الاستنساخ الجزيئي والخصائص والتطبيقات المحتملة لانزيمات من سلالة جيوباسيلس ثيرمودنتريفيكانس DSM-465

إعداد الطالب

لقمان ميان زاد

أ د . جلال الدين اعظم جلال اولياء خان

ملخص

الانزيمات هى جزيئات بروتينية لها ابعاد ثلاثية وانشطة تحفزية متخصصة. الانزيمات مسئولة عن تحضير أكثر من ٥٠٠٠ عمليات البيوكيميائية في الكائنات الحيوية. يرتبط رقي وتحضر البشرية بمدى استخدام الانزيمات فى الحياة. استخدم القدماء الصريين الانزيمات في تحضير الجبنة، وتم استخدام انزيمات الخمائر فى تصنيع المشروبات الكحولية بواسطة البابليون والسومريين من ٦٠٠٠ سنة قبل الميلاد. وتستخدم الانزيمات تجاريا حول العالم. فى هذه الدراسة تم استنساخ لبعض الانزيمات المستخدمة في صناعة الادوية داخل بكتريا اشرشيا كولى حيث تم عزل دنا من البكتريا اللمستهدفة جيوباسياليس ثرمودينيرفيكانس حيث تم الحصول عليه من المانيا حيث افضل نمو له عند درجة ٦٥ م. تم عزل جيوباسياليس ثرمودينيرفيكانس من عصير سكر البنجر فى استراليا. تم دراسة انزيمى ارجينيز و جلوتامينيز حيث الكود الجينى لهما ٩٠٠ و 938 ازواج قواعد نيتروجينية على الترتيب. تم استخلاص هذه الجينات والزيدة عددها والتعرف عليها باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة. تم استنساخ هاتان الانزيمات وادخالها في بكتريا اشرشيا كولى مع بلازميد PET21a(+) . تم التأكد من عملية الاستنساخ لانتاج الانزيم فى الظروف المثلى. تم تنقية الانزيم بواسطة داي اثيل امينو سيليولوز الذى يرتبط بالسالب. تم عمل الخصائص الفيزيوكيميائية للانزيمات. تم دراسة النموذج الثلاثى الابعاد لكل انزيم وتركيبه والمثبطات الخاصة بهم. تم مقارنة تركيب الانزيمات المستنسخة بالانزيمات المتماثلة لها من الانسان. وجد ان الوزن الجزئي لانزيم ارجينيز و جلوتامينيز هو ٣٣ و ٣٤ كيلودلتون على الترتيب باستخدام الهجرة الكهربائية. افضل نشاط لانزيمى ارجينيز و جلوتامينيز عند اس هيدروجيني ٩ و درجة

حرارة ٧٠ م. ثابت ميخائيل واقصي نشاط لانزيم الارجينيز هو ١٥١ ميلي مولار و١٥٠ ميكرومولار/ دقيقة. ثابت ميخائيل واقصي نشاط لانزيم جلوتامينيز هو ١٠٤ ميلي مولار و٢٣٨ ميكرومولار/ دقيقة. تم التعرف على ثلاثى الابعاد لكل انزيم. تم مقارنة هذه الانزيمات فى الانسان والتعرف على الشكل الاساسى. تم عمل دراسة نظرية ببرنامج الدوكنك لهذه الانزيمات كتركيب ومعرفة مكان التحفيز ومدى درجة ارتباطها وطاقتها الارتباطية مع بعض الجزئيات المثبطة في الانسان و البكتريا. تم دراسة هذه الانزيمات كمضادات للاورام. الانزيمات المستنسخة من بكتريا مقاومة للحرارة. الدراسة التحليلية للتركيب الكيميائى للبروتين وضحت بوجود اختلافات باستخدام مثبطات متنوعة عن الكائنات الأخرى.

Molecular cloning, properties and potential applications of enzymes from *Geobacillus thermodenitrificans* strain DSM-465

By

Luqman Shah

Prof. Jalaluddin A. Khan

Abstract

Enzymes are macromolecules, exclusively three dimensionally folded proteins which have specific catalytic activities. These macromolecules have been reportedly responsible for catalysing more than 5000 biochemical processes in the living systems. Use of enzymes in the human life started in parallel with the human civilization. Older Egyptians were unknowingly using enzymes in the preparation of cheese, first commercial application of yeast enzymes to produce alcoholic beverages by the Babylonians and Sumerians as early as 6000 BC. Commercial enzymes represent a growing industry worldwide. Present study describes the molecular cloning, *E. coli* expression, purification, biochemical, *in silico* analysis and potential applications of enzymes in pharmaceutical industry. The DNA of target bacterial strain *Geobacillus thermodenirificans* DSM 465 was obtained from DSMZ (Germany). The species with optimal growth at 65°C was isolated in Austria from the juice of sugar beet and it was unexplored for its enzymes and proteins. In the present study two enzymes, arginase and glutaminase were produced in *E. coli*. The genes coding for arginase (900 bp) and glutaminase (938 bp) were PCR amplified and cloned in *E. coli* strain BL21 (DE3) with pET21a (+) plasmid. The confirmed recombinant clones were used to produce enzymes under optimized conditions. The enzymes were purified by DEAE-Cellulose based anion exchange chromatography and characterized for physiochemical properties. *In silico* 3D models of each enzymes were built and their affinities with the protein partners and inhibitory molecules were

studied. A structural comparison of recombinant enzymes was made with corresponding human enzymes. The enzymes were expressed in high quantities, representing more than 50% of all *E. coli* proteins. The molecular weight of purified recombinant arginase and glutaminase were 33 kDa and 34 kDa respectively on SDS-PAGE. The optimum pH for the activity of arginase and glutaminase was 9 and they exhibited maximum activity at 70°C. The K_M value of arginase was 151.6 mM and its V_{max} was 150 µmole per min of L-arginine. The K_M value of glutaminase was 104 µM and V_{max} was 238.1 µmole per mg per min. The 3D structural models of both enzymes were built *in silico*. The comparative structural analysis with corresponding human enzymes have shown significant identity and conserved domains in the enzymes from two systematically different species. The molecular docking of enzymes with protein partners and inhibitory molecules have shown their affinity with inhibitors. The inhibitors of arginases and glutaminases from human and *Geobacillus* have been ranked according to their binding free energies that can be further exploited for the *in vivo* anticancer studies. The present study has revealed the characteristics of recombinant enzymes from an unexplored moderately thermophilic microorganism. Kinetic studies have provided the insights in to properties and abilities of these enzymes to perform at relatively higher temperatures. The *in silico* structural analysis have revealed a series of conserved protein domains among the enzymes from taxonomically different organisms suggesting the studies for the selection of more versatile inhibitors.