Enzimska karakterizacija piruvat-kinaze bakterije Bacillus subtilis

Kovač, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:787265

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Kristina Kovač

ENZIMSKA KARAKTERIZACIJA PIRUVAT-KINAZE BAKTERIJE *Bacillus subtilis*

Diplomski rad

Zagreb, 2012. godina

Ovaj rad, izrađen u AgroParisTech centru u Grignonu, Francuska i Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a, pod vodstvom prof. dr. sc.Ivana Mijakovića i doc. dr. sc.Damjana Franjevića predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije.

Zahvale

Zahvaljujem se svojim mentorima prof. dr. sc. Ivanu Mijakoviću i doc. dr. sc. Damjanu Franjeviću što su mi pružili priliku da sudjelujem u ovom projektu. Njihovu podršku i razumijevanje, te pomoć u svim dilemama i problemima sam imala tijekom cijele izrade diplomskog rada i boravka u Francuskoj. Hvala im na odgovorima na sva moja pitanja, kao i na raspravama koje su me dovele do odgovora.

Nadalje, zahvaljujem se na strpljenju, potpori i pomoći svim kolegama iz AgroParisTech centra u Grignonu, posebno Charlotte Cousin i Ahasanulu Kobiru koji su mi svojim vodstvom pomogli u stručnom i kolegijalnom smislu.

Zahvaljujem se i ERASMUS programu na stipendiji koja mi je omogućila boravak u Francuskoj.

Na kraju, zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama, a posebno svojoj obitelji na potpori i razumijevanju tokom cijelog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

ENZIMSKA KARAKTERIZACIJA PIRUVAT-KINAZE BAKTERIJE *Bacillus subtilis*

Kristina Kovač

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Sažetak

Piruvat-kinaza je ključni enzim glikolize i metabolizma ugljika. Katalizira završni korak glikolitičkog puta, prenoseći fosforilnu skupinu fosfoenolpiruvata (PEP) na ADP, stvarajući ATP i piruvat. Reakcija je ireverzibilna, te predstavlja važno regulatorno mjesto u glikolizi. U ovom istraživanju piruvat-kinaza je izolirana iz aerobne Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtillis*, te pročišćena metodom afinitetne kromatografije do homogenosti. Enzimska rekacija se odvijala pri pH 7.5, uz prisustvo supstrata (PEP i ADP), te iona - K^+ i Mg^{2+} koji s ADP-om tvori Mg^{2+}-ADP kompleks, koji djeluje kao pravi substrat enzimu. Cilj istraživanja je bio utvrditi kinetičke parametre – K_m i V_m piruvat-kinaze. Eksperimentalni podaci dobiveni spektrofotometrijskom metodom prikazani su Michealis-Menten modelom enzimske kinetike, te su pomoću linearizacijskih prikaza izračunate vrijednosti K_m=1,2138 mM, V_m=227,062 µmol NADH/min/µg proteina za ADP, te K_m=0,9081 mM, V_m=97,1125 µmol NADH/min/µg proteina za PEP. Navedni su rezultati dobiveni Hanes-Woolf linearizacijskim prikazom.

(40 stranica, 14 slika, 7 tablica, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: piruvat-kinaza, enzimska karakterizacija, *Bacillus subtilis*
Voditelji: Dr. sc. Damjan Franjević, doc.; Dr. sc. Ivan Mijaković, red. prof.
Ocjenitelji: Dr. sc. Damjan Franjević, doc.
Dr. sc. Ivan Mijaković, red. prof.
Dr. sc. Zdravko Dolenec, red. prof.
Dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, red. prof. (zamjena)

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF *Bacillus subtilis* PYRUVATE KINASE

Kristina Kovač

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Abstract

Pyruvate kinase is key enzyme in glycolysis and carbon metabolim. It catalyzes the final step of glycolytic pathway, transferring phosphoryl group of phosphoenolpyruvate (PEP) to ADP, yielding ATP and pyruvate. Reaction is irreversible and it represents important regulatory point in glycolysis. In this research pyruvate kinase is isolated from aerobic Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and purified to homogenity. Enzymatic reaction proceeded at pH 7.5 in presence of substrates (ADP and PEP) and ions - K^+ and Mg^{2+}. Mg^{2+} creates a Mg^{2+}-ADP complex with ADP, which acts as a true substrate of the enzyme. Goal of this research was to identify kinetic parameters - K_m i V_m of pyruvate kinase. Experimental data given by spectrofotometric method are shown with Michaelis-Menten model of enzyme kinetics. By means of linear plotting, values were calculated to K_m=1,2138 mM, V_m=227,062 µmol NADH/min/µg protein for ADP and K_m=0,9081 mM, V_m=97,1125 µmol NADH/min/µg protein for PEP. Mentioned results were given by Hanes-Woolf linear plot.

(40 pages, 14 figures, 7 table, 30 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central biological library.
Key words: pyruvate kinase, enzymatic characterization, *Bacillus subtilis*
Supervisors: Dr. Damjan Franjević, Asst. Prof.; Dr. Ivan Mijaković, Prof.
Reviewers: Dr. sc. Damjan Franjević, Asst. Prof.
Dr. sc. Ivan Mijaković, Prof.
Dr. sc. Zdravko Dolenec, Prof.
Dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina Prof. (substitute)

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. Uvod ……1

1.1. Piruvat-kinaza – općenite karakteristike, uloga i funkcija ……....2

1.2. Mehanizam djelovanja piruvat- kinaze ……..3

1.3. Ekspresija i regulacija aktivnosti piruvat-kinaze ……4

1.4. Struktura piruvat-kinaze …….5

1.5. Evolucijska konzerviranost i podrijetlo piruvat-kinaze…….….6

1.6. Ciljevi istraživanja ……12

2. Materijali i metode ……13

2.1. Materijali ……...13

2.1.1. Bakterijski sojevi ……13

2.1.2. Plazmidni vektori ……...…13

2.1.3. Oligonukleotidne početnice ……...14

2.1.4. Enzimi, proteini i markeri molekulskih masa ……14

2.1.5. Kompleti reagensa …….15

2.1.6. Uređaji ……...15

2.1.7. Podloge i otopine ……...…….……....…….....15

2.2. Metode ……...16

2.2.1. Pripremanje elektrokompetentnih stanica *E.coli* ……16

2.2.2. Amplifikacija gena piruvat-kinaze (*pykA*) pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) …….16

2.2.3. Cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama ……17

2.2.4. Ligacija ……...18

2.2.5. Transformacija elektrokompetentnih stanica *E. coli* ……..18

2.2.6. PCR na bakterijskim kolonijama ……18

2.2.7. Izolacija plazmida iz stanica *E. coli* ……...19

2.2.8. Sinteza i pročišćavanje 6xHis-tagged proteina afinitetnom kromatografijom ……...19

2.2.9. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) ……...20

2.2.10. Utvrđivanje koncentracije proteina ……..21

2.2.11. Enzimski esej ……...21

3. Rezultati ……..23

3.1. Ekspresijski plazmidni vektori i pročišćavanje 6xHis-tagged proteina ……23

3.2. Uklanjanje 6xHis-taga s proteina pomoću TEV proteaza 24

3.3. Enzimski esej ……....27

3.3.1. Mjerenje kinetičkih parametara za ADP 28

3.3.2. Mjerenje kinetičkih parametara za PEP 31

4. Rasprava 35

5. Zaključak 37

6. Literatura 3

1. Uvod

Piruvat-kinaza pripada obitelji transferaza i kinaza koje prenose fosfatnu skupinu s visokoenergetskog donora na specifični substrat u procesu fosforilacije, dio je jednog od najkonzerviranijih metaboličkih puteva u živim organizmima – glikolize. Uz heksokinazu i fosfofruktokinazu, piruvat-kinaza je enzim koji katalizira nepovratne reakcije, tj. reakcije s negativnom ΔG energiju. Na taj način predstavlja vrlo bitno kontrolno i regulatorno mjesta u ciklusu glikolize.

Proučavanje kinetike i svojstava enzima sve je bitniji predmet brojnih istraživanja zbog otkrivanja njihove točne uloge u metabolizmu, utvrđivanja katalitičkih svojstava i na koji način se njihova aktivnost može kontrolirati. To se utvrđuje enzimskom karakterizacijom, kojom se spektrofotometrijskim mjerenjima pokušavaju utvrditi parametri K_m i V_m.

Vrsta *Bacillus subtilis* je fakultativno anaerobna bakterija tla, sposobna živjeti u različitim uvjetima, od terestičkih i akvatičkih staništa, do probavnog sustava životinja. U nedostatku hranjivih tvari i u nepovoljnim stresnim okološnim uvjetima stvara spore staničnom diferencijacijom, te predstavlja modelni organizam među Gram-pozitivnim bakterijama. Njena široka industrijska i medicinska primjena čini ju predmetom mnogih istraživanja.

1.1. Piruvat-kinaza – općenite karakteristike, uloga i funkcija

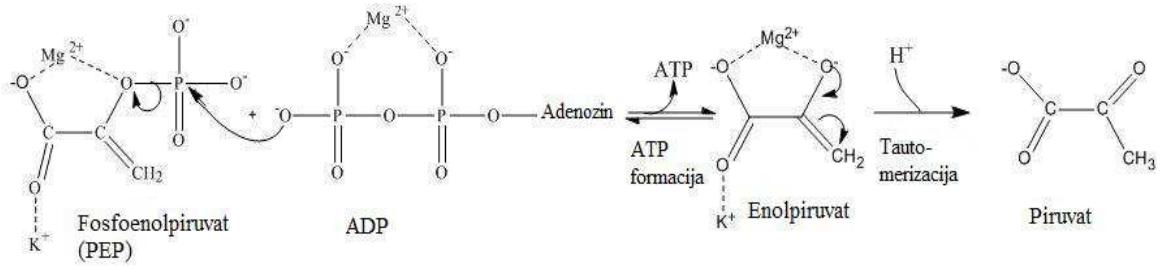
Piruvat-kinaza (ATP: piruvat fosfotransferaza, EC2.7.1.40) katalizira završni korak glikolitičkog puta. Ključan je enzim ciklusa glikolize i metabolizma ugljika. Piruvat, kao produkt reakcije katalizirane piruvat-kinazom, odlazi u brojne metaboličke cikluse, poput daljnjeg anaerobnog procesuiranja do laktata i etanola, u mliječno-kiselinskom, odnosno alkoholnom vrenju; te u aerobne procese poput ciklusa limunske kiseline i oksidativne fosforilacije; što piruvat-kinazu stavlja na primarno kontrolno mjesto u metaboličkim putevima (Munoz & Ponce, 2003).

U fiziološkim uvjetima katalizira nepovratnu reakciju transfosforilacije s fosfoenolpiruvata (PEP) i adenozin difosfata (ADP), stvarajući adenozin trifosfat (ATP) i piruvat. (Munoz & Ponce, 2003). Fosfoenolpiruvat koji nastaje prethodnom reakcijom dehidracije posjeduje veliki transferni potencijal prijenosa fosforilne skupine. Fosforilna skupina drži molekulu u nestabilnoj enolnoj formi, te kad se fosforilna skupina pomoću piruvat-kinaze preda ADP-u, enol prelazi u stabilniju formu ketona – piruvat. To mjesto iskorištavanja fosfoenolpiruvata predstavlja važnu regulatornu točku u tkivima i stanicama organizama koji su sposobni za glikolizu i glukoneogenezu, zbog čega je piruvat-kinaza predmet brojih istraživanja u nizu različitih prokariotskih i eukariotskih organizama (Tuominen & Bernlohr, 1971).

Dodatna važnost piruvat-kinaze za organizam se može primjetiti kroz istraživanja s *pyk* mutantama bakterije *Bacillus subtilis*; utvrđeno je kako nedostatak tog enzima ima veliki utjecaj na rast stanice na minimalnom mediju, iz razloga što vrsta *B. subtilis* nema druge enzimske aktivnosti s kojima bi mogao nadoknaditi eventualan nedostatak piruvat-kinaze. Prekidanje tog gena antibiotskim markerom na razini kromosoma povećalo je generacijsko vrijeme bakterije *B. subtilis*, čak i u medijima gdje aminokiseline mogu služiti kao izvor ugljika. Ta promjena generacijskog vremena se reflektirala i na razini sporulacije, gdje je kod *pykA* mutanata zabilježeno ranije stvaranje spora nego kod divljeg tipa. Slična situacija je primjećena i kod bakterije *E.coli*, kada su oba izoenzima piruvat-kinaze bila deaktivirana (Muñoz, Le Borgne, Bolivar, & Valle, 1997.).

1.2. Mehanizam djelovanja piruvat-kinaze

Enzimi unutar bioloških sustava imaju veliku moć kemijske transformacije. Kao i sve katalitičke molekule enzimi funkcioniraju na način snižavanja energije aktivacije, s čime se brzina reakcije nevjerojatno ubrzava. Glavne karakteristike svih enzima su njihova katalitička snaga i specifičnost u vezanju širokog raspona molekula. Njihova katalitička aktivnost ovisi o prisustvu malih molekula kofaktora u obliku koenzima i raznih metala, te efektora. U slučaju piruvat-kinaze kao kofaktori djeluju K^+ i Mg^{2+}, a kao aktivacijski efektori fosfoenolpiruvat i ADP, no moguće ga je aktivirati i pomoću drugih nukleozid difosfata, poput GDP, IDP ili UDP. Dokazano je kako za postizanje maksimalne brzine enzima potrebna ujednačena koncentracija iona magnezija i molekula ADP-a, što snažno ukazuje da se stvara ADP-Mg^{2+} kompleks koji djeluje kao substrat enzimu, a slobodan ADP je vjerojatno snažan inhibitor. Na tu mogućnost upućuju i eksperimenti u kojima je koristena viša koncentracija ADP-a, što je dovelo do snažne inhibicije enzima (H. Sakai & Suzuki, 1986).



Slika 1. Mehanizam reakcije koju katalizira piruvat-kinaza. Preuzeto i prilagođeno s proteopedia.org

Enzim pokazuje vrlo nisku razinu aktivnosti bez prisutnosti aktivatora; adenozin monofosfat (AMP) i riboza 5-fosfat su snažni aktivatori, kao i glukoza 6-fosfat i fruktoza 6-fosfat koji u nešto manjoj mjeri utječu na aktivaciju. ATP i anorganski fosfat su snažni inhibitori većine piruvat-kinaza, s time da anorganski fosfat inhibira piruvat-kinazu smanjujući afinitet PEP-a prema enzimu; na sličan način može doći i do inhibicije ADP-om koji uz to na sebe veže ione magnezija, te se tim putem smanjuje količinu magnezijevih iona u mediju koji su potrebni za aktivaciju enzima. (H. Sakai & Suzuki, 1986) Pretpostavlja se da alosterička modifikacija piruvat-kinaze, primjerice fruktozom 1, 6-bisfosfat, ATP-om ili alaninom predstavlja fiziološki mehanizam kojom se aktivnost enzima povisuje tokom glikolize, a snižava za vrijeme

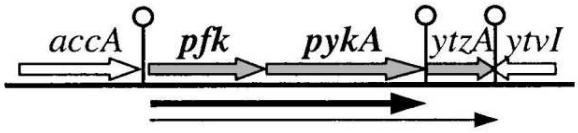
glukoneogeneze (Tuominen & Bernlohr, 1971). I druga istraživanja upućuju kako bi fruktoza 1,6- bisfosfat mogla biti alosterički aktivator (H Sakai & Ohta, 1993), no u velikim količinama inhibitor (H. Sakai & Suzuki, 1986). Kalcijevi ioni su također poznati kao snažni inhibitori piruvat-kinaza kod prokariota (Boiteux, A et al. 1983). Unutarstanične koncentracije Ca^{2+} se povećavaju dok se prenose skupa s citratom, te dolazi to inhibicije piruvat-kinaze.

1.3. Ekspresija i regulacija aktivnosti piruvat-kinaze

U stanici ekspresija svakog gena je regulirana; umjesto da se proizvodi cijelokupan spektar mogućih proteina svo vrijeme, stanica prilagođava transkripciju i translaciju određenih gena, ovisno o potrebi i/ili raznim indukcijama iz okoliša.

Ekspresija gena koji kodiraju za enzime zadužene za kataliziranje nepovratnih reakcija u ciklusu glikolize, što osim gena za piruvat-kinazu (*pykA*) uključuje i gene za fosfofruktokinazu (*pfk*) i gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*gapA*), inducirana je glukozom. Na taj način se vrši regulacija ciklusa glikolize, no i toka ugljika u organizmu. Ostatak enzima čija je uloga kataliziranje povratnih reakcija, sudjeluju u glikolizi kao i u glukoneogenezi, sintetiziraju se neovisno o prisutnosti glukoze. (Ludwig et al., 2001.) Indukcija glukozom kod enzima koji kataliziraju nepovratne reakcije glikolize primjećena je i kod vrsta *E.coli* i *Lactococcus lactis* (Kimata et al.,1997; Charpentier et al., 1998; Luesink et al., 1998; Plumbridge, 1998).

Istraživanja su pokazala kako svi glikolitički geni, osim fosfoglukoizomeraze (*pgi*) i fruktoza 1, 6-bisfosfat aldolaze (*fbA*), tvore klastere funkcionalno povezanih jedinica (Leyva-Vazquez & Setlow, 1994; Kunst et al., 1997; Tobisch et al., 1999). Tako gen koji kodira za piruvat-kinazu (*pykA*) je smješten odmah nizvodno od gena koji kodira za fosfofruktokinazu (*pfk*); ta dva gena su pod kontrolom zajedničkog promotora. Tvore zajednički operon, te se zajedno transkribiraju (H Sakai & Ohta, 1993, Kunst et al. 1997, Ludwig et al., 2001).



Slika 2. Shematski prikaz položaja *pykA* i *pfk*. Geni koji se zajedno transkribiraju na slici su prikazani sivim strelicama, susjedni geni prikazani bijelim strelicama ne transkribiraju se s glikolitickim genima, funkcija gena *ytzA* je nepoznata. Štapićasta struktura na slici označava promotora. Vidljivo je kako su *pfk* i *pykA* pod kontrolom istog promotora. Slika preuzeta iz Ludwig et al., 2001

Fosfofruktokinaza i piruvat-kinaza kataliziraju ireverzibilne reakcije tokom glikolize, te su pod kontrolom raznih alosteričkih regulatora, primjerice ATP-a koji je supstrat fosfofruktokinazi, a inhibira piruvat-kinazu kako bi se glikoliza usporila kad je prisutna visoka razina energije, tj. postoji dovoljno molekula ATP-a.

1.4. Struktura piruvat-kinaze

Piruvat-kinaza bakterije *Bacillus subtilis*, kao i većina drugih piruvat-kinaza u svojoj kvartarnoj strukturi postoji kao tetramer kojeg čine identične podjedinice - homotetramer. Svaka podjedinica je sastavljena od 4 odvojene domene. Prva A domena je katalitička domena koja je formirana od 2 odvojena lanca aminokiselina (od 1. do 70. aminokiselinskog ostatka, pa od 170. do 360. aminokiselinskog ostatka), koje se zajedno omotavaju u paralelni (β/α) valjak s dvije dodatne α uzvojnice. Druga B domena se sastoji od 4 beta valjkasta (eng. - barrel) motiva koji formiraju ‘’cap’’ preko aktivnog mjesta. Između A i B domene nalazi se aktivno mjesto. Treća C domena se sastoji od α/β motiva otvorene ploče (eng. - open sheet motif) i sadrži vezivno mjesto za alosteričke efektore (Kenichiro Suzuki, Ito, Shimizu-Ibuka, & Sakai, 2008).

Kod roda *Bacillus* nalazimo na dugačku *extra C – terminalnu sekvencu* (ECTS) koja se sastoji od oko 112 aminokiselinska ostatka i tvori C’ domenu. Dio te sekvence je u visoko homologan *PEP vezajućem motivu* (eng. PEP binding motif), te se pretpostavlja da ECTS u slaboj interakciji s domenom A i C (Kenichiro Suzuki et al.,

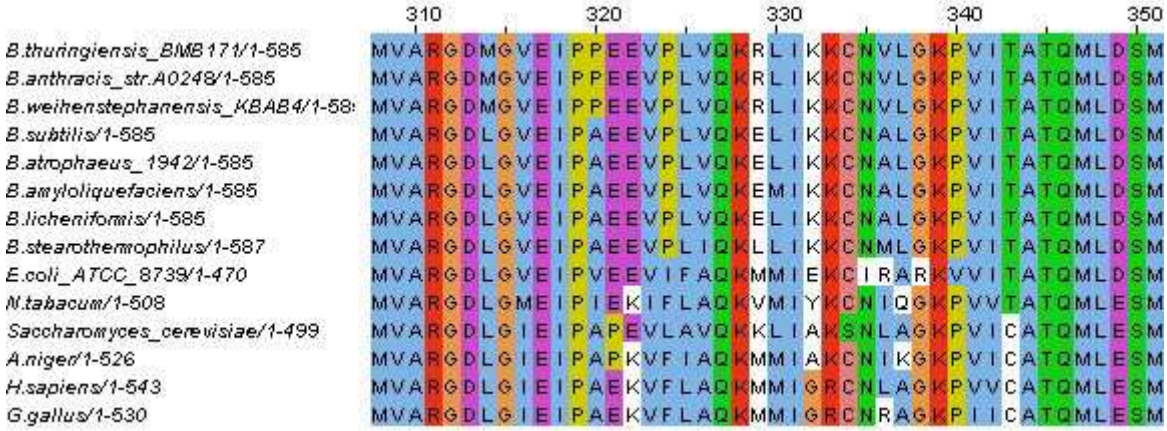
2008). Slične strukture nisu nadjene kod piruvat-kinaza ostalih rodova bakterija (Muñoz, Le Borgne, Bolivar, & Valle, 1997). ECTS je visoko konzervirana sekvenca u niz enzima koji kataliziraju reakciju u kojima je fosfoenolpiruvat supstrat ili produkt (Muñoz, Le Borgne, Bolivar, & Valle, 1997). Pretpostavlja se da je ECTS potekao od PEP sintaze tokom evolucijskog razvoja. Strukturno je sličan fosfohistidinskoj domeni piruvat, fosfat dikinaze (PPDK), što sugerira da C' domena igra određenu ulogu u aktivnosti i/ili regulaciji piruvat-kinaze; no mutagenim studijama nije uočena značajna funkcionalna uloga u aktivnosti enzima ili njegovim alosteričkim karakteristikama, ali se pretpostavlja da može imati određenu ulogu u strukturalnoj stabilnosti, na sto upućuje vodikova veza izmedju A i C' domene. Motiv za vezanje PEP-a nađen u ECTS-u i strukturalna sličnost fosfohistidinskoj domeni PPDK, ukazuju da je ECTS vjerojatno imao određenu ulogu u evoluciji piruvat-kinaze, te sudjeluje u zasada nepoznatoj enzimskoj reakciji (Kenichiro Suzuki et al., 2008).

1.5. Evolucijska konzerviranost i podrijetlo piruvat-kinaze

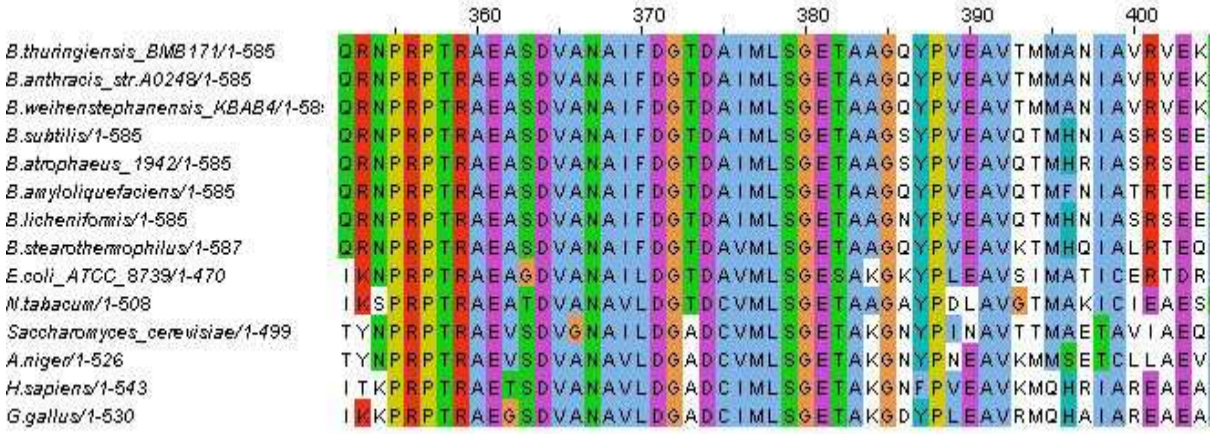
Važnost piruvat-kinaze za organizam reflektira se u visokoj konzerviranosti pojedinih slijedova njenih aminokiselina kod niza različitih vrsta, pošto se konzervirane sekvence u pravilu pojavljuju kod proteina koji su od vitalne važnosti za optimalno funkcioniranje stanice. Konzerviranost se očituje u sličnim ili identičnim sekvencama koje čine funkcionalno bitne dijelove proteina. Za usporedbu i prikaz preuzeti su i modificirani podaci iz Nguyen i Saier (1995) i Muñoz et al. (1997). Višestruko sravnjivanje amniokiselinskih sekvenci napravljeno je pomoću programa *ClustalW.*

Na *slici 3.* (A) i (B) prikazano je višestruko sravnjivanje aminokiselinskih sekvenci koje odgovaraju regiji 241 do 337 aminokiselinskog ostatka kod piruvat-kinaze vrste *Bacillus subtilis*; ta regija je visoko konzervirana u brojnim piruvat-kinazama, čak i u filogenetski udaljenijim vrstama.

(A)



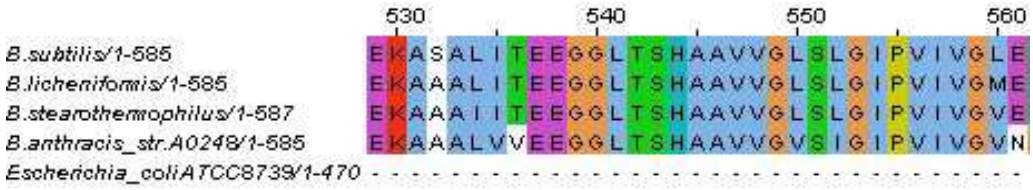
(B)



Slika 3. (A) i (B) Višestruko sravnjivanje aminokiselinskih sekvenci piruvat-kinaza. Prikazana regija od 265-361 aminokiselinskog ostatka, odgovara regiji 241-337 aminokiselinskog ostatka kod vrste *B. subtilis.* Sravnjene su sekvence piruvat-kinaza sljedećih vrsta: *Bacillus thuringiensis BMB171, Bacillus anthracis str.A0248, Bacillus weihenstephanensis KBAB4, Bacillus subtilis, Bacillus atrophaeus 1942, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis, Bacillus stearothermophilus, Escherichia coli ATCC 8739, Nicotiana tabacum, Saccharomyces cerevisiae, Asperigilus niger, Homo sapiens, Gallus gallus* pomoću programa *ClustalW.*

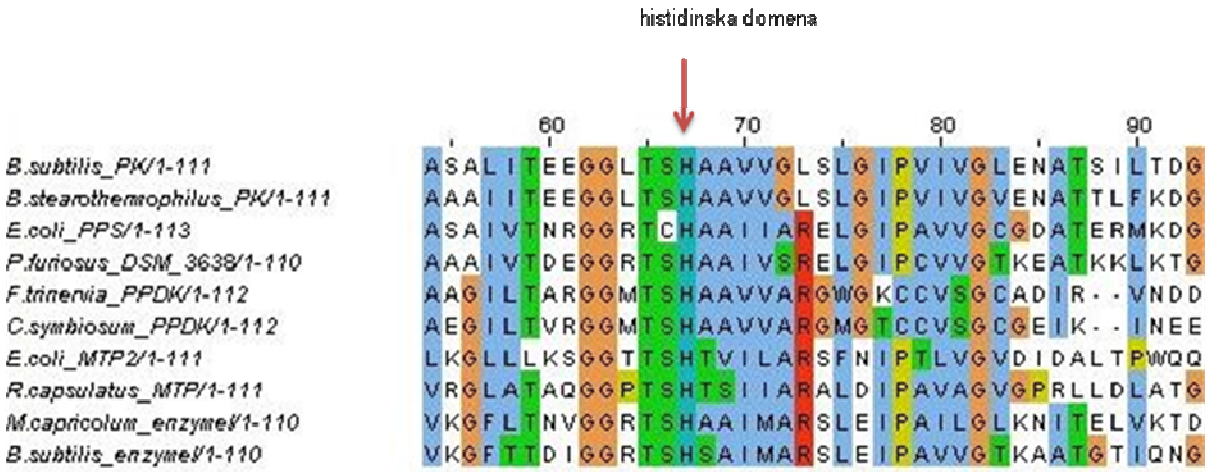
Prikazana regija sadrži aminokiselinsku sekvencu katalitičkog centra i petlji koje su presudne za alosteričke tranzicije i vezanje supstrata što dovodi do enzimske reakcije (Muñoz, Le Borgne, Bolivar, & Valle, 1997).

Kao što je već prethodno spomenuto kod vrsta roda *Bacillus* karakteristična je extra C terminalna sekvenca (ECTS) koja je visoko konzervirana kod piruvat-kinaza unutar tog roda. Unutar te sekvence može se uočiti konzervirana sekvenca – *PEP vezajući motiv*. Kao što je prikazano na *slici 3.* konzervirana sekevenca je prisutna samo kod vrsta roda *Bacillus* unutar ECTS-a, dok kod drugih sekvencioniranih piruvat-kinaza ECTS nije uočen (Muñoz, Le Borgne, Bolivar, & Valle, 1997).



Slika 4. Višestruko sravnjivanje aminokiselinskih sekvenci piruvat-kinaza. Regija 530-560 aminokiselinskog ostatka koja odgovara regiji 523-553 aminokiselinskog ostatka kod vrste *B.subtilis,* odgovara PEP vezajućem motivu, koji se može naći kod PEP vezajućih enzima. Sravnjene su sekvence piruvat-kinaza sljedećih vrsta: *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus stearothermophilus, Bacillus anthracis str.A0248 i Escherichia coli ATCC 8739.* Višestruko sravnjenje napravljeno pomoću programa *ClustalW.*

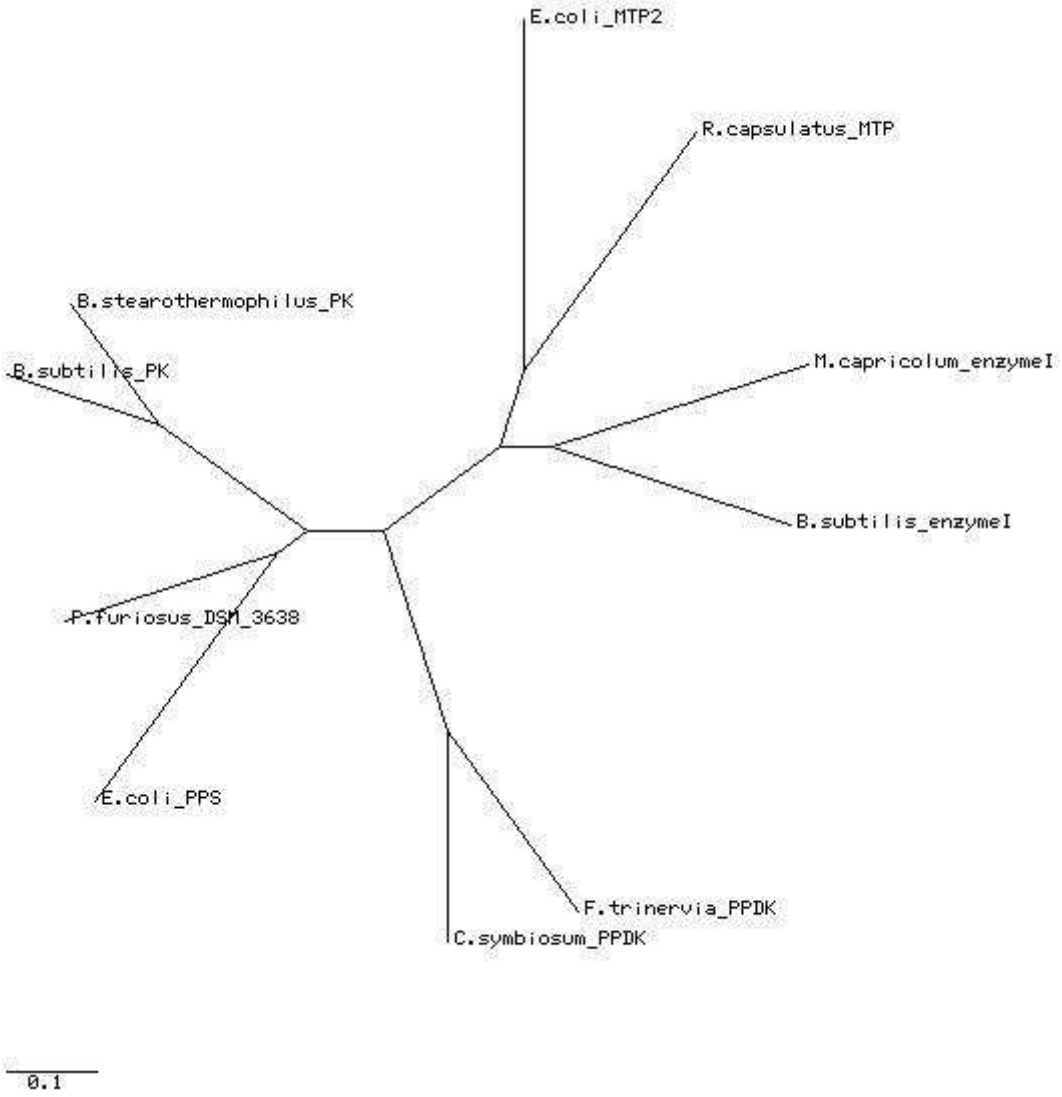
ECTS domena koja sadrži konzervirani PEP vezajući motiv iskazuje sličnost s fosforilacijskom domenom drugih enzima koji sintetiziraju ili troše PEP (PEP obitelj), što ukazuje na njihovo zajedničko evolucijsko podrijetlo (Nguyen & Saier, 1995). Na *slici 4.* sravnane su navodne fosforilacijske domene piruvat-kinaze *B. subtilisa* s fosforilacijskim domenama enzima iz PEP obitelji.



Slika 5. Višestruko sravnjivanje aminokiselinskih sekvenci fosforilacijskih domena enzima navedenih u *Tablici 1*. Prikazane pozicije iznad višestruko sravnanih sekvenci ne odgovaraju stvarnim pozicijama aminokiselinskih ostataka. Višestruko sravnjenje napravljeno pomoću programa *ClustalW*.

Kao što je vidljivo iz višestrukog sravnjivanja, četiri aminokiselinska ostatka su krajnje konzervirana oko histidinske fosforilacijske domene na poziciji 67 prikazanoj na *slici 5.*; a može se primjetiti i konzerviranost većine ostalih aminokiselinskih ostataka oko histidinske fosforilacijske domene (Nguyen & Saier, 1995).

Ukoliko se navedene sekvence prikažu na kladogramu može se primjetiti kako se proteinske domene granaju u tri klastera prema funkciji koju obavljaju.



Slika 6. Filogenetski odnos fosforilacijskih domena kod piruvat-kinaze *Bacillus subtilis* i ostalih srodnih enzima iz PEP obitelji enzima, navedenih u *tablici 1*. Filogenetska rekonstrukcija provedena pomoću programa *Phylodendron*.

Vidljivo je kako PPS-ovi tvore zajednički klaster, slično kao i PPDK-ovi i PK-ovi. Klasteri nisu toliko čvrsto povezani kao kad se promatra cijelokupna sekvenca enzima u filogenetskom stablu (Nguyen & Saier, 1995). Vidljivo je kako PK-ovi tvore zajednički klaster s PPS-ovima što ukazuje da fosforilacijske domene piruvat-kinaza prikazanih *Bacillusa* svoje porijeklo vuku od gena koji je kodirao za i za PPS (Nguyen & Saier, 1995).

Skraćenica	Ime	Organizam	Dio sekvence korišten u sravnavanju	Accession
B.subtilis_PK	Piruvat-kinaza	*Bacillus subtilis*	75 - 585	BSU29180
B.stearothermophilus_PK	Piruvat-kinaza	*Bacillus stearothermophilus*		BAA02406.1
E.coli_PPS	Fosfoenolpiruvat sintaza	*Escherichia coli*		CAQ32177.1
P.furiosus_DSM	Fosfoenolpiruvat sintaza	*Pyrococcus furiosus*		NP_577772.1
F.trinervia_PPDK	Piruvat, ortofosfat dikinaza	*Flaveria trinervia*		CAA40420.1
C.symbiosum_PPDK	Piruvat, ortofosfat dikinaza	*Clostridium symbiosum*		P22983.5
E.coli_MTP2	Multifosforil transferni protein 2	*Escherichia coli*		P32670.2
R.capsulatus_MTP	Multifosforil transferni protein	*Rhodobacter capsulatus*		P23388.1
M.capricolum_enzymeI	Enzim I	*Mycoplasma capricolium*		U15110.1
B.subtilis_enzymeI	Enzim I	*Bacillus subtilis*		P08838.3

Tablica 1. Članovi PEP obitelji korišteni u višestrukom sravnjivanju prikazanom na slici 5. Tablica izrađena prema Nguyen & Saier, 1995.

Poznato je da geni za neke enzime, koji kataliziraju povratne reakcije ili metabolički srodne reakcije, se mogu stopiti i formirati multifunkcionalni enzim. Jedna od pretpostavki je da je piruvat-kinaza vjerojatno mogla biti bifunkcionalni enzim s nekim drugim srodnim enzimom koji sadrži PEP vezajući motiv iz PEP obitelji, poput PPDK ili PPS. Tokom evolucije, mnoge piruvat-kinaze su izgubile svog partnera, no piruvat-kinaze roda *Bacillus* zadržale su degenerativnu sekvencu svog partnera. Druga je pretpostavka da je prisustvo ECTS-a početak evolucijske promjene kod piruvat-kinaze (Sakai, 2004).

1.6. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istrazivanja je pročišćavanje i enzimska karakterizacija piruvat-kinaze bakterije *Bacillus subtilis*. Dobiveni podaci će se koristiti u daljnjem istraživanju ovog enzima i ciklusa glikolize kod vrste *Bacillus subtilis*, kao i za uklapanje eksperimentalnih podataka dobivenih ovim istraživanjem u matematički modeliranu regulatornu mrežu, kako bi se potvrdio taj model.

2. Materijali i metode

2.1 Materijali

2.1.1. Bakterijski sojevi

U radu su korišteni sljedeći bakterijski sojevi :

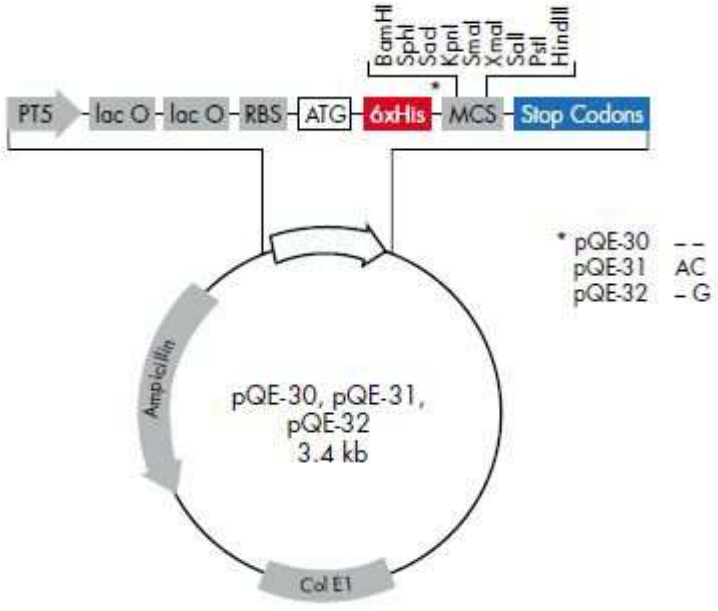
E. coli NM522 (*F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5*)

E.coli BL21

2.1.2. Plazmidni vektori

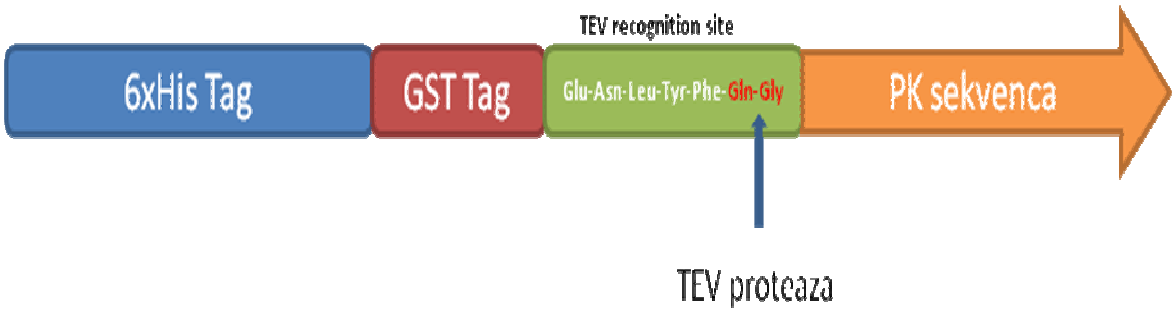
U radu su korišteni sljedeći plazmidni vektori :

- pQE-30 (QIAGEN, Njemačka) – ampicilin resistentan



Slika 7. pQE-30 ekspresijski vektor za proteinske konstrukte s N-terminalnim histidinskim privjeskom (6xHis). PT5 - inducibilni promotor iz bakteriofaga T5, lac O – lac operator, RBS – mjesto vezanja na ribosom, ATG – start-kodon, MCS – višestruko mjesto za kloniranje, Stop Codons – stop-kodoni u sva tri okvira čitanja, Col E1 – ishodište replikacije, Ampicillin – gen za otpornost na ampicilin. Preuzeto iz The QIAexpressionist handbook.

- pDuet (konstruiran pomoću dva različita vektora – PCDFDuet 1 i PETM30) – spektinomicin rezistentan. Sadrzi TEV recognition site za TEV proteazu na N-terminalnom dijelu proteina. TEV proteaza prepoznaje slijed od 7 aminokiselina (TEV recognition site); Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, te s visokom specifičnošću presijeca izmedju Gln i Gly.



Slika 8. Shematski prikaz dijela pDuet plazmidnog vektora na kojem se nalazi N-terminalni histidinski privjesak (6xHis-tag) i TEV recogniton site.

2.1.3. Oligonukleotidne početnice

Oligonukleotidne početnice korištene su za umnožavanje nukleotidnih sekvenci piruvat-kinaze :

Bam H1 – forward

gcGGATCCatgagaaaaactaaaattgtttgtaccatcggtccgg

Pst 1 - reverse

gcgcCTGCAGttaaagaacgctcgcacggccttgatagactgcg

2.1.4. Enzimi, proteini i markeri molekulskih masa

1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Albumin iz goveđeg seruma (BSA) (New England BioLabs)
Alkalna fosfataza iz škampa (SAP) (USB)
Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finska)
GoTaq polymerase (Promega, SAD)
BamH1, Pst1 (New England Biolabs)
T4 DNA ligase (Promega, SAD)
Lizozim (Sigma)
Precision Plus Protein Standard All Blue (Bio-Rad)
TEV proteaza (Invitrogen)
Zečja laktat-dehidrogenaza (Sigma) – tip 11 – 700-1200 jedinica/mg proteina (L1254)

2.1.5. Kompleti reagensa

U radu su korišteni sljedeći kompleti reagensa:

Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit GE Healtcare (Ujedinjeno Kraljevstvo)
QIAprep Spin Miniprep Kit (250), QIAGEN, Njemačka

2.1.6. Uređaji

U radu su korišteni sljedeći uređaji:

Centrifuga 5415 R (Eppendorf, Njemacka)
Centrifuga 5424 (Eppendorf, Njemacka)
Centrifuga Sorvall RC5C (GMI Inc., SAD)
TECHNE TC-3000 Thermal cycler (Scie-Plas Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo)
Spektrofotometar SECOMAM UviLine 9400 (SECOMAM, Francuska)
Spektrofotometar Ultrospec 10 Amersham biosciences (Biochrom LTD. Cambridge, England)
Inkubator Stuart Orbital Incubator SI500 (Keison, Ujedinjeno Kraljevstvo)
Block heater Stuart SBH200D/3
NanoDrop 2000 (ThermoScientific, SAD)

2.1.7 Podloge i otopine

U radu su korišteni sljedeće podloge i otopine:

LB (Luria-Bertani) medij (1L)

Tripton 10g
Ekstrakt kvasca 5g
NaCl 10g

Otopina A (1000mL):

50mM Tris-Cl pH 7.5
100mM NaCl
10% glicerol (V/V)

Otopina C (220mL):

Otopina A
300mM imidazol

Otopina B (220mL):

Otopina C 20ml
Otopina A 180ml

2.2. Metode

2.2.1. Pripremanje elektrokompetentnih stanica *E.coli.*

1 litra tekućeg LB medija inokulirana je s 10 mL predkulture stanica *E.coli* (BL21 ili NM522) i stavljena na trešnju na 37°C dok apsorbancija OD 600 ne dostigne vrijednost izmedju 0.45-0.48. U tom trenutku kultura je ohlađena na ledu 15 minuta i zatim cetrifugirana na 5000g, 15 minuta na 4°C. Talog je ispiran dva puta s po 1L rashlađene sterilne vode, zatim s 50mL

rashlađenog 10%-tnog glicerola. Nakon zadnjeg centrifugiranja talog je resuspendiran s 2mL 10%-tnog glicerola, te su napravljeni alikvoti po 50µL i pohranjeni na -80°C.

2.2.2. Amplifikacija gena piruvat-kinaze (*pykA*) pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR)

Genomska DNA vrste *Bacillus subtillis* korištena je za amplifikaciju nukleotidnih sekvenci koristeći Phusion High Fidelity DNA polimerazu, slijedeći upute proizvođača. Uvjeti PCR reakcije su bili: Početna denaturacija – 5 minuta na 98°C, 1 ciklus; denaturacija – 10 sekundi na 98°C, anneling – 30 sekundi na 57°C, extension - 1 minuta na 72°C – 30 ciklusa , završna ekstenzija – 10 minuta na 72°C, 1 ciklus.

Produkti PCR-a su pročišćeni s *Illustra GFX PCR DNA and gel band purification* kompletom reagensa slijedeći upute proizvođaća, te je njihova duljina provjerena na 1%-tnom agaroznom gelu. Problem parazitskih bandova je riješen dodatnim pročišćivanjem na agaroznom gelu, tako da je cijeli uzorak dobiven PCR-om nanesnen na agarozni gel, te je nakon elektroforeze dio s amplificiranim nukleotidnim sekvencama izrezan iz gela i pročišćen prema uputama proizvođača. Gustoća DNA provjerena je pomoću NanoDrop 2000.

2.2.3. Cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama

Produkti PCR-a podvrgnuti su cijepanju restrikcijskim endonukleazama kako bi ih bilo moguće ugraditi u željeni ekspresijski vektor – pQE30 i pDuet. Vektor pQE30 se koristi kao translacijska fuzija 6xHis-tagom, što omogućava njegovo pročišćavanje na Ni-NTA koloni. Vektor pDuet sadrzi T7-lac promoter, 6xHis-tag, GST-tag i TEV mjesto. Pomoću 6xHis-taga prepoznat ce se željeni protein, a pomoću TEV mjesta reže se 6xHis-tag pomoću TEV proteaza.

Reakcijska smjesa cijepanja PCR produkta sadržavala je 15µL PCR produkta (c=4,1µg/µL), 10µL 1 x NEBuffer 3 pufera, 8µL BamH1, 8µL Pst1, 8µL BSA (10x) i 51µL vode. Ukupni volumen je bio 100µL. Reakcija se odvijala 120 minuta na 37°C.

Cijepanju s istim restrikcijskim endonukleazama podvrgnuti su i vektori Pduet i pQE30. Za Pduet učinjene su dvije *single* digestije; 14µL Pduet vektora, 2 µL 1 x NEBuffer 3 pufera, 2,5µL BamH1/Pst1, 0.5µL BSA. Nakon 60 minuta dodano je 0,5 µL SAP-a koji defosforilira (odstranjuje fosfatne skupine na 5' i 3' krajevima) DNA i tako spriječava autoligaciju vektorske DNA. Ukupni volumen iznosio je 19µL. Za pQE30 – 10µL vektora, 10µL 1 x NEBuffer 3 pufera, 8µL BamH1, 8µL Pst1, 1µL BSA i 63µL vode. Nakon 60 minuta dodano je 1,5µL SAP-a. Ukupni volumen je iznosio 100µL. Reakcija se odvijala 120 minuta na 37°C.

Nakon svakog cijepanja, reakcijska smjesa se pročistila s GFX PCR DNA and Gel Band purification kit, te se izvršila provjera insert DNA i vektorske DNA na 1%-tnom agaroznom gelu.

2.2.4. Ligacija

Za ligaciju PCR produkta i željenog ekspresijskog vektora korištena je T4 DNA ligaza. Za pDuet napravljena je sljedeća reakcijska smjesa; 2 µL Pduet, 18µL insert DNA (*pykA*) (c=4,1µg/µL), Ligase Buffer 10x – 2µL, T4 DNA ligaza – 1µL, voda – 7µL. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 30µL. Prema preporuci proizvođača za ligaciju s ljepljivim krajevima, reakcija se odvijala na sobnoj temperaturi 3 sata.

Za pQE30 napravljena je sljedeća reakcijska smjesa; 0.5µL pQE30, 10µL insert DNA (*pykA*) (c=, 1,5 µL Ligase Buffer 10x, 1µ T4 DNA ligaza, 2µL vode. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 15µL. Epica s reakcijskom smjesom je prvo stavljena u vodu na 14°C, pa u sobu s 20°C preko noći. Na taj način postignut je postepen rast temperature reakcijske smjese i uspješna ligacija.

2.2.5. Transformacija elektrokompetentnih stanica *E.coli*

Elektrokompetentne stanice su izvađene s -80°C i stavljene na led. U 50µL elektrokompetentnih stanica (*E. Coli* BL21 za Pduet ekspresijski vektor i *E. Coli* NM522 za pQE30 ekspresijski vektor) unosi se 1µL ligacijske smjese i premješta u kivete za elektroporaciju, te ostavlja na ledu oko 3 minute. Zatim se kiveta stavlja u elektroporator (2,5kV, 100mA) i pritiskom na gumbe nekoliko sekundi stanice *E.coli* se elektroporiraju kako bi mogle primiti rekombinantni vektor. Odmah nakon elektroporacije brzo se dodaje 1000µL

tekućeg LB-a i ostavlja 60 minuta na 37°C. Nakon 60 minuta nanosi se 100µL i 900µL smjese elektroporiranih E.coli stanica na petrijevku s LB-om i odgovarajućim antibiotikom (ampicilin, spektinomicin). Petrijevke su ostavljene preko noci na 37°C.

2.2.6. PCR na bakterijskim kolonijama

Nakon prekonoćne inkubacije kolonije narastu na petrijevkama s LB-om i antibiotikom, te se metodom PCR na bakterijskim kolonijama (eng. - Colony PCR) provjerava je li transformacija uspjela. Koristi se GoTaq polimeraza, te se reakcija radi prema uputama proizvođača u ukupnom volumenu od 50µL po epici. PCR na bakterijskim kolonijama radi se za veći broj kolonija, te pozitivna kontrola u kojoj se nalazi 49µL reakcijske smjese i 1µL genomske DNA bakterije *B. subtillis*.

2.2.7. Izolacija plazmida iz stanica *E.coli*

Pojedinačne bakterijske kolonije koje sadrže rekombinantni plazmid s ugrađenom nukleotidnom sekvencom za piruvat-kinazu inokulirane su u 10mL tekućeg LB-a s odgovarajućim plazmidom (ampicilin, spektinomicin) i ostavljene na trešnji preko noći na 37°C. Zatim su plazmidi izolirani pomoću QIAprep Spin Miniprep Kit prema uputama proizvođača. Konačni volumen izolata je 50µL. Kako bi se utvrdilo da nije došlo do mutacija prilikom PCR-a, te da se insert pravilno ugradio u vektor, par uzoraka (do 3) od 30µL se šalje na komercijalno sekvencioniranje u tvrtku GATC Biotech, Njemačka.

2.2.8. Sinteza i pročišćavanje 6xHis-tagged proteina afinitetnom kromatografijom

Za sintezu 6xHis-tagged proteina koristeni su sojevi *E.coli* BL21 i *E.coli* NM52.

U 10mL LB medija s odgovarajućim antibiotikom prebačena je pojedinačna bakterijska kolonija, te je ostavljena na 37°C preko noći uz trešnju. Zatim je 1L LB medija s antibiotikom inokulirana navedenom predkulturom (100 x razrijeđenje) i ostavljena na 37°C uz trešnju, dok OD_{600} nije došla do 0.6. Tada se se u 1L dodaje 1 mL 1mM isopropil β-d-tiogalaktopiranozid (IPTG) koji potiče pojačanu transkripciju gena i u konačnici pojačanu ekspresiju proteina; dodatna prednost IPTG-a je što ga vrsta *E.coli* ne može metabolizirati, pa razina spoja ostaje konstantna. Kultura s dodanim IPTG-om stavlja se na trešnju na 37°C jos 3 sata. Zatim se

kultura prebaci u boce za centrifugu i centrifugira 5 min na 7000g, supernatant se baci, a talog se pohrani na -20°C do pročišćivanja proteina.

Talog se resuspendira s ukupno 10mL otopine A, 50µL lizozima (1mg/mL) i 10µL DNAze 5µg/mL), te se ostavi na sobnoj temperaturi na 15 minuta kako bi došlo to lize bakterijske stanične stijenke. Zatim se radi sonifikacija (vršenje lize stanične stijenke pomoću ultrazvuka). Stanična suspenzija se 2 minute sonificira do 40% jakosti sonifikatora. Time se zeli postići dodatna liza ostatka staničnih stijenki i membrana. Nakon sonifikacije stanice se stavljaju na centrifugu 15 minuta na 25 000 g.

U međuvremenu 1mL Ni-NTA agaroze se nanese na kolonu za kromatografiju i ekvilibrira sa 20 mL otopine A. Nakon centrifugiranja na kolonu se nanosi supernatant (sirovi ekstrakt proteina), te se ispire s 15mL otopine A i s 15mL otopine B. Protein koji pročišćavam ima na N-terminusu privjesak od 6 histidina (eng. – *6xHis-tagged protein*). Nikal s kolone koordinira dušike iz imidazolnog prstena histidina te se na taj način protein zadržava na koloni, dok se proteini bez histidinske oznake ispiru otopinama A i B. Protein s histidinskim privjeskom eluira se pomoću otopine C (koja sadrzi imidazol) u frakcije od cca. 1 mL (uobičajno se skupi oko 5-7 frakcija).

Koncetraciju proteina u pojedinoj frakciji određujem kolorimetrijski. U 40µL Bradfordovog reagensa (sadrži *Coomassie brilliant blue* boju za proteine) dodano je 10µL proteinske frakcije. Vezanjem proteina otopina poprimi plavu boju. Što je otopina intenzivnije plavo obojana, to je koncentracija proteina u frakciji veća. Proteini se drže na ledu do odsoljavanja.

Odsoljavanje se vrši na PD-10 kolonama koje se ekvilibriraju s oko 20 mL otopine A. Proteinske frakcije iz prethodnog koraka koje se nalaze eluirane u otopini C (koja sadrži visoke koncentracije soli), nanosi se na PD-10 kolonu i eluira s otopinom A (bez imidazola). Koncentracije proteina se provjeravaju kolorimetrijski Bradfordovim reagensom kako je već prethodno navedeno.

Proteini se čuvaju na -20.

2.2.9. Elektroforeza u SDS – poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Koncentracija proteina i eventualna prisutnost kontaminacija provjerena je elektroforezom na SDS - poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Svi SDS-PAA gelovi pripremljeni su kao 5 %-tni

gel za koncentriranje (eng. - *stacking gel*) i 12 %-tni gel za razdvajanje (eng. - *resolving gel*) Po 20µL uzorka proteinske frakcije pomiješano je s 4µL 6x boje za nanošenje proteinskog uzorka na gel. Elektroforeza (120V, 0.05A) se odvijala u 1X SDS Tris-glicin puferu. Veličina proteina procijenjena je uz pomoć proteinskog biljega *Precision plus Protein standards*. Nakon elektroforeze gelovi su ostavljeni preko noći u *Coomassie Brilliant Blue* boji. Sljedeći dan se premještaju u vodu na još jedan dan ili se odmah odbojaju kuhanjem u vodi.

2.2.10. Utvrđivanje koncentracije proteina

Kako bi se utvrdila što točnija koncentracija proteina dobivena nakon pročišćivanja afinitetnom kromatografijom koristi se Biorad razrijeđen 5x. Kao pozitivna kontrola koristi se BSA poznate koncentracije (1µg/mL) u volumenu od 2, 4, 6, 8 i 10 µL. Koncentracija se utvrđuje na sljedeći način; u kivete za spektrofotometar stavlja se 1mL Biorad 5x reagensa i u svaku prethodno naveden volumen BSA proteina poznate koncentracije. Mjeri se apsorbancija i u Excel se unose dobivene vrijednosti pomoću kojih se konstruira pravac, te vadi jednadžba pravca pomoću koje se utvrđuje finalna koncentracija proteina. Uzorci mojih proteina nanose se u 1mL Biorad 5x reagensa u volumenu od 5, 10 i 20 µL, mjeri se apsorbancija za svaki naneseni volumen, te se dobivene vrijednosti uvrštavaju u jednadžbu pravca iz kojih se srednja vrijednost uzima kao finalna koncentracija proteina.

2.2.11. Enzimski esej

Enzimska aktivnost mjeri se pomoću spektrofotometra kojim se prati reakcija dok ide od reaktanata u smjeru produkta. Kako bi se to izmjerilo mora postojati promjena u apsorbanciji reakcijske smjese produkata; na taj način može se mjeriti nestanak reaktanata ili nastanak produkata reakcije. U mojoj reakciji mjerio se nestanak NADH na 340 nm

Za enzimski esej i enzimsku karakterizaciju koristio se *coupled assay* s zečjom laktat-dehidrogenazom i govođom laktat-dehidrogenazom. Prvi korak uključuje testiranje zečje laktat-dehidrogenaze, tj. cilj je ustanoviti koja je najniža koncentracija enzima pri kojoj mu je aktivnost optimalna. U UV kivetu unosi se 50mM imidazol – HCl, 70 mM KCl, 7 mM $MgCl_2$, 5µL laktat-dehidrogenaze (c=1µg/µL), 1mM NADH i 1mM piruvata, te H_2O do 1mL. Testiranje govođe laktat-dehidrogenaze izvodilo se na jednak način, te je postignuta optimalna aktivnost pri sljedećim koncentracijama reaktanata; u UV kivetu unosi se 100 mM Tris (pH 7,5), 70 mM KCl, , 7 mM $MgCl_2$, 1mM NADH, 0,35 mM piruvata, te H_2O do 1mL. Sve

komponente reakcije držane su na sobnoj temperaturi. Reakcije su izvođene na sobnoj temperaturi.

Drugi korak se odnosi na testiranje uparene reakcije (eng. *coupled reaction),* tj. testiranje aktivnosti, te utvrđivanje granične koncentracije piruvat-kinaze pri kojoj joj je aktivnost optimalna. Cilj je ustanoviti je li se proporcionalno s koncentracijom piruvat-kinaze mijenjala i brzina reakcije, te koja je grančina koncentracija koja se odabire za sljedeći korak.

U reakcijski esej s zečjom laktat-dehidrogenazom unosi se 50mM imidazol – HCl, 70 mM KCl, 7 mM $MgCl_2$, 5µL laktat-dehidrogenaze (c=1µg/µL), 1 mM NADH, 2mM PEP, 2 mM ADP, te piruvat-kinaza u različitim koncentracijama – 20 µg, 10 µg, 5 µg, 2,5 µg,1,25 µg. Dodatna mjerenja su izvedena s 1 µg, 0,50 µg i 0,25 µg, te je 0,50 µg odabrano za daljnu enzimsku karakterizaciju.

U reakcijski esej s goveđom laktat-dehidrogenazom unosi se 100 mM Tris (pH 7,5), 70 mM KCl, , 7 mM $MgCl_2$, 1 mM NADH, 2 mM PEP, 2 mM ADP i 25 µL LDH, te piruvat-kinaza u različitim koncentracijama – 10 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg i 0,625 µg. Za daljnju karakterizaciju odabrana je koncentracija od 2,5 µg. Goveđa laktat dehidrogenaza pripremljena je po uputama proizvođača – 5,7 µL goveđe LDH u otopini amonijeva sulfata razrijeđeno je u 1mL Tris (pH 7,5) s 1% BSA. Na taj način sam dobila stock solution u kojoj se nalazi 0,5 jedinica proteina/mL. Uloga BSA je stabilizacija LDH. Prema uputama proizvođača LDH se trebao razrijediti s NaH_2PO_4, no nakon par testiranja primjetila sam kako NaH_2PO_4 inhibira reakciju koju katalizira piruvat-kinaza, pa sam odlučila zamijeniti s Trisom koji je neutralan.

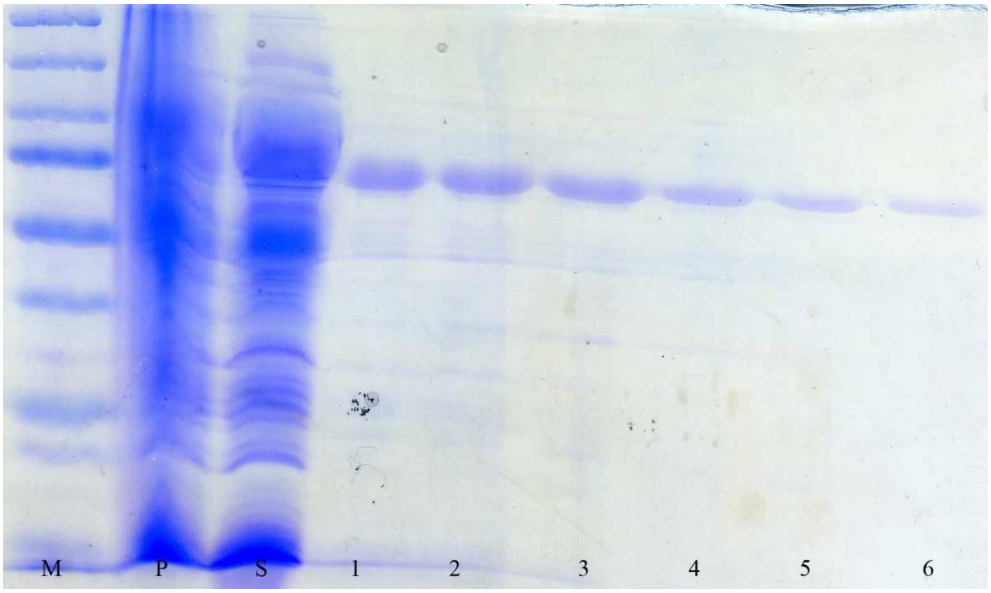
Treći korak je enzimska karakterizacija. Za mjerenje granične koncentracije ADP koristene su koncentracije reaktanata s zečjom laktat-dehidrogenazom utvrđene u drugom koraku s sljedećim varijabilnim koncentracijama ADP-a; 10 mM, 5 mM, 2 mM, 1 mM, 0,7 mM, 0,5 mM i 0,25 mM ADP.

Za mjerenje granične koncentracije PEP korištene su koncentracije reaktanata s goveđom laktat-dehidrogenazom utvrđene u drugom koraku s sljedećim varijabilnim koncentracijama PEP-a; 10 mM, 5 mM, 2 mM, 1 mM, 0,7 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM.

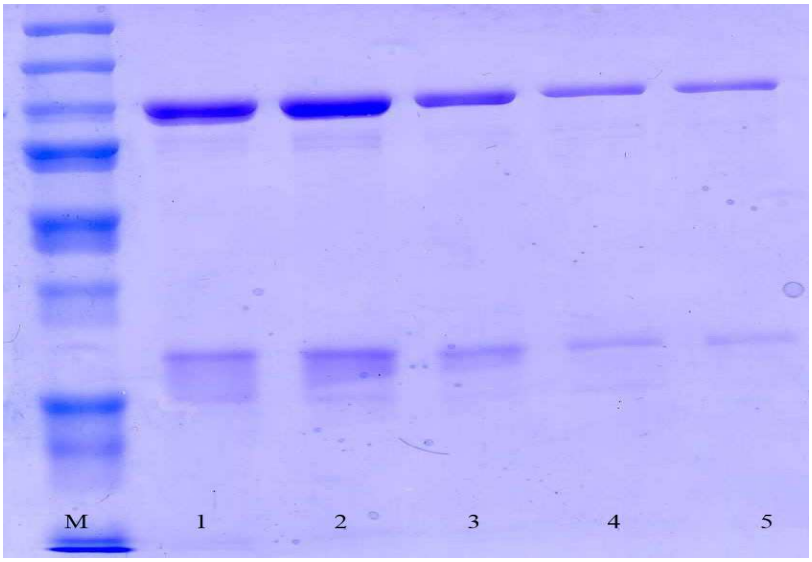
3. Rezultati

3.1. Ekspresijski plazmidni vektori i pročišćavanje 6xHis-tagged proteina

Konstruirani su ekspresijski vektori potrebni za sintezu i izolaciju proteina iz *E.coli* sastavljeni od pQE30 tj. pDuet plazmida, te umetnute nukleotidne sekvence *pykA*. Točnost ugrađene nukleotidne sekvence u pQE30 i pDuet provjerene su sekvencioniranjem (GATC Biotech, Njemačka). Svi 6xHis-tagged proteini pročišćeni su na Ni-NTA kolonama, a imidazol koji se nalazio u posljednjoj otopini za eluiranje proteina je uklonjen odoljavanjem na PD-10 kolonama, te je protein eluiran u otopini A. Proteini su provjereni na SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom, te obojani *Coomassie Brilliant Blue* bojom koja boji proteine. Protein je uspješno ekspresiran u oba korištena vektora.



Slika 9. SDS-PAGE pročišćenog proteina PK u ekspresijskom vektoru pQE30. Linija M je protein marker, linija P je talog, linija S je supernatant, a linije 1-6 su frakcije pročišćenog proteina.



Slika 10. SDS-PAGE pročišćenog proteina PK u ekspresijskom vektoru pDuet. Linija M je protein marker, a linije 1-5 su frakcije pročišćenog proteina.

Iz poliakrilamidnih gelova se vidi da je protein dobro topljiv i u dovoljnim koncentracijama za korištenje u enzimatskom eseju. Koncentracija proteina utvrđena je metodom opisanom u *Materijali i metode*, te usporedbom jačine bandova s bandovima proteina poznate koncentracije. Utvrđeno je da je koncentracija za protein ekspresiran u pQE30 oko 0.5µg/µL, a za protein ekspresiran u pDuet oko 0.4µg/µL.

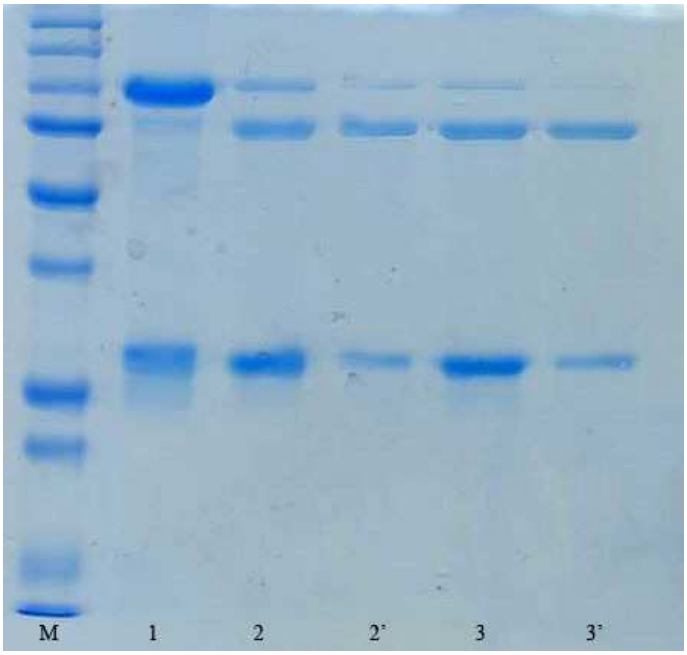
3.2. Uklanjanje 6xHis-tag s proteina pomoću TEV proteaza i afinitetne kromatografije

Na proteinu sintetiziranom kloniranjem u pDuet plazmidu moguće je ukloniti 6xHis-tag pomoću TEV proteaze. Mehanizam djelovanja TEV proteaze opisan je u *Materijali i metode*

Postupak je izveden na sljedeći način; u reakcijsku smjesu od 900µL dodano je 200µL proteina (c=0.7µg/µL), 75 µL TEV buffera, 15 µL DTT, 6µL TEV proteaze i 404 µL vode. Reakcijska smjesa je inkubirana na 16°C odnosno 30°C, 3 sata. Postotak proteina s uklonjenim 6xHis-tagom provjerava se na SDS-PAGE gelu, na način koji je opisan u *Materijali i metode*.

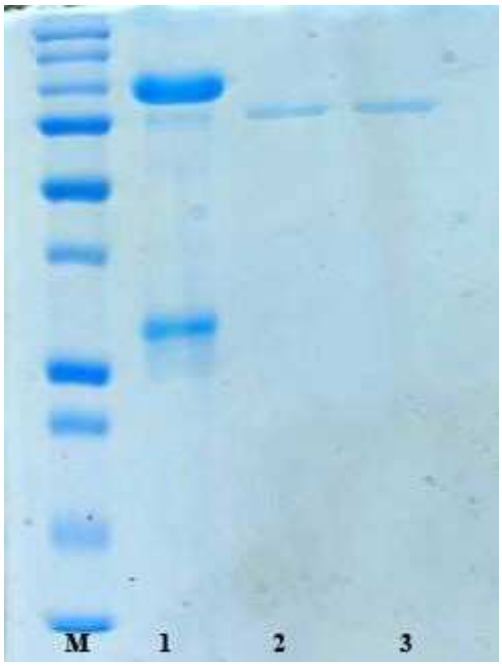
Neodrezani proteini, 6xHis-tag i TEV proteaza uklanjaju se Ni-NTA afinitetnom kromatografijom; u epicu se stavi 150µL Ni-NTA agaroze i ekvilibrira s oko 1 mL otopine A centrifugirajući u stolnoj centrifugi 5 minuta. Otopina A se dodaje kako bi se smjesa ekvilibrirala na pH 7.5; taj pH je neophodan za efikasno vezanje histidinskog privjeska za Ni-NTA talog. Zatim se ukloni supernatant, te se na talog nanese reakcijska smjesa proteina i TEV proteaze. Uzorak se inkubira 2 sata na 4°C uz trešnju. Nakon toga se centrifugira kao što je ranije navedeno, te se uzima supernatant i provjerava na SDS-poliakrilamidnom gelu (Slika 11).

Uzorci se pohranjuju na -20°C.



Slika 11. SDS-PAGE pročišćenog proteina, te frakcija proteina tretiranih TEV proteazom. Linije M sadrži protein marker, linija **1** procisceni 6xHis-tagged protein, linija **2** protein tretiran TEV proteazom u uvjetima od 16°C, linija **2'** sadrži protein iz linije 2 kojem su suvišni 6xHis-tag i neodrezani proteini uklonjeni Ni-NTA afinitetnom kromatografijom; linija **3** sadrži protein tretiran TEV proteazom u uvjetima od 30°C, linija **3'** sadrži protein iz linije 3 kojem su suvišni 6xHis-tag i neodrezani proteini uklonjeni Ni-NTA afinitetnom kromatografijom.

Pošto nije postignut 100%-tni učinak u uklanjanju 6xHis-tagged proteina i suvišnih 6xHis-tagova, smjese proteina se još jednom tretiraju na isti način Ni-NTA afinitetnom kromatografijom i provjeravaju na SDS-PAGE-u.



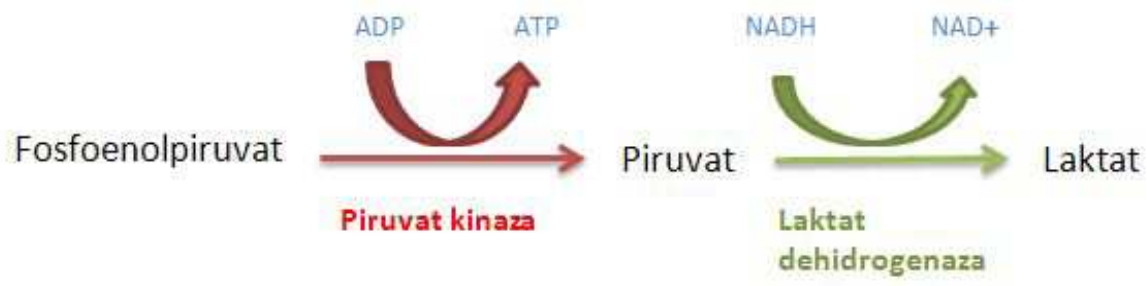
Slika 12. SDS-PAGE pročišćenog proteina dodatno tretiranog s Ni-NTA, radi uklanjanja 6xHis-tagged proteina i suvisšnih 6xHis-tagova. Linija **M** sadrzi protein marker, linija **1** sadrži uzorak neodrezanog proteina s histidinskog privjeska i GST tagom. Linija **2** sadrži uzorak proteina tretiranog TEV proteazom u uvjetima od 16°C i dodatno pročišćenog s Ni-NTA afinitetnom kromatografijom. Linija **3** sadrži uzorak proteina tretiranog TEV proteazom u uvjetima od 30°C i dodatno pročišćenog s Ni-NTA afinitetnom kromatografijom.

Na taj način dobila sam protein bez N-terminalnog histidinskog privjeska koji mogu koristiti za enzimski esej. Uklanjanjem histidinskog privjeska eliminirana je mogućnost da privjesak na bilo koji način utječe na enzimsku kinetiku piruvat-kinaze.

Iz ovoga se može zaključiti kako su obje temperature (16°C i 30°C) optimalne za odstranjivanje histidinskog privjeska s proteina piruvat-kinaze, iako se veći učinak čini s metodom na 30°C i dalje je problem gubitak velike količine materijala tokom tretiranja proteina afinitetnom kromatografijom.

3.3. Enzimski esej

Enzimsku aktivnost sam prvotno pokušala ustanoviti primjenjujući enzimski esej u kojem se izvodi jedna enzimska reakcija, tj. reakcija u kojoj nastaje piruvat pomocu PEP-a i ADP-a, te se mjeri gubitak PEP-a na 270nm. Pošto reakcija nije davala rezultate, tj. gubitak PEP-a nije bilo moguće ustanoviti spektrofotometrom; prešla sam na sparenu reakciju s laktat-dehidrogenazom (LDH) koja koristi piruvat nastao iz reakcije koju katalizira piruvat-kinaza, te ga uz oksidaciju NADH pretvara u laktat; ta reakcija predstavlja sekundarnu reakciju tokom koje dolazi do spektralne promjene koja se može izmjeriti spektrofotometrom. Dakle, aktivnost piruvat-kinaze mjeri se oksidacijom NADH u prisustvu PEP, ADP i suvišku laktat-dehidrogenaze.



Slika 13. Prikaz enzimske reakcije koja se koristila tijekom enzimatskog eseja

U tom slučaju mjeri se nestanak NADH na 340nm. Pritom je vrlo važno koristiti laktat-dehidrogenazu pogodnog K_m za piruvat. U slučaju da je K_m laktat dehidrogenaze previsok, biti će potrebne velike količine supstrata kako bi se enzim aktivirao, što je vrlo nepogodno za kasniju enzimsku karakterizaciju. Za ove reakcije korištene su dvije lakatat-dehidrogenaze – zečja laktat-dehidrogenaza s K_m = 0,67 mM za piruvat i goveđa laktat-dehidrogenaza s nepoznatim K_m za piruvat, koji je odabran zbog korištenja u sličnim eksperimentima, te s pretpostavkom da ima dovoljno nizak K_m za piruvat kako bi se izmjerio teoretski K_m za PEP, koji iznosi oko 0,2 mM piruvata. Teoretski K_m za ADP iznosi 0,7 mM piruvata, te je u toj karakterizaciji korištena zečja laktat-dehidrogenaza.

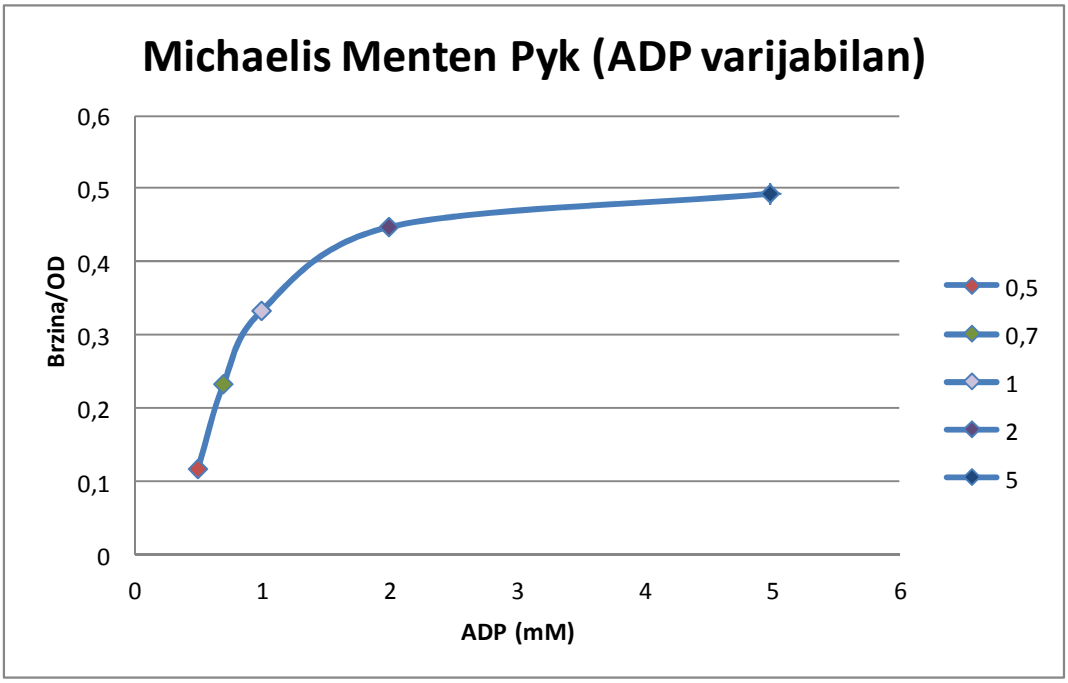
3.3.1. Mjerenje kinetičkih parametara za ADP

Za svaku varijabilnu koncentraciju ADP-a korištenih u *Materijalima i metodama*, utvrđena je maksimalna brzina koja se mijenja s promjenom OD. Dobivene vrijednosti unesene su u tablicu 02.

ADP (mM)	Brzina/OD
0,5	0,1166
0,7	0,2326
1	0,3329
2	0,4475
5	0,4933

Tablica 2. Prikaz koncentracije substrata korištene pri enzimskoj karakterizaciji i postignute brzine

Dobivene vrijednosti su korištene u izradi Michaelis – Menten modela enzimske kinetike.



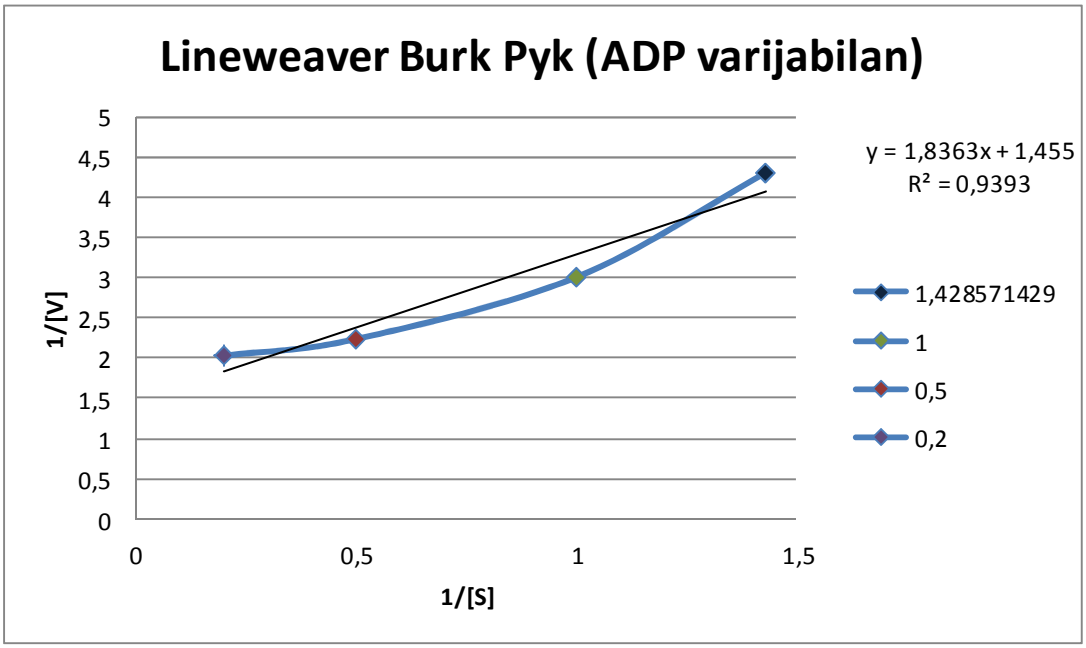
Slika 14. Model Michaelis-Menten enzimske kinetike, izrađen prema eksperimentalnim podacima iz tablice 02.

Eksperimentalne točke dobivene tijekom enzimske karakterizacije slijede pravokutnu hiperbolu. Na krivulji je vidljivo kako povećanjem koncentracije substrata, u ovom slučaju ADP, enzim se zasićuje substratom, te oko koncentracije 2 mM krivulja postaje pravocrtna, što znači da su aktivna mjesta za substrat na enzimu popunjena i dosegnuta je maksimalna brzina reakcije.

Sljedeći korak je linearizacija, tj. transformacija eksperimentalnih podataka tako da umjesto na hiperboli, leže na pravcu. Na taj način iz jednadžbe pravca očitati će se enzimski parametri V_m i K_m piruvat-kinaze za ADP. Za prikaz je korištena Lineweaver-Burk linearizacija.

1/[S]	1/[V]
1,428571429	4,299226139
1	3,003905077
0,5	2,234636872
0,2	2,027163998

Tablica 3. Prikaz vrijednosti koje su korištene za izradu Lineweaver-Burk linearizacije.



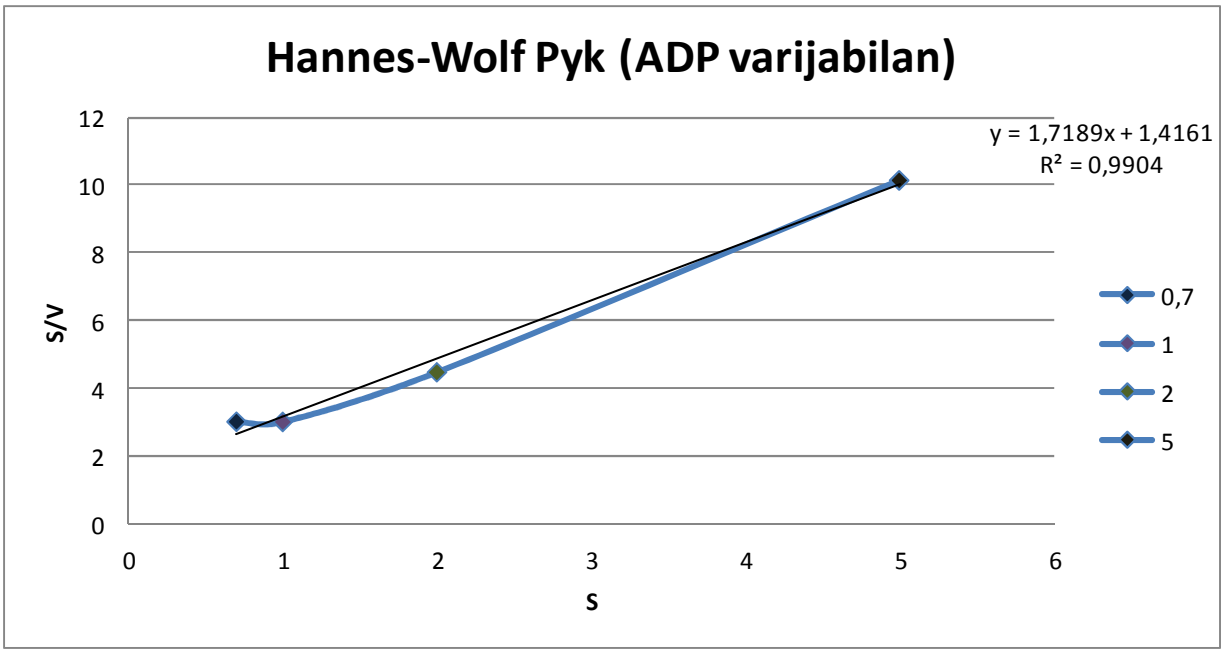
Slika 15. Prikaz Lineweaver-Burk linearizacije, izrađene pomoću eksperimentalnih podataka iz tablice 03.

Odabrane su točke iz eksperimentalnog mjerenja koje pokazuju najviši stupanj linearnosti, te je dobivena jednadžba pravca, pomoću koje su izračunati enzimski parametri. Dobivene vrijednosti pomoću ove linearizacije su K_m=1,262 mM, a V_m=220,8 µmol NADH/min/µg proteina.

Napravljena je i Hanes-Woolf linearizacija, radi usporedbe dobivenih podataka s Lineweaver-Burk.

S	S/V
0,7	3,009458298
1	3,003905077
2	4,469273743
5	10,13581999
10	11,26633619

Tablica 4. Prikaz vrijednosti koje su korištene za izradu Hannes-Wolf linearizacije



Slika 16. Prikaz Hannes-Woolf linearizacije, izrađene pomoću eksperimentalnih podataka iz tablice 4.

Odabrane su točke iz eksperimentalnog mjerenja koje pokazuju najviši stupanj linearnosti, te je dobivena jednadžba pravca, pomoću koje su izračunati enzimski parametri. Dobivene

vrijednosti pomoću ove linearizacije su K_m=1,2138 mM, a V_m=227,062 µmol NADH/min/µg proteina.

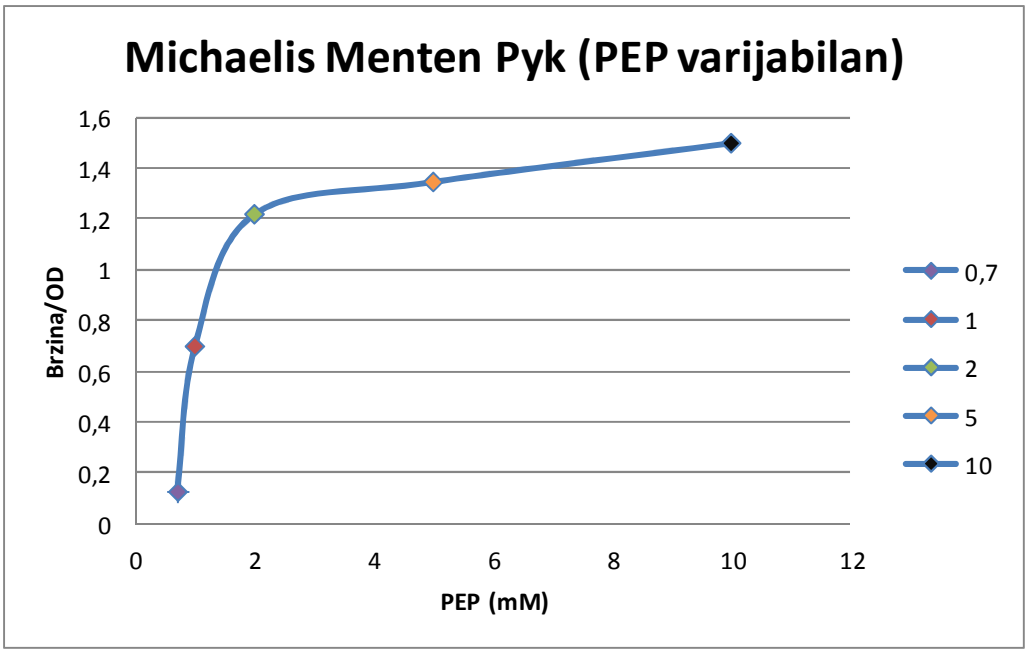
3.3.2 Mjerenje kinetičkih parametara za PEP

Za svaku varijabilnu koncentraciju PEP-a korištenih u *Materijalima i metodama*, utvrđena je maksimalna brzina koja se mijenja s promjenom OD. Dobivene vrijednosti unesene su u tablicu 5.

PEP (mM)	Brzina/OD
0,7	0,12378
1	0,69745
2	1,2177
5	1,3446
10	1,49735

Tablica 5. Prikaz koncentracije substrata korištene pri enzimskoj karakterizaciji i postignute brzine

Dobivene vrijednosti su korištene u izradi Michaelis – Menten modela enzimske kinetike.



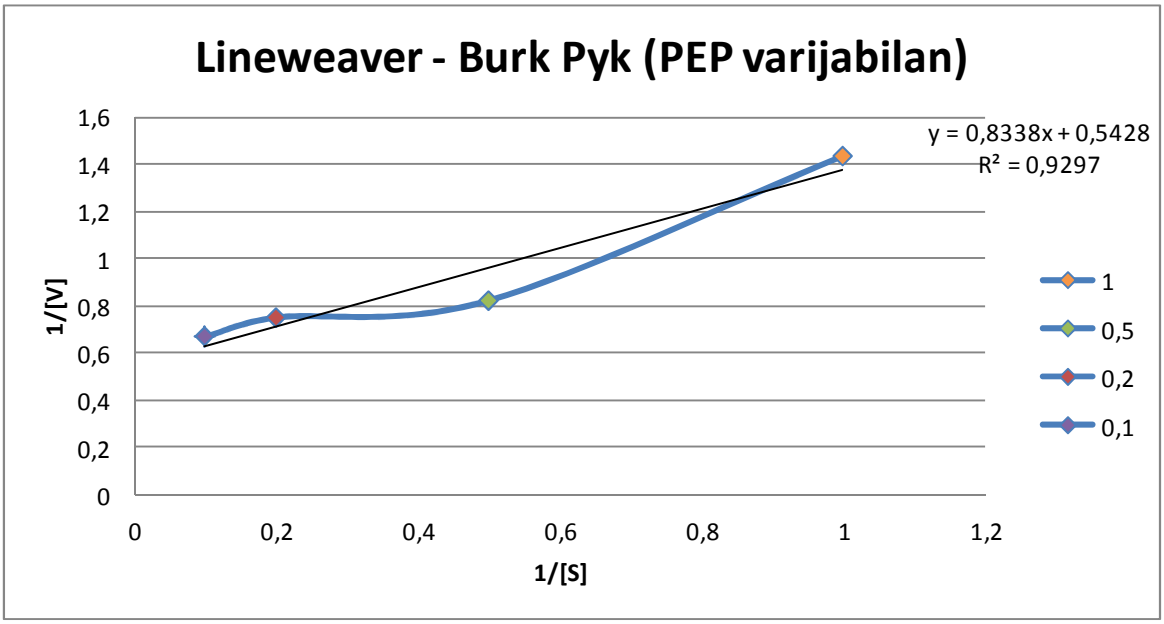
Slika 17. Model Michaelis-Menten enzimske kinetike izrađen prema eksperimentalnim podacima iz tablice 5.

Eksperimentalne točke dobivene tijekom enzimske karakterizacije i u ovom slučaju slijede pravokutnu hiperbolu. Na krivulji je vidljivo kako povećanjem koncentracije substrata, ovdje je to PEP, enzim se zasićuje substratom, te već oko koncentracije 2 mM krivulja postaje gotovo pravocrtna, reakcija se značajno usporova, te zadržava vrlo blagi rast sve do 10mM, što znači da su skoro sva aktivna mjesta za substrat na enzimu popunjena i dosegnuta je maksimalna brzina reakcije.

Sljedeći korak je linearizacija, tj. transformacija eksperimentalnih podataka tako da umjesto na hiperboli, leže na pravcu. Na taj način iz jednadžbe pravca očitati će se kinetički parametri V_m i K_m piruvat-kinaze za PEP. Za sljedeći prikaz je korištena Lineweaver-Burk linearizacija.

1/[S]	1/[V]
1	1,433794537
0,5	0,821220333
0,2	0,749288176
0,1	0,667846529

Tablica 6. Prikaz vrijednosti koje su korištene za izradu Lineweaver-Burk linearizacije.



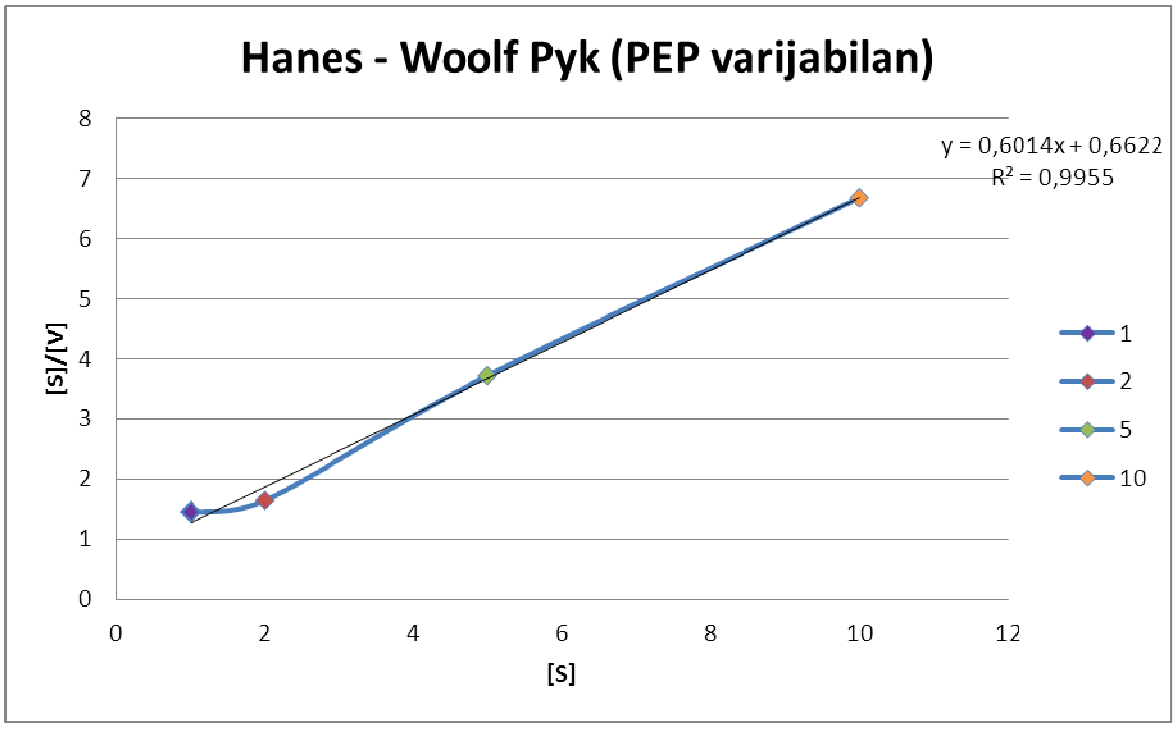
Slika 18. Prikaz Lineweaver-Burk linearizacije za fosfoenolpiruvat, izrađene pomoću eksperimentalnih podataka iz tablice 6.

Odabrane su točke iz eksperimentalnog mjerenja koje pokazuju najviši stupanj linearnosti, te je dobivena jednadžba pravca, pomoću koje su izračunati kinetički parametri. Dobivene vrijednosti pomoću ove linearizacije su K_m=1,5361 mM, a V_m=118,4756 µmol NADH/min/µg proteina.

Napravljena je i Hannes-Woolf linearizacija, radi usporedbe dobivenih podataka s Lineweaver-Burk.

[S]	[S]/[V]
1	1,433794537
2	1,642440667
5	3,718578016
10	6,678465289

Tablica 7. Prikaz vrijednosti koje su korištene za izradu Hanes-Woolf linearizacije



Slika 14. Prikaz Hannes-Woolf linearizacije za fosfoenolpiruvat, izrađene pomoću eksperimentalnih podataka iz tablice 07.

Odabrane su točke iz eksperimentalnog mjerenja koji prikazuju najviši stupanj linearnosti, te je dobivena jednadžba pravca, pomoću koje su izračunati kinetički parametri. Dobivene vrijednosti pomoću ove linearizacije su K_m=0,9081 mM, a V_m=97,1125 µmol NADH/min/µg proteina.

4. Rasprava

Tokom istraživanja koristila su se dva različita ekspresijska vektora za sintezu i izolaciju proteina piruvat-kinaze, ekspresijski vektor pDuet, odnosno pQE30. Oba vektora posjeduju 6xHis-tag koji služe za vezanje nikla prilikom afinitetne kromatografije. Specifičnost pDuet vektora je postojanje TEV *recognition site*, tj. slijeda od 7 aminokiselina na N-terminalnom dijelu proteina koje prepoznaje TEV proteaza (shema prikazana u *Materijali i metode*), koja se koristi za uklanjanje 6xHis-tag s proteina. Problematika proteina s 6xHis-tagom je što zbog dodatne aminokiselinske sekvence uvijek postoji mogućnost utjecaja na smatanje proteina, što će uzrokovati promjenu u formaciji, a time i drugačija enzimska svojstva piruvat-kinaze. Isto tako, uklanjanje 6xHis-taga TEV proteazom, također može dovesti do promjena. Inicijalno, u spektrofotometrijskim mjerenjima su korištene obje piruvat-kinaze; dakle piruvat-kinaza sintetizirana u pQE30 s 6xHis-tagom, te piruvat-kinaza sintetizirana u pDuet s uklonjenim 6xHis-tagom radi uspredbe. Mjerenja su pokazala kako piruvat-kinaza s odstranjenim 6xHis-tagom ima donekle promijenjenu kinetiku, te postoji dugi period mirovanja u kojem ne dolazi do reakcije ili zahtijeva veću količinu supstrata za pokretanje reakcije. Pretpostavljam da je do toga došlo zbog promjene u strukturi proteina ili aktivnog mjesta, te je vezanje susptrata otežano. Također, postoji mogućnost da je zbog tretiranja TEV proteazom protein postao nestabilan, te ga je bilo u premaloj količini u stabilnoj formi u reakcijskoj smjesi. Iz navedenih razloga odlučeno je da će se u daljnjim spektrofotometrijskim mjerenjima u ovom istraživanju koristiti piruvat-kinaza sa 6xHis-taggom čijim mjerenjem su dobiveni optimalni podaci koji su na kraju korišteni za izradu Michaelis-Menten modela enzimske kinetike i linearizacijske prikaze, te računanje kinetičkih parametara.

Piruvat-kinaza kao važno regulatorno mjesto u metaboličkoj mreži, bila je predmet i brojnih istraživanja kako na bakteriji *B. subtillis* (Diesterhaft & Freese, 1972.), tako i na srodnim bakterijama poput *B. licheniformis* (Tuominen & Bernlohr, 1971.) i *B. stearothermophilus* (H. Sakai & Suzuki, 1986.). Kinetički parametri kod navedenih srodnih vrsta uzeti su kao teoretske vrijednosti i vodilje pri određivanju kinetičkih parametara za vrstu *B. subtilis* u ovom istraživanju; K_m *B. licheniformis* za ADP je utvrđen na 0,7 mM, dok je kod vrste *B. sterarothermophilus* utvrđen K_m za PEP od 0,2 mM. U ovom istraživanju za određivanje kinetičkih parametara piruvat-kinaze korištena je laktat-dehidorogenaza iz dva različita izvora (goveđa i zečja LDH) i mjerenje pri 340nm, pošto spektrofotometrske analize u samostalnoj

reakciji piruvat-kinaze nisu ustanovile nestanak fosfoenolpiruvata pri 270nm. Pomoću teoretskih vrijednosti pretpostavila sam da će se i K_m substrata kod vrste *B. subtilis* kretati oko tih vrijednosti, pa shodno tome pri enzimskoj karakterizaciji i uparenoj reakciji s laktat-dehidrogenazom odabrane su laktat-dehidrogenaze s dovoljnom niskim K_m za piruvat, jer u slučaju previsokog K_m laktat-dehidrogenaze, biti će potrebne veće količine supstrata kako bi se enzim aktivirao, što bi rezultiralo pogrešnim mjerenjima i krivim kinetičkim parametrima za piruvat-kinazu.

Tokom mjerenja neki rezultati za K_m ADP-a upućivali su na aktivnost enzima i pri 0,5mM piruvata, no ta mjerenja su uvrštena samo u izradu Michaelis-Menten modela enzimske kinetike, dok pri linearizacijskim modelima su izbačene zbog nelinearnosti. Također na vrlo niskim koncentracijama piruvata, pri mjerenju spektrofotometrom, primjećeni su veliki periodi mirovanja u trajanju od cca. 10-15 minuta, u kojima ne bi bilo reakcije. Uzorci su nakon toga držani na sobnoj temperaturi, pri čemu se period mirovanja smanjio, no i dalje je bio značajan, čime je mjerenje bilo nepouzdano, što je jedan od razloga neuvrštavanja u linearizacijske prikaze i izračune. Slični rezultati su dobiveni i u mjerenjima s PEP-om. Zbog nedostatka vremena i problema pri optimizaciji laktat-dehidrogenaza za spektrofotometrijsku analizu dobiveno je nekoliko optimalnih mjerenja, iz kojih su napravljeni Michaelis-Menten prikazi u ovom radu, te linearizacije za oba suspstrata. Za linearizacijske prikaze Michaelis-Mentena enzimske kinetike korišteni su Lineweaver-Burk i Hanes-Woolf linearizacija za oba supstrata, te su dobiveni približno jednaki rezultati. Ipak, Hanes-Woolf linearizacijom dobiven je linearniji prikaz, te izračunati kinetički paramteri su bliži vrijednostima izmjerenih kod srodnih vrsta. U linearizacijskim prikazima Michaelis-Menten enzimske kinetike, općenito se smatra da je Hanes-Woolf linearizacija bolji prikaz od Lineweaver-Burk.

Dobiveni rezultati su na tragu teoretskih vrijednosti. Potrebna je dodatna optimizacija postupka, te dodatna spektrofotometrijska mjerenja. Podaci se mogu koristiti u daljnjem istraživanju kao smjernica za točno utvrđivanje kinetičkih parametara piruvat-kinaze bakterije *B. subtillis*.

5. Zaključak

Rezultati mjerenja kinetičkih parametara piruvat-kinaze bakterije *Bacillus subtilis* dobivenih ovim istraživanjem, odgovaraju vrijednostima izmjerenima kod srodnih vrsta postavljenima prijašnjim istraživanjima. Prikazan je i sažetak evolucijskih analiza i mjerenja koja prikazuju visoku konzerviranost aminokiselinskih sekvenci za piruvat-kinaze iz različitih izvora. Shodno tome i rezultatima prikazanima u ovom radu, može se zaključiti kako će i dodatna mjerenja potvrditi kako su kinetički parametri piruvat-kinaze unutar pretpostavljenih vrijednosti. Također, vrijednosti dobivene ovim istraživanjem poslužiti će kao polazišna točka za istraživanje utjecaja drugih metabolita na aktivnosti piruvat-kinaze.

6. Literatura

1. Muñoz, M-E., Ponce E., 2003. Pyruvate kinase/current status of regulatory and functional properties. Comp. Biochem. Physiol. Part B , 135, 197-218
2. Muñoz, M-E., Le Borgne, S., Bolivar, F. and Valle, F., 1997. Molecular cloning of the gene that codes for the pyruvate kinase of Bacillus subtilis, primary caracterization of a strain carrying this gene insertionally inactivated. Lat.-Amer. Microbiol. 39, 129-140
3. Sakai, H., Suzuki, K., Imahori, K., 1986. Purification and properties of pyruvate kinase from *Bacillus stearothermophilus*. J. Biochem. 99, 1157–1167
4. Sakai, H., Ohta, T., 1993. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene for pyruvate kinase of *Bacillus stearothermophilus* and the production of the enzyme in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 211, 851–859.
5. Suzuki, K., Ito, S., Shimizu-Ibuka A., Sakai H., 2008. Crystal structure of pyruvate kinase from *Geobacillus stearothermophilus*, J. Biochem. 144, 305-312
6. Sakai, H., 2004. Possible structure and function of the extra C-Terminal sequence of pyruvate kinase from *Bacillus stearothermophilus*, J. Biochem. 136, 471-476
7. Tuominen, F.W., Bernlohr, R.W., 1971. Pyruvate Kinase of the Spore-forming Bacterium, *Bacillus licheniformis*, I. Purification, stability, regulation of synthesis, and evidencefor multiple molecular states. J. Biochem. 246, 1733-1745
8. Tuominen, F.W., Bernlohr, R.W., 1971. Pyruvate Kinase of the Spore-forming Bacterium, *Bacillus licheniformis*, II. Kinetic properties. J.Biochem. 246, 1746-1755
9. Sonenshein A., Hoch J., Losick R. (2002) – *Bacillus subtilis* and it's closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, D.C.
10. Ludwig, G., Homuth, G., Schmalisch, M., Dyka, F.M., Hecker, M., Stülke, J. (2001.) - Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the gapA operon. Molecular Biology. 41(2), 409-422
11. Nguyen, C.C., Saier, Jr. M.H. (1995.) – Phylogenetic analysis of the putative phosphorylation domain of pyruvate kinase of *Bacillus stearothermophilus*. Res. Microbiol. 146, 713-719

12. Fry, B., Zhu, T., Domach, M.M., Koepsel, R.R., Phalakornkule, C., Ataai, M. (2000.) – Charachterization of growth and acid formation in *Bacillus subtilis* pyruvate kinase mutant. Applied and Environmental Microbiology, 4045-4049

13. Kunst, F, Ogasawara, N, Moszer, I, Albertini, A. M., Alloni, G, Azevedo V. et al. (1997): The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis.* Nature 390, 249-256

14. Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P., and Aiba, H. (1997): cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. SciUSA 94: 12914–12919

15. Charpentier, B., Bardey, V., Robas, N., and Branlant, C. (1998): The EIIGlc protein is involved in glucose-mediated activation of *Escherichia coli* gapA and gapB-pgk transcription. J Bacteriol **180**: 6476–6483.

16. Luesink, E.J., van Herpen, R.E.M.A., Grossiord, B.P., Kuipers, O.P., and de Vos, W.M. (1998): Transcriptional activation of the glycolytic las operon and catabolite repression of the gal operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. Mol Microbiol **30**: 789–798.

17. Plumbridge, J. (1998): Expression of ptsG, the gene for the major PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose. Mol Microbiol **29**:1053–1063

18. Tobisch, S., Zuhlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., and Hecker, M. (1999): Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in Bacillus subtilis.J Bacteriol **181**: 6996–7004.

19. Leyva-Vazquez, M.A., and Setlow, P. (1994): Cloning and nucleotide sequences of the genes encoding triose phosphate isomerase, phosphoglycerate mutase, and enolase from *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **176**: 3903–3910.

20. Boiteux, A., M. Markus, T. Plesser, B. Hess, and M. Malcovati. **(**1983.): Interaction of pyruvate kinase from *Escherichia coli* with fructose 1,6-biphosphate and calcium ions. Biochem. J. **211:**631–640.

21. Diesterhaft, M., Freese, E. (1972.): Pyruvate kinase of *Bacillus subtilis*. Biochem. Biophys. Acta, **268:** 373-380

22. Stryer, Berg, Tymoczko (2007): Biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York

23. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002): Molecular biology of the cell. Garland Science, New York
24. Tamarin, R.H. (2004): Principles of Genetics. McGraw-Hill, New York
25. Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R. (2008): Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends Microbiol. **16**: 269-75
26. Jannière L, Canceill D, Suski C, Kanga S, Dalmais B, et al. (2007) Genetic Evidence for a Link between Glycolysis and DNA Replication. PloS ONE 2(5):e447. doi:10.1371/journal.pone.0000447
27. Waygood, E. B., Sanwal, B. D., (1973): The Control of Pyruvate Kinases of *Escherichia coli,* I. PHYSICOCHEMICAL AND REGULATORY PROPERTIES OF THE ENZYME ACTIVATED BY FRUCTOSE 1,6-DIPHOSPHATE. January 10, 1974 The Journal of Biological Chemistry, **249**, 265-274.
28. Mattevi, A., Bolognesi, M., Valentini, G. (1996) : The allosteric regulation of pyruvate kinase. FEBS Letters **389,** 15-19
29. Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, Gnad F, Kumar C, Jensen PR, Mann M. (2007): The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. Mol. Cell Proteomics. 2007 Apr;6(4):697-707.
30. Kobayashi et al. (2003): Essential *Bacillus subtilis* genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 April 15; 100(8): 4678–4683