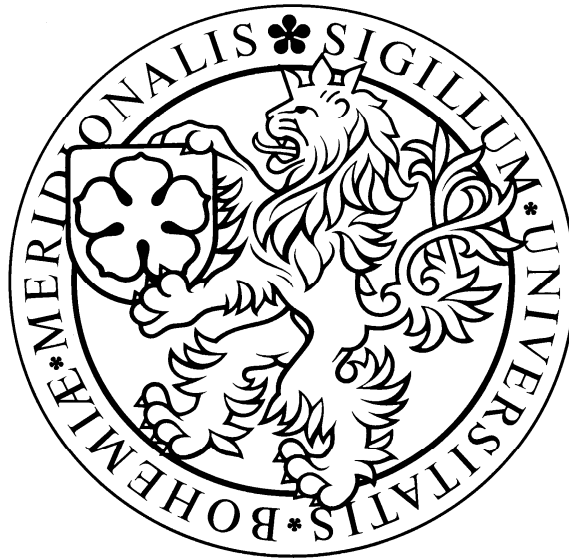


**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Interakce Zn^{2+} iontů s proteiny a nukleovými kyselinami

Studijní obor: Biofyzika a zdravotnická technika

Autor: Kateřina Dvořáková

Vedoucí práce: Mgr. Zdeněk Chval, Ph.D.

České Budějovice

15. května 2007

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Interakce Zn^{2+} iontů s proteiny a nukleovými kyselinami“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

Souhlasím s použitím práce k vědeckým účelům.

V Českých Budějovicích, 15. května 2007.

.....
podpis

Děkuji vedoucímu bakalářské práce panu Mgr. Chvalovi Ph.D. za vedení a připomínky vedoucí k sestavení této bakalářské práce.

Abstract

Interaction of Zn^{2+} ions with proteins and nucleic acids

Zinc is an important metal in biological systems. It is a strong Lewis acid, forms a stable Zn^{2+} ion and can exist in several coordination geometries. Zinc is required for the activity of more than 300 enzymes. In proteins zinc can either participate directly in chemical catalysis or can be important for maintaining protein structure and stability.

In this work a dataset of high quality (resolution better than 3 Å) crystal structures deposited in the Protein Data Bank on internet have been examined to identify typical zinc binding sites and to establish their coordination geometries. Totally 135 zinc binding sites found in 74 structures have been analyzed.

The most frequent coordinating atoms are sulphur in cysteine, NE2 and ND1 nitrogens in histidine followed by oxygen atoms in carboxylates of aspartic and glutamic acids. 67% of zinc binding sites were found to be four-coordinated with tetrahedral coordination geometry. In contrast Mg^{2+} cations show a clear preference to bind to oxygen atoms and to form octahedral cavities. We have not found any structure with a direct zinc coordination to DNA except the 1ZQT structure which was however excluded due to its low resolution (> 3 Å). Similarly only three zinc binding sites have been found in RNA structures which were however determined in the protein free environment. All other zinc binding sites have been located in proteins even in the presence of the nucleic acids.

Úvod.....	7
1. Současný stav.....	8
1.1. Přechodné prvky (kovy vedlejších podskupin).....	8
1.1.1. Společné vlastnosti přechodných prvků	8
1.1.2. Koordinační vazba	8
1.1.3. Koordinační vrstvy iontů	10
1.2. Zinek (Zincum) - $_{30}\text{Zn}^{\text{II}}$	10
1.2.1. Proč zinek?.....	10
1.2.2. Vlastnosti zinku ²⁴⁾	11
1.2.3. Biologický význam zinku	12
1.2.4. Funkce a mechanismy zinečnatých metaloenzymů	14
1.2.5. Vazebná místa zinku v proteinech	14
1.2.6. Vlastnosti ligandů zinku v první koordinační vrstvě	15
1.2.7. Geometrické parametry první koordinační vrstvy zinku	16
1.2.8. Vazebná místa pro více iontů zinku.....	17
1.2.9. Zinkový prst.....	17
1.3. Porovnání Zn^{2+} iontů s ionty Mg^{2+}	19
1.4. Proteiny	20
1.4.1. Struktura jednoduchých bílkovinných molekul.....	21
1.4.2. Rozdělení proteinogenních aminokyselin ²⁾	22
1.5. Enzymy	22
2. Cíle práce a hypotézy.....	23
2.1. Cíle.....	23
2.2. Hypotézy	23
3. Metodika	24
4. Výsledky	28
4.1. Interakce DNA se Zn^{2+} ionty	28
4.2. Interakce RNA se Zn^{2+} ionty.....	30
4.3. Interakce proteinů se Zn^{2+} ionty.....	34
4.4. Prostorové uspořádání.....	40
4.5. Porovnání vazebných míst Zn^{2+} iontů a Mg^{2+} iontů	44
5. Diskuse.....	46
6. Závěr	48
7. Seznam použité literatury	49

8. Klíčová slova	51
9. Přílohy.....	52

Úvod

Interakce kovových iontů významným způsobem ovlivňují strukturu a funkci nukleových kyselin a proteinů. Přibližně polovina enzymů obsahuje ionty kovů jako kofaktory a většina ribozymů nemůže správně fungovat bez přítomnosti iontů kovů. Nejčastěji vyskytujícími se kovy v proteinech jsou Ca^{2+} , Mg^{2+} a Zn^{2+} . Tato práce je zaměřena na analýzu rentgenových struktur biomolekul obsahujících Zn^{2+} ionty z hlediska jejich vaznosti. Získaná data jsou následně porovnána s obdobnými daty pro vaznost Mg^{2+} iontů na biomolekuly³⁾.

1. Současný stav

1.1. Přejchodné prvky (kovy vedlejších podskupin)

Přejchodné prvky (d – elementy) tvoří tři desetičlenné řady ve čtvrté, páté a šesté periodě. Dochází u nich k postupnému zaplňování orbitalů (n-1)d jedním až deseti elektrony. Podle Hundova pravidla elektronové páry vznikají až po obsazení všech (n-1)d orbitalů jedním elektronem, k čemuž dochází u prvků podskupiny manganu (VII A) a v důsledku stabilizace d^5 konfigurace i u chromu a molybdenu z podskupiny VI A. O stabilitě plně obsazených orbitalů (n-1)d svědčí to, že kromě zinku a kadmia jsou všechny přechodné prvky s konfigurací (n-1) d^{10} velmi ušlechtilé (Pd a Pt ve skupině VIII A, Cu, Ag a Au ve skupině I B, Hg ve skupině II B). Jako valenční elektrony se tedy u přechodných prvků mohou uplatňovat jak elektrony orbitalu ns, tak elektrony orbitalů (n-1)d, zvláště jsou – li nespárované. Maximální oxidační číslo prvků první přechodné řady závisí na počtu nespárovaných elektronů v orbitalech (n-1)d a počtu elektronů orbitalu ns.¹⁰⁾

1.1.1. Společné vlastnosti přechodných prvků

- všechny jsou kovy s typickými fyzikálními i chemickými vlastnostmi
- většina přechodných prvků se poměrně snadno účastní oxidačně redukčních reakcí a nabývá proto ve sloučeninách několika různých oxidačních čísel
- změna elektronové konfigurace se při těchto dějích projevuje často charakteristickými změnami zbarvení sloučenin
- většina přechodných prvků tvoří ochotně koordinační vazby s donory elektronových párů za vzniku koordinačních (komplexních) sloučenin

1.1.2. Koordinační vazba

Koordinační vazba se vyskytuje v tzv. komplexních sloučeninách. Nelze

stanovit ostrou hranici mezi sloučeninami jednoduchými a komplexními. Komplexní sloučeniny (nebo také koordinační sloučeniny) jsou sloučeniny přechodných kovů s Lewisovými bázemi. Klasickými komplexy (Wernerovy komplexy) jsou ligandy, které jsou vázány ke kovu pomocí volného elektronového páru.

Ligandy jsou částice (atomy, molekuly, ionty), které jsou vazbami připojeny k centrální částici, kterou může být atom nebo ion, obvykle přechodného prvku. Ligandy jsou charakterizovány nábojem, velikostí a chemickým složením.

Centrální atom je u jednojaderných komplexních částic jeden, u vícejaderných je jich několik. Ligandy vázané na tento centrální atom mu poskytují elektrony (centrální ion tedy vystupuje jako Lewisova kyselina) a vytvářejí dativní (koordinační) vazbu. Počet ligandů, na který se může centrální atom vázat, udává koordinační číslo (2 až 8). Jako centrální atom vystupuje v komplexních sloučeninách nejčastěji kov nebo polokov.

Elektrický náboj komplexních sloučenin může být kladný, záporný nebo nulový a je dán algebraickým součtem nábojů iontů, které tuto částici tvoří. Výsledný náboj komplexního iontu je v reálných roztocích kompenzován ionty s opačným znaménkem v tzv. vnější koordinační vrstvě.

Zvláštním případem komplexních sloučenin jsou chelátové komplexy = vnitřní komplexní sloučeniny. Chelátový ligand je většinou organická sloučenina, která může obsadit několik koordinačních míst na centrálním atomu, protože obsahuje několik vazebných skupin s volnými elektronovými páry. Název chelát je odvozen od slova chelé = klepeto, protože centrální atom je obklopen skupinami ligandu jako klepetem. Chelátový ligand se nazývá také chelátové činidlo. Vazby v chelátových komplexních sloučeninách bývají velmi pevné. Chelát kompenzuje vnitřní náboj centrálního atomu (hlavně jde – li o kovový ion) – mluvíme o „maskování“ tohoto iontu. Chelátově vázaný ion se v roztoku chová odlišně od volného iontu.¹⁰⁾

Kyselina je podle Lewisova pojetí sloučenina schopná přijmout elektronový pár. Podle počtu protonů odštěpitelných z jedné molekuly se rozeznávají kyseliny jednosytné (dusičná, octová), dvojsytné (sírová) i vícesytné (fosforečná). Silné kyseliny jsou v roztoku přítomny ve formě iontů, slabé kyseliny i ve formě nedisociovaných molekul.²⁴⁾

1.1.3. Koordinační vrstvy iontů

Ionty se nikdy v roztocích nevyskytují osamocené, ale vždy jsou obklopeny molekulami prostředí. V obecném případě hovoříme o koordinaci molekul k iontu kovu. Jsou-li tyto molekuly součástí rozpouštědla, pak hovoříme o solvataci iontu, v případě vodných roztoků pak o hydrataci.

Molekuly, které se přímo váží ke kovovému iontu se nazývají ligandy a tvoří první koordinační vrstvu. Molekuly, které se váží na molekuly první koordinační vrstvy pak tvoří druhou koordinační vrstvu atd. Počet ligandů v těchto vrstvách bude závislý na náboji a atomovém poloměru iontu kovu a na velikosti ligandů.

Koordinační vlastnosti Mg^{2+} , Zn^{2+} a Ca^{2+} iontů hrají důležitou roli v bioorganické chemii. Nejvíce obvyklá koordinační čísla jsou 4 až 6 pro Zn^{2+} , 6 a 9 pro Ca^{2+} , 6 pro Mg^{2+} . Z toho vyplývají některé vlastnosti a reakce iontů v biologických systémech jako např. schopnost nahradit Mg^{2+} ionty pomocí Ca^{2+} iontů v proteinech nebo flexibilita Zn^{2+} iontu v okolí aktivního místa metaloproteinů.³⁾

1.2. Zinek (Zincum) - ${}_{30}Zn^{II}$

1.2.1. Proč zinek?

Zinečnaté ionty mohou být v biomolekulách nahrazeny i jinými ionty kovů (např. Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}). Výhodou zinku je, že má na rozdíl od těchto iontů flexibilní prostorové uspořádání první koordinační vrstvy, která může měnit tvar a může být tvořena různými ligandy. Další dobrou vlastností zinku je střední polarizovatelnost (tvrdý – měkký charakter). Tvrdé ionty se totiž obtížně polarizují, zatímco měkké ionty se polarizují lehce a jejich elektronový obal se snadno deformuje ve vnějším elektromagnetickém poli.¹⁴⁾

1.2.2. Vlastnosti zinku²⁴⁾

Relativní atomová hmotnost: 65,409 amu

Atomové číslo: 30

Elektronegativita: 1,65

Elektronová konfigurace: [Ar] 3d¹⁰4s² (1s²2s²2p⁶3s²3p⁶3d¹⁰4s²)

Oxidační číslo: II

Skupina: 12 (II B)

Perioda: 4

Skupenství (při 20 °C): pevné

Hustota: 7,140 g/cm³

Tvrdość: 2,5 (Mohsova stupnice tvrdosti)

Teplota tání: 419,35° C, tj. 692,68 K

Teplota varu: 907 °C, tj. 1 180 K

Elektrochemický potenciál (k vodíkové elektrodě): -0,39 V

Zinek má ve valenční sféře orbital (n-1)d kompletně obsazen deseti elektrony, které nevyužívá k vytváření vazeb. Je to měkký lehce tavitelný modrobílý kov se silným leskem. Na vzduchu se pokrývá vrstvou uhličitanu, který jej chrání před další korozí. Ve vodě běžné tvrdosti je zinek poměrně stálý, avšak koroduje v destilované vodě. Velmi zhoubně působí na zinek vodní pára. Zinek je možno použít ve styku s benzínem, olejem, alkoholem a s mírně zásaditými roztoky. Zinek je po železe, mědi a hliníku čtvrtým nejvíce průmyslově vyráběným kovem. Je poměrně málo ušlechtilý, snadno reaguje s kyselinami za vývinu vodíku (vznikají zinečnaté soli s kationtem Zn²⁺) i s hydroxidy (vznik zinečnanů s aniontem ZnO₂²⁻ nebo Zn(OH)₄²⁻), jedná se tedy o amfoterní kov. Ve sloučeninách získává zinek pouze oxidační číslo II. Ochotně tvoří četné koordinační sloučeniny.

1.2.3. Biologický význam zinku

Zinek je biogenní prvek, který má v našem organismu velmi důležitou úlohu. Kontroluje procesy látkové výměny, řídí funkci enzymatických systémů nebo se podílí na tvorbě struktury mnoha životně důležitých enzymů. V organismu se vytvářejí jen poměrně malé zinečnaté rezervy, proto je nutné zinek neustále doplňovat.²³⁾

Nedostatečné množství zinku v potravě způsobuje nechtěný úbytek na váze, pomalé hojení ran, zhoršování paměti a smyslové poruchy – především zrakové a čichové, zpomalení vývoje svalů a slábnutí imunitního systému, takže se snižuje odolnost vůči nemocem.

Zinek je nezbytně nutný k syntéze bílkovin a DNA. Přítomnost zinku v organismu je důležitou podmínkou pro správné fungování řady enzymatických systémů – nejvýznamnější je patrně inzulínový, kdy zinek stimuluje tvorbu inzulínu (zinek se na inzulín váže v sekrečních granulích β -buněk). Důležitou roli hraje zinek při stabilizaci krve a udržování acidobazické rovnováhy v krvi. Je bezpodmínečně nutný k řádnému vývinu všech rozmnožovacích orgánů, normální funkci prostaty i k tvorbě testosteronu a spermií.

Zinek také reguluje schopnost kontrakce svalů. Může pomoci i u některých mentálních poruch (lze jej úspěšně používat při léčbě schizofrenie). Působí proti usazování cholesterolu.

Pro obyvatele velkoměst je z ekologického hlediska nepřítelem olovo a kadmium, které se dostává do ovzduší s výfukovými zplodinami a s cigaretovým kouřem. Trpí-li organismus nedostatkem zinku, přijímá více olova a kadmia - a naopak - konzumací zinku lze snížit stupeň vestavby těchto toxických látek do organismu. Zinek tedy poskytuje i určitou ochranu proti škodlivým vlivům znečištěného vnějšího prostředí.

Sportovci potřebují více zinku než průměrný člověk. Při tréninku a při závodech dochází k poměrně velké ztrátě zinku, a to nejen v důsledku pocení.

Organismus zinek využívá k tvorbě červených krvinek (jako náhradu ztrát způsobených hemolýzou) a dále ke stupňované přeměně mastných kyselin a železa.

Nejvíce zinku je obsaženo v různých typech masa, v "plodech" moře (mořské

ryby, krabi, ústřice atd.) a ve vejcích. Dalšími bohatými zdroji zinku jsou celozrnné cereálie, fazole, ořechy, pšeničné klíčky, pивní kvasnice, dýňová jádra, netučné mléko a hořčice. Protože množství přijímaného zinku, obsaženého v živočišné potravě značně převyšuje objem zinku, který může být získán z rostlinné potravy, je důležité, aby přísní vegetariáni dbali o dostatečný příjem zinku.

Zinek není obsažen v živých tkáních ve vysokém množství – tělo dospělého člověka obsahuje celkově pouze přibližně 2 g zinku. Zdroje a průměrný obsah zinku jsou uvedeny v tabulce č. 1 (mg/100g).

Tabulka č. 1: Zdroje zinku a jejich průměrný obsah zinku²¹⁾

Ústřice	120 - 700
Maso (červené)	5,2
Drůbež	3,0
Ořechy	3,5
Vejce	1,3
Mléčné výrobky	2,2
Obilniny	1,0
Chléb	1,0
Ryby	0,8

Zinek je účinněji metabolizován, je - li přijímán společně s vitamínem A, vápníkem a fosforem. Je nutné přijímat vyšší dávky vitamínu A nebo betakarotenu, užíváme - li doplňkovou výživu s obsahem zinku. V některých preparátech je zinek obsažen ve formě sulfátu, glukonátu nebo v chelátové podobě. Zinek ve formě chelátu je ke konzumaci nejvhodnější, protože takto vázaný zinek dokáže organismus nejlépe využít.

Při užívání výživových doplňků se zinkem je doporučená denní dávka 10-15 mg denně, avšak u sportovců lze denní dávku zvýšit až na 50 mg. Zvýšená dávka zinku se doporučuje i alkoholikům a diabetikům.

1.2.4. Funkce a mechanismy zinečnatých metaloenzymů

Zinek je potřebný k aktivitě více než 300 enzymů.⁶⁾ V proteinech je zinek koordinován čtyřmi až šesti ligandy, výsledný komplex má nejčastěji tvar čtyřstěnu. Ligandy jsou většinou tvořeny sírou z cysteinu, dusíkem z histidinu nebo kyslíkem z kyseliny asparagové nebo kyseliny glutamové, případně jejich kombinací.

V mnoha případech je zinečnatý ion základním kofaktorem pro biologickou funkci metaloenzymů. První zinečnatý metaloenzym (anhydrasa kyseliny uhličitě) objevili v roce 1940 Keilin a Mann. Biologické funkce zinku, které byly pozorovány v mnoha tkáních jsou nejčastěji spojeny s proteiny. Vyjmutí zinku z enzymu může vést ke ztrátě enzymatické aktivity.¹⁵⁾

1.2.5. Vazebná místa zinku v proteinech

Zinek se může v proteinech účastnit přímo chemické katalýzy nebo může být důležitý pro udržování proteinové struktury a stability. Ve všech katalytických místech funguje zinečnatý ion jako Lewisova kyselina.⁹⁾

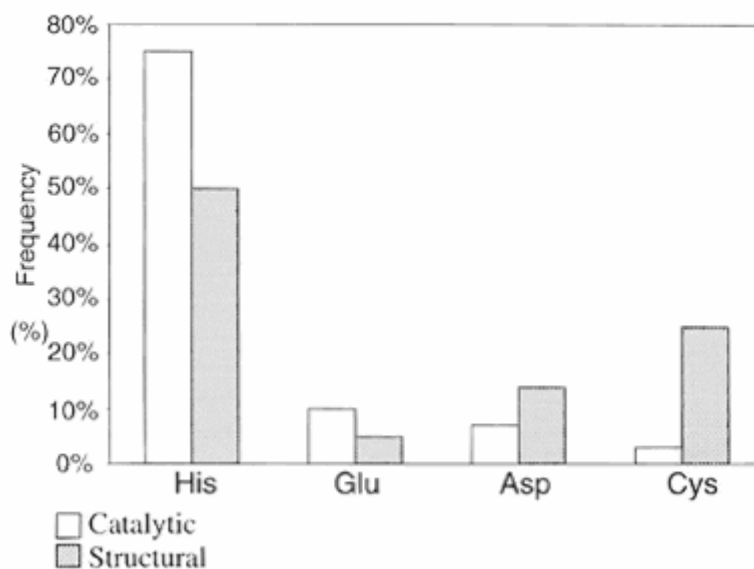
Katalytická role zinku spočívá ve schopnosti stabilizovat negativní náboje v reakcích díky svému elektrofilnímu charakteru. Mezi jeho nejčastější ligandy patří histidin, kyselina glutamová, kyselina asparagová a cystein (viz graf č. 1). Převládající geometrické uspořádání je čtyřstěn.¹³⁾

Strukturální role zinku se uplatňuje především při stabilizaci motivu tzv. zinkového prstu. Proteiny s tímto motivem jsou známy vysokou afinitou k DNA, struktura zinkového prstu přímo zprostředkovává interakci proteinu s DNA vazbou na DNA ve velkém žlábků. Zn^{2+} ion je zde tetraedrálně koordinovaný k histidinovým a cysteinovým zbytkům. Rozlišují se 3 různé typy vazebných motivů → His – His – Cys – Cys, His – Cys – Cys – Cys a Cys – Cys – Cys – Cys.⁷⁾

Zinečnaté ionty jsou také potřebné pro skládání proteinů (např. insulín) nebo mohou stabilizovat aktivní místo enzymu (např. hyperoxid dismutasa). Nejčastějšími

ligandy jsou cystein, histidin, případně kyseliny asparagová a glutamová. Převládající geometrické uspořádání je opět čtyřstěn.¹⁾

Graf č. 1: Četnost interakcí Zn^{2+} iontů v proteinech¹⁾



1.2.6. Vlastnosti ligandů zinku v první koordinační vrstvě

Zinečnaté ionty v katalytických místech enzymů jsou obvykle vystaveny rozpouštědlu a vážou na sebe molekuly vody. Zinečnaté ionty se strukturální funkcí se nachází uvnitř proteinů a neinteragují s rozpouštědlem, protože jsou obklopeny hustým systémem vodíkových vazeb, které poskytuje druhá koordinační vrstva (výjimkou je insulin, kde jsou dva Zn^{2+} ionty, které se na rozpouštědlo váží).

V případě vazby zinku na histidin existují dvě možné tautomerní formy histidinu záviselých na tom, na který atom dusíku se kov váže (viz obrázek č. 1):

- a, HIS NE2 – tautomer ϵ , reaguje s kovem ze 70%
- b, HIS ND1 – tautomer δ , reaguje s kovem z 30%¹⁾

Obrázek č. 1: Tautomerní formy histidinu s vyznačeným místem koordinace kovu



1.2.7. Geometrické parametry první koordinační vrstvy zinku

Koordinační geometrie první koordinační vrstvy se třídí do skupin podle koordinačního čísla zinku. Koordinační čísla zinku mohou nabývat hodnot 4, 5 a 6. Nejčastější koordinační číslo zinku je 4.

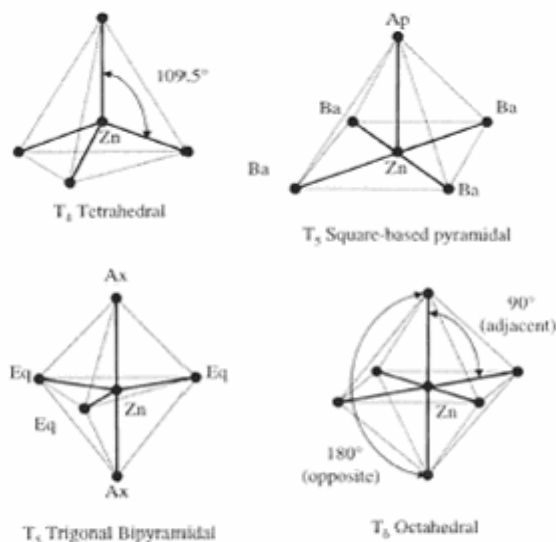
Tabulka č.2: Koordinační geometrie první koordinační vrstvy

Koordinační číslo	Geometrie první koordinační vrstvy	Hodnoty ideálních úhlů
4	čtyřstěn	109,5°
5	trigonální bipyramida	90°, 120°, 180°
	čtvercová pyramida	90°, 180°
6	osmistěn	90°, 180°

Charakteristické geometrie první koordinační vrstvy odpovídající jednotlivým koordinačním číslům jsou uvedeny v tabulce č. 2 spolu s hodnotami ideálních úhlů. Tyto úhly jsou ve skutečnosti deformované různými vlivy:

- vazebné a nevazebné (vodíkové vazby) interakce působící na ligandy
- vícečetné vazby jednoho ligandu
- jiné ionty ve druhé koordinační vrstvě (např. ve vazebných místech pro více iontů zinku, kde jsou Zn^{2+} ionty přemostěny jedním nebo více atomy kyslíku či síry).¹⁾

Obrázek č. 2: Prostorové uspořádání 1. koordinační vrstvy zinku



1.2.8. Vazebná místa pro více iontů zinku

Kladně nabité zinečnaté ionty jsou v těchto vazebných místech od sebe odděleny kyslíkovými atomy. Elektronegativní kyslíkové atomy stíní elektrostatické odpuzování dvou Zn^{2+} iontů. Proto se zvyšujícím se počtem stínících kyslíkových atomů se vzdálenost Zn^{2+} iontů snižuje.¹⁾

V případě vazby tří a více atomů kovu v jednom vazebném místě mluvíme o tzv. klastrech. Název je odvozen od anglického slovíčka cluster- shluk, chumel, hromada, skupina. Klastř vytvářejí některé přechodné kovy, například rhenium, nikl, zinek.¹⁸⁾

1.2.9. Zinkový prst

Jedná se o sekvenci aminokyselin spojenou zinkovým iontem za tvorby sekundární struktury ve tvaru prstu. Část řetězce tvoří alfa helix a interaguje s velkým žlábkem. Tato doména byla objevena už v roce 1986. Skládá se ze 30 aminokyselin. Tvar prstu jí zajišťuje iont zinku uvězněný ve smyčkách bílkoviny. Zinkový prst

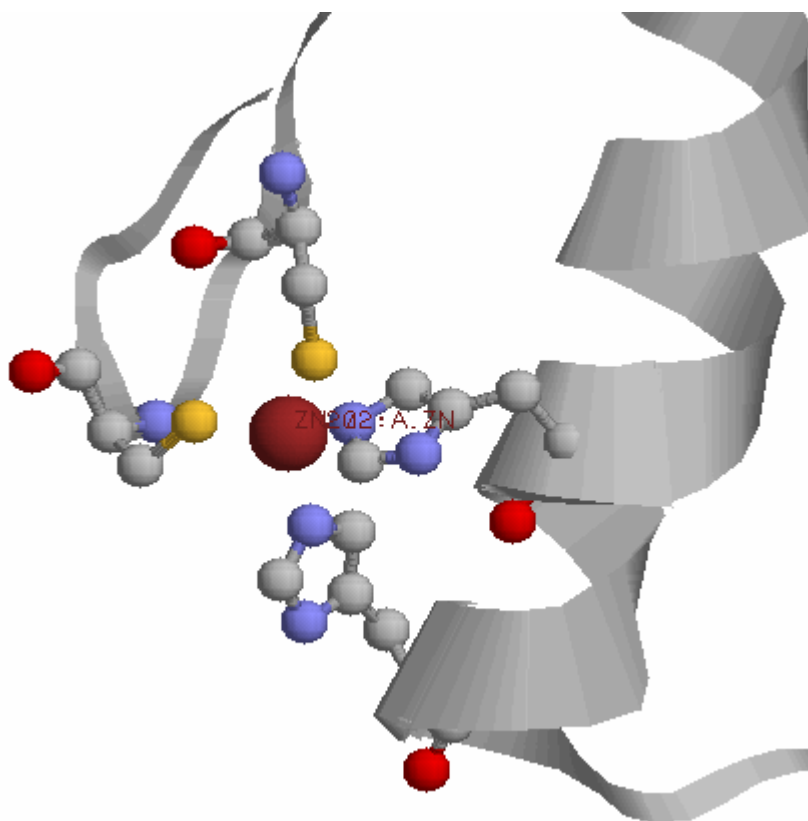
dovoluje bílkovině navázat se na dvojitou šroubovici DNA. Bývá proto součástí bílkovin nezbytných pro aktivaci vybraných genů. Pořadí aminokyselin v prstu určuje, na jaká písmena genetického kódu se prst v DNA naváže. Jeden prst dokáže rozlišit trojici písmen genetického kódu.

V roce 1993 byl objasněn mechanismus exprese genů. Transkripční faktor - skupina proteinů aktivující gen k přenosu informace - se k DNA připojuje právě pomocí zinkových prstů. Zinek tak svou přítomností v těchto proteinových strukturách se podílí na expresi genů a na syntéze a opravách DNA. Zinkové prsty proto mají zásadní vliv na dělení, růst, diferenciaci, vývoj a funkci všech buněk.¹¹⁾

1.2.12. Zinkové prsty Cys₂ - His₂

Nejčastější zinkový prst má Cys₂ -His₂ uspořádání okolí Zn²⁺ iontu (viz obrázek č. 3). Jeho stabilita je udržována iontem zinku nekovalentně interagujícím s dvěma histidiny a dvěma cysteiny. První koordinační vrstva Zn²⁺ iontů v zinkovém prstu je uspořádána do tvaru čtyřstěnu.⁷⁾ Vyskytuje se u transkripčních faktorů, které obsahují dva nebo více zinkových prstů typu Cys₂ - His₂. Snad nejznámějším členem této skupiny je všeobecně se vyskytující faktor Sp1, jehož DNA vazebná doména sestává ze 3 zinkových prstů.

Obrázek č. 3: Zinkový prst ve struktuře 1A1F zobrazený programem RasWin



1.3. Porovnání Zn^{2+} iontů s ionty Mg^{2+}

Hořčík (magnesium) patří do II.A skupiny periodické soustavy prvků (s^2 prvky). Má 2 valenční elektrony (ns^2) → ve sloučeninách má vždy oxidační číslo II. Je to stříbrobílý lesklý lehký kov. Tvoří převážně kovalentní vazby. Na povrchu se pokrývá vrstvičkou MgO, která ho chrání před korozí. V kyselinách se snadno rozpouští na příslušné soli a vodík. Alkalickým hydroxidům odolává. Hořčík je důležitý biogenní prvek při tvorbě listové zeleně - chlorofylu (chlorofyl umožňuje průběh fotosyntézy). Ionty Mg^{2+} jsou nezbytnou součástí těl živočichů. Působí například jako aktivátory některých enzymů.

Zinek i hořčík odštěpují při interakcích dva s – valenční elektrony, proto mají oba prvky oxidační číslo II. Zinek má orbitály d , které jsou zcela obsazeny elektrony, je tudíž lépe polarizovatelný než hořčík, který tyto orbitals nemá. To má za následek, že

zinek preferuje na měkčí ligandy (síra S) a hořčík naopak vazbu na tvrdší ligandy (kyslík O). Oba kovy mají téměř stejný iontový poloměr, který se liší v závislosti na struktuře první koordinační vrstvy. Jsou to biogenní prvky. Zinek i hořčík jsou nejčastěji součástí enzymů (metaloenzymy), kde stabilizují jejich strukturu a zajišťují správnou funkci.

Zn^{2+} ionty mají mnohem flexibilnější strukturu první koordinační vrstvy než Mg^{2+} ionty, jejichž první koordinační vrstva je v biomolekulách téměř vždy tvořena 6 ligandy, které jsou uspořádány do struktury osmistěnu. Zn^{2+} iont naproti tomu může obsahovat v první koordinační vrstvě 4 až 6 ligandů, které mohou být uspořádány do čtyř různých strukturních uspořádání (viz výše). Analýza těchto uspořádání tvoří důležitou součást této práce.

1.4. Proteiny

Proteiny (bílkoviny) jsou vysokomolekulární látky, které patří k základním chemickým sloučeninám živých objektů.

Bílkoviny patří mezi biopolymery (přírodní makromolekulární látky) a skládají se z aminokyselinových zbytků (více než 100) spojených peptidickou vazbou. Na jejich stavbě se podílí 20 proteinogenních L – α - aminokyselin (AK). V organismu mají proteiny různé funkce:

- a) stavební (kolagen, kreatin)
- b) katalytickou (enzymy)
- c) regulační (hormony)
- d) obrannou (protilátky)
- e) transportní (hemoglobin)

V molekulách proteinů je přítomen různý počet aminokyselin – od několika desítek až po několik tisíc. Relativní molekulová hmotnost se proto pohybuje v rozsahu řádově od 10^4 (vaječný albumin) až do zhruba 10^6 (botulotoxin).²⁾

Proteiny mohou být složeny ze samých aminokyselin – pak se označují jako

jednoduché. Kromě aminokyselin se však mohou na struktuře proteinů podílet i nebílkovinné složky – prostetické skupiny (metaloproteiny, fosfoproteiny, glykoproteiny..) – pak jde o proteiny složené. Molekuly proteinů mohou nabývat různých tvarů a na jejich podkladě i různých vlastností.

Metaloproteiny obsahují kovové ionty navázané koordinačně - kovalentní vazbou. Jejich úkolem je tyto ionty transportovat nebo skladovat. Významnou skupinou metaloproteinů jsou hemoproteiny. V metaloenzýmech se kovy přímo účastní katalytického procesu.²⁰⁾

Chemické složení bílkovinných molekul je poměrně stálé: uhlík tvoří 50 – 60 %, vodík 6,5 – 7,5 %, kyslík 21,5 – 28,5 %, dusík 15 – 18 %, síra do 2 % a fosfor do 2 %.

1.4.1. Struktura jednoduchých bílkovinných molekul

Primární struktura udává pořadí (sekvenci) jednotlivých aminokyselin a podmiňuje biochemickou funkci bílkovin. Za první se považuje AK tvořící N – konec (- NH₂) a za poslední AK s C – koncem (- COOH). Primární struktura byla poprvé zjištěna u insulínu.¹⁵⁾

Sekundární struktura je dána prostorovým uspořádáním polypeptidového řetězce. Je umožněna volnou rotací peptidových vazeb kolem alfa uhlíků a je stabilizována přítomností vodíkových vazeb. Základní typy sekundární struktury jsou: helikální (α – helix), skládaný list (β – struktura), zpětná smyčka (β -ohyb), zinkové prsty a leucinový zip.¹⁹⁾

Terciární strukturu tvoří uspořádání bílkovin do určitého prostorového útvaru, což je podmíněno uspořádáním primární a sekundární struktury. Typický je globulární (klubkový) nebo fibrilární (vláknitý) tvar. Jednotlivé části řetězce se k sobě váží pomocí disulfidických vazeb, na stabilizaci struktury se podílí se i vodíkové vazby, van der Waalovy síly a iontové vazby.

Kvartérní strukturu tvoří bílkoviny s více podjednotkami, které jsou většinou navzájem spojené hydrofobními interakcemi. Podjednotky mohou být stejné nebo jen podobné, jejich počet napomáhá termodynamické rovnováze, proto je obvykle sudý.

1.4.2. Rozdělení proteinogenních aminokyselin²⁾

- a) aminokyseliny s nesubstituovaným postranním řetězcem
 - glycin (GLY), alanin (ALA), valin (VAL), leucin (LEU), izoleucin (ILE)
- b) aminokyseliny s hydroxylovou skupinou v postranním řetězci
 - serin (SER), threonin (THR)
- c) aminokyseliny obsahující síru v postranním řetězci
 - cystein (CYS), methionin (MET)
- d) kyselé aminokyseliny s karboxylovou skupinou v postranním řetězci a jejich aminy
 - kyselina asparagová (ASP), kyselina glutamová (GLU), asparagin (ASN), glutamin (GLN)
- e) bazické aminokyseliny
 - arginin (ARG), lysin (LYS)
- f) aromatické aminokyseliny
 - fenylalanin (PHE), tyrosin (TYR), tryptofan (TRP)
- g) heterocyklické aminokyseliny
 - histidin (HIS), prolin (PRO)

1.5. Enzymy

Enzymy jsou bílkoviny, které katalyzují reakce probíhající v živých organismech. Urychlují průběh biochemických reakcí snížením aktivační energie, ale neovlivňují jejich rovnováhu. Jednosložkové enzymy jsou tvořeny pouze bílkovinou. Dvousložkové enzymy tvoří komplex nazývaný holoenzym, složený z apoenzymu (bílkovinné složky) a kofaktoru (nebílkovinné složky). Kofaktorem může být prostetická skupina, která je s apoenzymem spojena pevně kovalentní vazbou nebo koenzym, který je k apoenzymu poután slabě (např. deriváty vitamínů)¹²⁾

2. Cíle práce a hypotézy

2.1. Cíle

- a) Shromáždit reprezentativní data týkající se vaznosti Zn^{2+} iontů s nukleovými kyselinami a proteiny
- b) Porovnat výsledky pro Zn^{2+} ionty s výsledky pro ionty Mg^{2+}

2.2. Hypotézy

Zn^{2+} iont bude vykazovat podobnou relativní četnost přímých a nepřímých interakcí s nukleovými kyselinami a proteiny jako Mg^{2+} iont, bude však zaujímat jiná vazebná místa.

3. Metodika

Prvním krokem bylo získat potřebná data. Ta jsem si stáhla z internetové databáze Brookhaven Protein Data Bank (PDB). Tato databáze vznikla v roce 1971 v Brookhaven Národní laboratoři. V té době ji tvořilo celkem 7 struktur. V současné době obsahuje téměř 43 000 3D struktur biomakromolekul. Ty mohou být stanovené rentgenovou difrakcí nebo nukleární magnetickou rezonancí. V databázi lze vyhledávat podle struktury (sumární vzorec, kód sloučeniny, hledaný ion), autora (v případě publikované struktury), citace. Struktury jsou uloženy ve formátu pdb. Tento formát se stal jedním z hlavních standardů pro archivaci kartézských souřadnic (bio)molekul.

Obrázek č. 4: Úvodní internetová stránka Brookhaven Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/Welcome.do>, 25.dubna 2007)

The screenshot shows the RCSB Protein Data Bank homepage in a Mozilla Firefox browser window. The browser's address bar displays the URL: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do;jsessionid=7F69D255E61EE762CA95A3DC7E4CB678>. The page header includes the RCSB PDB logo and the text "A MEMBER OF THE PDB An Information Portal to Biological Macromolecular Structures". Below the header, there is a search bar with the text "PDB ID or keyword" and "Author", and buttons for "Site Search" and "Advanced Search". The main content area is titled "Welcome to the RCSB PDB" and contains several paragraphs of text. On the right side, there is a "News" section with a sub-heading "24-April-2007 Announcement: Release of Remediated PDB Data". At the bottom of the page, there is a "Molecule of the Month: Clathrin" section with a 3D molecular model of clathrin. The browser's taskbar at the bottom shows several open applications, including "Bakalářsk...", "Acrobat R...", "BPuprave...", "Microsoft...", "RCSB Prot...", and "Bez názvu...". The system clock in the bottom right corner shows "21:34".

Rentgenostrukturní data obsahují pouze souřadnice těžkých atomů, vodíkové atomy nejsou pomocí rentgenové difrakce detekovatelné. U jednotlivých funkčních skupin, nelze proto od sebe rozlišit jejich oxidované a redukované formy. Zvláště u neobvyklých struktur je třeba mít na paměti podmínky krystalizace, zvláště pak pH.

Pro tuto práci byly vybrány pouze krystalové struktury stanovené rentgenovou difrakcí s rozlišením lepším než 3,0 Å. Možná homologie jednotlivých struktur vůči sobě navzájem nebyla v této práci uvažována.

Zpracované struktury z PDB:

50 struktur Proteinů:

1AST, 1B4L, 1B4T, 1B8Y, 1BMC, 1BVT, 1C7K, 1CCS, 1CNC, 1D0Q, 1DXK, 1IAG, 1JCV, 1JML, 1KUH, 1LBA, 1LU0, 1OEK, 1PPT, 1PTQ, 1PTR, 1PZW, 1Q4V, 1QJ0, 1QJJ, 1RMD, 1S9Z, 1TRZ, 1TYL, 1UZ9, 1XER, 1Y02, 1YAZ, 1YJO, 1YSO, 1ZNI, 2APS, 2CE7, 2DS5, 2DS7, 2FYG, 2G43, 2IIM, 2JCW, 2OLM, 2OZU, 2P57, 3PSR, 4MT2, 8RNT,

13 struktur RNA:

1A8H, 1FFY, 1GAX, 1H3N, 1N32, 1NLC, 1Q2R, 1QF6, 1U0B, 1YXP, 2AB4, 2B3J, 2FK6,

11 struktur DNA:

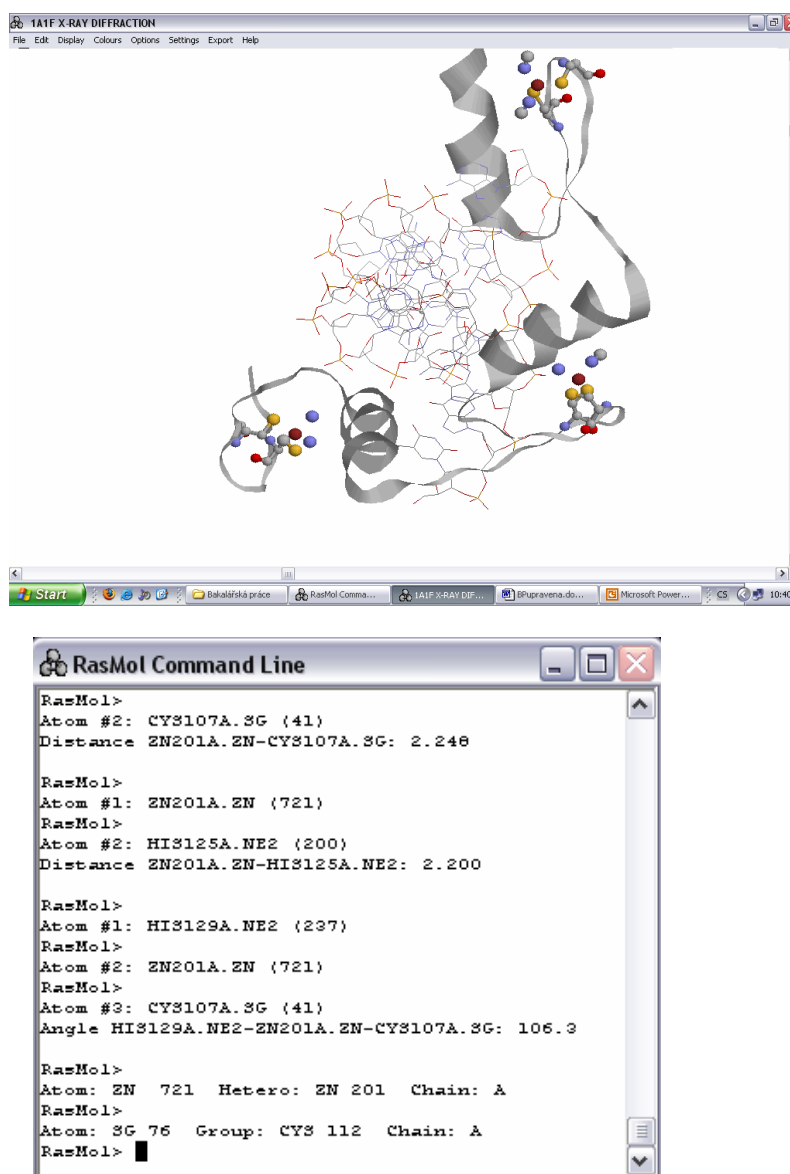
1A1F, 1A1G, 1A1L, 1AAZ, 1CIT, 1CW0, 1D0Q, 1GPC, 1JK2, 1ZAA, 2DRP.

Na základě souřadnic atomů v symetricky nezávislé části poskytnou strukturně orientované zobrazovací programy strukturu molekuly nebo i obrázek všech molekulárních komponent tvořících krystal. Z tohoto znázornění vyplývá jen minimum informací o struktuře krystalu a mezimolekulových interakcích. Dá se ale usoudit například na intramolekulární vodíkové vazby a hodnotit případné strukturní zvláštnosti, jako neobvyklé konformace nebo deformace úhlů, plynoucí z přizpůsobení molekuly mezimolekulovým interakcím v krystalu. Výhoda řady zobrazovacích

programů je volná dostupnost na internetu, ale jsou zde i nevýhody, především malá technická podpora a hůře zpracované manuály.

Z programů, vhodných pro nízkomolekulární komponenty a dostupný pro Windows, byl vybrán zobrazovací program RasWin Molecular Graphics (Windows Version 2.7.3). Program je zdarma dostupný na internetu. (online) <http://www.openrasmol.org/doc/rasmol.html>, 3.května, 2007.³⁾

Obrázek č. 5: Zobrazovací program RasWin



Program RasWin má v grafickém režimu jednoduché a intuitivní ovládání. Pokročilé příkazy a speciální funkce jsou přístupné z příkazové řádky. Byla využita hlavně možnost používat zároveň režimy zobrazení podle typu atomu a funkcí zobrazení meziatomových vzdáleností a hodnot úhlů.

V každé zobrazené struktuře jsem se zajímala především o polohu Zn^{2+} iontů. V okolí každého z nich byly elektronegativní atomy (S, N, O) do vzdálenosti 3 Å zařazeny do první koordinační vrstvy. O dalších elektronegativních atomech vzdálených mezi 3 Å a 5 Å jsem předpokládala, že náleží do druhé koordinační vrstvy. Nicméně toto dělení nebylo striktní a zařazení konkrétního atomu do jedné z koordinačních vrstev vždy záleželo na konkrétním geometrickém uspořádání daného vazebného místa.

Všechny výsledky byly zpracovány do tabulek a grafu v standardním programu Microsoft Excel.

4. Výsledky

Celkem jsem zpracovala 74 struktur, které obsahovaly 135 Zn^{2+} iontů (viz tabulka č. 3).

Shromážděná data týkající se vaznosti Zn^{2+} iontů s nukleovými kyselinami a proteiny by měly pomoci k hlubšímu pochopení těchto interakcí a umožnit lepší interpretaci výsledků počítačových simulací.

Tabulka 3: Přehled celkových výsledků

Biomolekula	Protein	RNA + Protein	DNA + Protein
Počet struktur	50	13	11
Počet nalezených Zn^{2+} iontů	79	28	28
Počet interakcí v první koordinační vrstvě	305	104	112
Počet interakcí v druhé koordinační vrstvě	440	190	150

4.1. Interakce DNA se Zn^{2+} ionty

Zn^{2+} ionty interagují s DNA především prostřednictvím proteinů. Nepodařilo se najít žádnou strukturu, v níž by se Zn^{2+} ion vázal přímo v první koordinační vrstvě k jakémukoli atomu DNA. Výjimkou je struktura 1ZQT, kde je O3' konec DNA přímo koordinován k Zn^{2+} iontu. Zn - O3' vzdálenost je poměrně velká: 3,3Å a O3' ligand leží ve vrcholu čtvercové pyramidy. Nicméně struktura 1ZQT byla určena s menším rozlišením než 3Å (3,4Å), tudíž jsem ji nezařadila do statistického zpracování.

Celkem bylo určeno 11 struktur, přičemž 4 z nich byly komplexy zinkového prstu a DNA. Zbýlých 7 struktur tvořily různé enzymy, které se váží na DNA.

Zn^{2+} ionty mají v DNA - vázajících proteinech hlavně strukturní roli, proto jsou většinou ukryty uvnitř proteinu a nebyly pozorovány žádné interakce atomů DNA se Zn^{2+} ionty dokonce ani ve druhé koordinační vrstvě. Tyto struktury jsem se přesto rozhodla zpracovat odděleně, protože nalezené vazebné motivy jsou zcela odlišné od motivů nalezených v „běžných“ proteinech. V tabulce č. 4 je přehled nejčastějších

ligandů Zn^{2+} iontu u proteinů vázajících se na DNA.

Tabulka 4: Ligandy Zn^{2+} iontů v proteinech vázajících se na DNA a četnost jejich interakcí v první i druhé koordinační vrstvě

Zkratka	Charakteristická vazba ^o	Počet vazeb celkem	1. KV	Průměrná vzdálenost [Å]	2. KV	Průměrná vzdálenost [Å]
GLY	N	11	0	-	10	4,74 ± 0,18
	O		0	-	1	4,772
ILE	N	9	0	-	9	4,91 ± 0,6
SER	OG	8	0	-	4	4,71 ± 0,12
	H		0	-	2	4,40 ± 0,12
	N		0	-	2	4,89 ± 0,10
CYS	SG	98	64	2,33 ± 0,14	0	-
	N		0	-	26	3,77 ± 0,33
	O		0	-	7	4,81 ± 0,13
	H		0	-	1	3,462
MET	N	6	0	-	6	4,86 ± 0,09
	O		0	-	0	-
ARG	NH1	10	0	-	1	3,92
	NH2		0	-	1	4,8
	N		0	-	8	4,88 ± 0,07
PHE	N	4	0	-	3	4,81 ± 0,12
	O		0	-	1	4,528
HIS	NE2	101	46	2,08 ± 0,16	3	4,12 ± 0,07
	ND1		3	2,17 ± 0,16	45	4,16 ± 0,13
	N		0	-	2	3,99 ± 0,05
	O		0	-	2	4,77 ± 0,01
HOH	O	7	0	-	7	4,32 ± 0,20

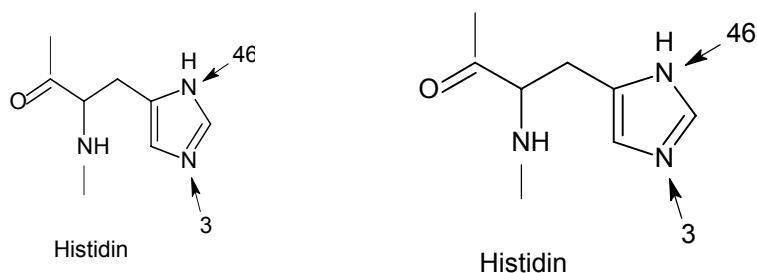
^o Zkratky čerpané z programu Raswin (Příloha 2)

V první koordinační vrstvě se váže Zn^{2+} ion pouze na síru cysteinu (SG) (56,6% případů) a dusíkové atomy histidinu (NE2 a ND1) (43,4%). Cystein a histidin se v první

koordinační vrstvě nacházeli pouze v těchto kombinacích: His – His – Cys – Cys (78,57%), His – Cys – Cys – Cys (14,29%) a Cys – Cys – Cys – Cys (7,14%).

V druhé koordinační vrstvě převažuje interakce s dusíky histidinu (NE2, ND1) (36,9%) a cysteinu (N) (24,1%). Tyto interakce však vyplývají z vazby dané aminokyseliny v první koordinační vrstvě a jsou způsobeny geometrickým uspořádáním příslušné aminokyseliny v prostoru. Kromě těchto interakcí Zn^{2+} ionty téměř výhradně interagují v druhé koordinační vrstvě s dusíky hlavního řetězce některých aminokyselin jako jsou glycin, isoleucin, arginin, methionin. Z postranních řetězců Zn^{2+} ion interagoval pouze s OH^- skupinou serinu.

Obrázek č. 6: Schematické znázornění vazebných míst Zn^{2+} iontů na aminokyselinové monomery v případě proteinů vázajících DNA a jejich četnosti



Z hlediska prostorového uspořádání měla všechna vazebná místa výhradně tvar čtyřstěnu.

4.2. Interakce RNA se Zn^{2+} ionty

Vaznost Zn^{2+} iontů na RNA je obdobná jako u DNA. Zn^{2+} ionty ve většině případů interagují v první i druhé koordinační vrstvě jen s molekulou proteinu. Pouze v jediném případě (Zn307 ion v 1N32 struktuře) se N2 atom guaninu nacházel v druhé koordinační vrstvě Zn^{2+} iontu, který byl ukryt v proteinové kavitě. Nalezla jsem také

dvě struktury, které byly změřeny za nepřítomnosti proteinů: 1NLC, 1YXP. V těchto strukturách Zn^{2+} ionty interagují v první koordinační vrstvě s N7 a O1P (resp. O2P) atomy adeninu a guaninu.

Vzhledem k nízkému počtu interakcí Zn^{2+} iontu s N7 a OP atomy v RNA, není statistické zpracování průměrných vzdáleností Zn^{2+} - ligand v obou koordinačních vrstvách hodnověrné. Toto může být jedna z příčin, proč jsou tyto vzdálenosti tak rozdílné od obdobných vzdáleností pro Mg^{2+} ion.(viz tabulka č. 6)

Stejně jako u DNA vázajících proteinů převažují interakce na síru v cysteinu a dusíkové atomy histidinu, navíc se však mohou vyskytovat interakce s kyslíky karboxylových skupin kyseliny asparagové a glutamové a hydroxyly tyrosinu. Poměrně častý byl výskyt koordinační vazby mezi Zn^{2+} iontem a vodou, což je zřejmě důsledek větší otevřenosti Zn^{2+} - vazebných míst v těchto proteinech vůči okolnímu prostředí.

V první koordinační vrstvě tvoří interakce Zn^{2+} iontů s cysteinem 75,6% a s histidinem 19,5%.

V druhé koordinační vrstvě je vazba na cystein z 42,7% a s histidinem z 22,6%.

Ve srovnání s DNA, pro RNA je podíl vázaných cysteinů v první koordinační vrstvě ještě vyšší, zatímco histidin je zastoupen relativně méně.

Tabulka č. 5: Ligandy Zn^{2+} iontů v proteinech vázajících se na RNA a v RNA a četnost jejich interakcí v první i druhé koordinační vrstvě

Zkratka	Charakteristická vazba ^o	Počet vazeb celkem	1. KV	Průměrná vzdálenost [Å]	2. KV	Průměrná vzdálenost [Å]
A	OP	18	3	$2,23 \pm 0,13$	5	$4,11 \pm 0,34$
	N7		1	2,52	1	4,10
	N9		0	-	1	$4,61 \pm 0,23$
	P		0	-	4	4,12
	O		0	-	2	$4,15 \pm 0,50$
G	OP	30	0	-	5	$4,48 \pm 0,19$
	N7		5	$2,30 \pm 0,12$	3	$4,72 \pm 0,14$
	N9		0	-	6	$4,51 \pm 0,23$
	O		0	-	11	$4,36 \pm 0,51$

GLY	N	7	0	-	7	4,74 ± 0,13
ALA	N	5	0	-	4	4,57 ± 0,12
	O		0	-	1	4,99
CYS	SG	115	60	2,35 ± 0,19	2	3,42 ± 0,09
	N		1	2,88	35	3,91 ± 0,30
	O		0	-	16	4,82 ± 0,27
ASP	OD	6	2	2,38 ± 0,18	3	3,49 ± 0,27
	N		0	-	1	4,462
GLU	OE	10	1	2,211	9	4,02 ± 0,23
GLN	N	4	0	-	2	4,52 ± 0,04
	NE2		0	-	2	4,81 ± 0,12
TYR	OH	4	1	2,244	2	4,50 ± 0,17
	O		0	-	1	4,408
HIS	NE2	44	4	2,29 ± 0,27	15	4,22 ± 0,22
	ND1		12	2,18 ± 0,11	4	4,35 ± 0,17
	N		0	-	5	4,75 ± 0,29
	O		0	-	4	4,56 ± 0,17
HOH	O	28	13	2,23 ± 0,19	15	4,14 ± 0,49

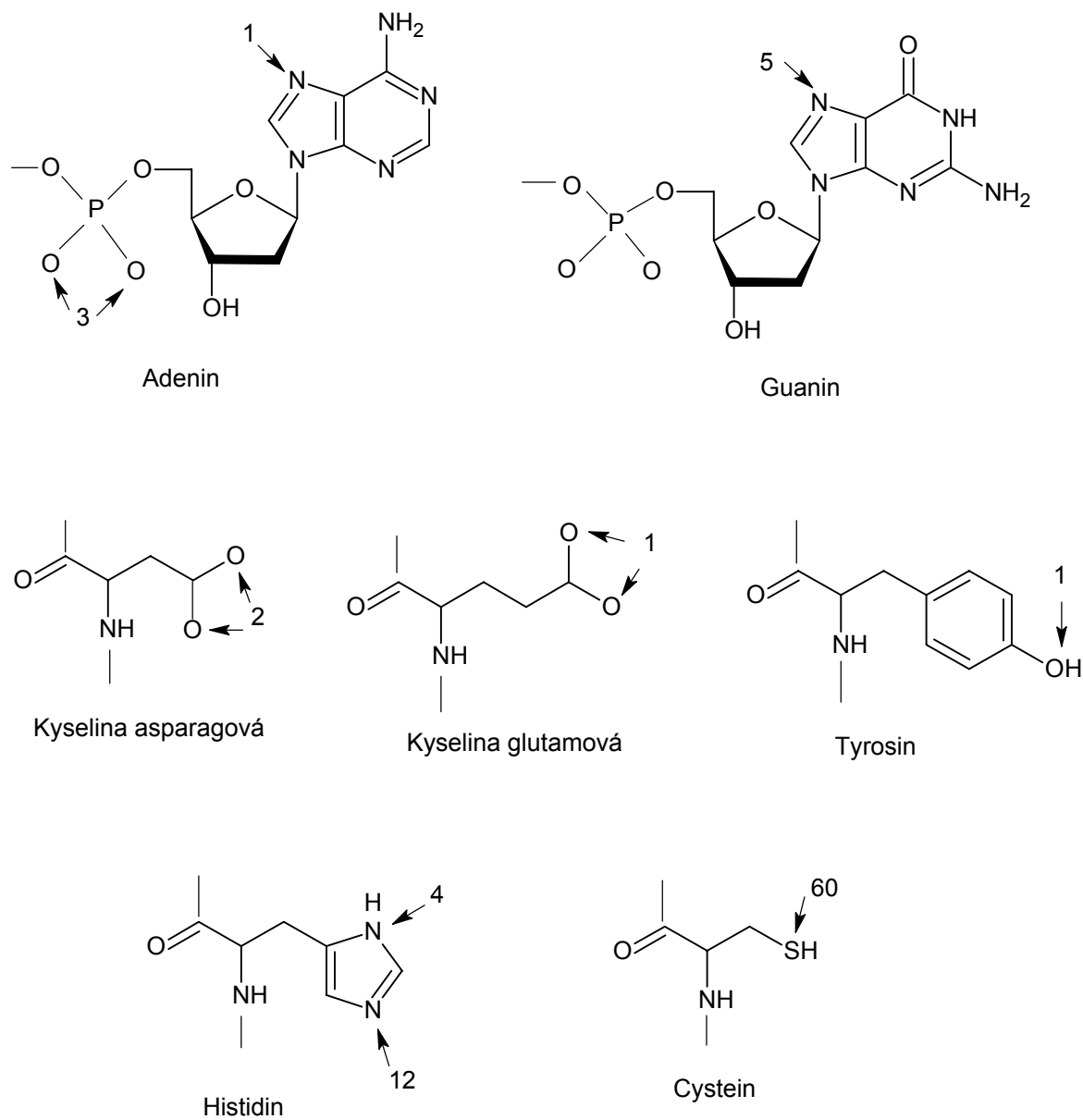
° Zkratky čerpané z programu Raswin (Příloha 2)

Tabulka č. 6: Porovnání vzdáleností Mg^{2+} a Zn^{2+} iontů k adeninu a guaninu (v Å)

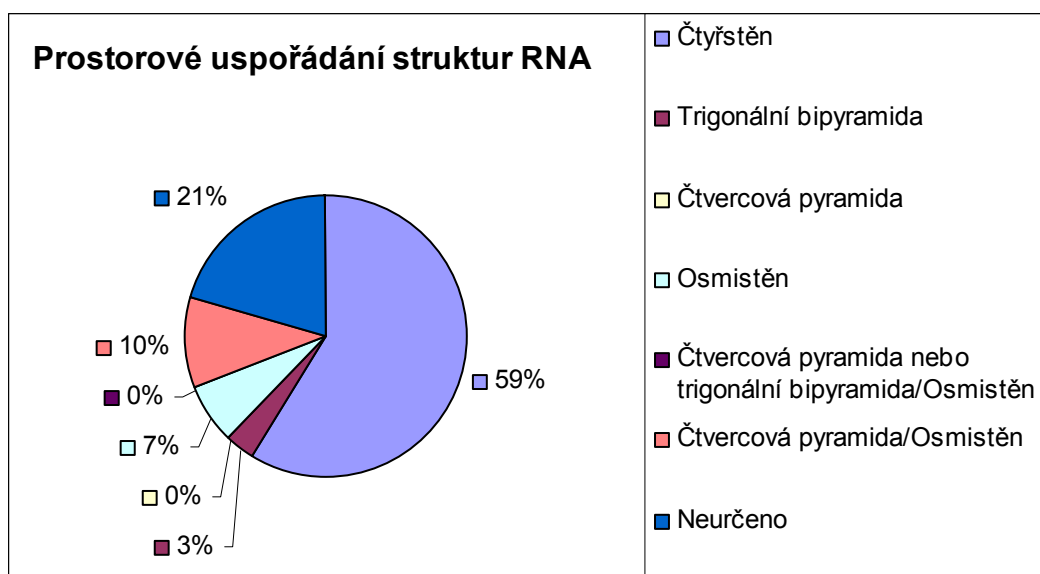
	G (OP)°		G (N7)°		A (OP)°	
	1. KV	2. KV	1. KV	2. KV	1. KV	2. KV
Mg^{2+}	2,29 ± 0,30	3,89 ± 0,45	2,59 ± 0,33	3,54 ± 0,55	2,42 ± 0,27	4,16 ± 0,41
Zn^{2+}	-	4,48 ± 0,19	2,3 ± 0,12	4,72 ± 0,14	2,23 ± 0,13	4,11 ± 0,34

° Zkratky čerpané z programu Raswin (Příloha 2)

Obrázek č. 7: Schematické znázornění vazebných míst Zn^{2+} iontů na aminokyselinové monomery proteinů vázajících RNA a na RNA nukleotidy s vyznačením jejich četnosti



Graf č. 2: Prostorové uspořádání struktur RNA



Různorodost prostorového uspořádání RNA molekul je způsobena větší variabilitou proteinů vázajících RNA než tomu bylo u DNA. Stále ale převládá čtyřstěn (59%). Bylo zde obtížné určit nějaké pravidlo, podle kterého by se dalo odhadnout uspořádání první koordinační vrstvy na základě znalosti jejího složení. První koordinační vrstvu tvořily v případě proteinových struktur kombinace aminokyselin (HIS, CYS, ASP, GLU a TYR) a vody. Pouze pokud se (stejně jako u DNA) v první koordinační vrstvě vyskytuje kombinace cysteinu a histidinu (viz výše), jedná se vždy o čtyřstěn.

V případě struktury 1NLC měla dvě koordinační místa strukturu osmistěnu, struktura jednoho vazebného místa nemohla být rozpoznána kvůli pouze dvěma navázaným ligandům. To samé platí i pro dvě koordinační místa ve struktuře 1YXP, kdy byl navázán vždy jen jeden ligand.

4.3. Interakce proteinů se Zn^{2+} ionty

Nejvíce interakcí Zn^{2+} iontů bylo nalezeno s aminokyselinami obsahujícími síru (S), dusík (N) a karboxyl (COO^-) v postranním řetězci. Jednalo se o aminokyseliny

cystein (25,0%), histidin (42,2%), kyselinu asparagovou (10,7%) a kyselinu glutamovou (4,8%). S hlavním řetězcem interagovaly Zn^{2+} ionty pouze výjimečně. Ve všech (třech) případech se jednalo o zbytek glycinu (2 x O, 1 x N atom).

V první koordinační vrstvě je nejvíce specifická vazba na síru cysteinu (SG, průměrná vzdálenost Zn^{2+} iontu od atomu síry je $2,34 \pm 0,08 \text{ \AA}$), poté na některý z dusíků histidinu (ND1, průměrná vzdálenost $2,13 \pm 0,15 \text{ \AA}$; NE2, průměrná vzdálenost $2,12 \pm 0,11 \text{ \AA}$), méně často pak na COO^- skupinu kyseliny glutamové (OE, průměrná vzdálenost $2,42 \pm 0,38 \text{ \AA}$) a asparagové (OD, průměrná vzdálenost $2,32 \pm 0,40 \text{ \AA}$).

V druhé koordinační vrstvě je nejčastější vazba na dusík histidinu (ND1, průměrná vzdálenost $4,18 \pm 0,18 \text{ \AA}$; NE2, průměrná vzdálenost $4,20 \pm 0,21 \text{ \AA}$; N, průměrná vzdálenost $4,69 \pm 0,29 \text{ \AA}$), cysteinu (N, průměrná vzdálenost $4,02 \pm 0,39 \text{ \AA}$), glycinu (N, průměrná vzdálenost $4,82 \pm 0,15 \text{ \AA}$) a kyseliny asparagové (N, průměrná vzdálenost $3,91 \pm 0,05 \text{ \AA}$) (tabulka č. 7). V případě histidinu a cysteinu je tak vysoký výskyt opět způsoben geometrií aminokyselin vázaných na zinek v první koordinační vrstvě, uvedené vzdálenosti pak dávají určitou informaci o konformaci těchto aminokyselin v prostoru vzhledem k Zn^{2+} iontu.

Co se týká vazby Zn^{2+} iontů na dusík, v 99% případů je ligandem jeden z dusíků histidinu. Histidin se vyskytuje ve dvou tautomerních formách - ϵ a δ (viz výše, kapitola 1.2.5). Tautomer ϵ interaguje se Zn^{2+} ionty prostřednictvím dusíku NE2 a tautomer δ prostřednictvím dusíku ND1, přičemž tautomer ϵ je více častý (56%) než tautomer δ (44%). Poměrné zastoupení tautomeru ϵ je výrazně menší v proteinech nevázájících se na nukleové kyseliny než v případě proteinů vázájících DNA. V případě, že jsou všechna data (pro DNA, RNA, proteiny) uvažována společně, tak se mé průměrné hodnoty 65% a 35% téměř shodují s publikovaným procentuálním zastoupením 70% a 30%¹⁾. Určitý rozdíl může být způsoben jiným zastoupením různých typů proteinů v obou statistických souborech.

Vazba Zn^{2+} iontů na atom kyslíku je méně častá než na dusík a její průměrná vzdálenost je delší ($2,32 \pm 0,35 \text{ \AA}$) než vazba na dusík ($2,12 \pm 0,13 \text{ \AA}$). Publikované vzdálenosti jsou pro kyslík $2,11 \pm 0,14 \text{ \AA}$ a pro dusík $2,08 \pm 0,10 \text{ \AA}$ ¹⁾. V případě kyslíku se většinou jednalo o vazbu na karboxylovou skupinu kyseliny asparagové nebo

glutamové. V 75% případů se jednalo o dvou vazebnou koordinaci na oba kyslíky karboxylu. Ve většině případů však obě koordinační vazby nebyly rovnocenné a bylo obtížné stanovit hranici mezi dvou vazebnou a jedno vazebnou koordinací. Nejasnou definicí dvou- a jedno vazebné koordinace na kyslíky karboxylu lze vysvětlit určitou neshodu našich průměrných vzdáleností na kyslík se vzdálenostmi uvedenými v literatuře i velkou hodnotu střední odchylky kvadratického průměru u Zn-O vzdáleností GLU a ASP v tabulce č. 9. V této práci byly považovány jako dvou vazebné všechny karboxylové skupiny, u nichž vzdálenost k oběma kyslíkovým atomům byla menší než 3 Å a zároveň rozdíl vzdáleností obou kyslíků od Zn^{2+} iontu nebyl větší než 1 Å, což může být příliš velká hodnota.

Atom síry z vedlejšího řetězce cysteinu je v první koordinační vrstvě nejčastěji se vyskytujícím ligandem. Průměrná vzdálenost síry od Zn^{2+} iontu je $2,34 \pm 0,08$ Å, což je zcela ve shodě s publikovaným údajem $2,32 \pm 0,10$ Å¹⁾. Taktéž všechny ostatní naměřené průměrné vzdálenosti se zcela shodují s již publikovanými výsledky¹⁾

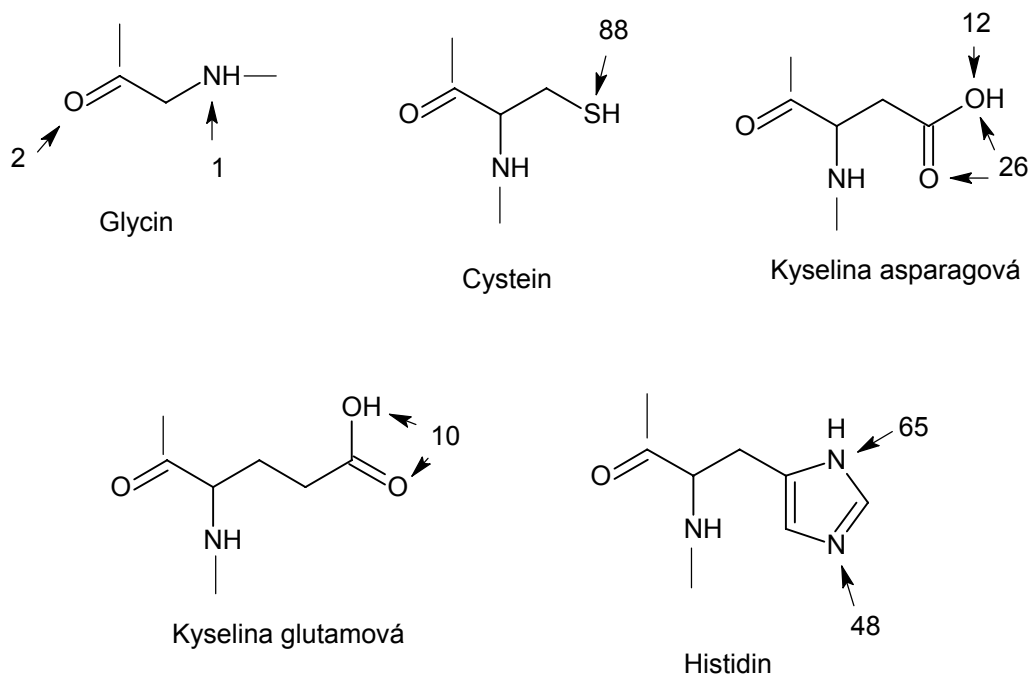
Tabulka 7: Ligandy Zn^{2+} iontů v proteinech a četnost jejich interakcí v první i druhé koordinační vrstvě

Zkratka	Charakteristická vazba ^o	Počet vazeb celkem	1. KV	Průměrná vzdálenost [Å]	2. KV	Průměrná vzdálenost [Å]
GLY	N	18	1	2,19	17	$4,82 \pm 0,15$
	O	9	2	$2,12 \pm 0,01$	7	$4,81 \pm 0,12$
ALA	N	3	0	-	3	$4,85 \pm 0,09$
VAL	O	2	0	-	2	$4,47 \pm 0,49$
	N	2	0	-	2	$4,74 \pm 0,24$
LEU	O	9	0	-	9	$4,69 \pm 0,20$
CYS	SG	93	88	$2,34 \pm 0,08$	5	$4,62 \pm 0,29$
	N	47	0	-	47	$4,02 \pm 0,39$
	O	16	0	-	16	$4,69 \pm 0,29$
SER	OG	7	0	-	7	$4,57 \pm 0,32$
	N	4	0	-	4	$4,76 \pm 0,11$
THR	OG1	3	0	-	3	$4,43 \pm 0,40$

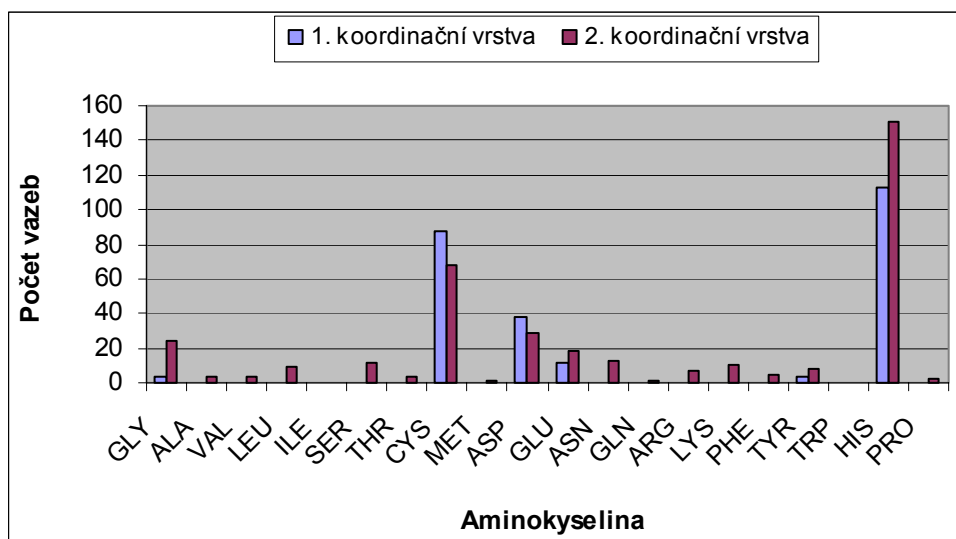
MET	SD	1	0	-	1	4,9
ASP	OD	53	38	2,32 ± 0,40	15	3,39 ± 0,51
	N	13	0	-	13	3,91 ± 0,05
	O	1	0	-	1	4,74
GLU	OE	28	12	2,42 ± 0,38	16	4,25 ± 0,29
	O	1	0	-	1	4,23
	N	1	0	-	1	4,33
ASN	ND2	8	0	-	8	4,36 ± 0,10
	OD1	3	0	-	3	4,95 ± 0,05
	N	2	0	-	2	4,92 ± 0,05
GLN	O	1	0	-	1	4,871
ARG	NH1	2	0	-	2	4,09 ± 0,17
	NH2	1	0	-	1	4,17
	NE	1	0	-	1	4,36
	N	3	0	-	3	4,76 ± 0,06
LYS	O	7	0	-	7	4,05 ± 0,40
	N	3	0	-	3	4,86 ± 0,09
PHE	N	5	0	-	5	4,81 ± 0,29
TYR	OH	6	1	2,54	5	4,08 ± 0,73
	OXT	1	1	2,72	0	-
	O	2	1	2,01	1	4,27
	N	2	0	-	2	4,85 ± 0,10
	HH	1	1	2,57	0	-
HIS	NE2	116	65	2,12 ± 0,11	51	4,20 ± 0,21
	ND1	114	48	2,13 ± 0,15	66	4,18 ± 0,18
	N	29	0	-	29	4,69 ± 0,29
	O	5	0	-	5	4,56 ± 0,28
PRO	N	1	0	-	1	4,145
	O	1	0	-	1	4,996
HOH	O	95	31	2,31 ± 0,29	64	4,35 ± 0,50

° Zkratky čerpané z programu Raswin (Příloha 2)

Obrázek č. 8: Schematické znázornění vazebných míst Zn^{2+} iontů na aminokyselinové monomery v případě proteinů a jejich četnosti

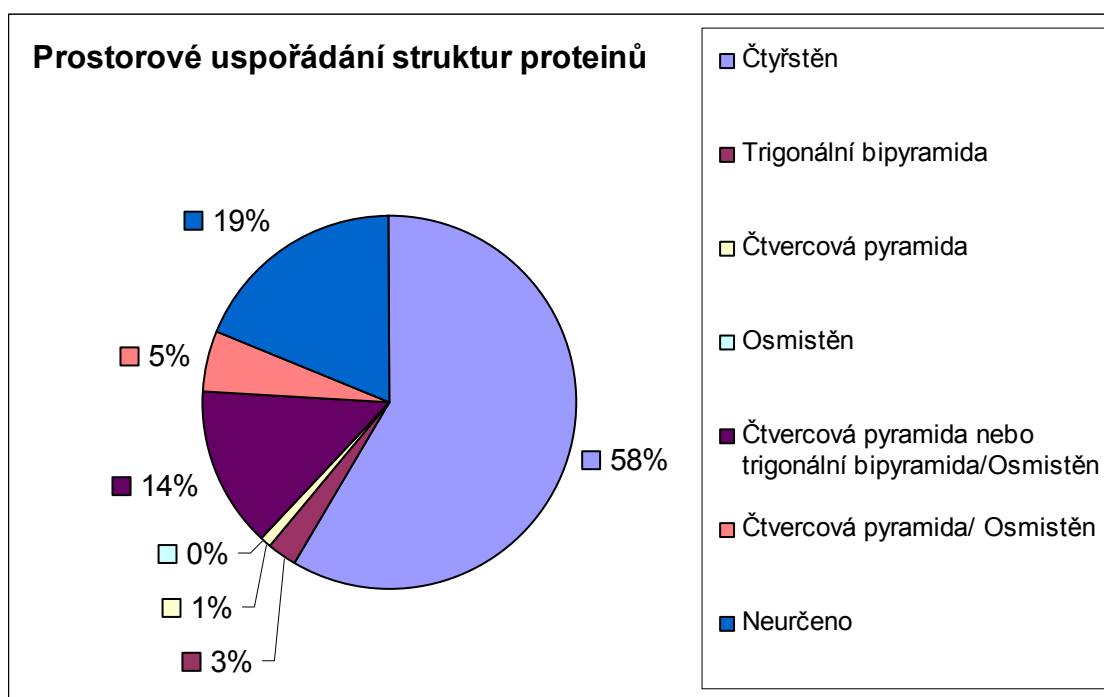


Graf č. 3: Četnost interakcí Zn^{2+} iontu s aminokyselinami



V druhé koordinační vrstvě převažuje vazba Zn^{2+} iontů na atom dusíku histidinu a cysteinu. Tyto interakce však vyplývají z vazby dané aminokyseliny v první koordinační vrstvě a jsou způsobeny geometrickým uspořádáním příslušné aminokyseliny v prostoru. V druhé koordinační vrstvě dochází k interakcím s hlavním řetězcem proteinu, přibližně stejně časté jsou interakce jak s kyslíkem karbonylu, tak s dusíkem.

Graf č. 4: Prostorové uspořádání struktur proteinů



Pro Zn^{2+} ion je v první koordinační vrstvě nejvíce specifická vazba na cystein a histidin. I zde platí, že pokud se v první koordinační vrstvě nachází pouze tyto ligandy, tak prostorové uspořádání těchto ligandů okolo Zn^{2+} iontu bude ve tvaru čtyřstěnu. U 19% struktur proteinů jsem nebyla schopna určit prostorové uspořádání navázaných ligandů pro jejich nízký počet (1 až 3).

4.4. Prostorové uspořádání

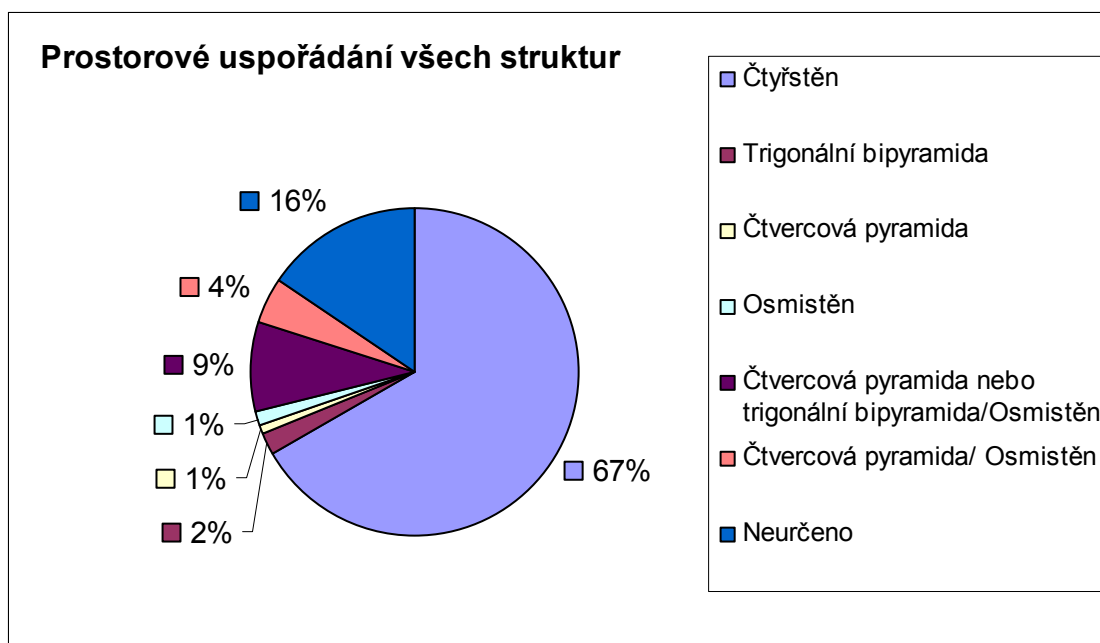
Zn^{2+} ion může obsahovat v první koordinační vrstvě 4 až 6 ligandů, které mohou být uspořádány do čtyř různých strukturních uspořádání (viz výše).

V průběhu zpracovávání výsledků jsem narazila na několik struktur, u kterých nebylo určení uspořádání možné. Bylo to způsobeno nízkým počtem ligandů v první koordinační vrstvě (1 nebo 2). Jinou komplikací bylo, že první koordinační vrstva obsahovala jen 4 ligandy, změřené úhly mezi nimi vylučovaly čtyřstěn, tudíž se mohlo jednat jak o trigonální bipyramidu, tak o čtvercovou pyramidu nebo osmistěn. V některých případech se podle naměřených úhlů dala vyloučit trigonální bipyramida, ale dále se nedalo určit, zda se jedná o čtvercovou pyramidu nebo osmistěn. Všechny tyto možnosti jsou uvedené v tabulce č. 8 a v grafu č. 5.

Tabulka č. 8: Přehled všech struktur a jejich prostorového uspořádání

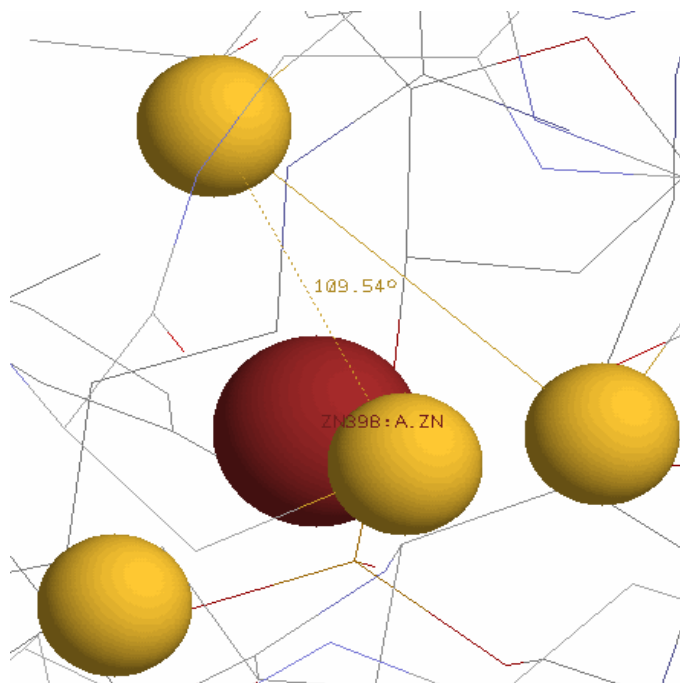
Biomolekula	Protein	RNA + Protein	DNA + Protein
Počet struktur	50	13	11
Počet nalezených Zn^{2+} iontů	79	28	28
Čtyřstěn	46	17	28
Trigonální bipyramida	2	1	0
Čtvercová pyramida	1	0	0
Osmistěn	0	2	0
Pyramida/Osmistěn	11	0	0
Čtvercová pyramida/Osmistěn	4	3	0
Neurčeno	15	6	0

Graf č. 5: Prostorové uspořádání všech struktur

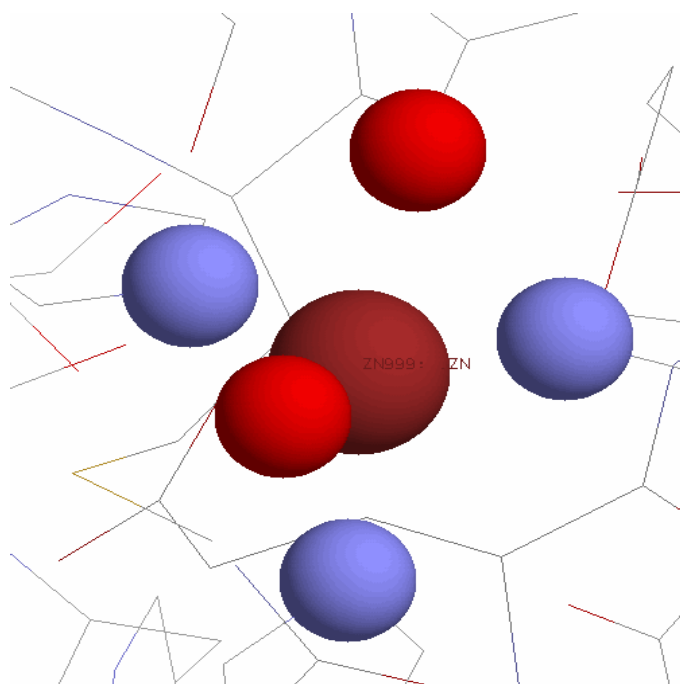


V grafu č. 5 je znázorněno prostorové uspořádání všech struktur dohromady (DNA, RNA, proteiny). Podle výsledků lze říci, že ze 74 struktur, které dohromady obsahovaly 135 Zn^{2+} iontů, tvoří 67% čtyřstěny. U DNA byla geometrie všech struktur čtyřstěn, u proteinů bylo toto prostorové uspořádání nalezeno v 58 % případů a u RNA v 59% případů.

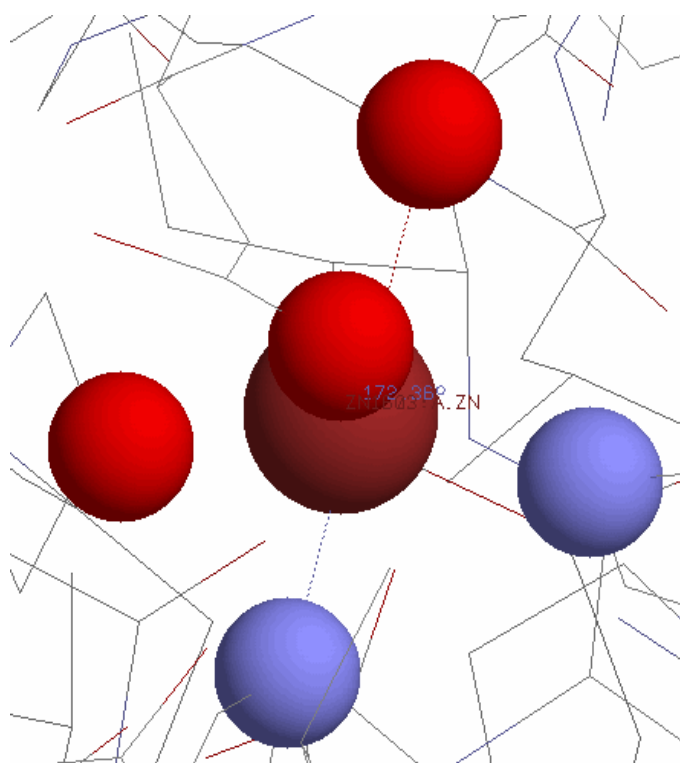
Obrázek č. 9: Geometrie čtyřstěnu, struktura ICIT, ion Zn 399 693



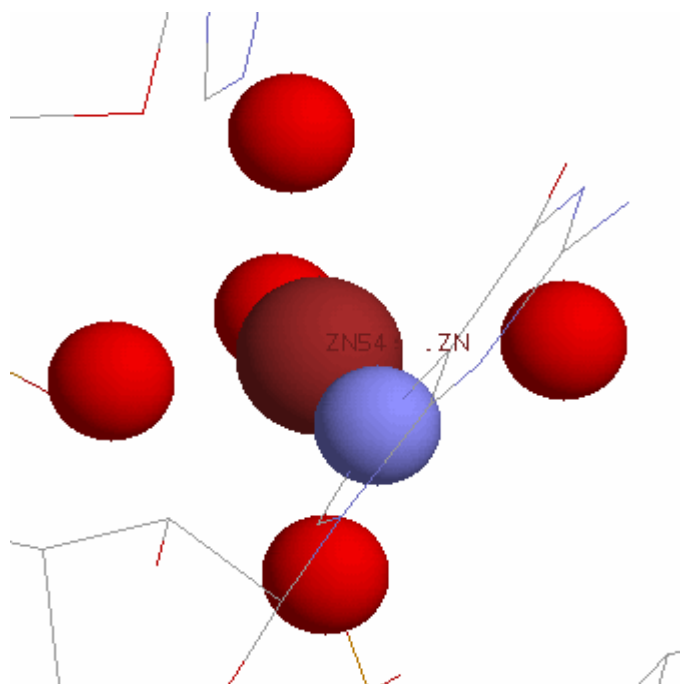
Obrázek č. 10: Geometrie trigonální bipyramidy, struktura IAST, ion Zn 999 1593



Obrázek č. 11: Geometrie čtvercové pyramidy, struktura 1AST, ion Zn 999 1593



Obrázek č. 12: Geometrie osmistěnu, struktura 1NLC, ion Zn 54 1056



4.5. Porovnání vazebných míst Zn^{2+} iontů a Mg^{2+} iontů

Porovnání vaznosti Zn^{2+} iontů a Mg^{2+} iontů bylo možné udělat pouze pro proteiny. Byly sledovány vazby na atomy dusíku N, kyslíku O a síry S v první (viz graf č. 6) i druhé koordinační vrstvě.

V první koordinační vrstvě se Zn^{2+} ionty váží z velké většiny na atom síry a dusíku, o něco méně pak na atom kyslíku. Mg^{2+} ionty se na rozdíl od Zn^{2+} iontů váží výhradně na atom kyslíku. Pro atomy dusíku a síry nebyla nalezena v první koordinační vrstvě žádná interakce³⁾.

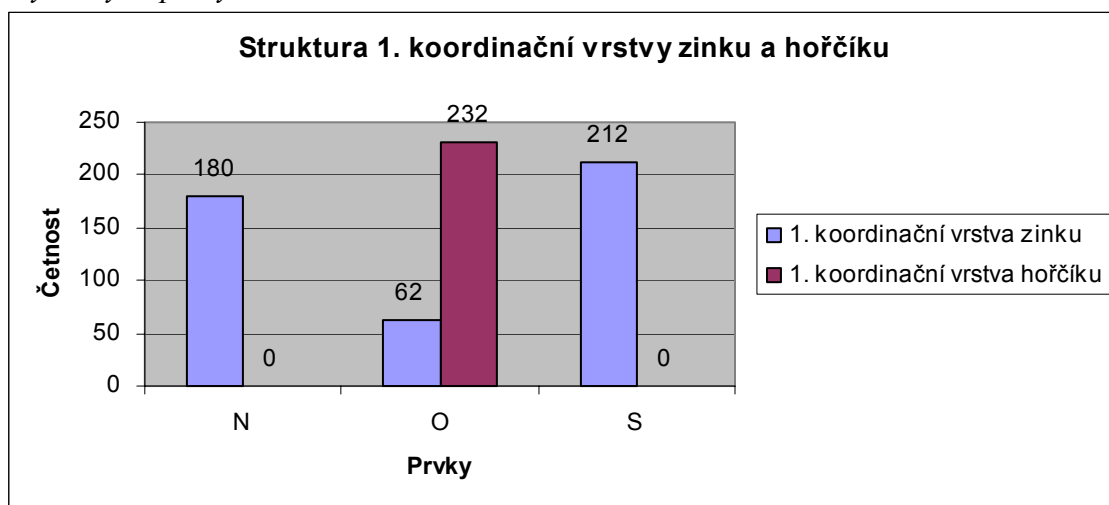
Mg^{2+} ionty se nejčastěji váží na kyselinu asparagovou a glutamovou³⁾. Porovnala jsem průměrné vzdálenosti iontů Mg^{2+} a Zn^{2+} s těmito aminokyselinami a zpracovala je do tabulky č. 9. Zn-O vazebné délky jsou výrazně delší než Mg-O vazebné délky. Vzhledem k tomu, že v literatuře se pro oba ionty uvádí podobné vazebné délky pro případ $Mg(H_2O)_6^{2+}$ a $Zn(H_2O)_6^{2+}$ komplexů⁵⁾, vzniklý rozdíl může být způsoben, že v citované práci nebyla uvažována dvou vazebná koordinace karboxylu na Mg^{2+} ion.

Tabulka č. 9: Porovnání vzdáleností Mg^{2+} a Zn^{2+} iontů ke kyselinám asparagové a glutamové (údaje pro Mg^{2+} převzaty z práce 3)

	GLU (OE) ^o		ASP (OD) ^o	
	1. KV	2. KV	1. KV	2. KV
Mg^{2+}	2,18 ± 0,20	3,68 ± 0,49	2,17 ± 0,21	3,90 ± 0,42
Zn^{2+}	2,42 ± 0,38	4,25 ± 0,29	2,32 ± 0,40	3,39 ± 0,51

^o Zkratky čerpané z programu Raswin (Příloha 2)

Graf 6: Porovnání četnosti interakcí Zn^{2+} iontu a Mg^{2+} iontu v 1. koordinační vrstvě s vybranými prvky



5. Diskuse

V internetové databázi jsem vyhledala struktury nukleových kyselin a proteinů, které interagují se zinečnatými ionty.

Co se týče struktur proteinů, tak byla prokázána jednoznačná preference přímých interakcí Zn^{2+} iontu vzhledem k histidinu, cysteinu, kyselině asparagové, kyselině glutamové a glycinu, což uvádí i odborné články^{1),9)}. Zjištěné průměrné hodnoty vzdáleností pro interakce Zn^{2+} iontu v první koordinační vrstvě jsou $2,34 \pm 0,08$ Å pro síru cysteinu a $2,12 \pm 0,13$ Å pro atomy dusíku v kruhu histidinu. Tyto hodnoty se shodují s již publikovanými výsledky¹⁾, kde průměrná délka vazby se sírou cysteinu byla $2,32 \pm 0,10$ Å a s dusíkem v kruhu histidinu $2,08 \pm 0,10$ Å)

V 99% případech, kdy dochází k vazbě Zn^{2+} iontů na dusík, je ligandem jeden z dusíků histidinu (odborný článek uvádí 92%¹⁾). Histidin se vyskytuje ve dvou tautomerních formách - ϵ a δ . Tautomer ϵ interaguje se Zn^{2+} ionty prostřednictvím dusíku NE2 a tautomer δ prostřednictvím dusíku ND1, přičemž tautomer ϵ je více častý (65%) než tautomer δ (35%) (výsledky se téměř shodují s publikovaným procentuálním zastoupením 70% a 30%¹⁾)

U struktur obsahujících RNA a DNA bylo zpracování výsledků složitější. Zinek interagoval přímo s nukleovou kyselinou jen ve dvou případech, oba se týkaly RNA. Byly to struktury 1NLC a 1YXP. V těchto strukturách Zn^{2+} ionty interagují v první koordinační vrstvě s N7 a O1P (resp. O2P) atomy adeninu a guaninu. Vzhledem k nízkému počtu interakcí Zn^{2+} iontu s N7 a OP atomy v RNA, není statistické zpracování průměrných vzdáleností kov - ligand v obou koordinačních vrstvách hodnověrné. Ostatní struktury byly tvořeny komplexem proteinu s nukleovou kyselinou, v nichž se zinek vázal pouze na atomy proteinu.

Malý počet vazebných míst Zn^{2+} iontů v případě nukleových kyselin byl pro mě poměrně překvapující vzhledem k existenci velkého množství teoretických studií zabývajících se rozdíly ve vaznosti Zn^{2+} iontů a Mg^{2+} iontů právě na nukleové kyseliny^{8),16),17)}. Svou roli jistě hrály experimentální podmínky, kdy krystalizace většinou probíhala v přítomnosti solí jiných kovů než zinku (např. v prostředí NaCl,

MgCl₂ apod.). In vivo lze také očekávat, že nukleové kyseliny jsou stabilizovány především jednomocnými kovy K⁺, Na⁺ a dvoumocným Mg²⁺, který má vyšší afinitu k fosfátovým kyslíkům DNA než Zn²⁺ a je v buňkách přítomen v mnohem vyšší koncentraci.

Zinečnaté ionty na sebe přednostně váží jiné jiné atomy (S- cystein, N- histidin) než Mg²⁺ ionty, které mají mnohem vyšší afinitu především ke kyslíku (kyslíky fosfátových skupin v případě nukleových kyselin, karboxyly kyselin asparagové a glutamové v případě proteinů). Vyšší afinita Zn²⁺ iontů k dusíku vzhledem k Mg²⁺ iontům byla pozorována v řadě jiných prací^{16), 17)}.

V souladu s publikovanými daty^{4), 5)} byla prokázána jednoznačná preference uspořádání ligandů v první koordinační vrstvě do tvaru čtyřstěnu.

6. Závěr

Tato práce byla zaměřená na interakci Zn^{2+} iontů s proteiny a nukleovými kyselinami a na určení prostorového uspořádání ligandů. Všechny zpracované RTG struktury s rozlišením do 3 Å byly vyhledány v internetové databázi PDB. Celkem bylo nalezeno 74 struktur, které obsahovaly 135 Zn^{2+} iontů.

Zn^{2+} ionty interagují s DNA především prostřednictvím proteinů. Zn^{2+} ionty mají v DNA-vázajících proteinech většinou strukturní roli. Jsou ukryty uvnitř proteinu a proto nebyly pozorovány žádné interakce atomů DNA se Zn^{2+} ionty dokonce ani ve druhé koordinační vrstvě.

Vaznost Zn^{2+} iontů na RNA je obdobná jako u DNA. Zn^{2+} ionty ve většině případů interagují v první i druhé koordinační vrstvě jen s proteinem. Zde jsem ale našla dvě struktury, které byly změřeny za nepřítomnosti proteinů: 1NLC, 1YXP. V těchto strukturách Zn^{2+} ionty interagují v první koordinační vrstvě s N7 a O1P (resp. O2P) atomy adeninu a guaninu.

Nejvíce interakcí Zn^{2+} iontů bylo nalezeno s aminokyselinami. Jednalo se o aminokyseliny obsahujícími síru (S, cystein - 25,0%), dusík (N, histidin - 42,2%) a karboxyl (COO^- , kyselinu asparagová - 10,7% a kyselinu glutamová - 4,8%) v postranním řetězci.

Z hlediska prostorového uspořádání byly ligandy v 67% vazebných míst uspořádány do tvaru čtyřstěnu. Toto uspořádání bylo zvláště typické pro první koordinační vrstvu tvořenou pouze ligandy cysteinu a histidinu v daných kombinacích (His – His – Cys – Cys , His – Cys – Cys – Cys nebo Cys – Cys – Cys – Cys).

Zn^{2+} ionty se preferenčně váží na atomy dusíku a síry, zatímco Mg^{2+} ionty na atomy kyslíku.

7. Seznam použité literatury

- 1) Alberts I. L., Nadassy K., Wodak S. J., Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Science.*, **1998**, 7, 1700 - 1716.
- 2) Benešová M., Satrapová H., *Odmaturuj z chemie, Didaktis. Brno*, **2002**, s 157 – 161. ISBN 80-86285-56-1
- 3) Bezchlebová Eva, Interakce Mg^{2+} iontů s nukleovými kyselinami a proteiny, *Bakalářská práce, JCU ZSF České Budějovice*, **2006**
- 4) Dudev M., Wang J., Dudev T., Lim C., Factors Governing the Metal Coordination Number in Metal Complexes from Cambridge Structural Database Analyses, *J. Phys. Chem.*, **2006**, 110, 1889 - 1895
- 5) Dudev T., Lim C., A DFT/CDM Study of Metal - Carboxylate Interactions in Metalloproteins: Factors Governing the Maximum Number of Metal-bound carboxylates., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1553-1561
- 6) Dudev T., Lim C., Principles Governing Mg, Ca, and Zn Binding and Selectivity in Proteins., *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 773-787
- 7) Dudev T., Lim C., Tetrahedral vs Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest: A DFT/CDM Study., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 11146-11153
- 8) Kabeláč M., Hobza M., Na^{2+} , Mg^{2+} , and Zn^{2+} Binding to All Tautomers of Adenine, Cytosine, and Thymine and the Eight Most Stable Keto/Enol Tautomers of Guanine: A Correlated ab Initio Quantum Chemical Study, *J. Phys. Chem.*, **2006**, 110, 14515 - 14523
- 9) Karlin S., Zhu Z., Classification of Mononuclear Zinc Metal Sites in Protein Structures., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 14231 - 14236
- 10) Kolektiv autorů, *Lékařská chemie a biochemie - Praktikum*, Avicenum. Praha, **1991**, s 82 – 83, 177 - 202. ISBN 80-201-0114-4
- 11) Laity J. H., Lee B. M., Wright P. E., Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity., *Current Opinion in Structural Biology.*, **2001**, 11, 39 – 46
- 12) Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J., *Biochemie pro studující medicíny I. díl*,

Karolinum. Praha, **2006**, s 31 – 53. ISBN 80-246-0849-9

- 13) Lin Y., Lee Y., Lim C., Differential Effects of the Zn-His-Bkb vs Zn-His-[Asp/Glu] Triad on Zn-Core Stability and Reactivity., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 11336-11347
- 14) Lipscomb W. N., Strater N., Recent Advances in Zinc Enzymology., *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2375-2433
- 15) Mc Call K. A., Huang Ch., Fierke C. A., Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *The Journal of Nutrition*, **2000**, 22, 1437S – 1444S
- 16) Rulišek L., Šponer J., Outer – Shell and Inner – Shell Coordination of Phosphate Group to Hydrated Metal Ions (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) in the Presence and Absence of Nucleobase. The Role of Nonelectrostatic Effects, *J. Phys. Chem.*, **2003**, 107, 1913 - 1923
- 17) Šponer J. E., Sychrovský V., Hobza P., Šponer J., Interactions of Hydrated Divalent Metal Cations with Nucleic Acid Bases. How to Relate the Gas Phase Data to Solution Situation and Binding Selectivity in Nucleic Acids, *J. Phys. Chem.*, **2004**, 6, 2772 - 2780
- 18) Vallee B. L., Auld D. S., Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and Other Proteins., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 29, 5647 - 5659
- 19) Vodrážka Z., *Biochemie.*, Academia, Praha, **1999**
- 20) Voet D., Voetová J. G., *Biochemie.*, Victoria Publishing, Praha, **1995**
- 21) Internet Projekt a. s., Portál o zdravotnictví a léčivech, [online], http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/55_2054.html, 6.1. 2007
- 22) Kovy, <http://www.nom.wz.cz/KOVY/zinek.htm>, 20. 1. 2007
- 23) Weisbauer Jan, Zinek, [online], <http://volny.cz/weis/zinek.htm>, 9. 1. 2007
- 24) Wikipedie:GNU Free Documentation License,GNU FDL, Zinek, [online], <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/182487-zinek>, 3. 12. 2006

8. Klíčová slova

Zinek

Struktura

PDB

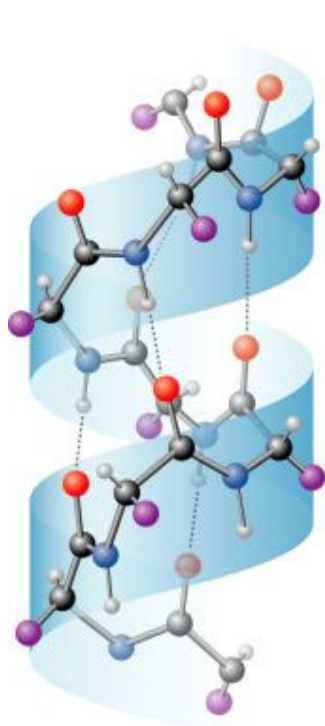
Koordinační vrstva

Nukleové kyseliny

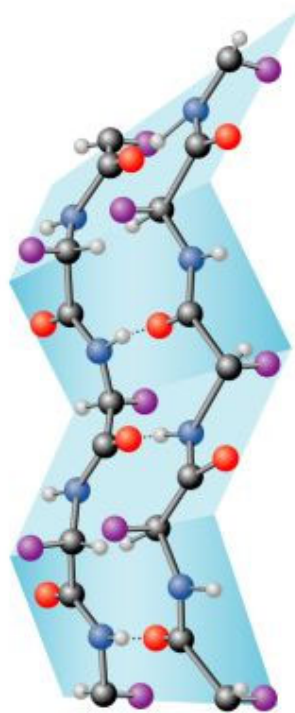
Proteiny

9. Přílohy

Příloha 1: Přehled sekundárních struktur bílkovin



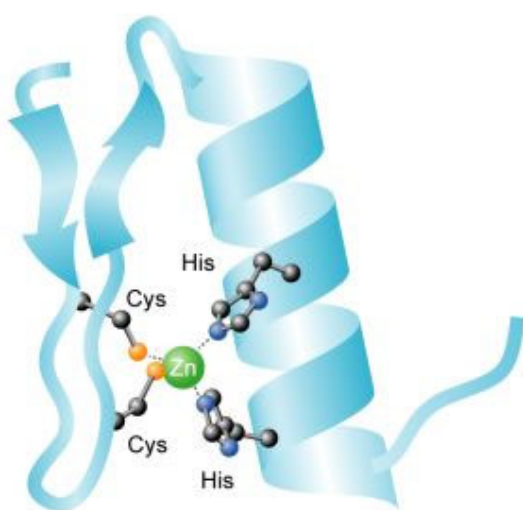
α -helix



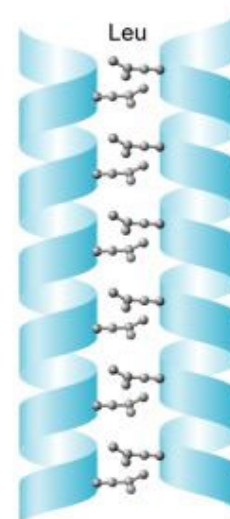
β -list



β -ohyb



Zn-prst



Leu - zip

Příloha 2: o Vysvětlivky pro zkratky čerpané z programu Raswin ©

ND1 atom dusíku cyklu (HIS)

NE2 atom dusíku cyklu (HIS)

ND2 atom dusíku vedlejšího řetězce (ASN)

NE2 atom dusíku vedlejšího řetězce (GLN)

OD atom karboxylové skupiny (ASP, ASN)

OE atom karboxylové skupiny (GLU, GLN)

OG atom OH (SER)

OG1 atom OH (THR)

OXT atom kyslíku koncové karboxylové skupiny (TYR)

SD atom síry methioninu (MET)

SG atom síry cysteinu (CYS)