

# Zachowawczość sekwencji aminokwasowych ferrytyny

Joanna Smól

Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polska Akademia Nauk  
Poznań

Sekwencja nukleotydów w cząsteczkach DNA określa sekwencję aminokwasową zakodowanego przez nie białka, ale nie ujawnia modyfikacji posttranskrypcyjnych. Sekwencja aminokwasów z kolei łączy informację genetyczną (zapisaną w DNA) ze strukturą przestrzenną białka, od której zależy jego funkcja biologiczna. Sekwencje aminokwasowe białek niespokrewnionych bardzo różnią się między sobą. Podobieństwa sekwencji aminokwasowych pojawiają się tylko u tych białek, które wywodzą się ze wspólnego pnia ewolucyjnego. Porównując sekwencje tych samych białek wyizolowanych z różnych gatunków można wyciągnąć wnioski na temat ich genealogicznego pokrewieństwa, a natura przypadkowych mutacji pozwala także określić czas dywergencji (czyli rozdzielenia się) dwóch linii ewolucyjnych. W związku z tym sekwencje aminokwasowe dostarczają wiele cennych informacji dotyczących pokrewieństwa białek, ich stosunków ewolucyjnych i chorób wywołanych mutacjami. Znajomość sekwencji jest również bardzo cenna w badaniach nad konformacją i funkcją białek (1).

W celu ustalenia sekwencji aminokwasowej ferrytyny łubinowej wykonano *western blotting*. Otrzymaną replikę na membranie PVDF wykorzystano do przeprowadzenia sekwencjonowania w Wittmann Institute of Technology and Analysis of Biomolecules w Teltow k. Berlina, Niemcy.

W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano następującą N-końcową sekwencję aminokwasową:

**PNVSLARQNY**

Z analizy N-końcowych sekwencji aminokwasowych obu podjednostek ferrytyny łubinowej wynika, że podjednostka lekka powstaje przez skrócenie podjednostki ciężkiej. Sekwencje N-końcowe obu podjednostek są bowiem identyczne. Najprawdopodobniej podjednostki te są wynikiem modyfikacji posttranslacyjnej, a nie produktami różnych mRNA specyficznych dla ferrytyny.

Następnie porównano sekwencję aminokwasową ferrytyny łubinowej ze znanymi już sekwencjami aminokwasowymi ferrytyny wyizolowanej z różnych organizmów:

## a) roślin:

- *Glycine max* (soja zwyczajna);
- *Phaseolus vulgaris* (fasola zwykła);
- *Pisum sativum* (groch zwyczajny);
- *Zea mays* (kukurydza zwyczajna);

## b) zwierząt:

- *Xenopus laevis* (żaba szponiasta);
- *Lymnaea stagnalis* (błotniarka stawowa) — komórki somatyczne i oocyty;
- *Pacifastacus leniusculus* (langusta);

c) człowieka (*Homo sapiens*).

Sekwencje te wyszukano w GenBanku dostępnym na serwerze National Center for Biotechnology Information (2-8). Porównywano je za pomocą programu komputerowego Pile Up (9). W zestawieniu nie ujęto sekwencji bakteryjnych, ponieważ dostępne sekwencje były zbyt krótkie, aby komputer mógł je uwzględnić w analizie porównawczej.

	1				50
<i>G. max</i>	..MALAPSKV	SS...FSGF	SPKPSVGDAL	KNPTCSVLS	FANVKLGSRN
<i>P. vulgaris</i>	..MALAPSKV	SP...FSGF	SLSDVG.VAV	RNPTCSVLS	FLNKKVGRN
<i>P. sativum</i>	..MALSSSKF	SS...FSGF	SLSPVSGNGV	QKP..FCDL	RVGEKWGRK
<i>Z. mays</i>	MMLRVSSSPA	AAVANHLGG	AAATAPARV	TAQRSGVLS	AAAAAGKQKE
<i>H. sapiens</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>X. laevis</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>L. stagnalis som</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>P. leniusculus</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>L. stagnalis ooc</i>	.....	.....	.....	.....	.....
	51				100
<b><i>L. luteus</i></b>				<b>PNVSLARQN</b>	<b>Y</b>
<i>G. max</i>	LRVCASTVPL	SGVIFEPFEE	VKKGELAVPT	APQVSLARQN	YADECESAIN
<i>P. vulgaris</i>	LGVSASTVPL	TGVI FEPFEE	VKKEELXVPT	AGQVSLARQY	YADECESAIN
<i>P. sativum</i>	FRVCATTAPL	TGVI FEPFEE	VKKDYLVPS	VPLVSLARQN	FADECESVIN
<i>Z. mays</i>	V.....L	SGVVFQPFEE	IKGELALVPQ	SPDRSLARHK	FVDDCEAAIN
<i>H. sapiens</i>	.....	.....	.....MT	TASTSQVRQN	YHQDSEAAIN
<i>X. laevis</i>	.....	.....	.....	..MQSQVRQN	FHSDCEAAIN
<i>L. stagnalis som</i>	.....	.....	.....	..MSVSQARQN	YHAESEAGIN
<i>P. leniusculus</i>	.....	.....	.....	..MASQIRHN	YHEDCEP..IN
<i>L. stagnalis ooc</i>	.....M	NSVLFLLAV	CSSLAY...G	KEFVATVRQN	YKENINQMLE
	101				150
<i>G. max</i>	EQIKVEYNAS	YAYHSLFAYF	DRDNVALKGF	AKFFKESSEE	EREHAEKLMK
<i>P. vulgaris</i>	EQINVEYNAS	YVYHSLFAYF	DRDNVALKGF	ARXFKESSEE	EREHAEKLMK
<i>P. sativum</i>	EQINVEYNVS	YVYHSMFAYF	DRDNVALKGF	AKFFKESSEE	EREHAEKLMK
<i>Z. mays</i>	EQINVEYNAS	YAYHSLFAYF	DRDNVALKGF	AKFFKESSEE	EREHAEKLMK
<i>H. sapiens</i>	RQINLELYAS	YVYLSMSYFF	DRDDVALKNF	AKYFLHQSHS	EREHAEKLMK
<i>X. laevis</i>	RMVNMEMYAS	YVYLSMSYFF	DRDDVALHHV	AKFFKESSEE	EREHAEKFLK
<i>L. stagnalis som</i>	RQINMELYAS	YSYQSMAYFF	DRDDVALPGF	HKFFKHSQSE	EREHAEKLMK
<i>P. leniusculus</i>	KQINLEFYAS	YVYMSMGHYF	DRDDISLPGA	SKFFKDSSEE	EREHGQKLMK
<i>L. stagnalis ooc</i>	QQIQKELAAS	YIYQAYASYF	QRADVSLPGI	KKFFSDASSE	ERDDAQSLID

	151				200
<i>G. max</i>	YQNTRGGRV . . . . .	..VLHAIKNV	PSEF . . . . .		
<i>P. vulgaris</i>	YQNTRGGRV . . . . .	..VLHPIKNV	PSEF . . . . .		
<i>P. sativum</i>	YQNTRGGRV . . . . .	..VLHPIKDV	PSEF . . . . .		
<i>Z. mays</i>	YQNKRGGRV . . . . .	..RLQSIVAP	LTEF . . . . .		
<i>H. sapiens</i>	LQNQRGGRI . . . . .	..FLQDIKKP	DCD . . . . .		
<i>X. laevis</i>	YQNKRGGRV . . . . .	..VLQDIKKP	ERD . . . . .		
<i>L. stagnalis som</i>	YQNKRGGRV . . . . .	..VLQDIKKP	DRD . . . . .		
<i>P. leniusculus</i>	YQNKRGRI . . . . .	..VLQAIAAP	SLQ . . . . .		
<i>L. stagnalis ooc</i>	YINQRGGHVQ YDKIDLKDAC	ETVMKFKVTS	TSGLEEFDR	RMCI	CGFVAT
	201				250
<i>G. max</i>	. . . . . EH	VEKGDALYAM	ELALSLEKLV	NEKLLNVHSV	ADRNDPQLA
<i>P. vulgaris</i>	. . . . . EH	VEKGDALYAM	ELALSLEKLV	NEKLRVHSV	ADRNDPQLA
<i>P. sativum</i>	. . . . . EH	VEKGDALHAM	ELALSLEKLT	NEKLLNVHSV	AERNNDLEMT
<i>Z. mays</i>	. . . . . DH	PEKGDALYAM	ELTLALEKLV	NEKLHSLHGV	ATRCNDPQLI
<i>H. sapiens</i>	. . . . .	.DWESGLNAM	ECALHLEKNV	NQSLLELHKL	ATDKNDPHLC
<i>X. laevis</i>	. . . . .	.EWGNTLEAT	QAALQLEKTV	NQALLDLHKL	ASDKVDAHLC
<i>L. stagnalis som</i>	. . . . .	.EWGTGLEAM	QVALQLEKSV	NQSLLDLHKL	CTSHDDAQMA
<i>P. leniusculus</i>	. . . . .	.EWGNLHDAL	QAALDLENEV	NQSLLDLDAT	ASKINDPHLT
<i>L. stagnalis ooc</i>	KTINDNCGER	SDWKEGLIAF	EDTLAIERYV	NAQLLDIHKK	ADDEKDAHLT
	251				300
<i>G. max</i>	DFIESEFLSE	QVESIKKISE	YVAQLRRVG . .	KGHGVWHF	DQRLLD . . .
<i>P. vulgaris</i>	DFIESEFLSE	QVEAIKKISE	YVAQLRMVG . .	KGHGVWHF	DQSLLDHGHA
<i>P. sativum</i>	HFIEGEYLAE	QVEAIKKISE	YVAQLRRVG . .	KGHGVWHF	DQRLLDHGVAH
<i>Z. mays</i>	DFIESEFLEE	QVEAINKVSK	YVAQLRRVG . .	NKGHGVWHF	DQMLLQEGA .
<i>H. sapiens</i>	DFIETHYLNE	QVKAIKELGD	HVTNLRKMGV	PESGLAEYLF	DKH . . . . .
<i>X. laevis</i>	DFLESEYLEE	QVKAMKQLGD	YITNLKRLVG	PQNGMGYELF	DKH . . . . .
<i>L. stagnalis som</i>	DFLESEFLEE	QVKSIKELSD	YITNLKRVGP	. . .GLGEYIF	DKE . . . . .
<i>P. leniusculus</i>	NMLEGEFLEE	QVESIEKIGN	LITRLKRAGT	. .SGLGEFLF	DKELKQRFPL
<i>L. stagnalis ooc</i>	HILEHEFLEE	QVSSINKIAH	AITRLRSFE .	.QSGSNYYKL	GRVYLRPTPQ
	301				
<i>G. max</i>	. . . . .				
<i>P. vulgaris</i>	A . . . . .				
<i>P. sativum</i>	A . . . . .				
<i>Z. mays</i>	. . . . .				
<i>H. sapiens</i>	TLGSDNES				
<i>X. laevis</i>	TLGESS . . .				
<i>L. stagnalis som</i>	TLSSSS . . .				
<i>P. leniusculus</i>	SLTSHPN . .				
<i>L. stagnalis ooc</i>	ISH . . . . .				

Zachowawczość sekwencji aminokwasów w roślinnych ferrytynach waha się od 60 do 92,5%. Wszystkie przedstawione ferrytyny pochodzą z roślin okrytozalążkowych i być może to jest przyczyną tak dużego podobieństwa. Wprawdzie przedstawiona analiza nie jest odwzorowaniem całego ewolucyjnego rozwoju roślin, jednakże dowodzi zachowawczości tego białka i jego dużego znaczenia dla komórek roślin okrytozalążkowych. Zachowawcze są zwłaszcza sekwencje od 101 do 160 aminokwasu oraz od 210 do 300, które wykazują duże podobieństwo także z ferrytynami zwierzęcymi i ludzką. Po-

twierdzeniem wysokiej zachowawczości sekwencji aminokwasowej ferrytyny roślinnej może być analiza sekwencji nukleotydowych w DNA. Dostępne sekwencje roślinne (z *Zea mays* i *Glycine max*) porównano za pomocą programu komputerowego BESTFIT (10).

Zea mays x Glycine max

1378	CAGTGTGGAGTACAACGCCTCGTATGCGTACCACTCCCTCTTCGCTACT	1427
1175	CAGTGTGGAATACAATGCTTCCTATGCGTACCACTCCCTGTTTGACATACT	1224
1428	TCGACCGCGACAACGTGGCCCTCAAAGGATTTGCCAAGTGAGTAGCCGTT	1477
1225	TTGACAGGGACAACGTGGCTCTCAAGGGATTTGCCAAGT.....	1263
1478	GCCGTCGTCGTCGTTGCCTGCGTCTCGCTACCAACCAACTTCGGCTATCC	1527
1264	.....AACCAACACAAAACCCCTTTC.	1284
1528	GTCTGTAAACAATAAATCACAGCATTACCGTTGATGTGGTTCTGCACACC	1577
1285	..CTCTAAATGTTTATTCTGTTTCTCAAATGGGTTTTCAATTCATGCGC	1332
1578	TGTTCTGTTCTCCAGGTTCTTCAAGGAATCCAGCGACGAGGAGAGGGAG	1627
1333	TGTTATGTGAAAACAGGTTCTTCAAGGAATCTAGTGAGGAAGAAAGAGAG	1382
1628	CACGCTGAAAAGCTCATGGAGTATCAGGT	1656
1383	CACGCTGAAAAGCTCATGAAATATCAGGT	1411

Z analizy tej wynika, że istnieją fragmenty o dużej homologii — 72,2%.

Ferrytyna roślinna syntetyzowana jest w formie prekursora zaopatrzonego w N-terminalną sekwencję dodatkową — tzw. tranzytową. Dzięki niej prekursor może być przetransportowany przez otoczkę chloroplastu do jego wnętrza. Na zewnętrznej błonie otoczki znajdują się receptory rozpoznające i wiążące prekursor bez udziału energii. Sam proces transportu białka do wnętrza chloroplastu wymaga już jednak energii. Wewnątrz chloroplastu następuje odcięcie sekwencji dodatkowej przez endopeptydazę, w wyniku czego powstaje dojrzałe białko zdolne do pełnienia swojej funkcji. Jest to tzw. posttranslacyjne dojrzewanie białka (11). Sekwencja tranzytowa złożona jest zazwyczaj z ok. 50 nukleotydów. Z porównania sekwencji aminokwasowych ferrytyny wyizolowanej z różnych roślin wynika, że ferrytyna wydzielona z łubinu tej sekwencji nie posiada. Prawdopodobnie uległa ona odcięciu w czasie procesu izolacji i oczyszczania białka.

Podsumowując, sekwencjonowanie DNA i chemiczna analiza białka są komplementarnymi technikami stosowanymi do badań strukturalnych podstaw funkcji białka.

**Literatura:**

1. Stryer L. (1997), *Biochemia*, PWN, Warszawa, 45-75.
2. Fobis-Loisy I. et al., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 231, 605-619.
3. van Wuytswinkel O., Savino G., Briat J. F., (1995), *Biochem J.*, 305, 253-261.
4. Dhar M. S., Chauthaiwale V. M., Joshi J. G., (1993), *Gene*, 126, 275-278.
5. Andrews S. C. et al., (1992), *J. Inorg. Biochem.*, 47 (3-4), 161-174.
6. Muller J. P. et al., (1991), *DNA Cell Biol.*, 10 (8), 571-579.
7. Ragland M. et al., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265 (30), 18339-18344.
8. Spence M. J., Henzl M. F., Lammers P. J., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 17 (3), 499-504.
9. Feng D. F., Doolittle R. F., (1987), *J. Mol. Evol.*, 25, 351-360.
10. Smith T. F., Waterman M. S., (1981), *Adv. Appl. Math.*, 2, 482-489.
11. Waldo G. et al., (1995), *Plant Physiology*, 109, 797-802.

**Conservation of ferritin amino acid sequences****Summary**

The present review describes the conservation of ferritin amino acid sequences. We investigated the N-terminal amino acid sequence of lupin ferritin. We found that both subunits had the same N-terminal sequence. Our data confirm that subunits are not programmed by different mRNAs but they are a result of posttranslational modification. The smaller subunit has a lower molecular weight probably because of deletion of some amino acids from the C-terminal end.

Then we compared the lupin ferritin sequence with other known ferritin sequences from plants and animals. Sequence data showed that the identity of plant sequences was 60-92.5%. This high sequence similarity was improved by analysis of genomic DNA from maize and soybean. Both DNAs share 72.2% nucleotide sequence identity.

An additional plant specific sequence (named the transit sequence) was observed at the N-terminal end. This sequence consists of 50 nucleotides. We found that lupin ferritin did not have that sequence. We suggest that the deletion of the transit sequence in lupin ferritin seems to be the result of isolation and purification.

**Key words:**

ferritin, amino acid sequence, nucleotide sequence, transit sequence.

**Adres do korespondencji:**

Joanna Smól, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, fax: (48-61) 8520-532.