تعبير *بكتيريا القولون* والخصائص الفسيولوجية الكيميائية لإنزيم ديهيدروجينيز اللاكتات الثابت حراريًا من سلاله حديثة التعرف *لجيوباسيلوس ثيرموديناتريفيكنس*

إعداد

عبدالعزيز عوض المالكي

تقدم هذه الرسالة استكمالًا لمتطلبات درجة الماجستير في علوم الكيمياء الحيوية

إشراف

د. محمد شاهد نديم

د. مصطفى عدنان زيادي

قسم الكيمياء الحيوية – كلية العلوم
جامعة الملك عبدالعزيز
جدة – المملكة العربية السعودية

١٤٤٠هـ / ٢٠١٨م

المستـخلـص

ديهيدروجينيز اللاكتات هو إنزيم في مسار التحلل السكري يتواجد في جميع الكائنات الحية ، ترتبط زيادة نشاط التحلل السكري وانزيم ديهيدروجينيز اللاكتات بالعديد من الحالات المسببة للأمراض بما في ذلك الالتهاب والسرطان ، مما يجعل من الإنزيم هدفًا دوائيًا مناسب. يمكن أن تكتشف الدراسات المرتكزة حول مجال التركيب البنائي والوظيفي لإنزيم ديهيدروجينيز اللاكتات من مختلف الفصائل عن جزيئات مثبطة جديدة. تصف دراستنا إنتاج بكتيريا القولون ودراسة خصائص انزيم ديهيدروجينيز اللاكتات معتدل الحرارة من بكتيريا جيوباسيلوس ثيرموديناتريفيكانس **DSM-465**. استعرضت هذه الدراسة ايضا نموذج السيليكون ثلاثي الابعاد لإنزيم اللاكتات المطعّم والالتحام الجزيئي مع مجموعة من المثبطات المحتملة. الانزيم المطعم انتج بشكل كبير في بكتيريا القولون ونقّي في تقنية التجانس الكهربائي. الوزن الجزيئي للإنزيم والذي تم تقديره بواسطة **MALDI-TOF** يساوي ٣٤٧٩٨,٩٦ دالتون. لقد أظهر أعلى درجة نشاطية عند درجة حرارة ٦٥° درجة مئوية و أُس هيدروجيني ٧,٥ وقيمة **KM** (ثابت ميكالس) للبايروفيت تساوي ٤٥ مايكرو مول. ديهيدروجينيز اللاكتات للجيوباسيلوس ثيرموديناتريفيكنس **(LDH-GT)** وديهيدروجينيز اللاكتات البشري **(LDH-A)** يتطابقان في تسلسل الحمض الأميني بنسبة ٣٥,٦% فقط. على عكس ذلك , مقارنةً بتركيب السيليكون البنائي يتبين أن اللاكتات جي تي احادي الجزيء يتطابق بنسبة ٨٠% مع قطاع من اللاكتات البشري. الأحماض الأمينية **"GEHGD"** ثابتة بالإضافة الى المواقع النشطة **His179** و **His193**. اظهرت دراسات ان طاقة الارتباط الحرة تغير المثبط المحتمل مع اللاكتات-اي و اللاكتات-جي تي في مدى -٤٠٧ كيلو جول الى ١٢٧,٣١- كيلو جول. بتسليط الضوء على التركيب والوظيفة الثابتة لإنزيم اللاكتات من نوعين متختلفين تماما سجلت الدراسة جزيء تثبيطي محتمل في قواعد الربط المتقاربة التي بامكانها ان تطبق في المعمل كدراسات مضادة للسرطان.

Escherichia coli **expression and physiochemical properties of thermostable lactate dehydrogenase from a newly identified strain of** ***Geobacillus thermodenitrificans***

By

Abdulaziz Awad Almalki

A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the award of degree of Master of Science in Biochemistry

Supervised By

Dr. Muhammad Shahid Nadeem

Dr. Mustafa Adnan Zeyadi

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY
JEDDAH-SAUDI ARABIA
1440 H – 2018 G

ABSTRACT

Lactate Dehydrogenase (LDH) is an enzyme of glycolytic pathway, ubiquitously found in living organisms. Increased glycolysis and LDH activity are associated with many pathogenic conditions including inflammation and cancer, making the enzyme a suitable drug target. Studies on the conserved structural and functional domains of LDH from various species can reveal novel inhibitory molecules. Our study describes, *E. coli* production and characterization of a moderately thermostable LDH (LDH-GT) from *Geobacillus thermodenitrificans* DSM-465. *In silico* 3D model of recombinant enzyme and molecular docking with a set of potential inhibitors are also described. The recombinant enzyme was overexpressed in *E. coli* and purified to electrophoretic homogeneity. The molecular weight of enzyme determined by MALDI-TOF was 34798.96 Da. It exhibited maximum activity at 65°C and pH 7.5 with K_M value for pyruvate as 45 µM. LDH-GT and human LDH-A have only 35.6% identity in the amino acid sequence. Contrary to that, a comparison by *in silico* structural alignment reveals that LDH-GT monomer has about 80% identity to that of truncated LDH-A. The amino acids 'GEHGD' as well as the active site His^{179} and His^{193} are conserved. Docking studies have shown the binding free energy changes of potential inhibitors with LDH-A and LDH-GT ranging -407.11 kJ $mole^{-1}$ to -127.31 kJ $mole^{-1}$. Highlighting the conserved structural and functional domains of LDH from two entirely different species, study has graded potential inhibitory molecules on the basis of their binding affinities that can be applied for *in vivo* anticancer studies.