

**PENGEKSPRESAN DAN PENULENAN PROTEIN  
KINASE, PknJ DALAM *Mycobacterium bovis*  
BCG Pasteur 1173P2**

**LEE HOONG FATT**

**TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI  
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI  
IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI  
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**FEBRUARI 2005**



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PENGESTRESAN DAN PENULLENAN PROTEIN KINASE, PkAT DALAMMycobacterium bovis BCG Parteur 1173 P2.Ijazah: SARJANA MUDASESI PENGAJIAN: MEI 2002 - APRIL 2005Saya LEE HOONG FATT

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)\* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. \*\*Sila tandakan ( / )

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

  
 (TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

 Alamat Tetap: 33, PEJAJARAN WIRA TAYA  
TIMUR 17, TAMAN DESA KESUBURAN,  
31350 IPOH, PERAK.
DR. LEE PING CHIN  
 Nama Penyelia
Tarikh: 24/3/2005Tarikh: 24/3/2005

CATATAN: \* Potong yang tidak berkenaan.

\*\* Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu diklasikan sebagai SULIT dan TERHAD.

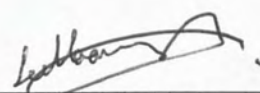
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



## PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

21 Februari 2005



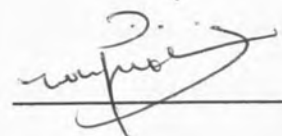
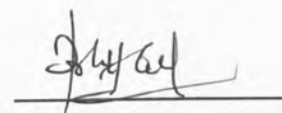
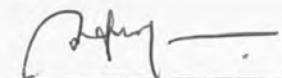
---

LEE HOONG FATT  
HS 2002-3055



**DIPERAKUKAN OLEH**

Tandatangan

1. **PENYELIA****(DR. LEE PING CHIN)****DIWAKILI OLEH: DR. ZALEHA ABDUL AZIZ**2. **PEMERIKSA 1****(MADAM TEOH PEIK LIN)**3. **PEMERIKSA 2****(DR. ROZIAH HJ. KAMBOL)**4. **PEMERIKSA 3****(DR. WONG NYET KUI)**5. **DEKAN****(ASSOC. PROF. DR. AMRAN AHMED)**

## PENGHARGAAN

Setinggi-tinggi penghargaan saya ucapkan kepada Dr. Lee Ping Chin, penyelia saya ke atas segala tunjuk ajar dan panduan kepada saya semasa kajian ini dijalankan. Segala cadangan dan pandangan dari pihak beliau amat saya hargai.

Selain itu, saya juga ingin merakamkan penghargaan kepada pelajar-pelajar Sarjana di dalam makmal-makmal Pasca Siswazah Bioteknologi dan Penyelidikan Bioteknologi Universiti Malaysia Sabah terutamanya Glenda Wong, Cik Ainol dan Wei Loon yang sanggup memberi panduan dan kemudahan ke atas pengumpulan sample kajian, pengambilan bahan kimia serta peminjaman rujukan yang ditawarkan. Begitu juga, jasa Encik Foo, Encik Awang, Helena dan Jagdish atas bantuan dan nasihat tentang masalah yang dihadapi semasa kajian projek ini dijalankan adalah amat dihargai.

Akhirnya, saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan-rakan sekerja terutamanya Cik Lau Sing Leng yang banyak memberi bantuan dan sokongan kepada saya. Sekian, terima kasih.





## ABSTRAK

*Mycobacteria* dapat menggunakan protein kinase untuk menjalankan proses fosforilasi dalam sistem transduksi isyarat sendiri selepas menerima rangsangan daripada persekitaran yang kurang sesuai atau mengganggu sistem transduksi isyarat selular sel-sel perumah lalu membolehkan mereka beradaptasi dan terus bersifat patogenik. Dalam kajian ini, gen *pknJ* yang mengekodkan protein kinase *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 sebagai protein kinase J (PknJ) telah diklonkan dalam vektor pengekspresan, pET16b dan ditransformasikan di dalam *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Pengekspresan dirangsangkan selepas penambahan 1mM IPTG. Penulenan PknJ rekombinan yang mempunyai jisim molekul relatif 64kDa dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi keafinan berdasarkan pengikatan protein rekombinan His X10-PknJ kepada matriks Ni-NTA dan dianalisis dengan SDS-PAGE.. PknJ sebagai protein kinase menyerupai eukariotik mengandungi domain-domain Hanks dengan organisasi struktur transmembran tunggal, mempunyai domain pemangkinan N-terminal di dalam sitoplasma dan domain C-terminal ekstraselular. Domain intraselular dapat menjalankan autofosforilasi ke atas residu-residu serina dan treonina. Aktiviti autokinase ini memerlukan kewujudan satu residu lisina pada kedudukan 43 dalam subdomain Hanks II yang juga dikenali membawa fungsi kepada aktiviti kinase dalam sistem eukariot. Penglibatan PknJ bagi aliran transduksi isyarat dari luar persekitaran ke intraselular bakteria telah dicadangkan.



**EXPRESSION AND PURIFICATION OF PROTEIN KINASE, PknJ OF  
*Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2**

**ABSTRACT**

*Mycobacteria* is able to employ protein kinase that poses phosphorylation in its own signaling transduction as a response to environmental stress or interfere with the cellular signaling network of host cells to promote bacterial adaptation and persistently pathogenic. In this study, the *pknJ* gene that encodes a protein kinase of *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 as protein kinase J (PknJ) was cloned into expression vector, pET16b and transformed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Expression was induced after addition of 1 mM IPTG. 64kDa protein, PknJ recombinant was purified using affinity chromatography technique depending to the binding ability of X10 His tag-PknJ to Ni-NTA matrix and analyzed with SDS-PAGE. PknJ is an eukaryotic-like serine/threonine protein kinase with Hanks' domains and single transmembrane organizational structure, consists of a cytoplasmic N-terminal catalytic domain and a C-terminal extracellular domain. Intracellular domain can poses the activity of autophosphorylation on serine and threonine residues. This autokinase activity requires a lysine residue at position 43 in subdomain II, which is known to be essential also for eukaryotic kinase activity. Involvement of PknJ in the transduction of external signals into the cytosol of bacteria is proposed.



## KANDUNGAN

	Muka Surat
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI SINGKATAN	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif Kajian	5
<b>BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Mycobacterium</i>	7
2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> KOMPLEKS	9
2.2.1 <i>Mycobacterium microti</i>	9
2.2.2 <i>Mycobacterium africanum</i>	10
2.2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.2.4 <i>Mycobacterium bovis</i>	13
2.2.5 <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	13
2.2.6 Perbandingan Genom antara <i>M. tuberculosis</i> Kompleks	15
2.3 TRANSDUKSI ISYARAT	21
2.4 FOSFORILASI DAN DEFOSFORILASI	24
2.5 PROTEIN KINASE	25
2.6 PROTEIN FOSFATASE	26





2.7	TRANSDUKSI ISYARAT DALAM PROKARIOT	27
2.7.1	Sistem Transduksi Isyarat Dua Komponen	28
2.7.2	Sistem Dua Komponen <i>M. tuberculosis</i> , <i>devR-devS</i>	30
2.8	PROTEIN KINASE SERINA/TREONINA (STPK)	32
2.9	STPK DALAM <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
2.10	PknJ	39
<b>BAB 3</b>	<b>METODOLOGI</b>	42
3.1	RUMUSAN CARTA ALIRAN PROTOKOL	43
3.2	PROTOKOL UMUM	44
3.2.1	Penyediaan Media Piring Kultur LB/Ampicillin/ Kloramfenikol	44
3.2.2	Penyediaan Sel Cepak <i>E. coli</i>	44
3.2.3	Miniprep Plasmid	44
3.3	PENKLOANAN <i>pknJ</i> DARIPADA pUC19 KE DALAM pET16b	46
3.3.1	Carta Aliran Protokol	46
3.3.2	Langkah-langkah	47
3.4	TRANSFORMASI pET16b- <i>pknJ</i> KE DALAM <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	51
3.4.1	Carta Aliran Protokol	51
3.5	PENGEKSPRESAN <i>pknJ</i> DALAM <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	52
3.5.1	Carta Aliran Protokol	52
3.5.2	Perangsangan IPTG	52
3.6	PENULENAN PknJ DI BAWAH KEADAAN TERNYAHASLI	53
3.6.1	Carta Aliran Protokol	53
3.6.2	Pengekstrakan PknJ	54
3.6.3	Penulenan dengan Kolum Ni-NTA	54
3.7	ANALISA SDS-PAGE	55
3.7.1	Carta Aliran Protokol	56
3.7.2	Langkah-langkah	56



3.8	PENENTUAN KEPEKATAN PknJ DENGAN KAEDAH BRADFORD	57
3.8.1	Carta Aliran Protokol	58
3.8.2	Langkah-langkah	58
3.9	ANALISA BIOINFOMATIK	59
<b>BAB 4</b>	<b>KEPUTUSAN</b>	60
4.1	PENKLOANAN <i>pknJ</i> KE DALAM VEKTOR PENGEKSPRESAN pET16b	60
4.2	ANALISA SUSUNAN ASID AMINO PknJ	61
4.3	PENGEKSPRESAN DAN PENULENAN PknJ	67
4.4	TABURAN PknJ DALAM SEL <i>Mycobacterium</i>	69
4.5	PENENTUAN KEPEKATAN PknJ DENGAN KAEDAH BRADFORD	70
<b>BAB 5</b>	<b>PERBINCANGAN</b>	74
5.1	PENGEKSPRESAN DAN PENULENAN PknJ	76
5.2	PENGHASILAN PROTEIN REKOMBINAN DENGAN SISTEM pET16b	78
5.3	CIRI-CIRI PROTEIN REKOMBINAN PknJ-His-tag	83
5.4	FUNGSI-FUNGSI PknJ	86
5.5	SISTEM TRANSDUKSI ISYARAT SEBAGAI SASARAN UBAT BARU	90
<b>BAB 6</b>	<b>KESIMPULAN</b>	93
	RUJUKAN	96
	LAMPIRAN	103



**SENARAI JADUAL**

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Ciri-ciri sebahagian mycobacteria	8
2.2 Projek-projek penyusunan genom mycobacteria	16
2.3 Bahagian berubah gen-gen terhilang	18
2.4 Rumusan ciri-ciri STPK <i>M. tuberculosis</i>	34
4.1 Pengumpulan data-data mengenai serapan cahaya bagi kepekatan protein BSA yang berlainan pada 595nm.	70
4.2 Pengumpulan data-data mengenai serapan cahaya pada 595nm protein PknJ pada peringkat elusi yang berlainan dalam kromatografi afiniti yang menggunakan kolum Ni-NTA.	72



## SENARAI RAJAH

No. Rajah		Muka Surat
2.1	Mikrograf elektron satu makrofaj alveolar terpencil daripada bronkolavaj dari seorang penyakit tuberculosis di Malawi.	11
2.2	Pengekspresan <i>mtrA</i> dalam makrofaj-makrofaj ditunjukkan dengan penyepaduan <i>mtrA-gfp</i> dan mikroskopi “epifluorescence”.	14
2.3	Peta-peta BAC <i>M. tuberculosis</i> H37Rv dan <i>M. bovis</i> BCG Pasteur yang telah disusun dan dilapiskan pada peta fizikal DraI <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	17
2.4	Ilustrasi skema laluan-laluan transduksi isyarat intraselular yang penting.	22
2.5	Elemen kitaran dalam sistem transduksi isyarat dua komponen bakteria.	29
2.6	Pemangkinan STPK terhadap pemindahan kumpulan fosfat daripada $\gamma$ -ATP kepada kumpulan hidroksil dalam residu-residu ser/thr protein.	32
2.7	Susunan 11 STPK <i>M. tuberculosis</i> dari domain Hanks VI kepada IX.	36
2.8	Analisa-analisa struktur 11 STPK <i>M. tuberculosis</i> .	37
4.1	Elektroforesis gel agarose 1%.	61
4.2	Analisa asid amino-asid amino dalam protein PknJ <i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2.	62
4.3	Analisa susunan asid amino-asid amino bagi protein PknJ dengan membandingkan PknJ dengan STPK organisma lain.	64 65
4.4	Komponen-komponen struktur utama dalam PknJ.	
4.5	Peramalan struktur $\alpha$ -heliks protein transmembran tunggal bagi PknJ di antara asid amino 343 hingga 361.	65





4.6	Gel poliakrilamida yang menunjukkan proses penulenan protein PknJ dengan menggunakan kolum Ni-NTA daripada ekstrak sel-sel <i>E. coli</i> di bawah keadaan denaturasi.	69
4.6	Keluk piawai yang menunjukkan graf linear bagi amaun protein melawan serapan cahaya pada 595nm (O.D. <sub>595nm</sub> ).	71
5.1	Peta plasmid pET16b.	79
5.2	Turutan pengekodan residu-residu asid amino lain di depan tapak pengklonan <i>XhoI</i> dan <i>NdeI</i> bagi <i>pknJ</i> termasuk residu histidina X10.	80
5.3	Susunan turutan asid amino-asid amino bagi protein rekombinan PknJ yang disepadukan dengan residu histidina.	80
5.4	Kumpulan imidasol histidina dan kumpulan =NH arginina yang dapat menerima proton.	84
5.5	Topologi protein transmembran PknJ.	84
5.6	Model 3D struktur domain pemangkinan PknJ.	85



## SENARAI SINGKATAN

°C	Darjah Celcius
%	Pearatus
μl	mikroliter
ml	mililiter
l	Liter
M	Molar
μg	mikrogram
mg	miligram
g	gram
rpm	Putaran per minit
SDS	Sodium duodesil sulfat
DMSO	Dimetil sulfoksida
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylenediamine
IPTG	Isopropiltio-β-D-galaktosida
Ni-NTA	Nikel-nitrilotriasetik
LB	Luria-Bertani
GDP	Guanosina difosfat
GTP	Guanosina trifosfat
ADP	Adenosina difosfat
ATP	Adenosina trifosfat
cAMP	Siklik adenosina monofosfat
Asp	Asid aspartik
Lys	Lisina
Ser	Serina
Thr	Treonina
STPK	Protein kinase serina/treonina
STPP	Protein fosfatase serina/treonina
HPK	Protein kinase histidina



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 PENGENALAN

Penyakit batuk kering (Tuberculosis, TB) merupakan masalah kesihatan global yang teruk dan melibatkan lebih daripada dua juta nyawa setiap tahun (WHO, 2000). Kes penjangkitan TB didapati telah meningkat akibat HIV yang berleluasa yang melemahkan sistem pertahanan badan manusia. Dengan itu, antibiotik-antibiotik yang telah dihasilkan mula kehilangan pengaruhnya terhadap TB dengan penahanan ubat berbilang, MDR (multi-drug-resistant).

Pada masa kini, vaksin hidup TB, BCG (*Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guérin) digunakan dengan luas dari abad lalu untuk menentang TB tetapi didapati vaksin ini mula kehilangan pengaruh atas melawan TB dan penjangkitan masih lagi tersebar secara berterusan (Fine, 1989). Vaksin BCG dibangunkan daripada *M. bovis* yang telah dilemahkan dan mempunyai hubungan kesamaan DNA 90% dengan *M. tuberculosis* (Behr *et al.* 1999; Gordon *et al.*,1999) dengan mutasi yang disebabkan kehilangan 16 bahagian pembacaan terbuka (ORF) dalam genom yang mengekod antigen T sel yang penting.



*M. tuberculosis* boleh terus hidup dalam perumah disebabkan berkebolehan menyekat kematangan fagosom, mengelakkan diri daripada fagolisosom dan membawa penggandaan bakteria intraselular. Patogenesis *M. tuberculosis* berkaitan rapat dengan kebolehnya untuk terus hidup dan replikasi dalam perumah. Dengan pemerhatian tersebut, satu soalan telah ditanya bahawa sistem apakah yang terlibat dalam patogen yang dapat menahan sistem pertahanan perumah?

Sebahagian bakteria yang patogenik menggunakan protein kinase untuk mengganggu rangkaian isyarat selular sel-sel perumah supaya menjamin bakteria hidup secara berterusan. Modifikasi post-translasi (sebelum translasi) protein melalui pemfosforilan enzimatik oleh protein kinase dan defosforilasi oleh protein fosfatase dapat menghasilkan isyarat-isyarat selular yang boleh ditransduksikan kepada pelbagai jenis kesan biologikal sama ada mengaktifkan atau menyekat aktiviti tertentu untuk tujuan mengawal proses metabolisme, pertumbuhan dan pembahagian sel, morfologi atau adaptasi organisma pada tahap keperluan yang sesuai dalam keadaan yang berbeza (Cohen, 1989).

Peranan sistem dua komponen dan serina/treonina protein kinase (STPK) dalam sistem transduksi isyarat mycobacteria virulen yang berterusan dalam perumah adalah penting untuk mengetahui sistem transduksi isyarat lalu digunakan sebagai idea membangunkan ubat antitubercular yang baru. Fosforilasi dan defosforilasi protein merupakan prinsip utama untuk menukar isyarat daripada sekeliling kepada tindak balas selular dalam prokariot dan eukariot.





Dalam bakteria, sistem dua komponen terdiri daripada pengesanan histidina kinase dan protein pengawalatur balasan tindakan yang memainkan peranan dalam fosforilasi pada residu-residu histidina dan asid aspartik. Manakala dalam sel eukariot pula, didapati STPK dan fosfoprotein fosfatase dapat memangkinkan proses fosforilasi dan defosforilasi pada residu-residu serina, treonina dan tirosina.

Walaupun bagaimanapun, STPK dan fosfatase telah dijumpai juga wujud dalam bakteria dengan analisis bioinformatik dan penyusunan genom (Zhang, 1996) termasuk *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) di mana penjumpaan 14 gen dalam genom *M. tuberculosis* yang mengekod serina/treonina protein kinase (STPK) dan fosfatase termasuk 11 gen STPK iaitu *pknA*, *pknB*, *pknD*, *pknE*, *pknF*, *pknG*, *pknH*, *pknI*, *pknJ*, *pknK* dan *pknL*, dan 1 serina/treonina protein fosfatase (STPP) iaitu *ppp*. Segmen-segmen gen tersebut boleh didapati dalam kedua-dua *M. tuberculosis* dan *M. bovis* BCG termasuk “strain” BCG pasteur 1173P2. Walaupun gen-gen yang mengekod STPK dan STPP telah dikenalpasti tetapi fungsi protein-protein tersebut masih tidak diketahui kecuali PknB.

Struktur krista satu STPK, PknB telah ditunjukkan terlibat dalam transduksi isyarat *M. tuberculosis* (Ortiz-Lombardia *et al.*, 2003). Pada masa kini, hanya satu laporan yang menggunakan isokuinolin dalam penyekatan aktiviti kinase dan pertumbuhan “mycobacteria” dan ini menunjukkan perencat protein kinase juga dapat digunakan sebagai agen penentang TB (Drews *et al.*, 2001).



Oleh itu, didapati bahawa sistem dua komponen, STPK dan fosfatase merupakan komponen-komponen penting dalam transduksi isyarat *M. tuberculosis*. Pelbagai pendekatan yang melibatkan bioinformatik, genetik, biokimia, sel dan biologi molekular, dan model binatang telah digunakan untuk mencirikan patobiologi *M. tuberculosis* (Jaya dan Deepak, 2004). Dengan itu, beberapa ramalan dapat ditimbangkan seperti STPK dan STPP mungkin memainkan peranan yang penting dalam membantu penjanaan, bertindak sebagai bahan perantaraan atau mengaktifkan enzim lain dalam sistem transduksi isyarat lain yang menyumbangkan kepada adaptasi terhadap perubahan sekeliling dalam sel perumah dan ciri-ciri patogenik *M. tuberculosis* secara langsung atau tidak langsung. Selain itu, STPK dan STPP *M. tuberculosis* juga mungkin boleh mengganggu sistem transduksi isyarat semasa menjangkit sel perumah untuk mengubah laluan transduksi isyarat atau keadaan sekeliling intraselular menjadi sesuai bagi pertumbuhan *M. tuberculosis* dan terus berhidup dalam perumah.

Dengan itu, pembelajaran terhadap analisis susunan, pengekspresan gen-gen yang mengekod STPK dan STPP, dan penyekatan STPK atau STPP dengan perencat mungkin dapat membangunkan ubat-ubat yang berkesan untuk menentang TB pada masa akan datang. Tetapi sebelum itu, beberapa soalan perlu dijawabkan terdahulu seperti apakah substrat-substrat yang dimangkinakan oleh STPK dan STPP? Adakah STPK dan STPP berinteraksi dalam sistem transduksi isyarat sel perumah?



## 1.2 OBJEKTIF KAJIAN

Protein kinase J, PknJ merupakan salah satu ahli serina/treonina protein kinase (STPK) yang terdapat pada *M. tuberculosis* dan juga *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2. Atas sebab ciri virulen *M. tuberculosis* yang merbahaya, pengkajian terhadap gen *pknJ* telah dijalankan dengan menggunakan *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 supaya mekanisme-mekanisme dan fungsi-fungsi dalam transduksi isyarat dalam *Mycobacterium* yang melibatkan STPK dapat dipelajari selanjutnya.

Sebelum ini, gen *pknJ* telah diklonkan dalam vektor amplifikasi pUC19 dan dibaca jujukan DNANYa. Projek ini meneruskan kajian awal di mana *pknJ* diklonkan daripada pUC19 ke dalam vektor pengekspresan pET16b dan kemudian menjalankan transformasi pET16b-*pknJ* ke dalam *E. coli* BL21(DE3)pLysS sebagai perumah pengekspresan *pknJ*.

Objektif yang seterusnya adalah untuk mengekspreskan *pknJ* yang telah ditransformasikan dalam *E. coli* BL21(DE3)pLysS dengan proses transkripsi dan translasi yang berikutan. Akhirnya, protein kinase rekombinan PknJ diekstrakkan daripada sel perumah *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Untuk mendapatkan PknJ yang tulen, kromatografi afiniti dijalankan untuk menuliskan PknJ yang terlabel dengan X10 His-tag dengan menggunakan kolum Ni-NTA. Sebahagian PknJ disamak dengan menjalankan SDS-PAGE. Selain itu, struktur, ciri-ciri dan fungsi-fungsi PknJ dapat diramalkan dengan menggunakan peralatan bioinformatik daripada laman web.





Sebagai ringkasan, objektif kajian ini adalah:

1. Mengklonkan *pknJ*-BCG ke dalam vektor pengekspresan pET16b
2. Mengekspresikan protein PknJ dalam *E. coli* BL21(DE3)pLysS.
3. Menuliskan protein rekombinan PknJ daripada *E. coli* BL21(DE3)pLysS.
4. Meramalkan dan mempelajari struktur, ciri-ciri dan fungsi-fungsi protein PknJ.





## BAB 2

### ULASAN PERPUSTAKAAN

#### 2.1 *Mycobacterium*

Robert Koch menjalankan penyelidikan penyakit kering (TB) pada tahun 1881 semasa satu pertujuh daripada kes kematian manusia disebabkan oleh TB. Genus *Mycobacterium* berjaya ditemui oleh Robert Koch dan seterusnya menunjukkan *Mycobacterium tuberculosis* merupakan agen penyebab tuberculosis pada tahun 1882 (Dietrich *et al.*, 2003). *Mycobacterium* adalah bakteria Gram-positif dengan peratusan GC yang tinggi dalam genomnya. Ia tidak dapat dilumurkan dengan cara biasa tetapi dengan pelumuran “acid-fastness” kerana sifat kewujudan komponen-komponen lipid unik yang dipanggil asid mikolik pada permukaan sel bermikobakteria. Pertumbuhan dalam “cord” menunjukkan kewujudan sifat lipid pada permukaan sel dan dikenali sebagai “cord factor”, iaitu glikolipid (Kolattukudy *et al.*, 1997).

Mycobacteria adalah berbentuk pleomorfik dan bertumbuh secara bercabang dan berfilamen. Secara umumnya, mycobacteria dapat dibezakan dalam dua kumpulan utama iaitu petumbuh lambat dan petumbuh cepat (Jadual 2.1). Mycobacteria biasa memerlukan nutrisi yang mudah. Pertumbuhan dapat berlaku dalam medium garam



mineral mudah dengan ammonium sebagai sumber nitrogen dan gliserol atau asetat sebagai sumber karbon dan penderma elektron yang diaramkan dalam keadaan aerobik.

Selain itu, sifat-sifat dan ciri-ciri *Mycobacterium* juga dapat dibezakan melalui kebolehan membentuk pigmen karotenoid kuning. Dengan pembentukan pigmen, mycobacteria dapat dikelaskan ke dalam tiga kumpulan iaitu tidak berpigmen seperti *Mycobacterium tuberculosis* dan *Mycobacterium bovis*, bersifat fotokromogenik yang hanya berpigmen sekiranya dikultur dalam keadaan bercahaya termasuk *Mycobacterium kansasii* dan *Mycobacterium marinum*, dan bersifat skotokromogenik juga berpigmen walaupun dikultur di bawah keadaan gelap dengan contoh sebagai *Mycobacterium gordonae* dan *Mycobacterium paraffinicum*.

Jadual 2.1 Ciri-ciri sebahagian mycobacteria. (Michael, John dan Jack, 2003)

	Spesies	Bertumbuh dalam 5% NaCl	Penurunan Nitrat	Bertumbuh pada 45 <sup>0</sup> C	Patogen Manusia	Pembentukan Pigmen
Petumbuh Lambat	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	-	+	Tiada
	<i>M. avium</i>	-	-	-	+	Pigmen pada koloni lama
	<i>M. bovis</i>	-	-	+	+	Tiada

	<i>M. kansasii</i>	-	+	-	+	Foto-kromogenik
Petumbuh Cepat	<i>M. smegmatis</i>	+	+	+	-	Tiada
	<i>M. phlei</i>	+	+	+	-	Pigmen
	<i>M. chelonae</i>	+	-	-	+	Tiada
	<i>M. parafortuitum</i>	+	+	-	-	Foto-kromogenik

## 2.2 *Mycobacterium tuberculosis* KOMPLEKS

*M. tuberculosis* kompleks terdiri daripada beberapa sub-spesies yang dapat menyebabkan TB mamalia di mana semuanya bertumbuh dengan perlahan dan mempunyai kesamaan lebih daripada 99.95% dalam tahap nukleotida dan analisa genetik (Sreevatsan *et al.*, 1997). *M. tuberculosis* kompleks terdiri daripada *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* dan *M. bovis* BCG dan sub-spesies ini menjalani adaptasi dalam perumah yang berlainan dan memiliki darjah pembezaan yang luas dalam sifat patogenik terhadap manusia.

### 2.2.1 *Mycobacterium microti*

*M. microti* pada asalnya dipencilkan daripada sejenis haiwan “vole” yang menyerupai tikus United Kingdom dalam tahun 1930 dan menyebabkan TB dalam “rodensia”



(Wells dan Oxon, 1937). Beberapa jenis *M. microti* daripada keturunan yang berbeza telah dipencilkan dan tidak bersifat virulen terhadap manusia dan bovin yang menyerupai lembu.

### **2.2.2 *Mycobacterium africanum***

*M. africanum* mempunyai hubungan yang sangat rapat kepada *M. tuberculosis* yang dipencilkan daripada penyakit-penyakit dari Afrika. Fenotip *M. africanum* wujud antara *M. bovis* dan *M. tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2000).

### **2.2.3 *Mycobacterium tuberculosis***

*Mycobacterium tuberculosis* yang merupakan agen penyebab TB, sesuatu penjangkitan kronik yang terlibat dengan seramai dua juta kes setiap tahun di seluruh dunia. *M. tuberculosis* memerlukan masa generasi sebanyak 24 jam dalam kultur *in vitro*. *M. tuberculosis* memerlukan masa generasi yang terlalu panjang sehingga dua minggu atau lebih dalam binatang terjangkit secara eksperimen. Oleh itu, *M. tuberculosis* dapat bersifat dorman dalam sel perumah termasuk juga makrofaj dan membahagi dalam sel vakuol perumah sehingga keadaan adalah sesuai untuk merebak dalam sel tersebut (Rajah 2.1).





## RUJUKAN

- Alex, L.A. dan Simon, M.I., 1994. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.* **10**, 133-138.
- Andersen, P., 2001. Review: TB vaccines: progress and problems. *TRENDS in Immunology* **22**(3).
- Av-Gay, Y. dan Everett, M., 2000. The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* **8**, 238-244.
- Bakal, C.J. dan Davies, J.E., 2000. No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. *Trends Cell Biol.* **10**, 32-38.
- Behr, M. A., Wilson, M. A., Gill, W. P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S. dan Small, P. M., 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**, 1520-1523.
- Bloom, B.R. dan Fine, P.E.M., 1994. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington (DC): *American Society for Microbiology*. p. 531-57.
- Bohmann, D., 1990. Transcription factor phosphorylation: a link between signals transduction and the regulation of gene expression. *Cancer Cells* **2**, 337-344.
- Boitel, B., Ortiz-Lombardia, M., Duran, R., Pompeo, F., Cole, S.T., Cervenansky, C. dan Alzari, P.M., 2003. PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **49**(6), 1493-1508.
- Bork, P., Brown, N.P., Hegyi, H. dan Schultz, J., 1996. The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues, *Protein Sci.* **5**, 1421-1425.
- Brian J. B. dan Valerie D., 2003. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *PNAS* **100**(9), 5142-5147.
- Brosch, R., Gorgan, S.V., Pym, A., Eiglmeier, K., Garnier, T. dan Cole, S.T., 2000. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 143-152.



- Calmette, A., Guerin, C., Negre, L. dan Bocquet, A., 1927. Sur la vaccination preventive des enfants nouveau-nés contre la tuberculose par le BCG. *Ann Inst Pasteur* **3**,201.
- Chaba, R., Raje, M. dan Chakraborti, P.K. 2002. Evidences that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1078–1085.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. dan Meyerowitz, E.M., 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR-1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544.
- Chater, K.F., 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* **47**, 97-125.
- Clemens, D.L., 1996. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Trends Microbiol.* **4**, 113–118.
- Cohen, P., 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review Biochemistry* **58**, 453–508.
- Cohen, P., 1991. Classification of protein serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods in Enzymology* **201**, 389–408.
- Cohen, P., Chen, M. dan Armstrong, C. Novel protein phosphatases that may participate in cell signaling. In: Hikada H, Nairn A, editors, 1996. *Advances in Pharmacology: Intracellular Signal Transduction*. Boston: *Acadademic Press*. p. 67–89.
- Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S., Wilson, M.E., Burdick, E., Fineberg, H.V., *et al.*, 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* **271**, 698–702.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T.S., Gentles, N., Hamlin, S., Holroyd, T., Hornsby, K., Jagels, Krogh, A., Mclean, J., Moule, J., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, dan Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544.





- Cole, S. T. dan Saint-Girons, I., 1999. Bacterial genomes – all shapes and sizes. In: Organization of the prokaryotic genome. Charlebois, R. I. (ed.), *American Society for Microbiology*, Washington DC. pp. 35-62.
- Cozzone., A.J., 1997. Diversity and Specificity of Protein-Phosphorylating Systems in Bacteria. *Folia Microbiol.* **42**(3), 165-170.
- Dasgupta, N., Kapur, V., Singh, K.K., Das, T.K., Sachdeva, S., Jyothisri, K. dan Tyagi, J.S., 2000. Characterization of a two-component system, devR-devS of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tubercle Lung Diseases* **80**, 141–159.
- Dietrich, G., Viret, J.F. dan Hess, J., 2003. *Mycobacterium bovis* BCG-based vaccines against tuberculosis: novel developments. *Vaccine* **21**, 667–670.
- Domenech, P., Barry II, C.E. dan Cole, S.T., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Current Opinion in Microbiology* **4**, 28–34.
- Drews, S. J., Hung, F. dan Av-Gay, Y., 2001. A protein kinase inhibitor as an antimycobacterial agent. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**, 369–374.
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M. dan Pieters, J., 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* **97**, 435–447.
- Fine, P.E., 1989. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev. Infect. Dis.* **11**(Suppl. 2), S353–S359
- Fine, P.E.M., 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* **346**, 1339-1345.
- Fine, P.E.M., Carneira, I.A.M., Milstien, J.B. dan Clements, C.J., 1999. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. Geneva: World Health Organization.
- Francesco V., Bhupinder M. dan Kim S., 1998. Effect of the Protein Denaturants Urea and Guanidinium on Water Structure: A Structural and Thermodynamic Study. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10748-10753.
- Galyov, E.E., Hakansson, S., Forsberg, A. and Wolf-Watz, H., 1993. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**, 730-732.
- Gercken, J., Pryjma, J. dan Ernst, M., 1994. Defective antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect. Immun.* **62**, 3472–3478.



- Gheorghiu, M., Augier, M. dan Lagrange, P.H., 1983. Maintenance and control of the French BCG strain 1173P2 (primary and secondary seed-lots). *Bull Inst Pasteur* **83**, 281–288.
- Gonzalez, G., Menzel, P., Leonard, J., Fischer, W. dan Montminy, M., 1991. Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP responsive transcription factor CREB. *Molecular Cell Biology* **11**, 1306–12.
- Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K. dan Cole, S.T., 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* **32**, 643–655.
- Hakansson, S., Galyov, E.E., Rosqvist, R. dan Wolf-Watz, H., 1996. The Yersinia YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol. Microbiol.* **20**, 593–603.
- Hanks, S.K. dan Hunter, T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576–596.
- Hanks, S. dan Quinn, A.M., 1991. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* **200**, 38–62.
- Hanlon, W. A., Inouye, M. dan Inouye, S., 1997. Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **23**, 459–471.
- Helleday, T., 1998. Session 1: Signal transduction. *Toxicology in Vitro* **12**, 519–522.
- Hua, J., Sakai, H. dan Meyerowitz, E.M., 1997. The ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. In: A.K. Kanellis, C. Chang, H Kende, D Grierson, eds, *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands, pp 71–76.
- Hunter, T., 1995. Protein kinases and phosphatases. The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225–36.
- Jaya S.T. dan Deepak S., 2004. Special Section: Tuberculosis: Signal transduction systems of mycobacteria with special reference to *M. tuberculosis*. *Current Science* **86**(1).
- Kemp, B.R. dan Pearson, R.B., 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Elsevier Science Publishers Ltd*, (UK) 342–346.





- Kennelly, P. J., dan Potts., M., 1996. Fancy meeting you here! A fresh look at prokaryotic' protein phosphorylation. *J. Bacteriol.* **178**, 4759–4764.
- Kolattukudy, P.E., Fernandes, N.D., Azad, A. K., Fitzmaurice, A.M. dan Sirakova., T.D., 1997. (MicroReview) Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Molecular Microbiology* **24**(2), 263-270.
- Koul, A., Choidas, A., Tyagi, A.K., Drlica, K., Singh, Y. dan Ullrich, A., 2001. Serine/ threonine protein kinases PknF and PknG of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization and localization. *Microbiology* **147**, 2307–2314.
- Lamichhane, G., Zignol, M., Blades, N.J., Geiman, D.E., Dougherty, A., Grosset, J., Broman, K.W. dan Bishai, W.R., 2003. A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A)* **100**, 7213–7218.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. dan Parker, J., 2003. *International Edition: Brock biology of microorganisms*. Ed. ke-10. Pearson Education, USA, 415.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. dan Saito, H., 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242-245.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C. dan Stover, C.K., 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178**, 1274-1282.
- Matsumoto, A., Hong, S.K., Ishizuka, H., Horinouchi, S. dan Beppu, T., 1994. Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**, 47-56.
- Nadvornik, R., Vomastek, T., Janecek, J., Technikova, Z. dan Branny, P., 1999. Pkg2, a novel transmembrane protein Ser/Thr kinase of *Streptomyces granaticolor*. *J. Bacteriol.* **181**, 15–23.
- Nishizuka, Y., 1992. Signal transduction: crosstalk. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 367-443.
- Oettinger, T., Jorgensen, M., Ladefoged, A., Haslov, K. dan Andersen, P. 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and Lung Disease* **79**(4), 243–250
- Ortiz-Lombardia, M., Pompeo, F., Boitel, B. dan Alzari, P. M., 2003. Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **278**, 13094–13100.



- Parkinson, J.S., 1993. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**, 857–871.
- Parkinson, J. S. dan Kofoid., E., 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71–112.
- Philipp, W. J, Nair, S., Guglielmi, G., Lagranderie, M., Gicquel, B. dan Cole, S. T., 1996. Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and from *M. bovis*. *Microbiology* **142**(11), 3135-3145.
- Rousseau, F. J., Schymkowitz, W. H., Sanchez del Pino, M. dan Itzhaki., L. S., 1998. Stability and Folding of the Cell Cycle Regulatory Protein, p13suc1. *J. Mol. Biol.* **284**, 503-519.
- Russell, D.G., Mwandumba, H.C. dan Rhoades, E.E., 2002. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *The Journal of Cell Biology* **158**(3), 421–426.
- Sharma, K., Chandra, H., Gupta, P.K., Pathak, M., Narayan, A., Meena, L.S., D'Souza, R.C.J., Chopra, P., Ramachandran, S. dan Singh, Y., 2004. PknH, a transmembrane Hank's type serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis* is differentially expressed under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters* **233**, 107–113
- Saier, M. H., Wu, Jr, L-F. dan Reizer, J., 1990. Regulation of bacterial physiological processes by three types of protein phosphorylating systems. *Elsevier Science Publishers Ltd. (UK)* **0376**, 5076/90.
- Shenolikar, S., 1998. Protein phosphorylation: hormones, drugs and bioregulation. *FASEB Journal* **2**, 2753–64.
- Sibley, L. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J. dan Krahenbuhl, J. L., 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* **56**, 1232-1236.
- Shimkets, L.J., 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **54**, 473-501.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S. dan Musser, J.M., 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **94**(18), 9869-9874.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. dan Stock, A. M., 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**, 450-490.





- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H. dan Chakraborty, P. *et al.*, 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**, 678–681.
- Treuner-Lange, A., Ward, M.J. dan Zusman, D.R., 2001. Pph1 from *Myxococcus xanthus* is a protein phosphatase involved in vegetative growth and development. *Mol. Microbiol.* **40**, 126–140.
- Triccas, J.A. dan Gicquel, B., 2000. Special Feature: Life on the inside: Probing *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during infection. *Immunology and Cell Biology* **78**, 311–317.
- Udo, H. Munoz-Dorado, J., Inouye, M. dan Inouye, S., 1995. *Myxococcus xanthus*, a Gram-negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of  $\beta$ -lactamase by phosphorylation. *Genes Dev* **9**, 972-983.
- Umeyama, T., Lee, P.C. dan Horinouchi, S., 2002. Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 419–425.
- Wang, J., S. Lory, R. Ramphal dan S. Jin, 1996. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* genes inducible by respiratory mucus derived from cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* **22**, 1005–1012.
- Wells, A.Q. dan Oxon D.M., 1937. Tuberculosis in wild voles. *Lancet* 1221.
- Williamson, M.P., 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**, 249–260.
- World Health Organization, 2000. Tuberculosis. Fact Sheet No. 104, WHO (<http://www.who.org>)
- Zahrt, T.C. dan Deretic, V., 2000. An Essential Two-Component Signal Transduction System in *Mycobacterium tuberculosis*. American Society for Microbiology: *Journal Of Bacteriology* **182**(13), 3832–3838.
- Zhang, C.C., 1996. MicroReview: Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Molecular Microbiology* **20**(1), 9-15.
- Zhang, C.C. dan Libs, L., 1998. Cloning and characterization of the *pknD* gene encoding an eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 26-33.

