
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ANTONIO PASCOTTO, ANTONIO MONTORO, ALFONSO
BARBARISI

Purificazione parziale di una subunità nativa (6 S) della tireoglobulina di ratto

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.2, p. 233–239.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_2_233_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_2_233_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. — *Purificazione parziale di una subunità nativa (6 S) della tireoglobulina di ratto* (*). Nota di ANTONIO PASCOTTO, ANTONIO MONTORO e ALFONSO BARBARISI, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY. — Thyroid glands from 800 Sprague-Dawley rats have been excised from the animals and incubated in a culture medium for 30' in the presence of tracing amounts of a radioactive amino acid (4,5 ^3H -leucine). The soluble thyroid extracts have been purified by repeated ammonium sulfate precipitations and several sucrose density gradient centrifugations. A protein component, whose sedimentation coefficient approximates to 6 S, has been isolated. Such a component coincides both by ultracentrifugation and electrophoresis with an ^3H -6 S protein whose nature as a biosynthetic subunit of 19 S thyroglobulin has been well established.

The 6 S stable protein isolated in the present study is slightly contaminated with serum albumin and immunoglobulins.

It is concluded that very small quantities of a native stable subunit (6 S), probably in equilibrium with its polymer from (19 S), are present in soluble extracts from thyroid glands.

Durante studi sulla biosintesi della tireoglobulina (19 S) di ratto, effettuati mediante incorporazione *in vivo* o *in vitro* di aminoacidi marcati da parte di ghiandole tiroidee, è possibile isolare un componente marcato avente un coefficiente di sedimentazione da 3 a 8 S mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio [1, 2, 3]. Recentemente, nel nostro laboratorio, tale componente è stato ulteriormente frazionato in tre costituenti marcati, aventi coefficienti di sedimentazione di 3-4 S, 6 S e 7 S. È stato possibile dimostrare che le due frazioni proteiche 6 S e 7 S sono correlate immunologicamente con la tireoglobulina ed hanno un peso molecolare pari a circa 120.000 per la 6 S e circa 180.000 per la 7 S [4, 5].

È pertanto verosimile che queste due proteine marcate rappresentino le subunità biosintetiche della tireoglobulina 19 S di ratto, rilasciate nella fase solubile del citoplasma tiroideo prima della loro polimerizzazione in molecole di 19 S.

Dal momento che si tratta di proteine neosintetizzate *in vitro* nel periodo di incubazione delle ghiandole, esse sono probabilmente contenute in quantità minime e il marcaggio con isotopi radioattivi rappresenta un metodo particolarmente utile per la visualizzazione di esse. Tuttavia, durante l'isolamento delle proteine marcate con ^3H -leucina o con ^3H -o ^{14}C -mannosio si è sempre riscontrato un picco di assorbimento ottico a 280 m μ che coincide quasi esattamente con il picco della subunità radioattiva 6 S.

(*) Centro di Endocrinologia ed Oncologia sperimentale del C.N.R., Istituto di Patologia Generale, Università di Napoli.

(**) Nella seduta del 20 febbraio 1971.

Nel presente lavoro viene descritto il metodo di purificazione della proteina che, approssimativamente, ha lo stesso coefficiente di sedimentazione della ^3H -6S e ciò allo scopo di vedere se essa costituisca una subunità « stabile » (6S) della tireoglobulina di ratto. L'isolamento di tale proteina in quantità dell'ordine di grandezza di milligrammi consentirebbe l'effettuazione di studi sulle proprietà chimiche e chimico-fisiche di una subunità della tireoglobulina che finora non si è mai potuta ottenere allo stato puro e in soluzione acquosa mediante studi di dissociazione della 19S [6, 7, 8].

PARTE SPERIMENTALE

Sono state utilizzate ghiandole tiroidi di ratti Sprague-Dawley maschi di peso variabile dai 150 ai 250 g. Allo scopo di isolare quantità apprezzabili della proteina 6S sono state utilizzate fino a 800 ghiandole tiroidi per la medesima preparazione. In genere in ciascun esperimento le ghiandole tiroidi di 100-200 animali venivano preincubate per 15-20' in mezzo di Eagle (5-10 ml) privo di *L*-leucina sotto pressione di O_2 (95 %) e CO_2 (5 %) e poi incubate nello stesso mezzo per 30' in presenza di 4,5 ^3H -*L*-leucina (100-500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ pari a 3-15 $\mu\text{Moli}/\text{ml}$) ovvero, in mezzo di Eagle contenente *L*-leucina non marcata nella stessa concentrazione.

L'incubazione in presenza della leucina radioattiva è stata effettuata allo scopo di marcare la subunità ^3H -6S della tireoglobulina che in tal modo può fornire un termine di riferimento durante le varie tappe di purificazione. L'incubazione in presenza dell'aminoacido non marcato è stata effettuata considerando la possibilità che la subunità 6S nativa, visibile al profilo di assorbimento ottico a 280 μ , da noi precedentemente osservata, si formi, come la 6S marcata con ^3H -leucina, durante i 30' di incubazione *in vitro* seguenti i 15' o 20' di preincubazione in mezzo privo di *L*-leucina non marcata.

Il periodo di preincubazione in mezzo privo di *L*-leucina ha la funzione non solo di rendere le ghiandole più avidi di questo aminoacido e quindi facilitare l'incorporazione del corrispondente aminoacido radioattivo nel periodo di incubazione vero e proprio, ma anche la funzione di far rallentare il processo della sintesi proteica (a causa della mancanza di un aminoacido essenziale) e, indirettamente, stimolare la sintesi proteica nel periodo della incubazione successiva, quindi, probabilmente, anche la sintesi della subunità nativa 6S.

Il periodo di incubazione di 30' è quello ottimale per ottenere l'incorporazione massima di ^3H -leucina nel precursore 3-8S della tireoglobulina.

Dopo l'incubazione le ghiandole tiroidi sono state congelate a -20°C e conservate per un periodo massimo di 7 giorni. Le ghiandole tiroidi provenienti da diversi esperimenti di incubazione sono state utilizzate per la preparazione descritta nel presente lavoro. Tale preparazione è consistita nelle seguenti tappe:

1) omogenizzazione del tessuto tiroideo in tampone di KCl 0,1 M + Na -Fosfati 0,02 M ($\text{pH} = 7,2$) (tampone standard);

- 2) separazione della fase solubile citoplasmatica dai residui cellulari e dagli organuli citoplasmatici mediante centrifugazione a $105.000 \times g \times 30'$;
- 3) precipitazione frazionata con solfato di ammonio a $\text{pH} = 6,8$, secondo le modalità precedentemente descritte [3];
- 4) ultracentrifugazione in gradiente di densità della frazione proteica precipitata in presenza di solfato di ammonio 1,8M. I gradienti contenevano saccarosio (5-40 %) disciolto in tampone « standard » e venivano effettuati nel rotore SW 25.2 dell'ultracentrifuga Spinco-Beckman L-2-65 HV;
- 5) doppia ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio (5-28 %) nel rotore SW 41 della medesima centrifuga delle frazioni « leggere » (3-8 S) ottenute dopo l'ultracentrifugazione con rotore SW 25.2.

In fig. 1 è riportato il profilo ottenuto mediante gradiente di saccarosio della proteina 6 S dopo l'ultima tappa di ultracentrifugazione nel rotore SW 41. Un sol picco è visibile, tanto per quanto riguarda l'assorbimento ottico a $280 \text{ m}\mu$, tanto per quanto riguarda la distribuzione della radioattività dovuta alla ^3H -leucina.

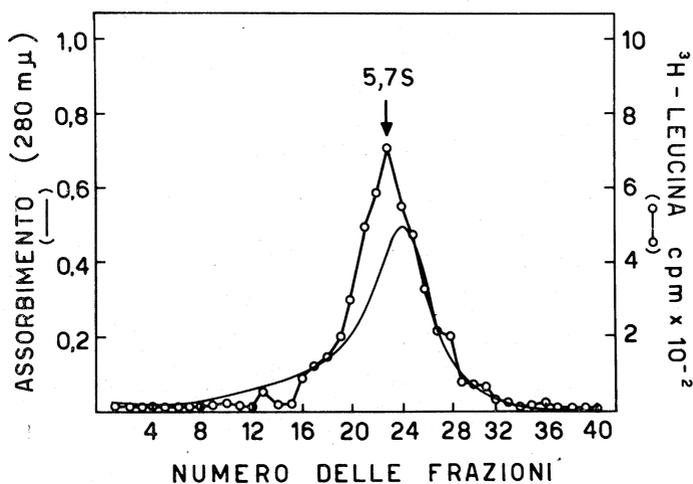


Fig. 1. - Profilo di sedimentazione in gradiente di saccarosio della proteina 6 S ottenuta mediante purificazione degli estratti tiroidei di 800 ratti (ved. Parte Sperimentale). Ultracentrifugazione effettuata con il rotore SW 41 della centrifuga Spinco-Beckman L-2-65 HV. Gradiente di saccarosio dal 5 al 28%, tempo di centrifugazione circa 32 ore a 39.000 rpm . Sedimentazione da sinistra verso destra.

È tuttavia possibile che la preparazione presentata in fig. 1 sia leggermente contaminata da una proteina a sedimentazione più lenta, visibile come una « coda » (« trailing ») sulla sinistra del componente 6 S. Un'altra considerazione può essere fatta dall'osservazione di questo grafico e cioè che esiste un leggero spostamento tra il picco della radioattività e quello della densità ottica, quest'ultimo essendo spostato leggermente sulla destra del primo. Ciò potrebbe essere indice di eterogeneità del componente 6 S isolato.

Allo scopo di accertare questa eventualità il componente è stato esaminato anche in base alle sue caratteristiche elettroforetiche in gel di poliacrilamide. Due aliquote di circa 100 μ l ognuna (corrispondenti ad una quantità di proteina, stimata spettrofotometricamente, pari a circa 100 μ g e corrispondenti a 10.000 3 H cpm) sono state stratificate su due colonnine (6,0 cm \times 0,5 cm) di gel di poliacrilamide al 5% in presenza di un colorante (bleu di bromo-

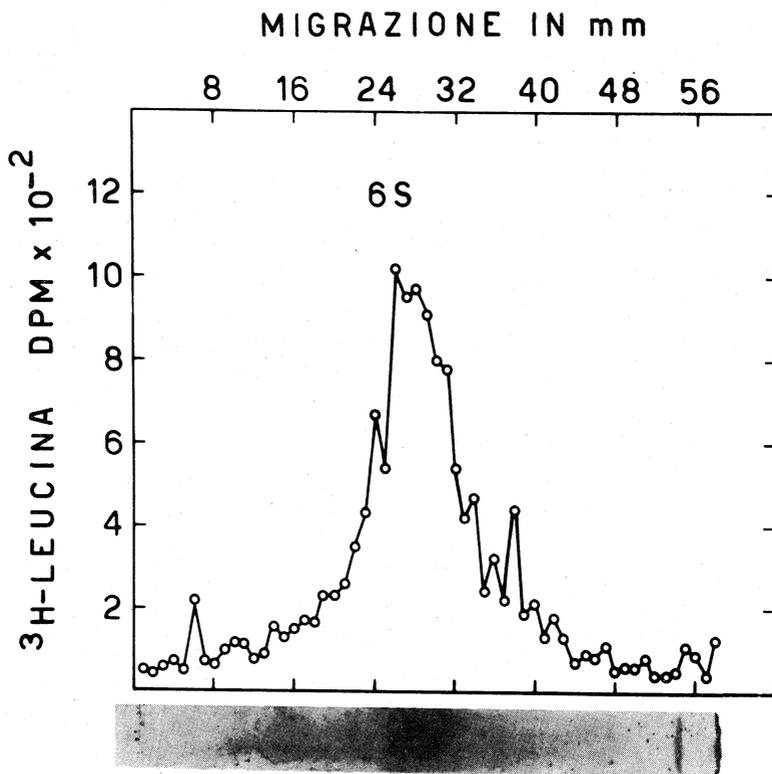


Fig. 2. - Profilo elettroforetico della proteina 6 S ottenuta come descritto in fig. 1. La radioattività dovuta alla 3 H-leucina di ciascun millimetro di una colonnina di gel di poliacrilamide al 5% è stata misurata secondo quanto descritto nella Parte Sperimentale. La migrazione della proteina marcata è paragonata alla migrazione delle proteine colorate con bleu di Coomassie. Migrazione da sinistra verso destra per tre ore (110 volt, 8 mA per ciascuna colonnina di gel).

fenolo) che forniva l'indice della migrazione. L'elettroforesi è stata effettuata in tampone di TRIS 0,05 M + glicina 0,4 M a pH = 8,3 secondo il metodo descritto da Reisfeld e Small [9]. Dopo tre ore di migrazione elettroforetica una delle colonnine di gel di poliacrilamide veniva colorata con bleu di Coomassie e decolorata mediante breve elettroforesi in una camera contenente acido acetico al 10% e alcool metilico al 10% [10]. La differenza di potenziale veniva applicata in direzione perpendicolare all'asse maggiore della colonnina di gel. Il periodo di decolorazione era di 15-20'. L'altra colonnina veniva

tagliata in fettine sottili (circa 1 mm) mediante apparecchio appositamente costruito secondo il modello descritto da Iandolo [11]. Le fettine venivano poi depositate in boccettine per scintillazione liquida, digerite secondo le modalità descritte da Le Bouton [12] e la radioattività delle singole boccettine

misurata in un contatore a scintillazione β della Nuclear Chicago, modello Mark I. L'efficienza di conteggio per il tritio, nelle nostre condizioni sperimentali, era del 30 % circa. Il risultato di questo esperimento è rappresentato in fig. 2.

La radioattività di ciascuna frazione (opportunamente corretta per il « quenching ») della colonnina di gel è stata riportata contro la lunghezza del gel medesimo. La migrazione elettroforetica della banda radioattiva è paragonata a quella delle proteine colorate con bleu di Coomassie. La banda di radioattività (che corrisponde alla subunità $^3\text{H}-6\text{S}$ correlata immunologicamente con la tireoglobulina 19 S) possiede la medesima migrazione della banda proteica quantitativamente più importante. Questo risultato dimostra la identità tra la subunità $^3\text{H}-6\text{S}$ e almeno una delle frazioni proteiche presenti nel componente 6 S isolato mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio. Tuttavia tanto il profilo di ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio (fig. 1), tanto il tracciato elettroforetico delle proteine messe in evidenza con il bleu di Coomassie (fig. 2) sembrano indicare la presenza di altre proteine contaminanti la preparazione della subunità nativa 6 S.

La natura delle proteine contaminanti è stata accertata mediante un'altra prova di elettroforesi in gel di poliacrilamide in cui venivano usate per riferimento, su altre colonnine di gel, proteine purificate note la cui presenza nell'estratto acquoso tiroideo e nelle

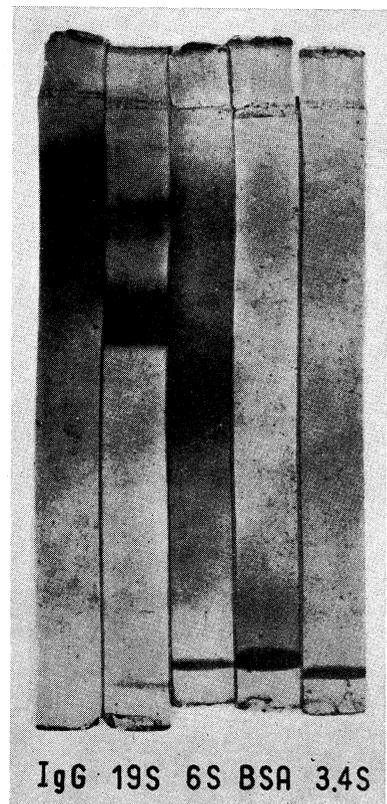


Fig. 3. - Profilo elettroforetico in gel di poliacrilamide al 5% della proteina 6 S paragonato a quello di immunoglobuline G (IgG), tireoglobulina 19S, sieralbumina bovina (BSA) e proteina 3,4 S. Quest'ultima è stata ottenuta dalla medesima preparazione da cui è stata purificata la proteina 6 S (ved. Parte Sperimentale). Migrazione dall'alto verso il basso. Altre condizioni di elettroforesi come in fig. 2.

frazioni « leggere » del gradiente di saccarosio, poteva essere presumibile. Tali proteine sono le immunoglobuline G (Ig G) e la sieralbumina (BSA). In fig. 3 vengono riportati i tracciati elettroforetici della preparazione della subunità 6 S, della tireoglobulina 19 S, della sieralbumina bovina, della immunoglobulina G e di una proteina 3,4 S presente nelle frazioni « leggere » dei gradienti di saccarosio. Dall'esame della figura è evidente che, benchè il compo-

nente 6 S correlato con la tireoglobulina (che migra verso la porzione centrale della colonnina di gel) rappresenti la banda proteica più importante, esistono almeno due contaminanti proteici, uno avente mobilità simile alle immunoglobuline G e l'altra mobilità simile alla sieralbumina bovina (BSA) e alla migrazione di una proteina 3,4 S isolata dalle frazioni « leggere » del gradiente di saccarosio durante la medesima preparazione descritta per il componente 6 S.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati riportati nel presente lavoro dimostrano che è possibile ottenere piccole quantità di un componente avente coefficiente di sedimentazione di circa 6 S, partendo dagli estratti tiroidei solubili di ghiandole tiroidee di ratto.

Tale componente coincide, per quanto riguarda la velocità di sedimentazione, con il componente 6 S marcato con ^3H -leucina, ottenuto dopo incubazione *in vitro* di ghiandole tiroidee di ratto in presenza di questo aminoacido. Tale componente è correlato immunologicamente con la tireoglobulina 19 S isolata dalla stessa specie animale [4, 13].

Il componente proteico 6 S isolato nel presente lavoro, oltre a possedere velocità di sedimentazione in gradiente di saccarosio simile a quella della subunità ^3H -6 S, presenta, all'elettroforesi in gel di poliacrilamide, una banda proteica che coincide esattamente con la migrazione della subunità ^3H -6 S. Ciò dimostra che tale componente contiene certamente la subunità 6 S visibile, oltre che come radioattività, anche come proteina. Non è ancora certo se tale subunità sia il risultato della sintesi avvenuta *in vitro* durante i 30' di incubazione, ovvero essa sia presente in condizioni di « steady state » nella ghiandola tiroidee in quantità minime e in equilibrio con la forma proteica largamente più stabile sintetizzata dalle cellule tiroidee, cioè la tireoglobulina 19 S.

Il componente isolato 6 S, tuttavia, presenta almeno due frazioni proteiche contaminanti, probabilmente di origine plasmatica: una frazione costituita da Ig G, dimostrabile, oltre che mediante elettroforesi (vedi fig. 3), anche immunologicamente (risultato non presentato) e una frazione sieralbuminica. La contaminazione con Ig G non desta sorpresa, se si considera che le varie tappe di purificazione hanno incluso la precipitazione con solfato di ammonio entro limiti nei quali possono essere co-precipitate piccole quantità di γ -globuline. Inoltre tali proteine posseggono un coefficiente di sedimentazione di 6,5 S e non sono pertanto separabili dalla proteina 6 S mediante ultracentrifugazione.

La contaminazione con piccole quantità di una proteina simile alla albumina è anche spiegabile, dal momento che tale proteina rappresenta il principale contaminante proteico degli estratti tiroidei acquosi di qualsiasi specie animale [14]. Non è ancora certo se questa frazione simile all'albumina del siero sia anche essa una contaminante plasmatica, come le immunoglobuline, ovvero una proteina sintetizzata dalle cellule tiroidee, come sembra

indicare la somiglianza tra il coefficiente di sedimentazione di questa proteina e quello di una frazione proteica marcata con ^3H -aminoacidi dopo incubazione *in vitro* di ghiandole tiroidee di ratto [4].

In conclusione, si può affermare che gli estratti tiroidei solubili di ratto (e verosimilmente anche di altre specie animali) contengono piccole quantità di una subunità nativa (6S) della tireoglobulina.

Utilizzando grandi quantità di tessuto tiroideo è possibile ottenere preparazioni parzialmente purificate di questa subunità. Ulteriori ricerche da effettuarsi partendo da ghiandole tiroidee di maggiori dimensioni (quale la ghiandola tiroide di maiale, di bue o di uomo) permetteranno di isolare questa subunità eliminando le maggiori proteine contaminanti, rappresentate da immunoglobuline e sieroalbumine forse di origine plasmatica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] SEED R. W. e GOLDBERG I. H., « Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. », 50, 275 (1963).
- [2] LISSITZKY S., ROQUES M., TORRESANI J., SIMON C. e BOUCHILLOUX S., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 20, 71 (1965).
- [3] VECCHIO G., SALVATORE M. e SALVATORE G., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 25, 402 (1966).
- [4] VECCHIO G., CARLOMAGNO M. S. e CONSIGLIO E., in corso di pubblicazione (1971).
- [5] VOSA C., SANTORELLI V. e VECCHIO G., in corso di pubblicazione (1971).
- [6] DE CROMBRUGGE B., PITT-RIVERS R. e EDELHOCH H., « J. Biol. Chem. », 241, 2766 (1966).
- [7] LISSITZKY S., ROLLAND M., REYNAUD I., SAVARY J. e LASRY S., « European J. Biochem. », 4, 464 (1968).
- [8] PIERCE J. G., RAWITCH A. B., BROWN D. M. e STANLEY P. G., « Biochem. Biophys. Acta », 111, 247 (1965).
- [9] REISFELD R. A. e SMALL P. A., « Science », 152, 1253 (1966).
- [10] WARD S., « Anal. Biochem. », 33, 259 (1970).
- [11] IANDOLO J. J., « Anal. Biochem. », 36 (1970).
- [12] LE BOUTON A. V., « Anal. Biochem. », 26, 445 (1968).
- [13] VECCHIO G., CARLOMAGNO M. S. e CLAAR G. M., « Febs Letters », 4, 323 (1969).
- [14] SALVATORE G., SENA L., VISCIDI E. e SALVATORE M., in « C. Cassano and M. Andreoli, Current Topics in Thyroid Research », Acad. Press Inc., New York, 193 (1965).