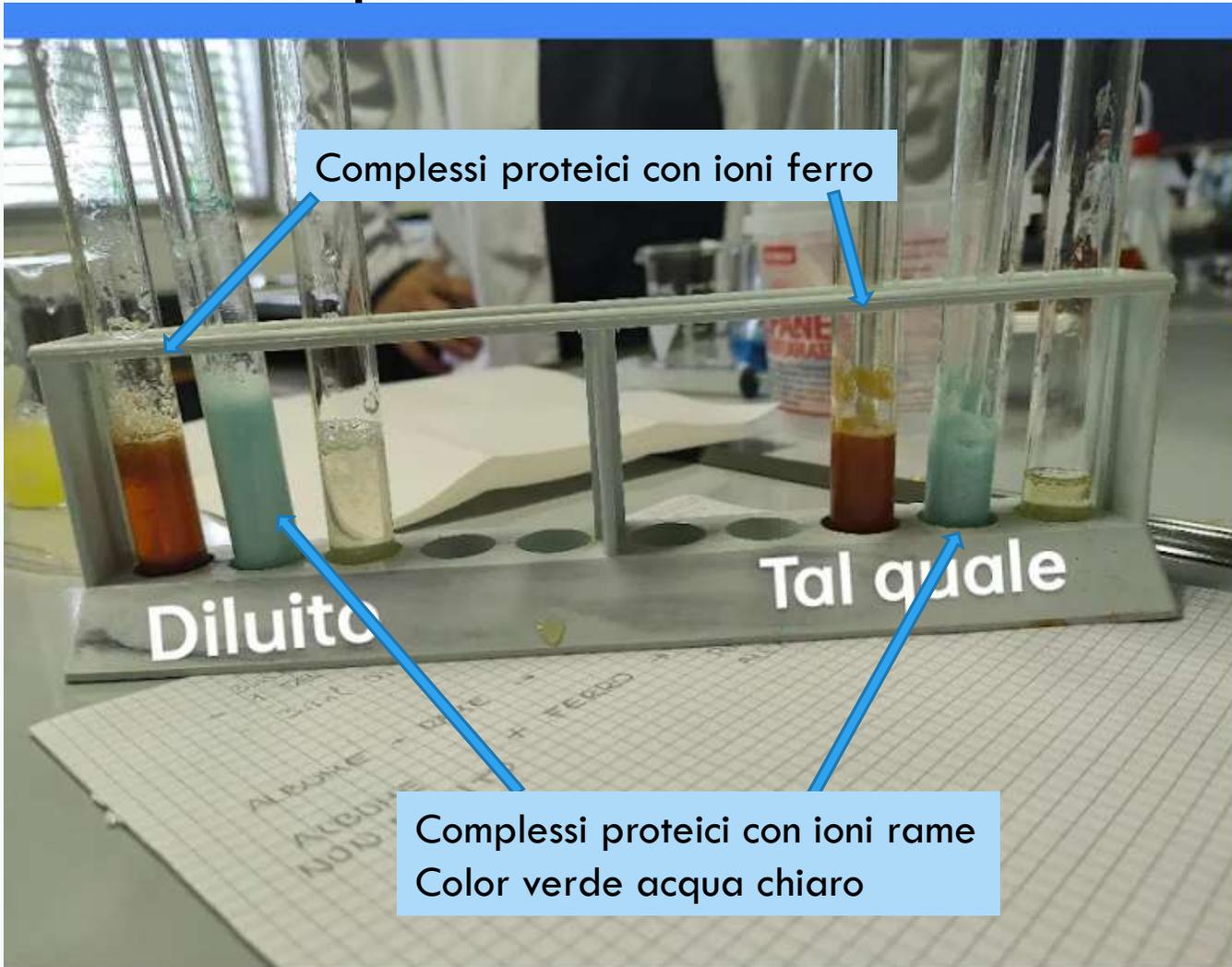
Soluzione di cloruro ferrico 0,2M

Addizione di soluzione di cloruro ferrico ai campioni di albume



Formazione del complesso ferro-proteina
Color ruggine

Addizione di soluzione di cloruro ferrico e nitrato rameico ai campioni di albume



I complessi del ferro sono gelatinosi e rimangono in sospensione

I complessi del rame sono gelatinosi e tendono a precipitare

Addizione di soluzione di cloruro ferrico e nitrato rameico ai campioni di albume esperimento casalingo



+ Fe³⁺: precipitato ruggine



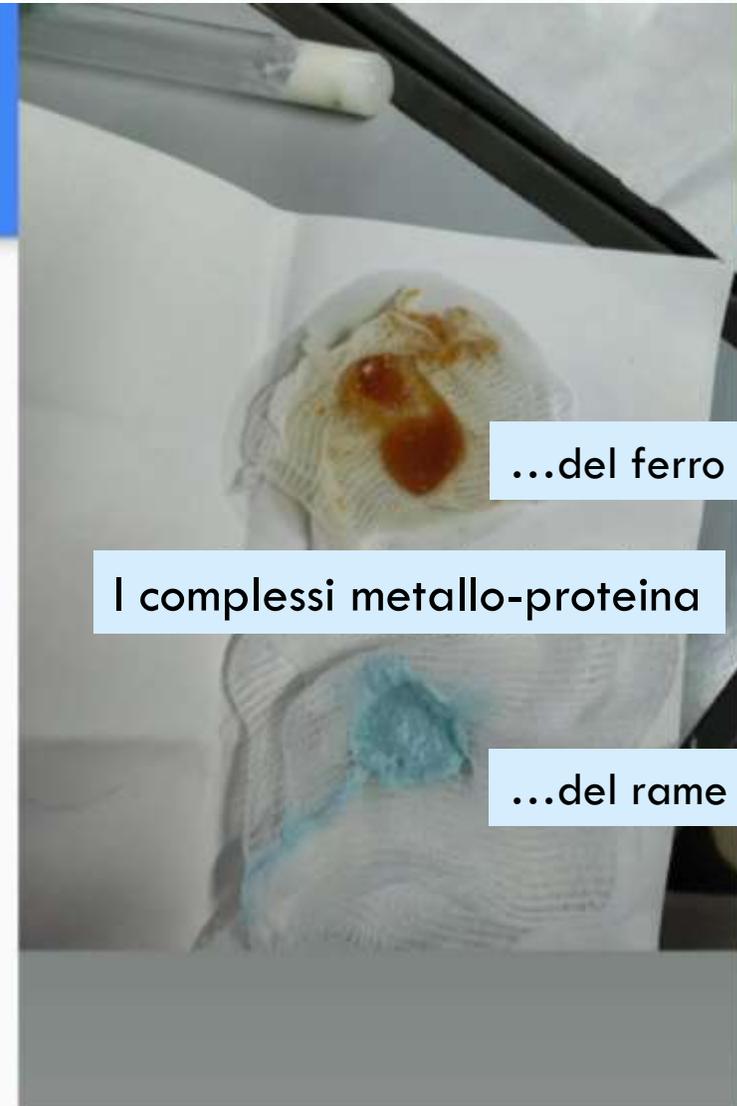
+ Cu(NO₃)₂: precipitato verde celeste

Valutazione stabilità dei precipitati ottenuti



Filtrazione tramite carta
da filtro particolarmente
lenta

Filtrazione tramite garza
Medica
Più veloce



...del ferro

I complessi metallo-proteina

...del rame

Addizione di soluzione di cloruro ferrico e nitrato rameico ai campioni di albume addizionato con NaCl

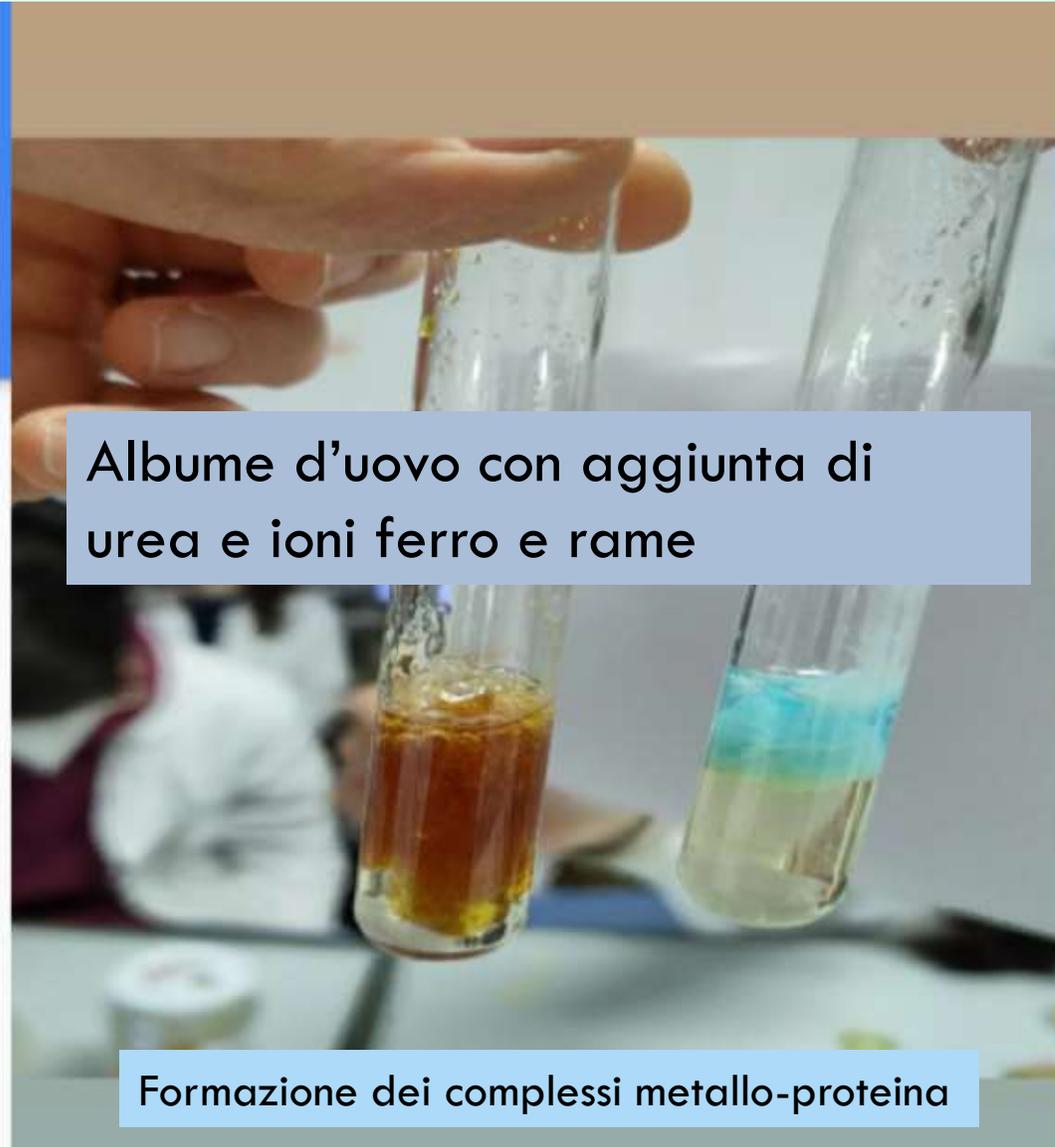


Albume d'uovo con aggiunta di cloruro di sodio e ioni ferro
Formazione di complesso metallico



Albume d'uovo con aggiunta di cloruro di sodio e ioni rame
Formazione del complesso metallico

Addizione di soluzione di cloruro ferrico e nitrato rameico ai campioni di albume addizionato con urea



Albume d'uovo con aggiunta di urea e ioni ferro e rame

Formazione dei complessi metallo-proteina

Albume diluito e addizionato con alcol etilico

The diagram illustrates a two-step process. On the left, a test tube contains a clear, pale yellow liquid. A blue box below it states: "La soluzione si opacizza Probabile effetto denaturante". A blue arrow points from this test tube to a beaker on the right. Above the arrow is a blue box labeled "Aggiunta di ioni ferro". The beaker on the right contains a thick, brown, opaque precipitate. A blue box below it states: "Formazione del complesso metallo-proteina".

Albume diluito in acqua e alcol

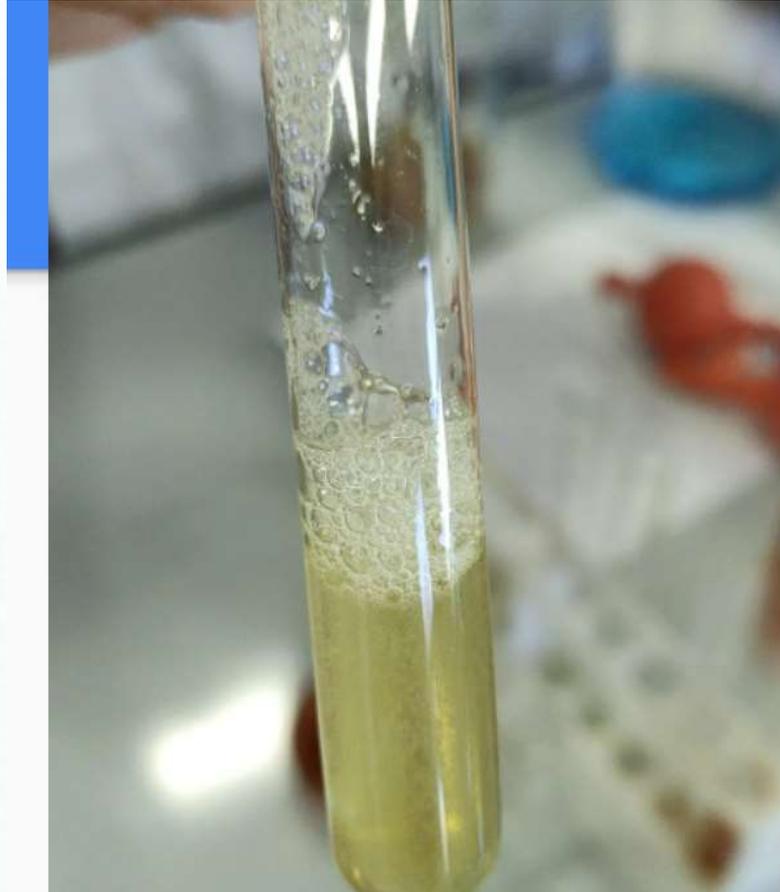
La soluzione si opacizza
Probabile effetto denaturante

Aggiunta di ioni ferro

Formazione del complesso metallo-proteina

Variazioni di pH

Dal pH naturale fortemente basico al pH acido

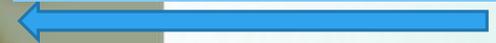


Albumine diluito acidificato
con HCl fino a pH=2

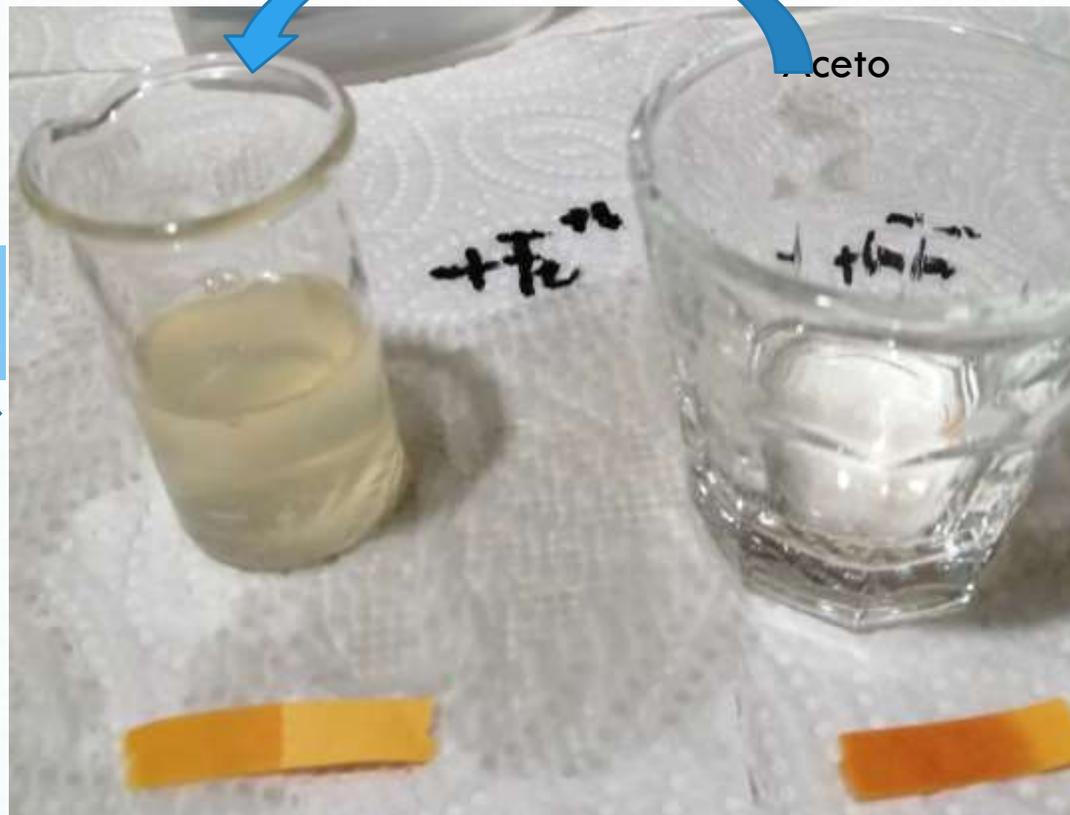


Albumine diluito acidificato
con HCl pH=2 ed
addizionato con ioni ferro

L'aggiunta degli ioni ferro
Non porta ad alcun precipitato



ADDIZIONE DI ACETO AL 6%



L'aggiunta degli ioni ferro
Non porta ad alcun precipitato



La denaturazione con aggiunta di aceto non porta a perdita delle proprietà tipiche delle soluzioni di nanoparticelle

Effetto Tyndall

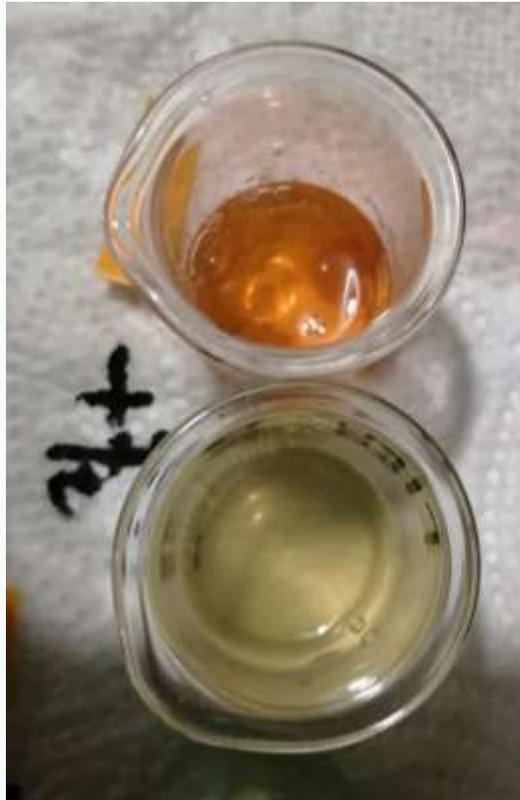
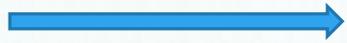


Luminescenza



Soluzioni a confronto di albume naturale e acidificato con aceto

Aggiunta ioni ferro



Aggiunta ioni rame



Variazioni di pH

Aggiunte di NaOH fino a pH=14



Albumi alcalinizzati
Ed addizionato di ioni ferro



Precipita il
complesso metallico

Albumi diluiti alcalinizzati
con NaOH fino a pH=14 ed
addizionato con ioni ferro

+NaOH



Prova in bianco, sulle soluzioni di cloruro ferrico e nitrato rameico per vedere se l'ambiente particolarmente alcalino facesse precipitare dei complessi metallici

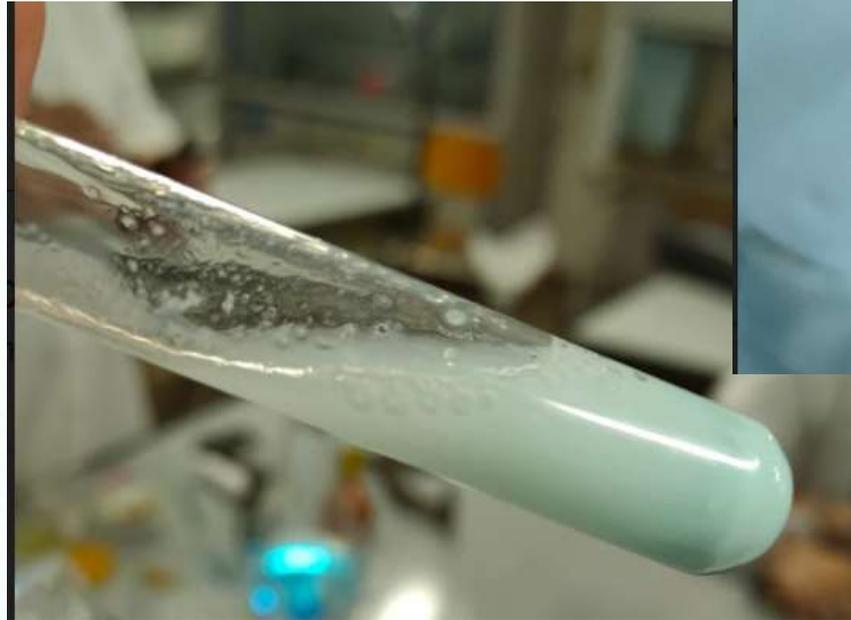
Nessun complesso
metallico



Denaturazione meccanica

Non si hanno precipitati

né con aggiunta di ioni Fe^{3+}
Né con aggiunta di ioni Cu^{2+}



Conclusioni

Lo scopo di poter modulare dall'esterno l'attività metallo-chelante delle proteine dell'uovo non ha sempre sortito gli effetti sperati né modificando la forza ionica con il cloruro di sodio, né indebolendo i legami secondari con alcol etilico o urea né aggiungendo NaOH fino a pH=14

Mentre la denaturazione meccanica e l'aggiunta di acidi sono risultati efficaci per inibire l'azione chelante di tali proteine. In particolare è stato interessante raffrontare i risultati in ambiente acido con il meccanismo di rilascio del ferro delle transferrine di sistemi biologici

L'azione della transferrina di rilasciare il ferro nell'endosoma, è proprio legato all'ambiente acido di tale sito (pH=5/6) in tali condizioni il Fe^{3+} si dissocia dalla transferrina modificando la sua struttura

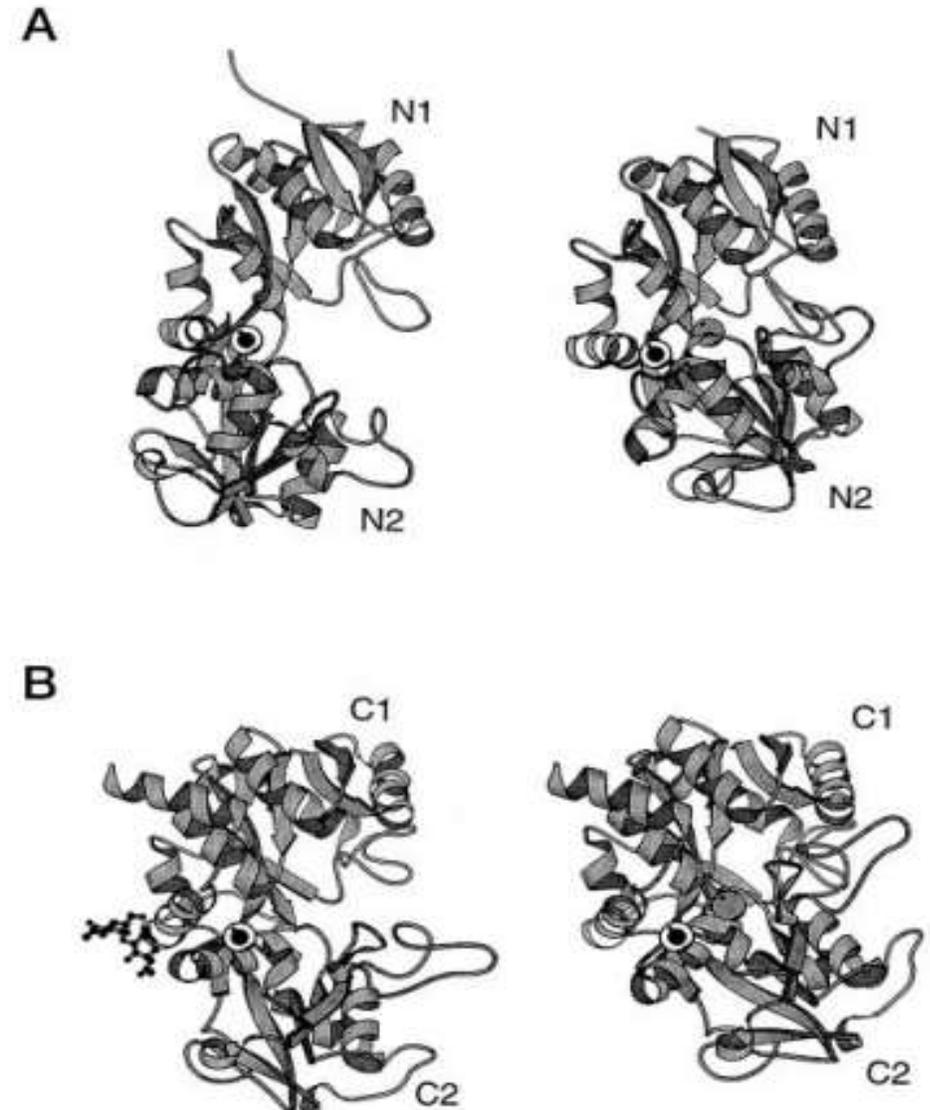
Il legame o il rilascio di Fe^{3+} nella transferrina procede attraverso un meccanismo che coinvolge l'apertura e la chiusura del dominio della proteina a conferma di come la struttura tridimensionale è ancora strettamente correlata all'attività biologica delle proteine

Domini proteici N e C aperti e chiusi

Le transferrine subiscono un cambiamento conformazionale all'assorbimento e al rilascio dei ferri: i domini ruotano come corpi rigidi attorno a un asse che ne consente l'apertura o la chiusura facilitando il rilascio o il legame con il ferro

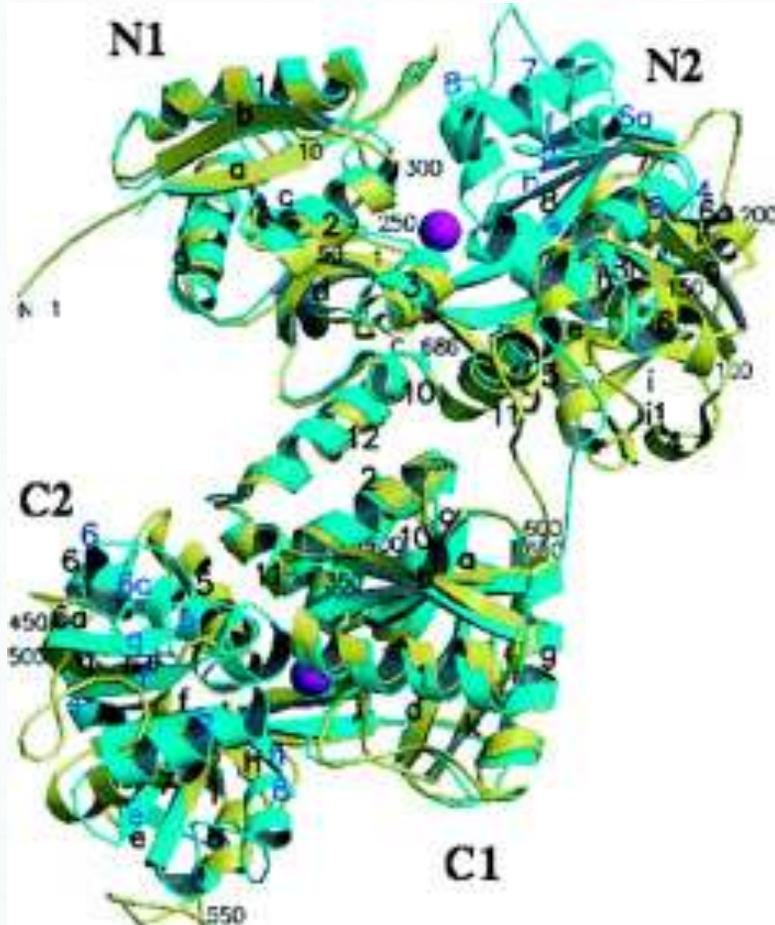
Due residui basici nei due domini formano un insolito legame idrogeno a pH neutro e il legame dovrebbe essere rotto e facilita il rilascio di ferro a un pH basso dell'endosoma.

Per l'ovotransferrina, la cinetica di rilascio del ferro di due lo corrispondono bene al numero di siti di legame anione che si trovano nelle strutture cristalline.

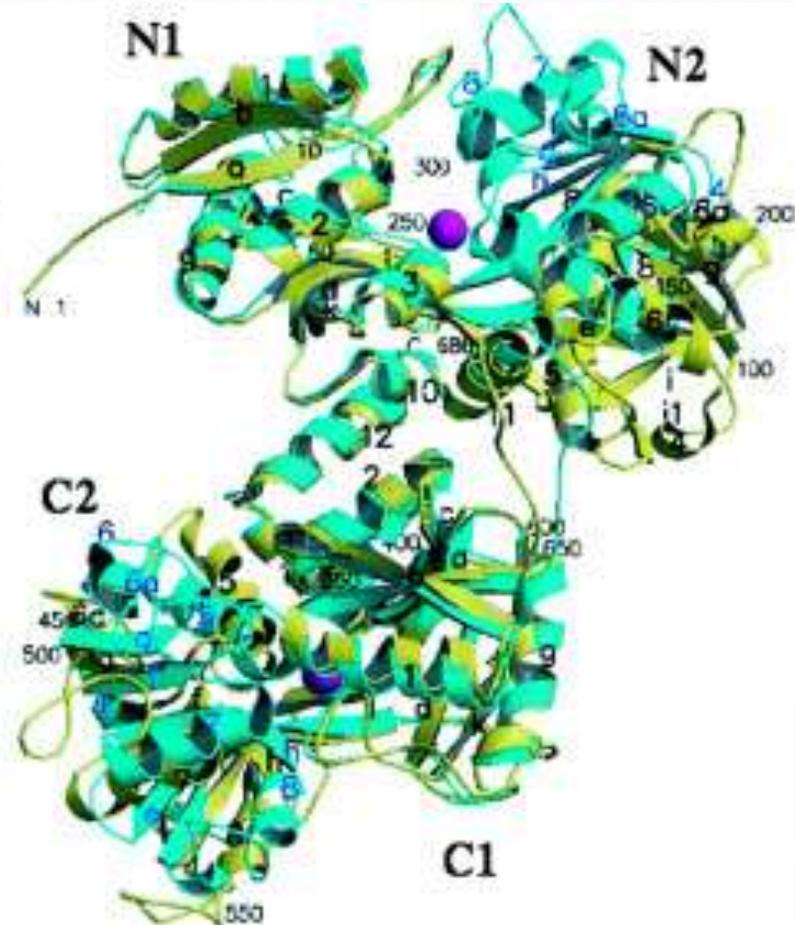


Domini proteici N e C aperti e chiusi Sovrapposti

Proteina aperta
Apo-transferrina
Colore giallo



Proteina transferrina
Colore verde chiaro



Applicazione dell'azione chelante delle albumine dell'uovo nel trattamento della malattia di Wilson

Dialisi dell'albumina: rimozione efficace del rame in un paziente con malattia di Wilson fulminante e collegamento riuscito al trapianto di fegato: una nuova possibilità per l'eliminazione delle tossine legate alle proteine

È stato trattato con la dialisi dell'albumina utilizzando un dializzato contenente 44 g/l di albumina e un flusso di dialisi lento (1–2 l/h).

Risultati: Centocinque milligrammi di rame sono stati rimossi dalla dialisi dell'albumina entro i primi sei trattamenti, con conseguente normalizzazione dei livelli di rame nel sangue.



Journal of Hepatology
Volume 31, Issue 6, December 1999, Pages 1080-1085

Case Report

Albumin dialysis: effective removal of copper in patient with fulminant Wilson disease and successful bridging to liver transplantation: a new possibility for the elimination of protein-bound toxins

Bernhard Kreymann  , Markus Seige, Ursula Schweigart, Klaus-Friedrich Kopp, Meinhard Classen



Journal of Hepatology

Volume 31, Issue 6, December 1999, Pages 1080-1085



Case Report

Albumin dialysis: effective removal of copper in a patient with fulminant Wilson disease and successful bridging to liver transplantation: a new possibility for the elimination of protein-bound toxins

Bernhard Kreymann  , Markus Seige, Ursula Schweigart, Klaus-Friedrich Kopp, Meinhard Classen

Bibliografia e Sitografia

[Food Research International](#)

[Volume 46, Numero 2](#) , Maggio 2012 , Pagine 480-48

https://en.wikipedia.org/wiki/Ovotransferrin#cite_note-3

<http://www.summagallicana.it/Volume2/B.XVIII.11.4.b.htm>

[Journal of Hepatology](#)

[Volume 31, Issue 6](#), December 1999, Pages 1080-1085

Il meccanismo strutturale per l'assorbimento e il rilascio di ferro da parte delle transferrine

Masaaki HIROSE *Bioscienze, biotecnologie e biochimica* , volume 64, numero 7, 1 gennaio 2000, pagine 1328–1336, <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1328>

Pubblicato:

01 gennaio 2000

<https://it.scribd.com/document/446835749/Conalbumina-docx>

https://www.my-personaltrainer.it/Tv/Destinazione-Benessere/Alimentazione/funzioni_proteine.html

[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52069-5/fulltext#seccesstitle80](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52069-5/fulltext#seccesstitle80)

https://slidetodoc.com/presentation_image_h/f4d409decad3dd4efd35e7f2d7341359/image-9.jpg

<https://slideplayer.it/slide/10204088/33/images/8/Principali+proteine+dell%E2%80%99albumine.jpg>

<https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28445>



RINGRAZIAMO
I TUTOR
MARGHERITA VENTURI
ANNA CARONIA
PAOLA AMBROGI

Grazie a tutti per l'attenzione

