

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**  
**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**Кафедра биохимии**

**ГАЛУШКО**  
Виктория Владимировна

**СВЯЗЫВАНИЕ ИОНОВ ЦИНКА С ЭПИДЕРМАЛЬНЫМ ФАКТОРОМ**  
**РОСТА ЧЕЛОВЕКА**

Дипломная работа

Научный руководитель:  
учёный секретарь Института  
физиологии НАН Беларуси,  
кандидат биологических наук  
Хрусталёва Татьяна Александровна

Допущена к защите  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.  
Зав. кафедрой биохимии

кандидат биологических наук, доцент  
\_\_\_\_\_ И.В. Семак

Минск, 2022

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 50 страниц, 19 рисунков, 42 источника.

ЭПИДЕРМАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА ЧЕЛОВЕКА, САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ, ИОНЫ ЦИНКА, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ, ТРИПТОФАН.

**Объект исследования:** эпидермальный фактор роста человека.

**Цель работы:** оценить характер связывания ионов цинка с эпидермальным фактором роста человека.

**Методы исследования:** флуоресцентная спектроскопия, комплексонометрические, статистические.

Взаимодействие ионов цинка с эпидермальным фактором роста человека (hEGF) исследовали с помощью флуоресцентной спектроскопии для получения информации о связывании белка с лигандом, эффективности и механизме тушения флуоресценции. Эта информация востребована при дизайне лекарственных препаратов, направленных на терапию онкологических заболеваний, в которые вовлечён hEGF и его рецептор, при разработке селективных лигандов для определения пространственной структуры белков.

При титровании hEGF раствором  $\text{ZnSO}_4$  и  $\text{ZnCl}_2$  при 22°C и 37°C происходит связывание катионов металла вблизи остатков триптофана, что вызывает резкое уменьшение интенсивности флуоресценции. При достижении концентрации  $\text{Zn}^{2+}$   $8,936 \cdot 10^{-5}$  моль/л происходит смещение длины волны максимума эмиссии в коротковолновую область, что указывает не только на связывание нескольких ионов цинка молекулой пептида, но и на структурные изменения в самом hEGF, которые приводят к переходу остатков триптофана в более гидрофобное микроокружение. Остатки His16 в структуре димера эпидермального фактора роста человека контактируют с Tyr37, а Arg45 формирует катион-пи взаимодействие как с Tyr37, так и Trp50. Формирование комплекса катиона цинка с остатками His16 и Tyr37 может «затягивать» Trp50 в более гидрофобное микроокружение за счёт приближения его к остатку Arg45. Второй вероятный сайт связывания ионов цинка включает в себя Asp46 и Glu51, находящиеся в непосредственной близости от остатков триптофана, что также может приводить к снижению интенсивности флуоресценции. Однако С-конец hEGF известен своей структурной неустойчивостью, что затрудняет связывание с ним лигандов. С hEGF также связываются и хлорид-ионы.  $\text{Cl}^-$  взаимодействуют с остатком Arg41, и, наиболее вероятно, что в димерной форме пептида остаток Arg53 одной цепи образует сайт связывания хлорид-иона с Arg41 другой цепи.

**Область применения результатов исследования:** структурная биохимия, биоинформатика.

## РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 50 старонак, 19 малюнкаў, 42 крыніцы.

**ЭПІДЭРМАЛЬНЫ ФАКТАР РОСТУ ЧАЛАВЕКА, САЙТЫ ЗВЯЗВАННЯ, ІЁНЫ ЦЫНКУ, ФЛУАРЭСЦЭНЦЫЯ, ТРЫПТАФАН.**

**Аб'ект даследавання:** эпідэральны фактар росту чалавека.

**Мэта даследавання:** ацаніць характар звязвання іёнаў цынку з эпідэральным фактарам росту чалавека.

**Метады даследавання:** флуарэсцэнтная спектраскапія, комплекснаметрычныя, статыстычныя.

Узаемадзеянне іёнаў цынку з эпідэральным фактарам росту чалавека (hEGF) даследавалі з дапамогай флуарэсцэнтнай спектраскапіі для атрымання інфармацыі аб звязванні бялку з лігандам, эфектыўнасці і механізме тушэння флуарэсцэнцыі. Гэтая інфармацыя запатрабавана пры дызайне лекавых прэпаратаў, накіраваных на тэрапію анкалагічных захворванняў, у якія ўцягнуты hEGF і яго рэцэптар, пры распрацоўцы селектыўных лігандаў для вызначэння прасторавай структуры бялкоў.

Пры тытраванні hEGF растворами  $\text{ZnSO}_4$  і  $\text{ZnCl}_2$  пры  $22^\circ\text{C}$  і  $37^\circ\text{C}$  адбываецца звязванне катыёнаў металу паблізу рэшткаў трыптафану, што выклікае рэзкае памяншэнне інтэнсіўнасці флуарэсцэнцыі. Пры дасягненні канцэнтрацыі  $\text{Zn}^{2+}$   $8,936 \cdot 10^{-5}$  моль/л адбываецца зрушэнне даўжыні хвалі максімуму эмісіі ў караткахвалеваю вобласць, што паказвае не толькі на звязванне некалькіх іёнаў цынку малекулай пептыда, але і на структурныя змены ў самім hEGF, якія прыводзяць да пераходу рэштак трыптафану ў больш гідрафобнае мікраакружэнне. Рэшткі His16 у структуры дымера эпідэральнага фактару росту чалавека кантактуюць з Tyr37, а Arg45 фармуе катыён-пі ўзаемадзеянне як з Tyr37, так і Trp50. Фарміраванне комплексу катыёну цынку з рэшткамі His16 і Tyr37 можа «зацягваць» Trp50 у больш гідрафобнае мікраакружэнне за кошт набліжэння яго да астатку Arg45. Другі верагодны сайт звязвання іёнаў цынку ўключае ў сябе Asp46 і Glu51, якія знаходзяцца ў непасрэднай блізкасці ад рэшткаў трыптафану, што таксама можа прыводзіць да зніжэння інтэнсіўнасці флуарэсцэнцыі. Аднак C-канец hEGF вядомы сваёй структурнай няўстойлівасцю, што ўскладняе звязванне з ім лігандаў. З hEGF таксама звязваюцца і хларыд-іёны.  $\text{Cl}^-$  ўзаемадзейнічаюць з астаткам Arg41, і, найболей верагодна, што ў дымернай форме пептыда астатак Arg53 аднаго ланцуга ўтвораць сайт звязвання хларыд-іёна з Arg41 іншага ланцуга.

**Вобласць прымянення вынікаў даследавання:** структурная біяхімія, біяінфарматыка.

## ABSTRACT

Thesis, 50 pages, 19 figures, 42 sources.

HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR, BINDING SITES, ZINC IONS, FLUORESCENCE, TRYPTOPHAN.

**Object of research:** human epidermal growth factor.

**Aim of research:** to study the nature of the binding of zinc ions by human epidermal growth factor.

**Research methods:** fluorescence spectroscopy, complexometry, statistics.

The interaction of zinc ions with human epidermal growth factor (hEGF) was investigated using fluorescence spectroscopy to obtain information on protein binding to the ligand, efficiency and fluorescence quenching mechanism. This information is required in the design of drugs aimed at the treatment of oncological diseases, in which hEGF and its receptor are involved, in the development of selective ligands for determining the spatial structure of proteins.

When hEGF is titrated with a solution of  $\text{ZnSO}_4$  and  $\text{ZnCl}_2$  at  $22^\circ\text{C}$  and  $37^\circ\text{C}$ , metal cations are bound near tryptophan residues, which causes a sharp decrease in the fluorescence intensity. When the concentration of  $\text{Zn}^{2+}$  reaches  $8.936 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ , the wavelength of the emission maximum shifts to the short-wavelength region, which indicates not only the binding of several zinc ions by the peptide molecule, but also structural changes in hEGF itself, which leads to the transition of tryptophan residues to more hydrophobic microenvironment. His16 residues in the human epidermal growth factor dimer structure contact Tyr37, while Arg45 forms a cation- $\pi$  interaction with both Tyr37 and Trp50. The formation of a zinc cation complex with His16 and Tyr37 residues can “pull” Trp50 into a more hydrophobic microenvironment by bringing it closer to the Arg45 residue. The second likely zinc binding site includes Asp46 and Glu51, which are located in close proximity to tryptophan residues, which can also lead to a decrease in fluorescence intensity. However, the C-terminus of hEGF exhibits its structural instability, which necessarily binds ligands to it. Chloride ions also bind to hEGF.  $\text{Cl}^-$  interact with the Arg41 residue, and, most likely, in the dimeric form of the peptide of the Arg53 residue, one chain forms the site for binding the chloride ion to Arg41 by the other chain.

**Scope of the results:** structural biochemistry, bioinformatics.