
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CARLO VOSA, VINCENZO SANTORELLI, GIANCARLO
VECCHIO

Caratterizzazione delle subunità biosintetiche $^3\text{H-6S}$ e $^3\text{H-7S}$ 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. 247–254.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_2_247_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. — *Caratterizzazione delle subunità biosintetiche ^3H -6S e ^3H -7 S della tireoglobulina di ratto (*)*. Nota di CARLO VOSA, VINCENZO SANTORELLI e GIANCARLO VECCHIO, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY. — The heterogeneous component 3-8 S, labeled with ^3H -leucine after incubation of rat thyroid hemilobes *in vitro*, has been fractionated by means of several centrifugations in sucrose density gradients.

Two labeled components, the ^3H -6 S and the ^3H -7 S proteins have been isolated in ultracentrifugally homogeneous form. Their relations with 19 S thyroglobulin from the same species have been ascertained by means of immunologic criteria.

The molecular weight of the two proteins, determined by filtration through Sephadex G-150 and Sephadex G-200, are of about 120,000 for the ^3H -6 S and 165,000 for the ^3H -7 S. It is concluded that 19 S thyroglobulin results from the polymerization of two 6 S together with two 7 S subunits.

La biosintesi della tireoglobulina può essere studiata seguendo l'incorporazione *in vivo* o *in vitro* di aminoacidi marcati in frazioni proteiche aventi coefficienti di sedimentazione di circa 19 S (pari cioè al coefficiente di sedimentazione della tireoglobulina) dopo ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio.

È stato osservato che l'incorporazione degli aminoacidi marcati, tanto dopo incubazione *in vitro* in presenza di fettine [1] o emilobi tiroidei [2], tanto dopo iniezione *in vivo* del composto radioattivo [3], avviene dapprima in un componente avente coefficiente di sedimentazione relativamente basso e poi, a tempi più lunghi, sul componente 19 S. Il componente a sedimentazione lenta è stato definito 3-8 S, data l'eterogeneità di esso dimostrabile mediante centrifugazione in gradiente di saccarosio. È stato ipotizzato che tale componente rappresenti un precursore metabolico della tireoglobulina 19 S [1, 4]. È stato anche dimostrato che tale componente, che può essere marcato con carboidrati, quali il mannosio, ma non il galattosio [5], è correlato immunologicamente con la tireoglobulina 19 S proveniente dalla stessa specie animale [6, 7]. Recentemente Roques *et al.* [8] hanno riportato una parziale caratterizzazione di questo componente ed hanno riferito la presenza nell'ambito di esso di frazioni proteiche marcate aventi peso molecolare differente.

Tuttavia questi Autori non hanno ottenuto una separazione del componente eterogeneo 3-8 S nei suoi componenti costitutivi e pertanto la stima dei pesi molecolari ottenuta è verosimilmente inesatta.

Nel presente lavoro viene riportato un metodo di separazione che ha permesso di ottenere frazioni altamente purificate di due composti marcati

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

(**) Nella seduta del 20 febbraio 1971.

presenti nel componente 3-8 S: le frazioni proteiche così purificate sono state poi sottoposte a filtrazione su gel di destrano (Sephadex G-150 e G-200) per la determinazione dei loro pesi molecolari.

PARTE SPERIMENTALE

A) *Preparazione delle subunità marcate 6 S e 7 S.* L'incubazione *in vitro* di ghiandole tiroidee di ratto in presenza di $4,5 \text{ } ^3\text{H-l-leucina}$ in mezzo Eagle, la purificazione degli estratti tiroidei solubili e l'ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio sono state effettuate secondo quanto precedentemente

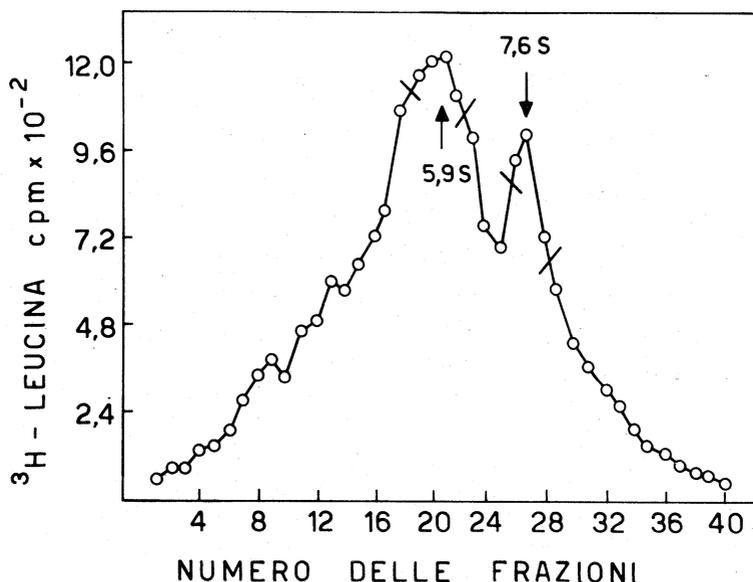


Fig. 1. - Profilo di ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio (5-28%) delle subunità marcate $^3\text{H-6 S}$ e $^3\text{H-7 S}$. Le subunità marcate di ghiandole tiroidee di ratto con $^3\text{H-leucina}$ sono state isolate dopo incubazione *in vitro* per 30' e successiva purificazione delle proteine tireoglobulina-simili a partire dal componente 3-8 S in un gradiente di saccarosio 5-40% (rotore SW 25.2; ved. Parte Sperimentale). Il coefficiente di sedimentazione veniva calcolato in base ad uno « standard » di siero albumina bovina presente in un altro tubo dello stesso rotore. Rotore SW 41 dell'ultracentrifuga Spinco-Beckman L2-65-HV; tempo di centrifugazione 30^{h} a 39.000 RPM a 4°C . La sedimentazione è da sinistra verso destra.

descritto [3, 6, 9]. Le frazioni del gradiente di saccarosio relative alla porzione superiore (a sedimentazione più lenta) di un gradiente ottenuto in un rotore preparativo dell'ultracentrifuga Spinco-Beckman (rotore SW 25.2) venivano concentrate mediante dialisi sotto vuoto, dializzate contro un tampone di $\text{KCl-0,1 M} + \text{Na-fosfati-0,02 M}$, $\text{pH} = 7,4$ (tampone « standard ») e ricentrifugate in un nuovo gradiente di saccarosio con il rotore SW 41 dell'ultracentrifuga Spinco-Beckman. Il risultato di questa seconda ultracentrifugazione è riportato in fig. 1. Due frazioni proteiche marcate con $^3\text{H-leucina}$ pos-

sono essere ben separate in queste condizioni sperimentali, una frazione avente coefficiente di sedimentazione 6 S e una 7 S. A partire dal diagramma mostrato in fig. 1 soltanto tre tubi corrispondenti ai valori massimi di radioattività sia per la 6 S che per la 7 S (secondo i tagli riportati in figura) sono stati utilizzati per la caratterizzazione successiva delle due subunità marcate della tireoglobulina.

B) *Determinazione del peso molecolare dell' ^3H -6 S e ^3H -7 S mediante filtrazione su gel di destrano (Sephadex G-150 e Sephadex G-200).* Le colonne sono state preventivamente tarate con proteine aventi peso molecolare noto; inoltre i campioni contenenti la proteina ^3H -6 S o ^3H -7 S venivano applicati insieme con almeno due proteine di riferimento.

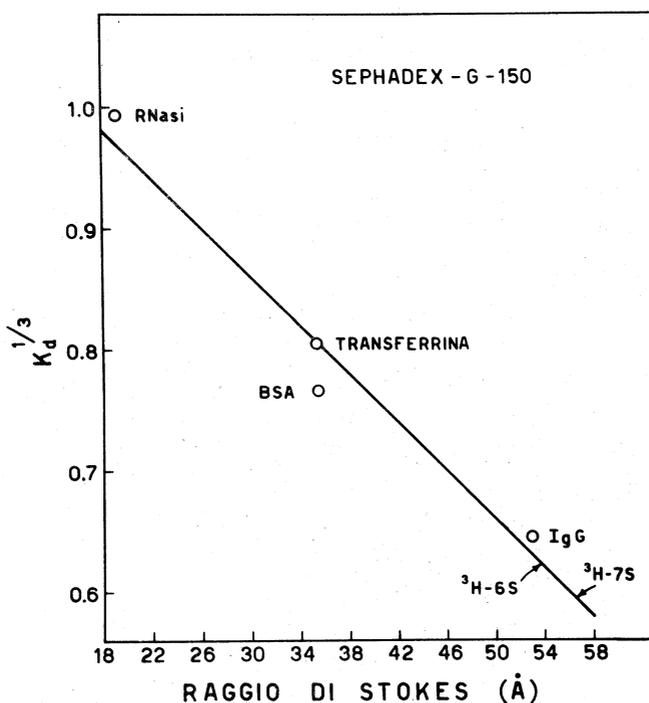


Fig. 2. - Interrelazione tra raggio di Stokes di alcune proteine di riferimento e relativi valori di $K_d^{1/3}$ ottenuti a partire dai volumi d'eluizione delle proteine medesime su una colonna Sephadex G-150 (ved. Parte Sperimentale). Nel grafico sono anche indicati i valori di raggio di Stokes ottenuti per le proteine ^3H -6 S e ^3H -7 S sottoposte a filtrazione attraverso la medesima colonna.

La colonna di Sephadex G-150 aveva un volume totale (« bed volume ») pari a 14 ml (diametro = 0,7 cm ed altezza = 33,4 cm, rispettivamente). L'eluizione delle proteine dalla colonna era ottenuta mediante un tampone « standard » a $+4^\circ\text{C}$. Le frazioni raccolte avevano un volume di 0,6 ml e la velocità di flusso era di 3,5 ml/h.

Un'aliquota di ciascuna frazione veniva prelevata e posta in fiale per la scintillazione liquida per misurarne la radioattività dovuta al tritio, mentre l'assorbimento ottico a $280\text{ m}\mu$ del volume residuo di ciascuna frazione mostrava l'andamento dell'eluizione delle proteine di riferimento.

In fig. 2 è riportato un grafico, nel quale, sull'asse delle ascisse è riportato il raggio di Stokes delle proteine usate come riferimento e sull'asse delle ordinate i valori di $K_d^{1/3}$ corrispondenti calcolati dal volume di eluizione ottenuto sperimentalmente. I valori di K_d sono stati calcolati in base alla formula:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_g - V_0}, \quad [10]$$

dove V_e = volume di eluizione delle proteine in esame;

V_0 = volume escluso della colonna;

V_t = volume totale del letto della colonna;

V_g = volume non accessibile al solvente (cioè volume dovuto alle molecole che costituiscono il gel);

inoltre

$$V_g = \frac{V_\tau}{B \times d}$$

dove B = volume occupato dal gel per grammo di sephadex secco;

d = densità del sephadex secco.

I raggi di Stokes ottenuti per le proteine $^3\text{H}-6\text{S}$ e $^3\text{H}-7\text{S}$ risultano pari a $53,8 \text{ \AA}$ e $56,6 \text{ \AA}$ rispettivamente. Poiché tali valori nel caso della filtrazione su Sephadex G-150 si trovano al limite della curva ottenuta con proteine aventi raggio di Stokes noto, la determinazione è stata ripetuta con una colonna di Sephadex G-200 in cui proteine aventi grandezza molecolare paragonabile a quella delle subunità marcate, vengono certamente « incluse ».

La colonna di Sephadex G-200 aveva un volume totale di 160 ml (diametro 1,46 cm e altezza 92 cm). Il volume di ciascuna frazione raccolta era di 1,0 ml circa. Le altre condizioni sperimentali erano simili a quelle descritte per la colonna di Sephadex G-150.

In fig. 3 viene riportato un grafico relativo ai valori di $K_d^{1/3}$ ottenuti per le proteine di riferimento usate contro i valori noti di raggio di Stokes delle medesime proteine.

In base ai volumi di eluizione ottenuti dopo filtrazione su Sephadex G-200, i raggi di Stokes erano pari a $50,4 \text{ \AA}$ per la 6S e $57,4 \text{ \AA}$ per la 7S.

Il peso molecolare delle due subunità marcate veniva calcolato in base alla formula:

$$M = \frac{6 \pi \eta N a S}{(1 - \bar{v} \rho)} \quad [10, 11]$$

dove ρ = viscosità del solvente, in centipoises;

N = numero di Avogadro;

a = raggio di Stokes in cm^{-8} (Å);

S = coefficiente di sedimentazione $\times 10^{-13}$;

\bar{v} = volume specifico parziale in g/ml.

Il valore usato per ρ è stato di 0,0100 (la viscosità dell'acqua a $+4^{\circ}\text{C}$, dal momento che l'eluizione delle proteine è stata fatta con un solvente acquoso). I coefficienti di sedimentazione usati sono stati di 5,7 S e 7,1 S per la 6 S e la 7 S rispettivamente. Tali valori rappresentano i valori medi ottenuti mediante quattro esperimenti di centrifugazione in gradiente di saccarosio per riferimento con proteine a coefficiente di sedimentazione noto. Il valore di \bar{v} usato

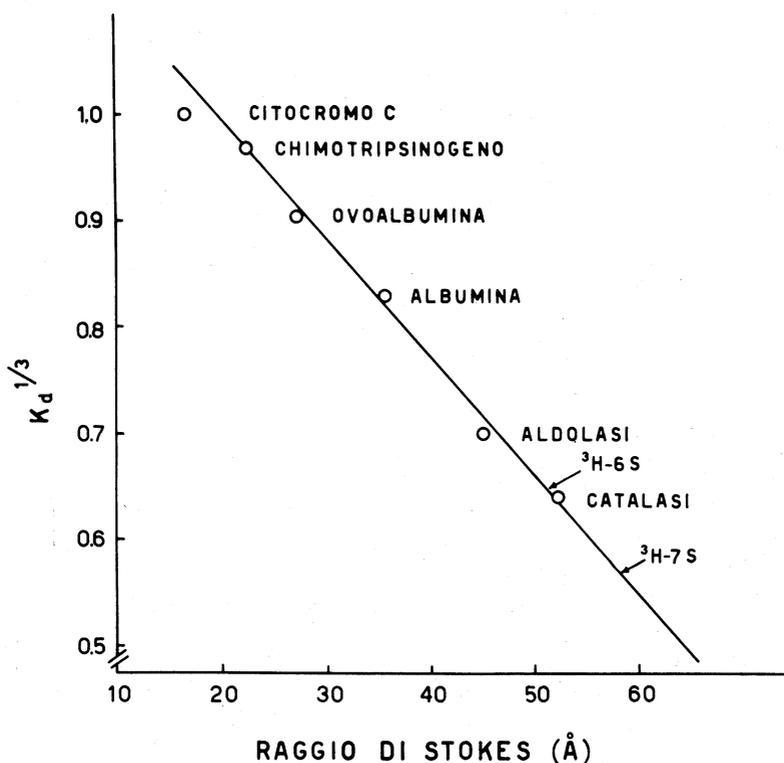


Fig. 3. - Interrelazione tra raggio di Stokes di alcune proteine di riferimento e relativi valori di $K_d^{1/3}$ ottenuti a partire dai volumi d'eluizione delle proteine medesime su una colonna Sephadex G-200 (ved. parte Sperimentale). Nel grafico sono inoltre riportati i valori di raggio di Stokes ottenuti per le proteine $^3\text{H-6 S}$ e $^3\text{H-7 S}$ sottoposte a filtrazione attraverso la medesima colonna.

non era quello della tireoglobulina 19 S (cioè 0,7135), bensì il valore considerato « medio » per le proteine e cioè 0,725. Ciò perché i valori di \bar{v} della 6 S e della 7 S sono probabilmente differenti da quelli della tireoglobulina 19 S dal momento che il contenuto in carboidrati delle due subunità marcate è senz'altro inferiore a quello della tireoglobulina [7].

Nella Tabella I sono riportati i valori di raggio di Stokes e i relativi valori dei pesi molecolari calcolati per le proteine 6 S e 7 S. Tali dati vengono confrontati con i valori noti della tireoglobulina 19 S bovina.

TABELLA I.

Raggi di Stokes e pesi molecolari delle subunità marcate 6 S e 7 S confrontati con i corrispondenti valori della tireoglobulina 19 S.

PROPRIETÀ MOLECOLARI	³ H-6 S		³ H-7 S		19 S
Raggio di Stokes . . .	53,8 ^(b)	50,4 ^(c)	56,6 ^(b)	57,4 ^(c)	57,4 ^(a)
Peso molecolare . . .	125.000 ^(d)	118.000 ^(e)	166.000 ^(d)	168.000 ^(e)	670.000 ^(a)

(a) Valori riportati da Edelhoeh [12].

(b) Determinato mediante filtrazione su gel di sephadex G-150.

(c) Determinato mediante filtrazione su gel di sephadex G-200.

(d) Calcolato sulla base del valore del raggio di Stokes ottenuto mediante filtrazione su gel di sephadex G-150 (ved. Parte Sperimentale).

(e) Calcolato sulla base del valore del raggio di Stokes ottenuto mediante filtrazione su gel di sephadex G-200 (ved. Parte Sperimentale).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati riportati nel seguente lavoro dimostrano in maniera diretta l'eterogeneità del componente 3-8 S marcato con aminoacidi radioattivi: sono state separate due proteine, a partire da tale componente, marcate con ³H-leucina, aventi coefficienti di sedimentazione pari a circa 6 S e 7 S mediante ultracentrifugazioni ripetute in gradienti di densità.

Poiché la tireoglobulina (P. M. 670.000) è costituita da subunità aventi peso molecolare inferiore, è ragionevole pensare che le molecole marcate presenti nel precursore 3-8 S rappresentino delle subunità molecolari della 19 S che ancora non hanno raggiunto il grado di polimerizzazione della tireoglobulina nativa. Mentre la 19 S risulta certamente di due subunità 12 S (PM = 330.000) unite insieme per lo più da legami di tipo non-covalente [12], il problema della grandezza molecolare delle catene polipeptidiche elementari della tireoglobulina ancora non è risolto. De Crombrughe *et al.* [13] hanno riportato un peso molecolare variabile tra 165.000 e 200.000 per questa subunità, mentre secondo Lissitzky *et al.* [14] la subunità elementare avrebbe un peso molecolare pari a 70.000-80.000. A seconda di quale delle due ipotesi sia valida, pertanto una molecola di 19 S risulterebbe composta rispettivamente da quattro o otto subunità.

Altro problema non risolto è quello riguardante l'identità o meno delle catene polipeptidiche elementari tra di loro. Benché infatti esistano prove indirette indicanti l'esistenza di due catene polipeptidiche elementari differenti nella molecola 19 S (15-18); tuttavia l'evidenza diretta di tale ipotesi, cioè l'isolamento di due differenti catene, non è stata finora fornita.

I risultati qui presentati suggeriscono che nella molecola di tireoglobulina esistano almeno due subunità aventi peso molecolare differente.

I valori di peso molecolare da noi ottenuti con il metodo della filtrazione su gel sono pari a circa 120.000 per la 6 S e a circa 167.000 per la 7 S. Bisogna considerare che queste due subunità, poiché sono state ottenute ad uno stadio relativamente precoce della sintesi della 19 S, sono quasi del tutto prive della porzione carboidratica, com'è dimostrato da esperimenti di marcaggio *in vitro* con ^3H o ^{14}C -galattosio [5]. Poiché la porzione glicidica rappresenta il 10 % in peso della tireoglobulina, è ragionevole pensare che il peso delle due subunità sarebbe pari a circa 132.000 per la 6 S e circa 184.000 per la 7 S, una volta che queste due subunità avessero ottenuto il completamento con le catene oligosaccaridiche. Dati questi valori di peso molecolare, l'ipotesi più ragionevole è che nella molecola di tireoglobulina 19 S vi siano due subunità 6 S e due subunità 7 S.

Il valore probabilmente inesatto del volume specifico parziale, assunto nel calcolo del peso molecolare (assunzione resa necessaria dall'impossibilità di determinare il valore reale con la quantità di proteine disponibile, mediante esperimenti di marcaggio con aminoacidi radioattivi), può probabilmente spiegare la lieve differenza esistente tra il valore di peso molecolare calcolato per la tireoglobulina in base all'ipotesi qui riportata (632.000) e il peso molecolare della tireoglobulina 19 S determinato sperimentalmente (650.000-670.000).

Le due subunità marcate isolate presentano un notevole grado di asimmetria, come dimostrato dalla similitudine dei valori di raggio di Stokes della 6 S e della 7 S con il raggio di Stokes della tireoglobulina. Ciò è probabilmente espressione del fatto che le due proteine neosintetizzate non sono ancora complete, dovendo ancora ricevere la maggior parte dei carboidrati nonché lo iodio, che viene aggiunto sulle molecole neosintetizzate di tireoglobulina prima della loro secrezione nei follicoli tiroidei.

Tali modificazioni chimiche sono probabilmente necessarie per conferire alle molecole della 6 S e della 7 S, una volta costituito il tetramero 19 S, la configurazione molecolare finale che esse posseggono nell'interno della molecola della tireoglobulina.

Gli Autori ringraziano il sig. E. Tufano per l'assistenza tecnica ricevuta nel corso della presente ricerca.

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] SEED R. W. e GOLDBERG I. H., « J. Biol. Chem. », 240, 764 (1965).
- [5] CARLOMAGNO M. S., ZANNINI G. e SANTONI G., lavoro in corso di pubblicazione.

- [6] VECCHIO G., CARLOMAGNO M. S. e CLAAR G. M., « FEBS Letters », *4*, 323 (1969).
- [7] VECCHIO G., CARLOMAGNO M. S. e CONSIGLIO E., lavoro in corso di pubblicazione (1971).
- [8] ROQUES M., TORRESANI I. e LISSITZKY S., « Biochim. Biophys. Acta », *194*, 406 (1969).
- [9] SALVATORE G., SALVATORE M., CAHNMANN H. J. e ROBBINS J., « J. Biol. Chem. », *239*, 3255 (1964).
- [10] SIEGEL L. M. e MONTY K. J., « Biochim. Biophys. Acta », *112*, 346 (1966).
- [11] ANDREWS P., « Methods of Biochem. Analysis », *18*, 1 (1969).
- [12] EDELHOCH H., « J. Biol. Chem. », *235*, 1326 (1960).
- [13] DE CROMBRUGGHE B., PITT-RIVERS R. e EDELHOCH H., « J. Biol. Chem. », *241*, 2776 (1966).
- [14] LISSITZKY S., ROLLAND M., REYNAUD J., SAVERY J. e LASRY S., « European J. Biochem. », *4*, 464 (1968).
- [15] EDELHOCH H., « Rec. Progr. Hormone Res. », *21*, 1 (1965).
- [16] LISSITZKY S., ROLLAND M. e BERGOT J., « Biochim. Biophys. Acta », *111*, 543 (1965).
- [17] SALVATORE G., ALOJ S., SALVATORE M. e EDELHOCH H., « J. Biol. Chem. », *242*, 5002 (1967).
- [18] NISSLEY P., CITTANOVA N. e EDELHOCH H., « Biochemistry », *8*, 443 (1969).