
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SERGIO CARLOMAGNO, GIANCARLO VECCHIO,
SALVATORE M. ALOJ

**Biosintesi della tireoglobulina: studi sulla frazione
poliribosomiale tiroidea di ratto**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.2, p. 224–232.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_2_224_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 della tireoglobulina: studi sulla frazione poliribosomiale tiroidea di ratto* (*). Nota di SERGIO CARLOMAGNO, GIANCARLO VECCHIO e SALVATORE M. ALOJ, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY. — The ribosomal fraction from rat thyroid glands has been isolated after *in vivo* and *in vitro* labeling with tritiated leucine by means of differential centrifugation, Na-DIC treatment and ultracentrifugation in sucrose density gradients. The single ribosomes (78 S) have been separated from heavier aggregates (polyribosomes). These last particles appear of at least two classes, one having sedimentation coefficient of about 180 S and the other of 230–250 S. The first class is composed of aggregates of 4–6 ribosomes and the second of 12–15 ribosomes, as shown by electron microscopy.

The nascent polypeptide chains labeled with the radioactive aminoacid have been detached from the polyribosomes and examined by density gradient centrifugation and immunoprecipitation. They have sedimentation coefficient less than 4 S and react up to 25% with an antiserum against thyroglobulin isolated from the same animal species.

The results indicate that thyroid cells synthesize polypeptide chains whose molecular weight is much smaller than that reported for the subunit of 19 S thyroglobulin.

Le cellule tiroidee rappresentano un sistema particolarmente utile per lo studio della sintesi proteica nei mammiferi; infatti la maggior parte delle proteine da esse sintetizzate appartengono ad un sol tipo, quello della tireoglobulina 19 S e delle altre proteine tireoglobulino-simili. Poichè, d'altra parte, tali proteine risultano certamente dall'aggregazione di subunità monomeriche aventi peso molecolare inferiore [1, 2] è opportuno studiare separatamente le due fasi della biosintesi della tireoglobulina: quella, cioè, della formazione delle catene polipeptidiche elementari e quella immediatamente successiva della polimerizzazione di esse in proteine di peso molecolare più elevato. L'isolamento della frazione poliribosomiale tiroidea permette appunto di separare queste due fasi, è possibile infatti staccare dai poliribosomi le catene polipeptidiche nascenti marcate con aminoacidi radioattivi prima che esse polimerizzino.

Inoltre, poichè è stata prospettata l'esistenza di un rapporto definito tra grandezza del poliribosoma e peso molecolare della catena polipeptidica sintetizzata dal poliribosoma stesso [3], l'isolamento della frazione poliribosomiale tiroidea può fornire di per sè utili indicazioni sulla grandezza della subunità elementare.

(*) Centro di Endocrinologia e Oncologia Sperimentale del C.N.R. — Istituto di Patologia Generale della Università di Napoli. Ricerche sovvenzionate dal Grant NATO n. 357.

(**) Nella seduta del 20 febbraio 1971.

Scopo del presente lavoro è stato pertanto di:

- 1) isolare i poliribosomi di tiroide di ratto e valutarne la grandezza, cioè il numero medio di ribosomi presenti su di un filamento di RNA messaggero;
- 2) isolare le catene polipeptidiche nascenti presenti sui poliribosomi e studiarne le correlazioni esistenti con la tireoglobulina 19 S di ratto.

PARTE SPERIMENTALE

Nelle prove condotte *in vivo* a ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley del peso di 150-250 g l'uno veniva iniettata endovena una soluzione di *L*-leucina 4-5 ^3H (NEN Chemicals Frankfurt/M Germ. Occ.) attività specifica 5-30 Curies/mMole) in quantità variabile da 0,5 a 2 mCuries in un volume totale di 0,1-0,4 ml, a pH 7,4. Gli animali venivano uccisi per dissanguamento e le ghiandole prelevate e lavate in un tampone di KCl 0,1 M + PO_4^- 0,02 M (tampone standard) erano congelate a -20°C .

Nelle prove condotte *in vitro* ogni lobo ghiandolare asportato dall'animale ucciso per dissanguamento, era tagliato in due, preincubato in mezzo di Eagle senza *L*-leucina [4] per 10' a 37°C in atmosfera di O_2 (95 %) e CO_2 (5 %). Alla fine della preincubazione i lobi erano incubati per 10' in presenza di ^3H -*L*-leucina fino ad un massimo di 1,0 mCurie/5 ml e successivamente lavati con tampone « standard » a 0°C e congelati a -20°C .

La frazione poliribosomiale era isolata mediante centrifugazioni differenziali, trattamento con sodio deossicolato e ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio secondo la metodica di Kondo *et al.* [5]. La raccolta della frazioni del gradiente era ottenuta manualmente, e la radioattività di ciascuna frazione, dopo lettura dell'assorbimento ottico a 260 m μ , veniva misurata su aliquote di 50 μl mediante scintillazione liquida nel contatore Mark 1 della Nuclear Chicago (efficienza misurata pari al 30 % circa).

Nella fig. 1 è riportato un tipico diagramma ottenuto dopo centrifugazione in gradiente di saccarosio di una preparazione di ribosomi e poliribosomi di tiroide di ratto preparati dopo iniezione dell'aminoacido marcato.

Sono chiaramente visibili 2 picchi di assorbimento ottico: il primo, più leggero (coefficiente di sedimentazione 78 S), corrispondente ai ribosomi singoli, non possiede radioattività legata, il secondo, più pesante, presenta un profilo di radioattività che riproduce esattamente quello dell'assorbimento ottico a 260 m μ . Tale picco è a sua volta costituito da una frazione avente coefficiente di sedimentazione di circa 180 S e da una « spalla » pesante con coefficiente di sedimentazione compreso tra 230 e 250 S.

Nella Tav. I, *a* è presentata una fotografia ottenuta al microscopio elettronico della frazione del gradiente di saccarosio relativa al picco dei ribosomi singoli. Le frazioni del gradiente di saccarosio relative al picco dei poliribosomi avente maggior assorbimento ottico (180 S) contengono preva-

lentemente aggregati a 4-6 unità (Tav. I, *b*) mentre le frazioni relative alla « spalla » (230-250 S) contengono poliribosomi a 12-15 unità (Tav. I, *c*).

Mediante prove di incubazione *in vitro* effettuate in presenza di un aminoacido marcato in quantità limitanti, ovvero in presenza prima dell'aminoacido marcato nelle stesse quantità e poi di un eccesso dello stesso aminoacido non marcato (prova di « chase ») è possibile ottenere picchi di poliri-

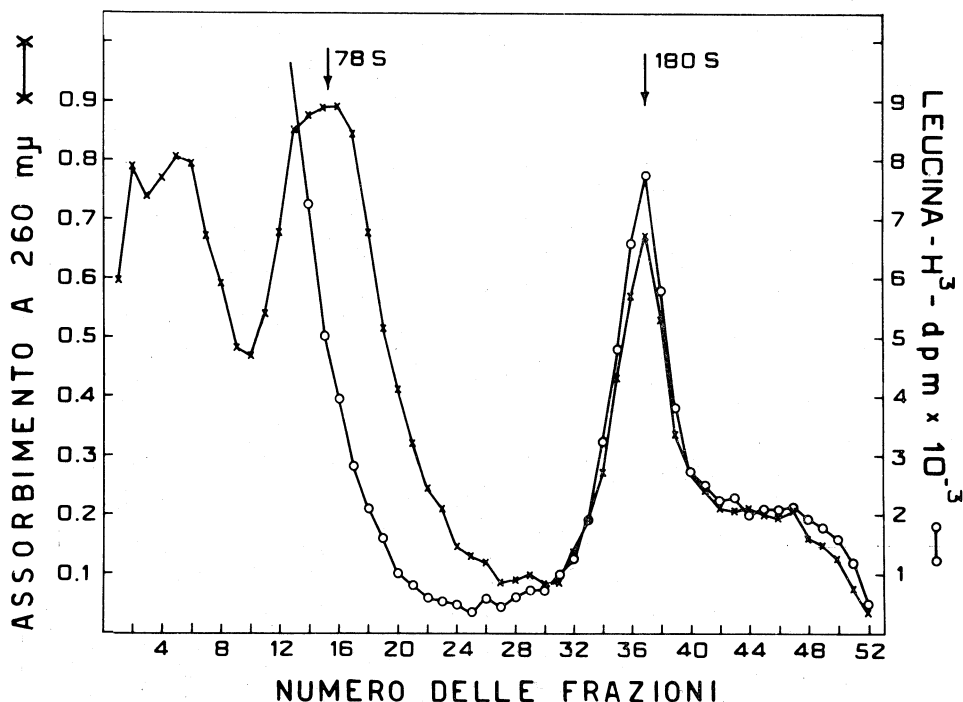


Fig. 1. - Diagramma di ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio di una preparazione di ribosomi e poliribosomi di tiroide di ratto dopo iniezione endovena di ^3H -*l*-leucina 2 mCuries in 0,4 ml; gradiente 10-34%, rotore $\text{SW}_{25.1}$ della centrifuga Spinco L-50. Tempo di centrifugazione: 105 minuti a $+4^\circ\text{C}$; velocità 23000 RPM. Sedimentazione da sinistra verso destra.

bosomi distribuiti prevalentemente nella classe più leggera (fig. 2 *a*) o in quella più pesante (fig. 2 *b*).

Allo scopo di isolare le catene polipeptidiche nascenti dai poliribosomi, le frazioni del gradiente di saccarosio corrispondenti al picco a costante di sedimentazione maggiore venivano riunite e centrifugate a $105000 \times g$ per 15 h a $+4^\circ\text{C}$. Al sedimento ottenuto e risospeso in tampone « standard » si aggiungeva RNasi pancreatica (Sigma Chemical Co., St. Louis) in una concentrazione finale pari a $1 \mu\text{g/ml}$ per 12 h a 20°C . In alcuni casi il sedimento era risospeso in una soluzione contenente $\text{LiCl } 2\text{M} + \text{Urea } 4\text{M}$ e lasciato a $+4^\circ\text{C}$ per 12 ore e successivamente dializzato contro tampone « standard »

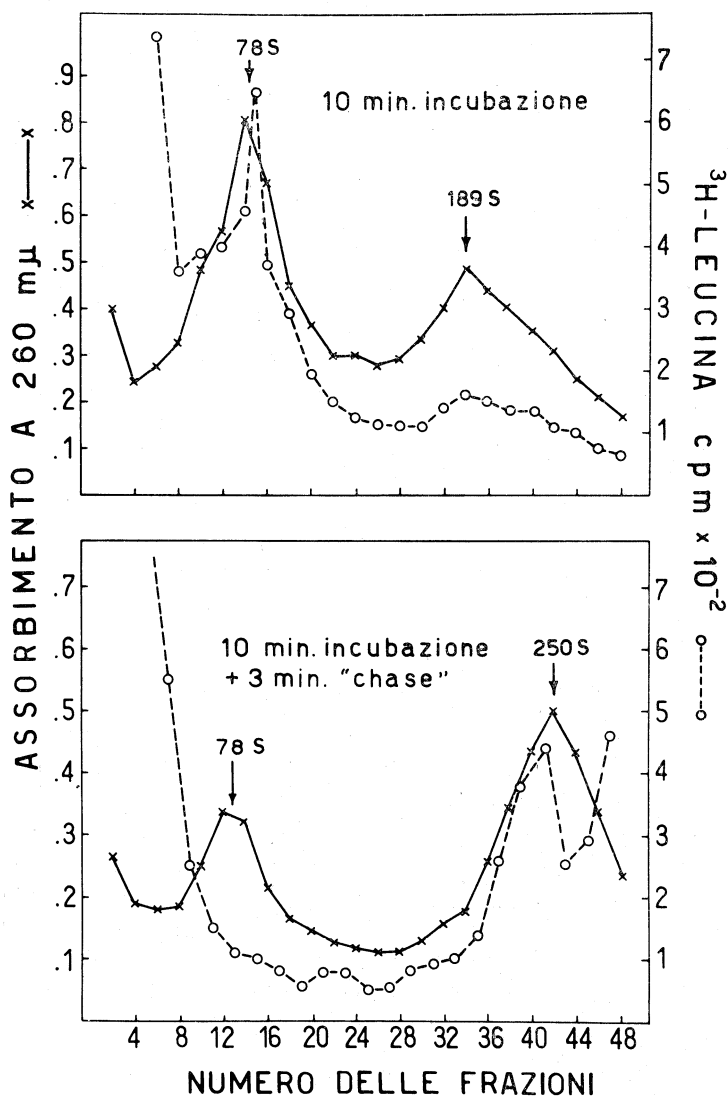


Fig. 2. - Diagramma di ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio di due preparazioni di poliribosomi di tiroide di ratto: a) preparazione da tiroidi incubate *in vitro* in 5 ml di mezzo di Eagle senza leucina + 0,04 μ Mol/ml di ³H-*L*-leucina per 10' a 37°C; b) preparazione da ghiandole incubate *in vitro* in 5 ml di mezzo di Eagle senza leucina + 0,04 μ Mol/ml di ³H-*L*-leucina 10' a 37°C + 3' dopo aggiunta di *L*-leucina non marcata in concentrazione pari a 40 μ Moli/ml («chase»). Condizioni di centrifugazione, come in 1.

contenente urea 0,5 M [6]. In entrambi i casi la soluzione era centrifugata 5' a 3000 RPM allo scopo, di eliminare eventuali impurità e il sopranatante, contenente le catene polipeptidiche in soluzione, era stratificato su di un gradiente di saccarosio e centrifugato ovvero utilizzato per le prove immunochimiche. La fig. 3 mostra il diagramma dopo ultracentrifugazione in

gradiente di saccarosio delle catene polipeptidiche marcate con ^3H -*l*-leucina. È possibile mettere in evidenza che si tratta di frazioni leggere, a costante di sedimentazione compresa tra 2 S e 4 S.

La natura delle catene polipeptidiche e, in particolare, la esistenza di determinanti antigenici comuni con la tireoglobulina 19 S, è stata accertata mediante prove di immunoprecipitazione. A tale scopo è stato utilizzato il sistema della co-precipitazione [7]. Poiché infatti la proteina solubilizzata

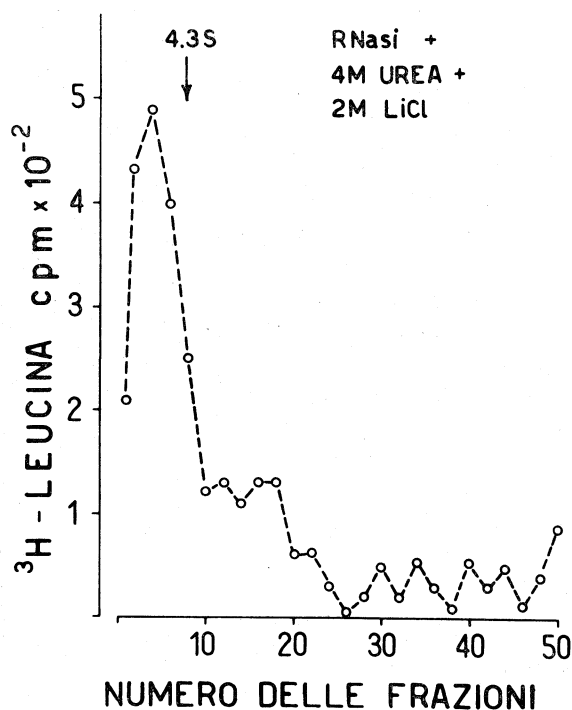


Fig. 3. - Diagramma di ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio di catene polipeptidiche nascenti solubilizzate da poliobosomi di tiroide di ratto. I coefficienti di sedimentazione approssimativa venivano calcolati in base ad uno «standard» di sieroalbumina bovina (4, 2 S) presente in un altro tubo dello stesso rotore. Gradiente 5-20 %, rotore SW₆₅ Ti della centrifuga Spinco Beckman L-2-65 HV. Tempo di centrifugazione: 8 ore a + 4°C; Velocità 63000 RPM.

era troppo scarsa per dare luogo a precipitato in presenza dell'antisiero specifico (anticorpi anti-tireoglobulina presenti nel siero di coniglio immunizzato) la precipitazione può essere ottenuta mediante aggiunta di anticorpi anti- γ -globuline di coniglio. I risultati ottenuti sono mostrati nella Tabella I. Circa il 25 % della radioattività delle catene polipeptidiche viene precipitata, tale precipitazione non viene inibita dalla tireoglobulina nativa, bensì dalla presenza di tireoglobulina dissociata mediante esposizione a pH alcalino e a bassa forza ionica [8].

TABELLA I.

Relazione di immunoprecipitazione tra le catene polipeptidiche neoformate liberate dai polisomi di tiroide di ratto e antisiero antitireoglobulina 19 S di ratto.

PROVA	COMPONENTI DELLA REAZIONE (1)					PRECIPITAZIONE (4)	INIBIZIONE (5)
	Catene polipeptidiche marcate con leucina ³ H	19 S di ratto non marcata (2 mg)		Siero anti-19S (2)	Siero anti-Ig di coniglio (3)		
		nativa	dissoziata				
A	+	—	—	+	+	25,0	—
B	+	+	—	+	+	29,2	o
C	+	—	+	+	+	8,0	68,0

(1) Aggiunti nell'ordine da sinistra a destra.

(2) Ottenuto da conigli immunizzati con TGB 19 S purificata di ratto [19].

(3) Ottenuto da capre immunizzate con immunoglobulina di coniglio.

(4) In percento della radioattività totale presente nella miscela.

(5) Radioattività rimasta in soluzione in percento della radioattività precipitata nella prova A.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La frazione «ribosomiale» proveniente da ghiandole tiroide di ratto marcate *in vivo* ed *in vitro* con aminoacidi radioattivi è stata isolata mediante centrifugazioni differenziali, trattamento con sodio desossicolato [9] e ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio. Con questa ultima metodica è stata separata la frazione dei ribosomi singoli (78 S) da quella degli aggregati poliribosomiali. Questa contiene tutta la radioattività legata presente nella frazione «ribosomiale», il che è indice che queste particelle si trovano in fase di attiva sintesi proteica, ed è costituita da almeno due classi di aggregati, una a coefficiente di sedimentazione 180 S e l'altra di 230–240 S. È possibile calcolare in base ai nomogrammi suggeriti da Noll (1970) il numero di unità ribosomiali presenti in ciascun aggregato polisomiale a partire dal coefficiente di sedimentazione. Su questa base il picco di 180 S dovrebbe consistere di 5 unità ribosomiali e quello di 230 S di 12 unità. L'osservazione al M. E. ha permesso di confermare questo dato.

Mediante le prove di incubazione *in vitro* è stato possibile dimostrare che la classe di poliribosomi a costante di sedimentazione minore è quantitativamente predominante negli esperimenti di incubazione in presenza del solo aminoacido marcato, cioè con una concentrazione di *L*-leucina notevolmente inferiore a quella fisiologica del plasma [11], mentre la classe di poliribosomi

più pesanti si riscontra o dopo marcatura *in vivo* e dopo incubazione *in vitro* in presenza di quantità non limitanti di *L*-leucina.

Sembra pertanto probabile che in condizioni fisiologiche entrambe le classi di poliribosomi siano presenti, ognuna di esse devoluta alla sintesi di un tipo di catena polipeptidica. La prima classe, contenente 4-6 ribosomi, dovrebbe sintetizzare proteine di peso molecolare intorno a 16000, la seconda, contenente 12-15 ribosomi, proteine intorno a 45000, secondo l'ipotesi che stabilisce un rapporto di 3000 tra peso molecolare della catena polipeptidica sintetizzata per ogni unità ribosomiale presente sul poliribosoma. Tali valori di peso molecolare sono notevolmente inferiori al peso molecolare della subunità della tireoglobulina proposto da De Crombrughe *et al.*, compreso cioè tra 165000 e 200000 [1], e inferiori al peso molecolare proposto da Lissitzky *et al.*, cioè tra 70000 e 80000 [2].

Lecocq e Dumont [12] hanno riportato i risultati ottenuti dal frazionamento di poliribosomi tiroidei di montone; Cartouzou *et al.* [13] di poliribosomi tiroidei di pecora; Morais e Goldberg [14] e Kondo *et al.* [5] di poliribosomi tiroidei di ghiandole bovine. I tracciati di densità ottica a 260 m μ ottenuti dagli autori citati sono più o meno simili tra loro e presentano, oltre ad un picco di ribosomi singoli, una serie di picchi corrispondenti a 2, 3, 4, 5, 6 unità ribosomiali. In genere il massimo di densità ottica corrisponde a 5-6 unità e sembra pertanto evidente che, qualunque sia la specie animale usata, la distribuzione dei poliribosomi tiroidei segua lo stesso andamento. Kondo *et al.* tuttavia, riferiscono la presenza di poliribosomi contenenti fino ad un massimo di 35 unità ribosomiali, quando vengano effettuate fotografie al M.E. delle frazioni del gradiente prossime al fondo del tubo di centrifuga. Keyani e Claude [15] hanno ottenuto fotografie in cui si potevano contare fino a 50 ribosomi, anche in questo caso utilizzando le ultime frazioni del gradiente. Questi ultimi risultati, insieme a quelli riportati da De Nayer e De Visscher [16], sono compatibili con un peso molecolare per la subunità della tireoglobulina vicino a quello proposto da De Crombrughe *et al.* [1], tuttavia la proporzione di questa frazione poliribosomiale « pesante » è tale da far ritenere che essa non sia quella devoluta alla sintesi della proteina quantitativamente più importante della tiroide.

I risultati qui presentati non escludono che le preparazioni ottenute risultino da disaggregazione parziale di poliribosomi più pesanti dovuta a liberazione di enzimi ad attività ribonucleasica durante le varie tappe dell'isolamento. Non è stato tuttavia possibile dosare nelle varie tappe della preparazione attività ribonucleasica in quantità apprezzabili.

L'isolamento delle catene polipeptidiche marcate con ^3H -*L*-leucina a partire dai poliribosomi tiroidei sembra in effetti confermare i risultati ottenuti con l'osservazione al M. E. dal momento che le catene polipeptidiche solubilizzate e centrifugate in gradiente di saccarosio posseggono un coefficiente di sedimentazione tra 2 e 4 unità Svedberg, cioè inferiore a quello che ci si dovrebbe aspettare da proteine di peso molecolare compreso tra 70.000 e 200.000.

Bisogna tener presente, tuttavia, che la stima della distribuzione delle catene polipeptidiche neosintetizzate, e quindi della loro grandezza molecolare, è resa particolarmente difficile dalla presenza di catene incomplete. Nel caso dell'esperimento riportato in fig. 4, tuttavia, le catene polipeptidiche marcate dovrebbero rappresentare delle subunità complete o vicine al completamento, poichè esse sono state ottenute dopo un prolungato tempo di « chase » in cui, cioè, la ^3H -*L*-leucina è stata enormemente diluita nel corrispondente isotopo non radioattivo e le catene ultime sintetizzate (incomplete) sono quelle non evidenziabili in quanto contenenti l'aminoacido non marcato.

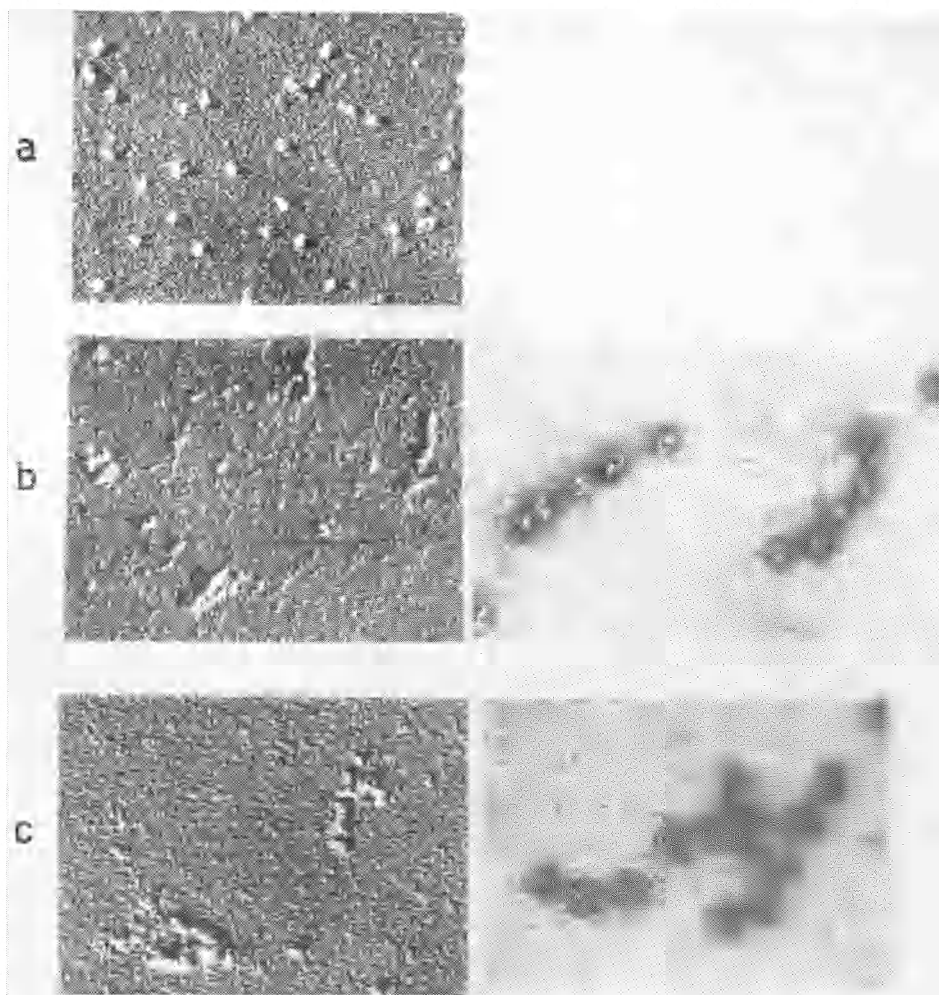
La solubilizzazione delle catene polipeptidiche nascenti ha permesso di accertare che tali catene sono, almeno per una certa parte (25 %), correlate immunologicamente con la tireoglobulina e questo dimostra che effettivamente i polisomi isolati sono impegnati nella sintesi della tireoglobulina. Le ragioni della mancata precipitazione quantitativa (100 %) della radioattività isolata può risiedere nella mancanza di alcuni determinanti antigenici nelle catene polipeptidiche solubilizzate. Che tale precipitazione delle catene venga inibita solo da parte di tireoglobulina dissociata e non da parte di tireoglobulina 19 S nativa è d'altra parte espressione dell'esistenza di determinanti antigenici localizzati nell'interno della molecola proteica e non accessibili nelle molecole di tireoglobulina 19 S. Questi determinanti antigenici sono presenti sulle catene polipeptidiche che non hanno raggiunto la configurazione spaziale definitiva e su molecole di tireoglobulina dissociate e « svolte » (« unfolded ») dall'azione di mezzi denaturanti. Analoghe conclusioni sono state recentemente raggiunte da Carlomagno *et al.* [17] e da Salabè *et al.* [18]. Questi ultimi autori hanno anche dimostrato l'esistenza nell'antisiero anti-tireoglobulina di almeno due tipi di anticorpi, uno capace di reagire soltanto con la 19 S nativa, l'altro capace di reagire sia con la tireoglobulina nativa, sia con la tireoglobulina denaturata.

Ringraziamenti. — Gli Autori ringraziano il prof. G. Salvatore per la guida ricevuta nel corso della presente ricerca e il prof. Franco Minio Paluello per quanto concerne gli esperimenti di microscopia elettronica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] DE CROMBRUGGHE B., PITT RIVERS R. e EDELOCH H., « J. Biol. Chem. », 241, 2766 (1966).
- [2] LISSITZKY S., ROLLAND M., REYNAUD J., SAVARY J. e LARRY S., « European J. Biochem », 4, 464 (1968).
- [3] WARNER J. R., RICH R. e HALL C. E., « Science », 138, 1399 (1962).
- [4] EAGLE H., « Science », 130, 432 (1959).
- [5] KONDO Y., DE NAYER P., LABAW L., ROBBINS J. e RALL J. E., « Endocrinology », 83, 1117 (1968).
- [6] COLOMBO B. e BAGLIONI C., « Mol. J. Biol. », 16, 51 (1966).
- [7] ROBBINS J., VAN ZYL A. e VAN DER WALT K., « Endocrinology », 78, 1213 (1966).
- [8] EDELOCH H., « J. Biol. Chem. », 235, 1326 (1960).

- [9] PALADE G. E. e SIEKEVITZ P., « Biophys. Biochem. Cytol. », 2, 171 (1956).
- [10] NOLL H., in *Techniques in protein biosynthesis* di Campbell P. N., e Sargent J. R., Academic Press, New York, 2, 101 (1970).
- [11] HERBERT J. D., COULSON R. A. e HERNANDEZ J., « Comp. Biochem. Physiol. », 17, 589 (1966).
- [12] LECOCQ R. E. e DUMONT J. E., « Biochim. Biophys. Acta », 129, 421 (1966).
- [13] CARTOUZOU G., GREIF R., DEPIEDS R. e LISSITZKY S., « Biochim. Biophys. Acta », 138, 90 (1967).
- [14] MORAIS R. e GOLDBERG I. H., « Biochemistry », 6, 2538 (1967).
- [15] KEYANI E. e CLAUDE A., Comunicazione al Congresso internazionale di Microscopia Elettronica, Roma 1968.
- [16] DE NAYER P. e DE VISSCHER M., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 36, 639 (1969).
- [17] CARLOMAGNO M. STELLA, BIANCO A. R., ALOJ S. M. e VECCHIO G., « Int. Arch. Allergy », 39, 391 (1970).
- [18] SALABÉ G., KONDO Y., DE NAYER P., ROBBINS J. e RALL J. E., « Endocrinology », 85, 752 (1969).
- [19] SALVATORE G., SALVATORE M., CAHNMAN H. J. e ROBBINS J., « J. Biol. Chem. », 239, 3267 (1964).



Microfotografie Elettroniche di ribosomi e poliribosomi di tiroide di ratto. Aliquote delle frazioni del gradiente di saccarosio riportato in fig. 1 adsorbite su griglie con membrane al carbonio, « ombreggiate » con platino o colorate con acetato di uranile all'1% e osservate al Microscopio Elettronico Siemens Elmiskope 1 A a 40000 ingrandimenti: *a*) ribosomi singoli 78 S (frazione 16 del gradiente); *b*) poliribosomi 180 S a 4-6 unità (frazione 37 del gradiente); *c*) poliribosomi 230 S a 12-15 unità (frazione 46 del gradiente).