
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIOVANNI MASSIMILIANO CLAAR, GIANCARLO VECCHIO

**Biosintesi in vivo della tireoglobulina:
caratterizzazione del precursore 6 S**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 43 (1967), n.6, p. 602–607.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_43_6_602_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Patologia. — *Biosintesi in vivo della tireoglobulina: caratterizzazione del precursore 6 S* (*). Nota di GIOVANNI MASSIMILIANO CLAAR e GIANCARLO VECCHIO, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY. — Previous studies on the biosynthesis of sheep thyroglobulin *in vitro* have shown that the formation of this iodoprotein (19S) is preceded by the appearance of two other components having a slower sedimentation rate (3-8S and 12S). While the 12S protein was interpreted as an intermediate in the synthesis of thyroglobulin, the nature of the 3-8S component still remained unclear.

Studies recently carried out in our laboratory have shown a clearcut precursor-product relationship between a slow sedimenting component (6S) and 19S thyroglobulin during the synthesis of this iodoprotein followed *in vivo*.

The present experiments have definitely clarified the nature of the slow-sedimenting component labeled *in vivo* with radioactive aminoacids. Only about 25 % of the total radioactivity present in the so-called 3-8S component is related to thyroglobulin. This fraction has been isolated and some of its physico-chemical properties have been determined: it has a sedimentation constant of about 6S and a molecular weight of about 165000 and probably represents one quarter of the thyroglobulin molecule.

Sezioni di ghiandola tiroide di montone mantenute in adatto mezzo di cultura sono capaci di incorporare aminoacidi marcati con ^3H o con ^{14}C [1, 2]. Risultati analoghi sono stati ottenuti con emilobi tiroidei di ratto [3, 4]. Mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio tali AA. hanno anche dimostrato che la radioattività così fissata si ritrova poi in due frazioni proteiche aventi coefficienti di sedimentazione rispettivamente di 3-8S e 12S e, dopo tempi più lunghi dalla pulso-marcatura, anche nella tireoglobulina 19S. Mentre tali studi non chiariscono la natura della frazione proteica a sedimentazione più lenta (3-8S), la quale è certamente eterogenea, essi sembrano indicare che il componente 12S, corrispondente ad una semimolecola di tireoglobulina [5], è precursore della 19S.

Più recentemente, dopo somministrazione *in vivo* di leucina marcata con ^3H , Vecchio *et al.* [6] hanno dimostrato che il componente 12 S è assente nel ratto ma è invece presente nella cavia. Sugli estratti tiroidei solubili di entrambe le specie animali, è anche sempre evidente una frazione proteica marcata con ^3H a sedimentazione più lenta e legata alla tireoglobulina da chiara relazione di tipo precursore-prodotto. In tali ricerche, a differenza di quelle *in vitro* di Seed e Goldberg [1, 2] e delle successive *in vivo* di Ekholm e Strandberg [7] e di Cavalieri e Searle [8], l'analisi mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio è stata effettuata non sull'estratto

(*) Lavoro in parte sovvenzionato dal Grant. P.H.S. TW-00236-01, National Institutes of Health, Bethesda, Md., U.S.A.

(**) Nella seduta del 9 dicembre 1967.

solubile crudo parzialmente purificato, ma invece sulla frazione delle proteine precipitabili entro limiti molto stretti di concentrazioni di solfato d'ammonio.

Scopo delle presenti ricerche è stato quello di isolare e meglio caratterizzare il componente a sedimentazione lenta marcato con ^3H dopo pulso-marcatura *in vivo*.

PARTE SPERIMENTALE.

Sono stati usati ratti maschi del peso di 100–150 g, ceppo Sprague-Dawley. Gli animali erano inoculati per via endovenosa con circa 4 milluries di L-Leucina-4,5- ^3H (New England Nuclear Corporation, attività specifica: 5 Curies/millimole) in un volume di 0,2 ml e uccisi per dissanguamento 30 minuti dopo la pulso-marcatura. La radioattività veniva misurata in un contatore a scintillazione liquida a tre canali munito di cambia-campioni automatico (Nuclear Chicago Co.). Le misure (c/m) erano effettuate con un e.s. $< 2\%$ e trasformate in dpm tenendo conto del « quenching » di ciascun campione. La concentrazione delle proteine tiroidee solubili era determinata spettrofotometricamente mediante misura dell'assorbimento nell'ultravioletto adoperando come coefficienti di estinzione specifica ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) 10,5 e 207, rispettivamente a 280 e 210 m μ .

In una prima serie di prove l'estratto tiroideo crudo veniva preparato secondo tecniche già descritte [9] da 4 animali inoculati con l'aminoacido marcato e uccisi 30' dopo la pulso-marcatura. Dopo dialisi per 24 ore contro tampone di KCl 0,1 M + fosfati 0,02 M (tampone « standard ») per rimuovere il saccarosio, l'estratto era frazionato mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio dal 5 al 20 % (rotore SW₃₉ dell'ultracentrifuga Spinco modello L2–HV). Le frazioni ottenute dal gradiente erano riunite in due gruppi: uno, corrispondente alla porzione inferiore del gradiente (frazioni 21–50), l'altro corrispondente alla porzione superiore (frazioni 2–20). Le frazioni 21–50 comprendono fondamentalmente tireoglobulina 19 S e iodoproteina 27 S[10]. Le frazioni 2–20 sono rappresentate da un componente « leggero » molto eterogeneo a coefficiente di sedimentazione da 3 a 8 S. Tale componente era quindi sottoposto a precipitazione frazionata col solfato d'ammonio (pH=6,8; 0 °C). Di ciascuna frazione ottenuta veniva misurata la radioattività totale e il coefficiente di sedimentazione.

Lo schema riportato di seguito riassume il frazionamento eseguito:

- A) ^3H -insolubile (iodoproteine particolate);
- B) Estratto solubile (44 % di ^3H);
 - I) Gradiente saccarosio: frazioni 21–50 (12 S (?), 19 S, 27 S);
 - II) Gradiente saccarosio: frazioni 2–20 (54 % del ^3H solubile);
 - a) precipitabile con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0–1,4 M (IgG, etc.);
 - b) precipitabile con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4–1,8 M (frazione TGB-simile);
 - c) precipitabile con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,8–3,5 M (^3H -Alb., etc.).

Si osservi che le frazioni « leggere » (2-20 del gradiente) comprendono almeno tre componenti, aventi diverse caratteristiche di solubilità in solfato d'ammonio:

1) una prima frazione (B-II-a) precipita a una concentrazione di solfato d'ammonio (1,4 M) inferiore a quella (1,5 M) alla quale comincia a precipitare la tireoglobulina a 0 °C [11]; tale frazione dell'estratto tiroideo solubile comprende in parte IgG (7 S) di origine plasmatica [12];

2) una seconda frazione (B-II-b), rappresentante circa il 25 % dell'estratto tiroideo solubile, coprecipita con la tireoglobulina e le iodoproteine tireoglobulino-simili tra 1,4 e 1,8 M solfato d'ammonio. Questa frazione è legata da relazione precursore-prodotto con la tireoglobulina 19 S marcata con tritio [6];

3) una terza frazione (B-II-c), possiede caratteristiche di solubilità in solfato d'ammonio, coefficiente di sedimentazione (circa 4 S) e proprietà immunochimiche analoghe a quelle dell'albumina plasmatica.

In una seconda serie di prove sono state usate le ghiandole tiroidi di 22 ratti allo scopo di ottenere maggiori quantità del componente « leggero » tireoglobulino-simile, necessarie per la ulteriore caratterizzazione di esso.

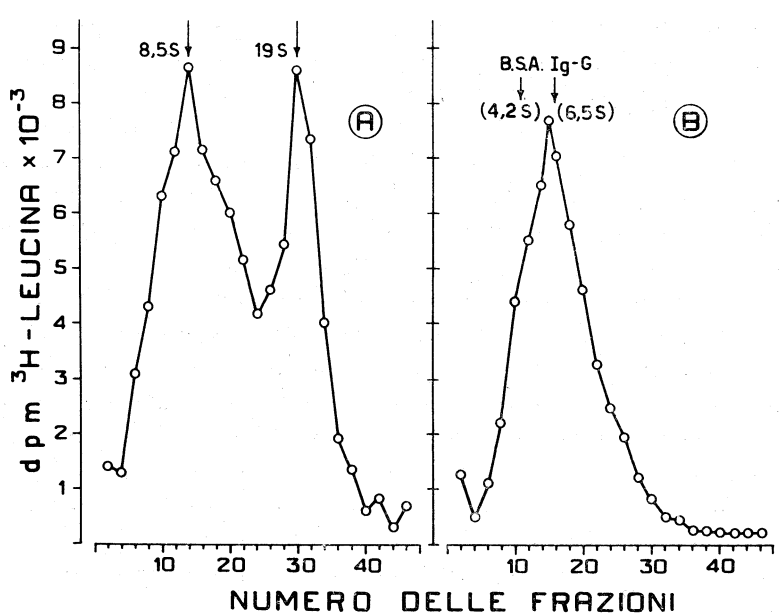


Fig. 1. - Isolamento della frazione « leggera » dell'estratto tiroideo marcato con L-Leucina-4,5- ^3H .

A - Ultracentrifugazione preparativa in gradiente di saccarosio dell'estratto solubile previamente purificato mediante precipitazione frazionata con solfato d'ammonio (vedi Parte Sperimentale). Saccarosio: 5-40%; tempo equivalente di centrifugazione a 23000 rpm = 30 h, 46'; rotore $\text{SW}_{25,2}$ dell'ultracentrifuga Spinco modello L2-HV.

B - Analisi mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio delle frazioni 13-18 del gradiente rappresentato nella parte A della figura. Saccarosio: 5-20%; tempo equivalente di centrifugazione a 38000 rpm = 7 h, 54'; rotore SW_{38} dell'ultracentrifuga Spinco modello L2-HV (BSA = sieralbumina bovina; IgG = immunoglobulina G di coniglio).

L'estratto solubile ottenuto era previamente purificato mediante precipitazione frazionata con solfato d'ammonio in concentrazione compresa tra 1,4 M e 1,8 M (tre volte) e successivamente sottoposto ad ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio (5-40 % saccarosio, rotore SW_{25.2}). La radioattività di un'aliquota (100 µl) di ciascuna frazione ottenuta dopo la centrifugazione veniva misurata allo scintillatore liquido allo scopo di stabilire il diagramma di sedimentazione (fig. 1, A). Il contenuto dei sei tubi corrispondenti al picco della frazione «leggera» era riunito, concentrato mediante dialisi sotto vuoto e infine dializzato contro tampone «standard» per rimuovere il saccarosio. La frazione finale così ottenuta veniva suddivisa in due aliquote: la prima era analizzata mediante un gradiente di saccarosio (5-20 % saccarosio, rotore SW₃₉); la seconda sottoposta ad una filtrazione su gel di Sephadex (G-100) su di una colonna previamente calibrata con proteine a noto peso molecolare [13].

TABELLA I.

Costante di sedimentazione (S_{20}) e peso molecolare () del precursore leggero della tireoglobulina marcato in vivo con ^3H -leucina.*

PROTEINA	Gradiente di saccarosio		Filtrazione su gel	
	frazione corrispondente al picco	costante di sedimentaz.	Volume di eluizione (ml)	peso molecolare (P.M.)
Tripsina	—	—	88,5	23.700
Sieroalbumina bovina .	11	4,2	61,5	67.000
Lattico-deidrogenasi .	—	—	53,0	117.000
IgG di coniglio	16	6,5	46,8	155.000
Componente «leggero» marcato con ^3H . .	15	6,1	44,0	165.000

(*) Valori ottenuti mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio [14] e filtrazione su Sephadex G-100 [13], per confronto con proteine di referenza.

L'ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio (fig. 1, B) ha mostrato la presenza di un unico componente avente coefficiente di sedimentazione pari a circa 6 S. La filtrazione su gel ha permesso di stabilire che il componente 6 S ha un volume di eluizione pari a 44 ml (vedi Tabella I), il che, nelle nostre condizioni sperimentali, corrisponde ad un peso molecolare di circa 165.000.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

Il componente definito 3-8 S, riscontrato durante la biosintesi della tireoglobulina, sia *in vitro* che *in vivo*, consiste di almeno tre differenti frazioni proteiche. Di queste una sola (25 % dell'estratto totale solubile) ha caratteristiche di solubilità in solfato d'ammonio identiche alla tireoglobulina e alle altre iodoproteine tireoglobulino-simili (precipita tra 1,4 M e 1,8 M a 0 °C). Le altre frazioni rappresentano contaminanti dell'estratto tiroideo probabilmente in gran parte derivanti dal plasma. La frazione tireoglobulino-simile marcata con ^3H ha un coefficiente di sedimentazione, determinato mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio, pari a circa 6,1 S ed un peso molecolare, determinato a mezzo di filtrazione su gel, pari a circa 165.000.

I risultati presentati, insieme con gli altri prima riportati sulla biosintesi della tireoglobulina *in vivo* [6] rendono verosimile l'ipotesi che il componente 6 S descritto, oltre a rappresentare il più importante precursore *in vivo* nella biosintesi della tireoglobulina, sia anche equivalente alla subunità 6 S trovata tra i prodotti di dissociazione della 27 S [15] e dopo riduzione dei ponti disolfuro della tireoglobulina [16]. Tale subunità corrisponderebbe ad un quarto della molecola di tireoglobulina 19 S, il che è in buon accordo con il peso molecolare di 165.000 determinato nelle presenti ricerche. Del tutto recentemente nel nostro laboratorio (ricerche in corso di pubblicazione) è stato dimostrato, mediante prove di immunoprecipitazione, che la molecola della subunità ^3H -6 S possiede determinanti antigenici in comune con la tireoglobulina 19 S.

TABELLA II.

*Proprietà molecolari del componente ^3H -6 S
e delle altre proteine della famiglia della tireoglobulina.*

Componenti proteici dell'estratto tiroideo	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	$S_{20,w}^0$ (a)	P.M. (b)	$D_{20,w}^0$ (c)	f/f_0 (d)	a/b (e)
27 S	Salvatore <i>et al.</i> , [10] .	27.0	1.220.000	1.91	1.61	11
19 S	Edelhoch, [5]	19.4	669.000	2.49	1.49	9
12 S	Aloj <i>et al.</i> , [17] . . .	11.7	331.000	3.11	1.49	9
^3H -6 S	presenti ricerche (f) . .	6.1	165.000	3.20	1.86	16

(a) $S_{20,w}^0$ = coefficiente di sedimentazione in unità Svedberg (10^{-13} sec.) in acqua a 20° C e a diluizione infinita.

(b) P. M. = peso molecolare.

(c) $D_{20,w}^0$ = costante di diffusione $\times 10^7$ cm²/sec a diluizione infinita.

(d) f/f_0 = rapporto tra il coefficiente d'attrito della proteina considerata e quello di una proteina sferica di egual volume.

(e) a/b = rapporto assiale di un'ellissoide prolata di rivoluzione non idratata.

(f) Coefficiente di sedimentazione e peso molecolare determinati sperimentalmente (ved. Tabella I e testo), altri valori calcolati in base a $S_{20,w}^0$ e P.M.

In base ai valori di P.M. e di $S_{20,w}^0$ ora trovati è possibile calcolare, mediante l'equazione di Svedberg, il coefficiente di diffusione ($D_{20,w}^0$) e quindi il rapporto d'attrito e il rapporto assiale della molecola proteica (vedi Tabella II).

Dall'esame della tabella si deduce che il rapporto d'attrito del componente $^3\text{H}-6\text{S}$, ammesso un P.M. = 165.000, è significativamente maggiore di quello delle altre proteine tireoglobulino-simili. Ciò significa che il precursore $^3\text{H}-6\text{S}$ della tireoglobulina ha un discreto grado di asimmetria molecolare (rapporto assiale, $a/b = 16$) ovvero che si tratta di una catena polipeptidica almeno parzialmente svolta (« unfolded »), che non ha ancora raggiunto la struttura terziaria caratteristica della proteina nativa.

È verosimile che il componente 6S non possieda ancora le unità glicidiche proprie della molecola della tireoglobulina e che ciò sia responsabile del suo maggior grado di asimmetria. Anche per la tireoglobulina, infatti, è stato suggerito che l'incorporazione dei carboidrati nella molecola proteica è successiva alla formazione delle catene polipeptidiche elementari [18-20].

Gli Autori ringraziano il prof. G. Salvatore per la guida e l'aiuto ricevuti nel corso delle presenti ricerche.

Il sig. A. Montoro ha prestato ottima assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] SEED R. W. e GOLDBERG I. H., « Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. », 50, 275 (1963).
- [2] SEED R. W. e GOLDBERG I. H., « J. Biol. Chem. », 240, 764 (1965).
- [3] SEED R. W. e GOLDBERG I. H., « Science », 149, 1380 (1965).
- [4] LISSITZKY S., ROQUES M., TORRESANI J., SIMON C. e BOUCHILLOUX S., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 16, 249 (1964).
- [5] EDELHOCH H., « J. Biol. Chem. », 235, 1236 (1960).
- [6] VECCHIO G., SALVATORE M. e SALVATORE G., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 25, 402 (1966).
- [7] EKHOLM R. e STRANDBERG V., « J. Ultrastruct. Res. », 17, 184 (1967).
- [8] CAVALIERI R. R. e SEARLE G. L., « Biochem. J. », 102, 25c (1967).
- [9] SALVATORE G., SALVATORE M., CAHNMAN H. J. e ROBBINS J., « J. Biol. Chem. », 239, 3267 (1964).
- [10] SALVATORE G., VECCHIO G., SALVATORE M., CAHNMAN H. J. e ROBBINS J., « J. Biol. Chem. », 240, 2935 (1965).
- [11] UI N. e TARUTANI O., « J. Biochemistry » (Japan), 50, 508 (1961).
- [12] ANDREOLI M., CALIFANO G. e VISCIDI E., « Folia Endocrinologica », 19, 269 (1966).
- [13] AURICCHIO F. e BRUNI C. B., « Biochem. Z. », 340, 321 (1964).
- [14] MARTIN R. G. e AMES B. N., « J. Biol. Chem. », 236, 1372 (1961).
- [15] VECCHIO G., EDELHOCH H., ROBBINS J. e WEATHERS B., « Biochemistry », 5, 2617 (1966).
- [16] DE CROMBRUGGHE B., PITT-RIVERS R. e EDELHOCH H., « J. Biol. Chem. », 241, 2766 (1966).
- [17] ALÖJ S., SALVATORE G. e ROCHE J., « J. Biol. Chem. », 242, 3810 (1967).
- [18] SPIRO R. W. e SPIRO M. J., « J. Biol. Chem. », 241, 1380 (1966).
- [19] BOUCHILLOUX S. e CHEFTEL C., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 23, 305 (1966).
- [20] HERSCOVICS A., « Federation Proc. », 26, 644 (1967).