
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIA STELLA CARLOMAGNO, GIANCARLO ZANNINI,
GERARDO SANTONI

Biosintesi della tireoglobulina: studi sulla incorporazione di carboidrati radioattivi

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.2, p. 240-246.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_2_240_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 incorporazione di carboidrati radioattivi* (*). Nota di MARIA STELLA CARLOMAGNO, GIANCARLO ZANNINI e GERARDO SANTONI, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY. — The biosynthesis of thyroglobulin has been studied after incubation of rat thyroid hemilobes in the presence of radioactive carbohydrates and/or aminoacids. The incorporation of an aminoacid such as ^3H -leucine and of a carbohydrate such as ^3H -mannose follows a very similar pattern: a 3-8 S protein component becomes labeled at early times of incubation whereas a component having approximately the sedimentation rate of thyroglobulin (17 S) becomes labeled at later times. A sugar such as galactose (labeled with ^3H or ^{14}C) is incorporated directly into the 17-19 S component. Furthermore, the ^3H -leucine and ^3H -mannose labeled 3-8 S component is immunochemically related to thyroglobulin, whereas no ^3H -galactose radioactivity immunologically related to thyroglobulin can be traced in the same zone of the gradient.

The results indicate that mannose is incorporated on the precursor subunits of thyroglobulin whereas galactose is incorporated only after polymerization of such subunits. The incorporation of mannose takes place at a time and site very similar to those where the aminoacids are incorporated, i.e. during the protein assembly on polyribosomes.

La tireoglobulina è una grossa glicoproteina il cui contenuto in carboidrati è pari a circa il 10 % del peso totale della molecola (670.000). Le unità oligosaccaridiche sono di due tipi fondamentali [1]: la prima consiste di dieci residui di mannosio e due di acetilglucosamina e la seconda di acido sialico (2 residui), fucosio (1 residuo), galattosio (4 residui), mannosio (3 residui) ed N-acetilglucosamina (5 residui).

Nelle unità di secondo tipo l'acido sialico si trova in posizione terminale, legato ad una molecola di galattosio o fucosio, mentre il mannosio e l'N-acetilglucosamina si trovano in posizioni «interne» della catena oligosaccaridica.

È stato suggerito che l'attacco delle unità carboidratiche avvenga a tappe e che tale processo sia successivo alla sintesi della porzione proteica della molecola [2-5].

La dimostrazione di queste due ipotesi, tuttavia può derivare soltanto dalle seguenti verifiche sperimentali: 1) isolamento, durante la biosintesi della tireoglobulina, studiata mediante incorporazione di carboidrati radio-

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

(**) Nella seduta del 20 febbraio 1971.

attivi, di frazioni proteiche marcate con alcuni carboidrati e mancanti di altri; 2) isolamento, dopo incorporazione simultanea di aminoacidi e monossaccaridi marcati, di frazioni proteiche contenenti il marcante proteico ma non quello della porzione glicidica.

Nel presente lavoro si è pertanto studiata la biosintesi della tireoglobulina dopo incubazione *in vitro* di emilobi tiroidei di ratto in presenza di un aminoacido marcato con ^3H e di due carboidrati marcati: l' ^3H mannosio e l' ^3H o ^{14}C galattosio le cui posizioni reciproche sulle catene polisaccaridiche della tireoglobulina sono relativamente distanti [1].

PARTE SPERIMENTALE

A - *Incubazione in presenza di ^3H -mannosio, ^3H -leucina, ^3H -galattosio.* L'incubazione degli emilobi tiroidei di ratti Sprague-Dawley (150-200 g), la purificazione e l'analisi degli estratti tiroidei marcati venivano effettuate secondo le modalità descritte precedentemente [6-8]. Nel caso dell'incubazione con ^3H -leucina questo aminoacido veniva aggiunto ad un mezzo di Eagle [9], privo di *L*-leucina non marcata, in proporzioni variabili da 100 a 600 $\mu\text{C}/\text{ml}$ (20-100 $\mu\text{Moli}/\text{ml}$); nel caso dell'incubazione con ^3H -mannosio, questo monosaccaride veniva aggiunto in quantità pari a 200 $\mu\text{C}/\text{ml}$ (0,36 $\mu\text{Moli}/\text{ml}$) insieme con D-galattosio non marcato (5,24 $\mu\text{Moli}/\text{ml}$); nel caso dell'incubazione con ^3H -galattosio questo composto era aggiunto in quantità pari a 200 $\mu\text{C}/\text{ml}$ (0,083 $\mu\text{Moli}/\text{ml}$) insieme con *L*-leucina non marcata (20-100 $\mu\text{Moli}/\text{ml}$) e D-mannosio non marcato (5,24 $\mu\text{Moli}/\text{ml}$). L'aggiunta dei carboidrati non marcati veniva effettuata allo scopo di prevenire la conversione di un composto marcato nell'isomero non marcato da parte delle tiroidi *in vitro* [10]. L'incorporazione dei carboidrati era sempre effettuata in mezzo di Eagle privo di glucosio.

I risultati di un tipico esperimento, ottenuti dopo 10' e 30' di incubazione in presenza dei tre composti marcati sono riportati in fig. 1. I profili di radioattività, che si riferiscono alle proteine marcate (^3H -leucina ed ^3H -mannosio) sono molto simili. Dopo 10' di incubazione le specie marcate sono: un componente leggero, il cui coefficiente di sedimentazione varia tra 5 e 9 S, un componente 12 S ed uno 17 S; una maggiore percentuale di radioattività è legata al componente 17 S a 30' più che a 10'.

Nel caso dell' ^3H -galattosio, invece, la radioattività, già dopo 10', è distribuita pressochè interamente sul componente 17 S mentre è solo in piccola proporzione associata con un componente leggero. La radioattività è quasi del tutto assente da tale componente dopo 30' di incubazione *in vitro* con ^3H -galattosio.

Il componente leggero è stato suddiviso in tre frazioni, secondo i tagli mostrati in fig. 1. Tali frazioni sono state saggiate contro un siero anti-tireoglobulina 19 S di ratto, allo scopo di accertare l'esistenza o meno di identità

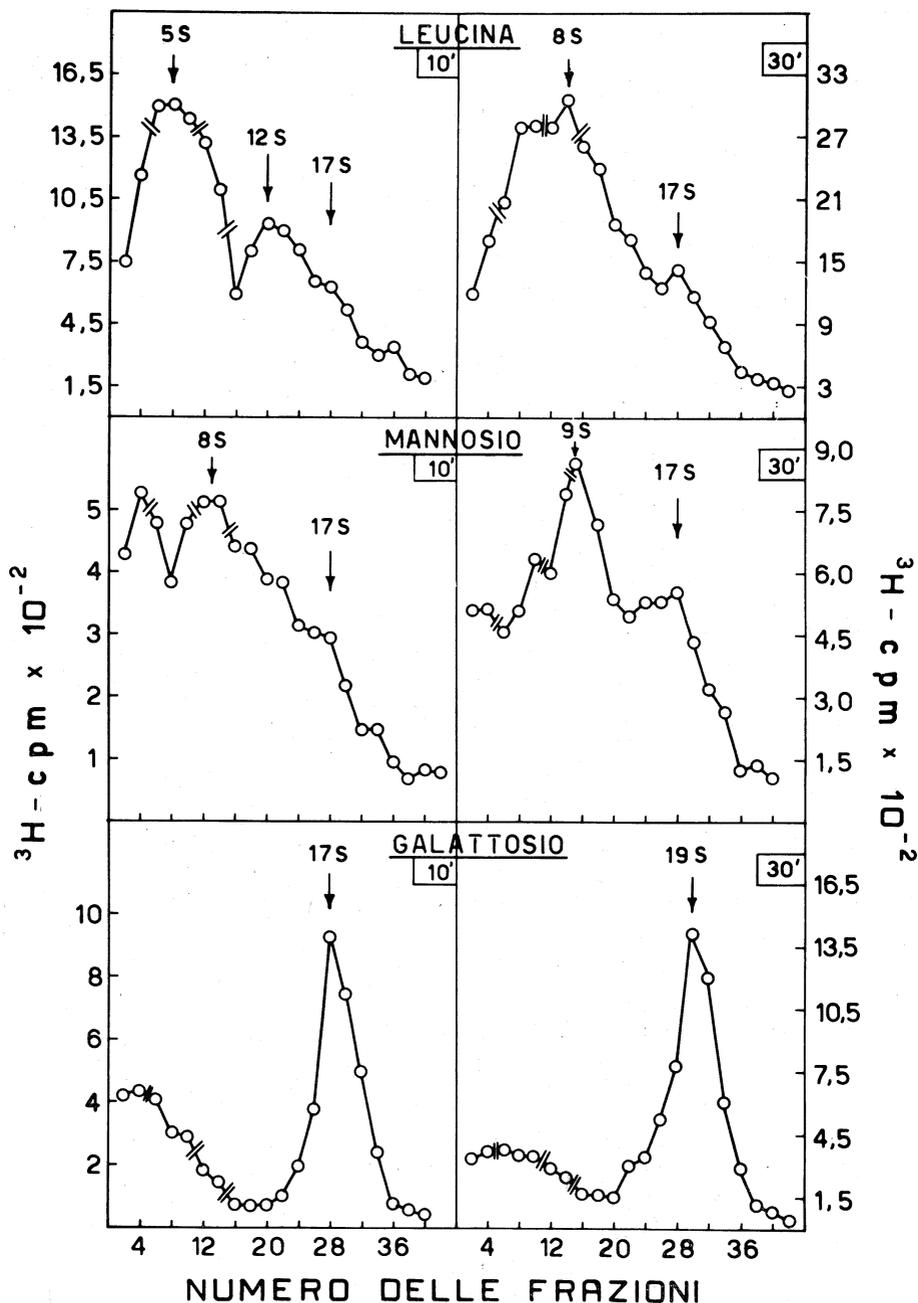


Fig. 1. - Tracciati di ultracentrifugazione in gradienti di saccarosio delle proteine tireoglobulino-simili purificate da ghiandole tiroidei di ratto incubate *in vitro* con ^3H -leucina, ^3H -mannosio o ^3H -galattosio per 10' o 30'. Ghiandole tiroidei di 7 ratti venivano incubate in 2,5 ml di mezzo Eagle nel caso di ciascuno composto marcato, aggiungendo delle quantità di questi ultimi specificate nella Parte Sperimentale. Alla fine dell'incubazione, avvenuta in atmosfera di CO_2 (5%) + O_2 (95%), le ghiandole sono state lavate in tampone KCl 0,1 M + PO_4^- 0,02 M, pH=7,4 a 0°C , congelate per 30'. L'estrazione e la purificazione delle ghiandole è stata effettuata seguendo tecniche precedentemente descritte [6-8]. Gradiente di saccarosio dal 5 al 34%, rotore SW 25.3 dell'ultracentrifuga Spinco-Beckmann L-2-65 HV. Tempo di centrifugazione a 23.000 *rpm*, 26^h e 30'. La sedimentazione è da sinistra verso destra.

antigeniche tra i composti marcati isolati e la tireoglobulina 19 S. Le prove di immunoprecipitazione sono state effettuate secondo quanto descritto precedentemente [8]. I risultati di tali prove sono presentati nella Tabella I.

TABELLA I.

Immuno-precipitazione del componente 3-8 S marcato con ^3H -leucina, ^3H -mannosio ed ^3H -galattosio (1).

FRAZIONE E TEMPO DI MARCAMENTO	MARCATE (% DI PRECIPITAZIONE)		
	^3H -Leucina	^3H -Mannosio	^3H -Galattosio
A-10'	34,3	44,4	32,0
B-10'	34,5	55,4	33,3
C-10'	60,6	79,0	16,4
A-30'	39,9	48,0	22,1
B-30'	43,5	65,0	41,0
C-30'	48,9	79,8	20,0

(1) Il componente ^3H -3-8 S è stato ottenuto dai tubi 2-5 (frazione A), 6-11 (frazione B), 12-15 (frazione C) dei gradienti di saccarosio mostrati in fig. 1. A ciascuna frazione, pari a circa 10.000-100.000 dpm in 200 μl di tampone « standard » sono stati aggiunti 20 μl di antisiero anti-tireoglobulina di ratto. Dopo 30' a + 37°C e 48h a + 4°C la miscela di reazione è stata centrifugata a $9500 \times g \times 10'$ e la radioattività dei precipitati e dei supernatanti è stata misurata in un contatore a scintillazione liquida. La precipitazione della radioattività veniva inibita quantitativamente mediante aggiunta di un eccesso di tireoglobulina 19 S di ratto non marcata.

Dall'esame della tabella si rileva che:

- 1) la percentuale di precipitazione della radioattività aumenta in funzione della velocità di sedimentazione della frazione esaminata ($C > B > A$) ed in funzione del tempo di pulso-marcatura ($30' > 10'$);
- 2) le frazioni marcate con galattosio presentano percentuali di precipitazione nettamente inferiori a quelle osservabili con gli altri due composti radioattivi. Tale precipitazione, inoltre, non sembra correlata con la velocità di sedimentazione delle frazioni isolate o con il tempo di incubazione *in vitro* delle ghiandole.

B - *Incubazione in presenza di ^3H -mannosio e C^{14} -galattosio aggiunti simultaneamente.* Il D-mannosio L - ^3H veniva aggiunto in quantità pari a 400 $\mu\text{C}/\text{ml}$ (3,6 $\mu\text{Moli}/\text{ml}$). Il mezzo di Eagle usato era privo di glucosio. I risultati ottenuti dopo incubazione *in vitro* per 30' in presenza dei due composti marcati

sono presentati in fig. 2. La radioattività dovuta al mannosio è distribuita su quattro picchi, aventi coefficiente di sedimentazione di 3 S, 7 S, 12 S, e 16 S; la radioattività dovuta al galattosio è quasi interamente distribuita sul componente 16 S, ed in parte su quello 12 S, mentre manca del tutto sui componenti a coefficiente di sedimentazione inferiore a 12 S.

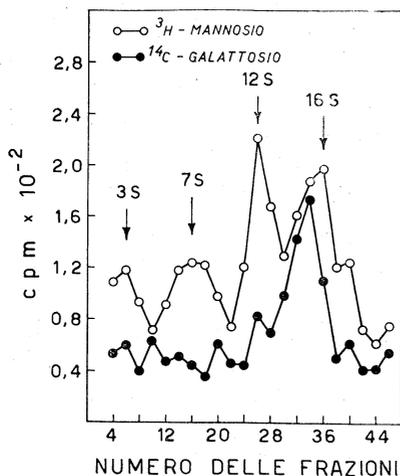


Fig. 2. - Tracciato di ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio delle proteine tireoglobulino-simili purificate da ghiandole tiroidee di ratto incubate *in vitro* con ^3H -mannosio e ^{14}C -galattosio per 30'. Ghiandole tiroidee di 9 ratti venivano incubate in 2,5 ml di mezzo di Eagle privo di glucosio aggiungendo le quantità di composti marcati specificate nella Parte Sperimentale. Gradiente di saccarosio 5-28%, rotore SW41 dell'ultracentrifuga Spinco-Beckman L-2-65 HV. Tempo di centrifugazione a 39.000 rpm, 12h. Sedimentazione da sinistra verso destra.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

È noto che l'incorporazione di aminoacidi marcati nella tireoglobulina 19 S è preceduta tanto *in vitro* [11] che *in vivo* [7] dalla comparsa di frazioni «leggere» che sedimentano in gradiente di saccarosio in una zona definita 3-8 S. Si pensa che il componente 3-8 S rappresenti il precursore biosintetico della tireoglobulina [11, 12] e recentemente è stata dimostrata l'esistenza di identità strutturali tra esso e la tireoglobulina 19 S [8, 13].

I risultati esposti nel presente lavoro hanno dimostrato che il componente 3-8 S può essere marcato *in vitro* oltre che con ^3H -leucina anche con ^3H -mannosio.

Le frazioni marcate con entrambi questi composti vengono precipitate in presenza di un siero anti-tireoglobulina di ratto il che è indice della stretta somiglianza strutturale esistente tra questo componente marcato e la 19 S della stessa specie animale. I risultati ottenuti con ^3H o ^{14}C galattosio, invece, hanno dimostrato che questo carboidrato è quasi totalmente assente dal componente 3-8 S anche a tempi relativamente brevi di incubazione (vedi fig. 1). Una certa percentuale di radioattività dovuta ad ^3H -galattosio è sì presente su di un componente avente lenta velocità di sedimentazione, tuttavia gli esperimenti di immunoprecipitazione hanno dimostrato che tale radioattività non è correlata con la tireoglobulina o lo è soltanto in piccola misura. Questi risultati indicano che il galattosio non viene incorporato sul precursore

biosintetico 3-8 S della tireoglobulina, ma soltanto ad uno stadio successivo della sintesi di questa glicoproteina.

Che il mannosio ed il galattosio vengano incorporati in momenti successivi è dimostrato in maniera diretta dalla prova d'incubazione simultanea dei due composti marcati (vedi fig. 2). È evidente infatti, in questo caso, l'assenza completa del galattosio dal componente leggero 3-8 S, e la presenza, in notevoli proporzioni, di radioattività dovuta al mannosio nella stessa regione del gradiente.

L'evidenza su basi biochimiche dell'attacco sequenziale dei due carboidrati sulla tireoglobulina è stata recentemente avvalorata da esperimenti di autoradiografia associati alla osservazione al microscopio elettronico [14]. Dopo marcaggio di ghiandole tiroidee con ^3H -mannosio o ^3H -galattosio è stato dimostrato che i due marcatori si distribuiscono in siti subcellulari diversi: il primo è localizzato a tempi brevi sul reticolo endoplasmico (sede attiva di sintesi proteica), il secondo sull'apparato di Golgi. I risultati qui presentati pertanto confermano l'ipotesi dell'attacco sequenziale dei carboidrati sulla porzione oligosaccaridica della tireoglobulina: alcuni più «esterni» quale ad esempio il galattosio, vengono aggiunti direttamente sulle subunità della tireoglobulina che hanno polimerizzato per formare molecole di 19 S; altri, quali il mannosio, vengono aggiunti direttamente sulle subunità prima della loro successiva polimerizzazione.

Il momento di attacco dei carboidrati del tipo del mannosio alle catene polipeptidiche della tireoglobulina non è differenziabile dal momento dell'incorporazione di un aminoacido quale la leucina, in base ai risultati qui riportati. Ciò sembrerebbe indicare che i due processi (sintesi dello scheletro polipeptidico ed aggiunta di alcuni residui oligosaccaridici) avvengano simultaneamente e quindi che la porzione glicidica della tireoglobulina sia sintetizzata sui poliribosomi mentre gli aminoacidi vengono legati per formare le subunità proteiche.

Carlomagno *et al.* (risultati non pubblicati) hanno in effetti dimostrato recentemente che sia il ^{14}C -mannosio che la ^{14}C -N-acetilglucosamina sono presenti sulla frazione poliribosomiale isolata da ghiandole tiroidee di ratto incubate *in vitro* in presenza di questi composti. È interessante notare che l'associazione sia del mannosio che della N-acetilglucosamina con poliribosomi è stata dimostrata anche nel caso delle immunoglobuline [15].

Sulla base dei risultati presentati si può concludere pertanto che il mannosio viene incorporato sulle catene polipeptidiche che costituiscono la tireoglobulina ad uno stadio molto precoce della loro formazione (probabilmente mentre queste catene sono sintetizzate sui poliribosomi); il galattosio, invece, viene aggiunto dopo che le catene monomeriche della tireoglobulina sono state rilasciate dai poliribosomi, ad uno stadio verosimilmente successivo a quello della loro polimerizzazione in molecole di 17 S-19 S.

BIBLIOGRAFIA

- [1] SPIRO R. G., « J. Biol. Chem. », 240, 1603 (1965).
- [2] SPIRO, R. G. e SPIRO M. S., in « C. Cassano e M. Andreoli, Current Topics in thyroid research », Academic Press., Inc. New York, 157 (1965).
- [3] SPIRO R. G., « New Eng. J. Med. », 281, 991 (1969).
- [4] SPIRO R. G. e SPIRO M. S., « J. Biol. Chem. », 241, 1271 (1966).
- [5] CHEFTEL C. e BOUCHILLOUX S., « Biochim., Biophys., Acta », 170, 15 (1968).
- [6] SALVATORE G., SALVATORE M., CAHNMANN H. S. e ROBBINS J., « J. Biol. Chem. », 239, 3267 (1962).
- [7] VECCHIO G., SALVATORE M. e SALVATORE G., « Biochem. Biophys. Res. Commun. », 25, 402 (1966).
- [8] VECCHIO G., CARLOMAGNO M. S. e CLAAR G. M., « Febs Letters », 4, 323 (1969).
- [9] EAGLE H., « Science », 130, 432 (1959).
- [10] HERSCOVICS A., « Biochem. J. », 112, 709 (1969).
- [11] SEED R. W. e GOLDBERG I. H., « Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. », 50, 275 (1963).
- [12] SEED R. W. e GOLDBERG I. H., « J. Biol. Chem. », 240, 764 (1965).
- [13] VECCHIO G., CARLOMAGNO M. S. e CONSIGLIO E. 1971, in corso di pubblicazione.
- [14] WHUR P., HERSCOVICS A. e LEBLOND C. P., « J. Cell. Biol. », 43, 289 (1969).
- [15] MELCHERS F. e KNOPF P. M., « Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. », 32, 255 (1967).