

## مقاله تحقیقی

### بررسی موقعیت هیستیدین های کوردینه کننده مس در ساختار دوم آنزیم تایروزیناز قارچ خوراکی

کمال الدین حق بین<sup>۱</sup>، رابعه خوشنویس زاده<sup>۲\*</sup>

۱. گروه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

\*مسئول مکاتبات: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران، آدرس الکترونیکی: r.khoshnevis@iauvaramin.ac.ir, biologybiophysics@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۸

#### چکیده

درک نوع ساختار دوم باقیمانده های جایگاه فعال به توضیح مکانیسم آنزیم ها کمک می کند. آنزیم تایروزیناز قارچ خوراکی (MT) دارای دو اتم مس در جایگاه فعال است که توسط ۶ اسید آمینه هیستیدین کوردینه شده اند. با کمک روش های پیشگویی ساختار دوم و سوم و استفاده از اطلاعات ساختاری پروتئین های کریستالوگرافی شده هم خانواده با MT، پیشگویی نوع ساختار دوم هیستیدین ها به ترتیب زیر صورت پذیرفت. هیستیدین های مستقر در موقعیت های ۵۷، ۲۵۰، ۲۵۴، ۲۵۰ و ۹۰، ۲۸۲ دارای ساختار هلیکس بوده و ساختار کویل برای هیستیدین ۸۱ محتمل است.

واژه های کلیدی: تایروزیناز، قارچ خوراکی، پیشگویی ساختار، هیستیدین

#### مقدمه

است که این آنزیم در کنار آنزیم های کتکول اکسیداز و لاکیز در گروه پلی فنل اکسیدازها قرار می گیرد (۷). اطلاعات حاصل از مطالعات اسپکتروسکوپی رزونانس پارامغناطیس الکترونی، UV/Vis و رامان، تایروزیناز را به عنوان یک متالوآنزیم (۴) دارای اتم مس در مرکز جایگاه فعال، همانند هموسیانین بندپایان و نرمتان معرفی می کند (۵) که قابل تیتراسیون در ولتاژ ثابت  $E'_{0} = 0.36 V$  در  $pH = 7$  است. تایروزیناز دو واکنش کروزولازی (فنلازی) و کتکولازی (پلی فنل اکسیدازی) را با انجام واکنش ارتوهیدروکسیلاسیون بر روی سوبسترای فنلی و سپس اکسیداسیون آن به مولکول کوبینون پیش می برد (۸). مطالعه بر روی وزن مولکولی و

تایروزیناز آنزیمی است که در تمام موجودات از باکتری ها تا جانداران عالی مثل انسان دیده می شود (۱). عملکرد مهم این آنزیم در ساخت ملانین است (۲) که با اکسایش ترکیبات فنلی به کوبینون اولین مرحله در مسیر تولید ملانین را تولید می کند. همین فرایند باعث سیاه شدگی میوه ها و محصولات کشاورزی می شود. از این رو کنترل فعالیت تایروزیناز از نظر اقتصادی اهمیت دارد (۶)، از نظر بالینی در بیماری هایی مثل ویتیلیگو و یا هایپرپیگمانتاسیون پوست از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۳). در مسیر شناسایی ویژگی های تایروزیناز از قارچ خوراکی بسیار استفاده شده است. مطالعات نشان داده

اسید آمینه است که باقیمانده های هیستیدین ۵۷، ۸۱ و ۹۰ مس جایگاه Cu<sub>A</sub> و باقیمانده های هیستیدین ۲۵۰ و ۲۵۴ و ۲۸۲ یون مس جایگاه Cu<sub>B</sub> را کوردینه می کنند.

### نتایج داده پایگاه BLOCK

سایت BLOCK MAP (۱۵) چهار ناحیه همولوگ را در بین اعضای این خانواده نشان داد. در پروتئین ها بلاک ها مناطقی هستند که از نظر توالی آمینو اسیدی در طول تکامل بسیار حفظ شده اند. چهار بلاک A, B, C, D در اعضای خانواده MT وجود دارد که بلاک A محل توالی جایگاه Cu<sub>A</sub> و بلاک D محل جایگاه Cu<sub>B</sub> می باشند.

توالی بلاک A HGQVLFPTWHRTYLSVLE (81)  
توالی بلاک B QPYWDW (128)  
توالی بلاک C VHDDIHVMVGYG (249)  
توالی بلاک D FDPFIWLHHTNVDRLSLW (274)

### نتایج داده پایگاه INTERPRO

در داده پایگاه INTERPRO (۱۶) این خانواده با کد IPR002227 معرفی شده است. در اعضای این خانواده پروتئین های هموسیانین، پلی فنل اکسیداز و تایروزیناز قابل مشاهده است. در همین داده پایگاه MT در ابرخانواده ای که بر اساس شباهت قلمرو مرکزی دارای جایگاه Cu طبقه بندی شده، قرار گرفته است. ابر خانواده دارای قلمرو Cu با کد شناسایی IPR008922 است. لازم به ذکر است که اغلب اعضای یک خانواده از نظر توالی بیش از ۳۰٪ به هم شباهت داشته و رابطه تکاملی دارند. اما اعضای یک ابر خانواده علیرغم پایین بودن شباهت توالی، خصوصیات ساختاری و عملکردی منشا تکاملی مشترکی را برای آنها متصور می سازند

### نتایج داده پایگاه PROSITE

در داده پایگاه PROSITE (۱۷) دو کد شناسایی برای MT معرفی شده است.

تعداد زیرواحدهای تایروزیناز قارچ خوراکی نتایج مختلفی را نشان داده است (۹-۱۱).

در برخی مطالعات این آنزیم تک زیر واحد و در برخی دارای ۴ زیرواحد معرفی شده است. تا امروز ۵ ایزوزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در قارچ خوراکی شناسایی شده است که ژن ایزوزیم PPO2، بیان کننده پروتئین تک زیرواحدی با جرم مولکولی 64000 دالتون، از طریق کلون کردن در سال ۲۰۰۳ توسط ویشر گزارش شد (۱۲). برای درک مکانیسم پروتئین ایزوزیم PPO2 (MT) در قارچ خوراکی به مطالعه ساختار جایگاه فعال، مخصوصاً ۶ هیستیدین کوردینه کننده مس های موجود در جایگاه فعال، از طریق پروتئین های هم خانواده که ساختارشان معلوم شده است و همچنین بهره گیری از نرم افزارها و داده پایگاه های بیوانفورماتیکی پرداخته شد.

### مواد و روش ها

در این مسیر از داده پایگاه اولیه UNIPROTKB برای دریافت مشخصات این پروتئین مثل اسید آمینه های کوردینه کننده مس ها استفاده شده است و از داده پایگاه های ثانویه PROSITE و BLOCK که به ارائه توالی های حفظ شده در طول تکامل می پردازد و ممکن است نقش ساختاری و یا عملکردی داشته باشد بهره گرفته شده است تا نواحی مهم MT پیدا شود. سپس از داده پایگاه های پیشگویی کننده ساختار دوم و یا سوم مثل ModBase, PHD, GOR, SOPMA و Hnn برای پیشگویی ساختار دوم توالی های مهم تایروزیناز استفاده شد. از پروتئین های هم خانواده با MT که ساختار آنها کریستالوگرافی شده بود نیز جهت پیشگویی ساختار بهره گرفته شد تا همه نتایج در کنار هم قرار گرفته و محتمل ترین ساختار دوم بدست آید. برای مشاهده ساختار سوم انواع پروتئین های کریستالوگرافی شده از نرم افزار PDBViewer استفاده شد.

### نتایج

#### نتایج داده پایگاه UNIPROT

مشخصات این پروتئین در داده پایگاه UNIPROT (۱۴) با کد ۰۴۲۷۱۳ درج شده است. این پروتئین دارای ۵۵۶

منطقه اول با کد شناسایی PR00497

H-X(4,5)-F-[L I V M F T P]-X-[F W]-H-R-X(2)-[L V M T]-X(3)-E

جایگاه دوم با کد شناسایی PR00498 به ترتب زیر است.

D-P-X-F-[L I V M F Y W]-X(2)-H-X(3)-D

### نتایج داده پایگاه ModBase

در داده پایگاه ModBase (۱۸) بر اساس تشابه توالی بین پروتئین هایی که ساختار سوم آنها از طریق بلورنگاری معلوم شده با پروتئین هایی که ساختار سوم آنها مجهول است

به پیشگویی ساختار سه بعدی می پردازد. ساختار سوم پیشگویی شده MT (شکل ۱) بر اساس الگوبرداری از پروتئین هموسیانیین *Rapana thomasiana* است که تشابه توالی بین آنها ۲۴٪ بوده و توالی ۴-۳۰۱ هموسیانیین را شامل می شود.



شکل ۱ - ساختار سوم پیشگویی شده MT توسط پایگاه بیوانفورماتیکی ModBase.

### پیشگویی ساختار دوم بر اساس برنامه های مختلف

از طریق چندین الگوریتم ساختار دوم بلاک های تایروزیناز قارچ خوراکی پیشگویی شد تا ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده مس ها که در این نواحی واقع شده اند آشکار شود. هر الگوریتم برای این هیستیدین ها پیشگویی داشته است که در جدول ۱ قابل مشاهده است (۱۹-۲۲).

از پروتئین های کریستالوگرافی شده و هم خانواده با تایروزیناز قارچ خوراکی مثل هموسیانیین اختاپوس (جدول ۲)، آنزیم کتکول اکسیداز سیب زمینی (جدول ۳)، تایروزیناز استرپتومایسز (جدول ۴) و پروتئین حاصل از ایزوزیم PPO3 تایروزیناز قارچ خوراکی جهت بررسی ساختار دوم بلاک ها استفاده شد تا نوع ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده مس ها در هر یک از آنها مشخص شود.

جدول ۱ - پیشگویی ساختار دوم ۴ بلاک MT توسط برنامه های Hnn, SOPMA, GOR4, ModBase و PHD

ترادف	باقیمانده ۵۷	بلاک A (۸۱-۹۸)	بلاک B (۱۳۳- ۱۲۸)	بلاک C (۲۴۹-۲۶۰)	بلاک D (۲۷۴-۲۹۲)
MT	H	HGQVLFPTWHRTYLSVLE	QPYWDW	VHDDIHVMVGYG	FDPIFWLHHTNVDRLLSLW
Hnn	C	CCCECCCCCCHHHHHHH	CEEEEC	HHHHHEEEETCCC	CCCEEECCCCCHHHHHHH
SOPMA	C	CCCCCCHHHHHHHHHHH	CCCCHC	HCCCHEEEEECCC	HCHHHHHCCHHHHHHH
GOR4	C	CCCECCCCCCHHHHHHH	CCCCCC	HCCCEEEEECCC	CCCHHHHCCCCCHHHHH
ModBase	E	CCCCHHHHHHHHHHHH	CCCCCC	HHHHHHHHHCCCCC	CCCHHHHHHHHHHHHH
PHD	C	CCCCCCHHHHHHHHHHH	CCCCCC	CCCHHHHEEECCC	CCCCCCEHHHHHHHHHH

جدول ۲ - ساختار دوم بلاک های پروتئین کریستالوگرافی شده هموسیانین اختاپوس.

ترادف هموسیانین ساختار از برنامه DSSP	باقیمانده ۵۸-۴۱) A	بلاک B (۱۷۶- ۱۷۱)	باقیمانده ۱۷۷ (خارج از بلاک)	باقیمانده ۲۰۴ (خارج از بلاک)	بلاک C (۲۲۳-۲۳۴)	بلاک D (۲۵۶-۲۷۴)
	QPGAIFSCFHPDLEEAR	AHHWHW	H	H	LHNWGHVTMARI	RDPIFYNWHRFIDNIFHEY
	CCCCCCCCCCHHHHHHH	HHHHHC	H	H	HHHHHHHHHHCCCC	CCCCHHHHHHHHHHHHHH

جدول ۳ - ساختار دوم بلاک های آنزیم کریستالوگرافی شده کتکول اکسیداز سبب زمینی.

بایتمانده ۸۸ (خارج از بلاک)	بلاک A (۱۲۶-۱۰۹)	بلاک B (۱۴۵-۱۴۰)	بلاک C (۲۵۰-۲۳۹)	بلاک D (۷۸۴-۷۶۶)
کتکول اکسیداز ترادف	<b>H</b> HNSWLFPPFHRRWLYLYFE	LPFWNW	PHIPHRWVGDP	RDIAFYCHHSNVDRMWTIW
ساختار از برنامه	H EBECCHHHHHHHHHHHHH	CCCCCC	CHHHHHHHHCCC	HCHHHHHHHHHHHHHHHHH

جدول ۴ - ساختار دوم بلاک های پروتئین کریستالوگرافی شده تائروزیناز استرپتومایسین.

بایتمانده ۳۸ (خارج از بلاک)	بلاک A (۷۵-۵۴)	بلاک B (۸۷-۸۳)	بلاک C (۱۹۸-۱۸۸)	بلاک D (۳۳۲-۲۰۹)
ترادف تائروزیناز استرپتومایسین	H HRSPSFLPWHRRLDDE	LPYWDW	LHNRVHWVVGYG	NDPVFWLHHAAYVDKLAEW
ساختار از DSSP	H CCCCCCHHHHHHHHHHHHH	CCCCCC	CHHHHHHHHCCC	CCCHHHHHHHHHHHHHHHHH

جدول ۵ - ساختار دوم بلاک های ایزوزیم PPO3 کریستالوگرافی شده قارچ خوراکی.

بایتمانده ۶۱	بلاک A (۸۵-۱۰۲)	بلاک B (۱۴۰-۱۴۵)	بلاک C (۲۵۸-۲۶۹)	بلاک D (۲۸۸-۳۰۶)
ترادف PPO3	H HGTVLPPTWHRAYESTWE	QPFWDW	VHNTVHFLGRD	FDPIFWHHCNVDRLLALW
ساختار از برنامه DSSP	H CCCCCCHHHHHHHHHHHHH	CCCCCC	HHHHHHHHHHHCC	CCCCCHHHHHHHHHHHHHHH

## بحث

در مطالعات پیشگویی ساختار جایگاه فعال، از داده پایگاه‌های مختلفی استفاده می‌شود که بر اساس الگوریتم-های ریاضی و نتایج مطالعات ساختار پروتئین‌های کریستالوگرافی شده و ترادف‌های اسید آمینه ای و یا اسید نوکلئیکی به پیش بینی ساختار دوم و یا سوم ترادف‌های مجهول می‌پردازند. برخی از داده پایگاه‌ها با مقایسه انواع ترادف‌ها به قرابت‌ها و بخش‌های ساختاری و عملکردی مهم در ساختار پروتئین اشاره دارند.

داده پایگاه ثانویه BLOCK قسمت‌هایی از توالی MT که دارای همولوژی با دیگر پروتئین‌های موجود در داده پایگاه است، می‌پردازد یعنی از این طریق می‌توان پروتئین‌هایی را که دارای جد مشترک با MT است را شناسایی کرد. داده پایگاه BLOCK نشان داد که ۴ توالی در ترادف اسید آمینه ای MT وجود دارد که با بلاک‌های A تا D معرفی می‌شوند. موضوع قابل توجه آن است که از میان ۶ هیستیدین کوردینه کننده مس‌های جایگاه فعال ۵ تا آنها در بلاک‌ها قرار گرفته اند بدین ترتیب که هیستیدین‌های کوردینه کننده CuA موجود در موقعیت‌های ۸۱ و ۹۰ در بلاک A، هیستیدین ۲۴۹ و ۲۵۴ در بلاک C و هیستیدین ۲۸۲ در بلاک D هستند که سه هیستیدین آخری کوردینه کننده CuB می‌باشند. داده پایگاه PROSITE به ارائه توالی‌هایی از پروتئین‌های می‌پردازد که نقش عملکردی داشته باشد مثل جایگاه فعال. برای MT دو ترادف که بیانگر دو منطقه ساختاری دارای عملکرد خاص است معرفی شده است ترادف اول مربوط به جایگاه CuA و ترادف دوم مربوط به CuB است این دو ناحیه منطبق با دو بلاک A و D هستند که ۳ هیستیدین کوردینه کننده مس‌ها را در بر دارند. این نتایج نشان می‌دهد بلاک‌های A و D دارای توالی حفظ شده و عملکردی هستند که در موقعیت جایگاه فعال قرار می‌گیرند. بقیه پروتئین‌های هم خانواده نیز همین ویژگی را دارند یعنی شباهت‌های توالی و ساختاری در آنها وجود دارد از این رو پروتئین‌های کریستالوگرافی شده در این خانواده راهنماهای خوبی برای پیشگویی ساختار دوم هیستیدین‌های کوردینه کننده هستند بطوریکه مطالعات Decker برای فعال سازی مصنوعی هموسیانین‌ها نشان داد که موقعیت اسید آمینه

های اثرگذار در جایگاه فعال این خانواده پروتئینی شباهت زیادی به هم دارند (۱۳). بررسی ساختار دوم هیستیدین‌های کوردینه کننده پروتئین‌های کریستالوگرافی شده هموسیانین اختاپوس (Hc)، کتکول اکسیداز سیب زمینی (IbCo)، تایروزیناز استریپتومایسز (ST)، محصول ایزوزیم PPO3 تایروزیناز قارچ خوراکی (PPO3) که هم خانواده با MT هستند نشان داد (جدول ۵-۲) که شباهت‌ها و تفاوت‌هایی بین آنها وجود دارد که در زیر به آنها اشاره شده است:

۱) هر ۶ هیستیدین کوردینه کننده یون‌های مس MT همانند Hc, IbCO, ST و PPO3 در دمین مرکزی پروتئین قرار دارند.

۲) در MT همانند IbCO, PPO3 و ST اولین هیستیدین لیگاندی جایگاه CuA در خارج از بلاک‌ها قرار می‌گیرد. اما ۵ هیستیدین کوردینه‌ای دیگر در داخل بلاک‌ها هستند.

۳) بلاک B پروتئین MT همانند PPO3, IbCO و ST فاقد هیستیدین لیگاندی است.

۴) دومین و سومین هیستیدین لیگاندی در هر چهار پروتئین PPO3, MT, IbCO و ST دقیقاً در مکان‌های ۲ و ۱۰ بلاک A و چهارمین و پنجمین هیستیدین مکان‌های ۲ و ۶ بلاک C قرار می‌گیرند.

۵) در بلاک‌های C و D پروتئین MT همانند PPO3, Hc, IbCO و ST بترتیب دو و یک هیستیدین لیگاندی قرار دارد. اما در Hc هر ۶ هیستیدین لیگاندی بر روی ساختمان‌های آلفا-هلیکسی قرار گرفته‌اند. در پروتئین‌های PPO3, IbCO و ST نیز بجز یکی از هیستیدین‌های لیگاندی در جایگاه CuA که دارای ساختاری غیر از هلیکس است بقیه بر روی ساختمان آلفا-هلیکسی جای دارند.

در داده پایگاه Modbase پروتئین Rapana thomasiانا بعنوان الگوی ساختاری مناسب جهت پیشگویی ساختار سوم MT قرار گرفته و ساختار سوم آن بازسازی شده است که بغیر از دو هیستیدین اول، نوع ساختار دوم هیستیدین‌های کوردینه کننده مس‌ها، هلیکس معرفی شده است.

از طریق داده پایگاه‌هایی که بر اساس الگوریتم‌های HNN, GOR, PHD و SOPMA به پیشگویی ساختار دوم پروتئین‌ها می‌پردازند توالی مناطق بلاک MT بررسی

هیستیدین های چهارم و پنجم بر روی یک هلیکس قرار گرفته اند این نتیجه به پیشگویی برنامه های PHD و ModBase نزدیک تر است و به نظر میرسد روش های قوی تر برای پیشگویی ساختار هستند.

#### تقدیر و تشکر

از پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری برای همکاری در انجام این تحقیق قدردانی می گردد.

شد که تقریباً در سه روش SOPMA و HNN، GOR بیشتر هیستیدین ها را در ساختار کوئل پیش بینی کرده اند (جدول ۱)، اما در روش PHD که الگوریتم قوی تری است هیستیدین های سوم، پنجم و ششم را در ساختار هلیکس پیشگویی کرده است.

با کنار هم قرار دادن انواع پیش بینی ها درباره نوع ساختار دوم هیستیدین های کوردینه کننده مس ها می توان به این جمع بندی رسید که بر اساس شباهت های ساختاری بین پروتئین های هم خانواده به احتمال زیاد به غیر از دومین هیستیدین بقیه هیستیدین ها ساختار هلیکس داشته که

#### منابع مورد استفاده

1. Lerch, K., 1981. Copper monooxygenases: tyrosine and dopamine b-monooxygenase. *Met Ions Biol Syst* 13: 143-186.
2. Korner, A., Pawelek, J., 1982. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 17: 1163-1165.
3. Vamos-Vigyazo, L., 1995. Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables: a review of principles and practice. Lee, C.Y., Whitaker, J.R (Eds.), *Enzymatic Browning and its Prevention*, ACS Symposium Series 600. American Chemical Society, Washington, DC, American chemical society 49-62.
4. Baharav, E., Merimski, O., Shoenfeld, Y., Zigelman, R., Gilbrud, B., Yechezkel, G., Youinou, P., Fishman, P., 1996. Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin Exp Immunol* 105: 84-88.
5. Mayer, A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* 67 (21): 2318-2331.
6. Solomon, E. I., Michael, D. L., 1993. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science* 259: 1575-1581.
7. Lerch, K., 1987. Molecular and active site structure of tyrosinase. *Life Chemistry Reports* 5: 22-28.
8. Gregg, D. C., Nelson, J. M., 1940. The action of tyrosinase on hydroquinone. *J Am Chem Soc* 62: 2510-2521.
9. Kertész, D., Romano, Z., 1957. Polyphenoloxidase (Tyrosinase): Purification and Molecular Properties. *Nature* 179: 1017-1018.
10. Bouchilloux, S., McMahon, P., Mason, H. S., 1963. The multiple forms of mushroom tyrosinase. *J Biol Chem* 238(5):1699-1706.
11. Strothkamp, K. G., Jolley, R. L., Manson, H. S., 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Comm* 70(2): 519-530.
12. Wichers, H. J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C. E. M., Biancone, G., Hoerberichts, F. A., Mooibroek, H., Soler-Rivas, C., 2003. Cloning, expression and characterization of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 336-341.
13. Decker, H., Tuzek, F., 2002. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* 25 (8): 392-397.
14. <http://www.uniprot.org/>
15. <http://blocks.fhrc.org>
16. <http://prosite.expasy.org/>
17. <http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/index.cgi>
18. [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html)
19. [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_phd.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html)
20. [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)
21. [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)