

## ESOCINASI DI TIPO I BOVINA: SEQUENZA DEL cDNA INTERO E CARATTERIZZAZIONE DELL'ENZIMA RICOMBINANTE

Andreoni F. (1), Serafini G. (2), Laguardia M.E. (2), Magnani M. (1,2)

(1) Centro di Biotecnologie - Università di Urbino – Via Campanella, 61032 Fano, Italia

(2) Istituto di Chimica Biologica - Università di Urbino – Via Saffi, 61029 Urbino, Italia

**RIASSUNTO** - Questo studio descrive l'isolamento del cDNA completo dell'esocinasi di tipo I (HKI) da un bovino di razza Marchigiana. Il lavoro nasce dall'osservazione di discordanze tra la sequenza dell'HKI bovina pubblicata (numero di accesso alla GenBank M65140) e una porzione del gene dell'HKI bovina studiata. Poiché questi dati sono stati confermati in ventisei bovini appartenenti a sette razze diverse, è stata risequenziata l'intera regione codificante del cDNA dell'HKI bovina e sono state isolate le estremità mediante RACE. Questa sequenza, quando comparata con quella pubblicata evidenziava un elevato numero di disappaiamenti alcuni dei quali corrispondenti a sostituzioni aminoacidiche. La sequenza del cDNA dell'HKI bovina rivista è lunga 3619 bp e codifica per una proteina di 917 aminoacidi. L'espressione dell'enzima intero ricombinante dimostra che la sequenza isolata codifica per un'esocinasi cataliticamente attiva.

**PAROLE CHIAVE:** Bovini, Ricombinazione hexokinase tipo I, Proprietà cinetiche.

### INTRODUZIONE

L'esocinasi (HK; ATP: D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1) catalizza la prima tappa della glicolisi, utilizzando MgATP per la fosforilazione del glucosio a glucosio 6-fosfato (Glc 6-P). Le cellule di mammifero esprimono quattro diversi isoenzimi dell'esocinasi, HKI-IV, i quali differiscono per la distribuzione tissutale e le proprietà cinetiche. L'HKI-III hanno un peso molecolare di circa 100 kDa, mentre l'HKIV o glucocinasi è un enzima di 50 kDa. Si ipotizza che gli isoenzimi HKI-III di mammifero si siano originati nel corso dell'evoluzione mediante un processo di duplicazione e fusione di un gene codificante un'HK ancestrale da 50 kDa (Wilson, 1995). L'HKI è espressa ubiquitariamente nei tessuti di mammifero ed in particolare gioca un ruolo fondamentale in tessuti glucosio-dipendenti, quali il cervello. L'HKI è inibita da concentrazioni fisiologiche di Glc 6-P (il prodotto di reazione) e glucosio 1,6 bifosfato (Glc 1,6-P<sub>2</sub>). La funzione catalitica dell'HKI è associata esclusivamente al dominio C-terminale, mentre il dominio N-terminale svolge funzioni di regolazione (Bianchi *et al.*, 1998). Attualmente è nota la struttura del gene l'HKI di ratto (White & Wilson, 1997) e umana (Ruzzo *et al.*, 1998). Il gene dell'HKI umana è lungo più di 100 kb ed è costituito da 25 esoni, dei quali 6 specifici delle cellule testicolari e 1 delle cellule eritroidi (Andreoni *et al.*, 2000). Il gene codifica trascritti multipli che sono generati da 'splicing' alternativo di esoni al 5' differenti. Relativamente all'HKI bovina è stata riportata precedentemente la sequenza della regione codificante (Griffin *et al.*, 1991). Poiché sono state osservate differenze tra la sequenza pubblicata ed una porzione del gene dell'HKI bovina, questo lavoro descrive l'isolamento dell'intero cDNA da un bovino di razza Marchigiana. Al fine di dimostrare che l'mRNA isolato codifica per un enzima cataliticamente attivo, è stato ottenuto e caratterizzato l'enzima ricombinate.

### MATERIALI E METODI

Una regione del gene dell'HKI è stata isolata mediante PCR, amplificando 100 ng di DNA genomico con i primers HK30 senso e HK31 antisenso, complementari a sequenze codificanti del gene dell'HKI umana, entrambi con un disappaiamento con il cDNA dell'HKI bovina (Griffin *et al.*, 1991). La PCR è stata condotta per 40 cicli ad una temperatura di annealing di 60°C ed un'estensione a 72°C con GeneAmp PCR Reagent kit. Il prodotto di PCR di 1,9 kb è

stato purificato e sequenziato direttamente con ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit sul sequenziatore automatizzato ABI 310 (Applied Biosystems). L'RNA totale è stato purificato con il TRIzol LS (Invitrogen Life Technologies) da cervello di un bovino di razza Marchigiana. Il cDNA dell'HKI bovina è stato isolato mediante 3 diverse 'one-step RT-PCR' (Qiagen), utilizzando 100 ng di RNA totale come stampo per la sintesi del cDNA e primers specifici per l'HKI bovina. Le 5' e 3'UTR sono state isolate mediante 'step-out RACE'.

L'HKI bovina è stata espressa come proteina ricombinate in cellule di *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) usando il sistema pET (Novagen). L'intera sequenza codificante dell'HKI bovina è stata isolata per amplificazione del cDNA usando la polimerasi *pfu* (Promega) con i primers HK20b senso (5'-AGCCCTCAACCGCCCATATGATCGCCGCGCAGC-3') e HK21b antisense (5'-CAGGCTGGGGGTCAGGATCCTTAGCTGCTCATTTC-3') degenerati al fine d'introdurre i siti di restrizione NdeI e BamHI rispettivamente ai nt 116 e 2872 (GenBank AF542053). La digestione del prodotto di PCR di 2791 bp ha dato 2 frammenti (al 5' di 318 bp NdeI/NdeI e al 3' 2438 bp NdeI/BamHI) che sono stati clonati in fasi successive nel vettore d'espressione pET-3a. Gli esperimenti di espressione e purificazione dell'enzima ricombinate sono stati condotti seguendo il protocollo ottimizzato per l'HKI umana (Bianchi *et al.*, 1996).

## DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Sulla base della struttura del gene dell'HKI umana e l'elevata omologia tra i cDNA dell'HKI umana e bovina è stato studiato il gene dell'HKI bovina. E' stato isolato un frammento che conteneva un introne di 1,7 kb, corrispondente all'introne 12 del gene umano, fiancheggiato da sequenze esoniche (GenBank AF309638-AF309639). L'allineamento delle sequenze codificanti (116 bp) ottenute da un campione di razza bovina Marchigiana con il cDNA dell'HKI precedentemente pubblicato (nt 1788-1903) ha evidenziato 18 disappaiamenti, 2 delle quali portano a sostituzioni aminoacidiche: aa 607 Gln → Lys e aa 634 Val → Ala. Allo scopo di chiarire se le differenze osservate rappresentassero dei polimorfismi, utili per la caratterizzazione delle razze bovine, questa regione dell'HKI è stata studiata in altri 26 campioni bovini appartenenti a 7 razze diverse (Marchigiana, Frisona Italiana, Limousine, Charolaise, Pezzata Rossa Italiana, Chianina e Bruna Alpina Italiana). Tutte le sequenze analizzate mostravano le stesse differenze rispetto al cDNA dell'HKI pubblicata cosicché l'ipotesi della presenza di polimorfismi in questa regione del gene dell'HKI è stata esclusa. I risultati ottenuti dall'analisi genomica hanno portato ad isolare e rifequenziare l'intera regione codificante del cDNA dell'HKI partendo da un campione di razza bovina Marchigiana. Sono stati isolati e sequenziati 3 frammenti sovrapposti che coprivano quasi interamente la regione codificante l'HKI bovina e sono state identificate le 5' e 3'UTR, ottenendo così la sequenza completa del cDNA dell'HKI. Questa risulta lunga 3619 bp e contiene una ORF predetta di 2751 bp codificante una proteina di 917 bp (GenBank AF542053). L'allineamento della sequenza dell'HKI isolata con quella precedentemente pubblicata ha evidenziato 348 disappaiamenti corrispondenti a 88 sostituzioni aminoacidiche (Fig. 1). La sequenza isolata in questo lavoro mostra un'elevata omologia quando comparata con altre HKI disponibili in GenBank ed un'elevata conservazione a livello dei domini di legame funzionali. Per dimostrare che il cDNA isolato codifica per un'HKI cataliticamente attiva ed escludere uno pseudogene l'HKI intera è stata espressa in cellule batteriche. La determinazione dell'attività specifica dell'HKI in lisati batterici ha rivelato che l'HKI intera è espressa in cellule batteriche in forma solubile e cataliticamente attiva (attività specifica di  $1,44 \pm 0,10$  U·mg<sup>-1</sup> di proteina). L'HKI intera ricombinante è stata purificata (purezza >90%) allo scopo di caratterizzarne le proprietà cinetiche e regolatorie (Tab. 1). Questi risultati indicano che l'HKI può essere assimilata agli isoenzimi di tipo I umano e di ratto, supportando ulteriormente l'evidenza che l'enzima che abbiamo clonato ed espresso è maggiormente conservato di quanto precedentemente osservato sulla base di una sequenza pubblicata non corretta.

Figura 1 – Comparazione delle sequenze aminoacidiche dedotte dell'HKI bovina.

Figure 1 – Comparison of the deduced amino acid sequences of bovine HKI.

AF542053	1	MIAAQLLAY	FTELKDDQVK	KIDKYLYAMR	LSDETLDDIM	NRFKKEMKNG	LSRDFNPTAT	60
M65140	1	MIAAQLLAY	FTELKDDQVK	KIDKYLYAMR	LSDETLDDIM	NRFKKEMKNG	LSRDFNPTAT	60
AF542053	61	VKMLPTFFVRS	IPDGSEKGF	IALDLGGSSF	RILRVQVNHE	QNCAVHMESE	VYDTPENIMH	120
M65140	61	VKMLPTFFVRS	IPDGSEKGF	IALDLGGSSF	RILRVQVNHE	QNEPVMHMESE	VYDTPENIMH	120
AF542053	121	GSQSQLFQDHV	AECLGDFMEK	KKIKDKKLPV	GFTFSFPCRQ	SRIIDEAILIT	WTKRFKASGV	180
M65140	121	GSQSQLFQDHV	LECLGDFMEK	KKIKDKKLPV	GFTFSFPCRQ	SRIIDQAILIT	WTKRFKARGA	180
AF542053	181	EGTDVVKLLD	KAIKKRGDYD	ANIVAVVNDT	VGTMVTCGYD	DOQCEVGLII	GTGTNACYME	240
M65140	181	EGNYVVKLLD	KAIKKRGDYD	ANIVAVVNDT	VGTMVDCGYD	DQHCCEVGLII	GTGTNACYME	240
AF542053	241	ELRHIDLVEG	DEGRMCVNT	WGAFGDDGSL	EDIRTEFDRE	IDRGS LNPGK	QIFEKMVSGM	300
M65140	241	ELRQIDFGWG	DDGRMCVNT	WGLDGDGSL	EDIRKEFDRE	FRRGS LNPGK	QRFEKMVSGR	300
AF542053	301	YLGELVRLFL	VKMAKEGLLF	EGRITPELLT	RGKFNTSDVS	AIEKNKEGLH	NAKEILTRLG	360
M65140	301	YMEDVVRLLV	VKMAKEGLLF	EGRITPELLT	RGKFNTSDVS	AIEKDKKEGLH	NAKEILTRLG	360
AF542053	361	VEPSDDDCVA	VQHVTIVSF	RSANLVAATL	GAILSRRLRDN	KSTPRLRRTV	GVDGSLYKTH	420
M65140	361	VERSDDDCVS	VQHVTIVSF	RSANLVAATL	GAILNRLRDN	KSTPRLRRTV	RVDGSLYKTH	420
AF542053	421	PQYSRRFHKT	LRRLVPCDV	RFLLESSESG	KGAAMVTAVA	YRLAEQHRQI	EETLAHFSLT	480
M65140	421	PQYSRRFHKT	LRRLVPCDV	RFLLESSESG	KGAAMVTAVA	YRLAEQHRQI	EETLAHFRLS	480
AF542053	481	KEMLTEVKKR	MRAEMETGLG	KOTLIDKAVVK	MLPSFVRSITP	DGTENGDFLA	LDLGGTNFRV	540
M65140	481	KOTLIEVKKR	LRTEMEMGLR	KETNSNATVN	MLPSFLRSITP	DGTEDGDFLA	LDLGGTNFRV	540
AF542053	541	LLVKIRSGKK	RSVEMHNKIY	AIPIEIMQGT	GEELFDHIVS	CISDFLDYMG	IKGPKMPLGF	600
M65140	541	LLVKIRSGKK	STVEMHNKIY	RIPIEIMQGT	GEELFDHIVS	CISDFLDYMG	IKGPKMPLGF	600
AF542053	601	TFSFPCQOTS	LDAGILITWT	KGFATDCVG	HDVATLLRDA	TKRREEFDLD	VVAVVNDTVG	660
M65140	601	TFSFPCQOTS	LDAGILITWT	KGFATDCVG	HDVVTLRDA	VKRREEFDLD	VVAVVNDTVG	660
AF542053	661	TMMTCAYEEP	TCEVGLIVGT	GSNACYMEEM	KNVETLEGNO	QMCINMEWG	AFGDNGCDD	720
M65140	661	TMMTCAYEEP	TCEVGLIVGT	GSNACYMEEM	KNVEMVEGNO	QMCINMEWG	AFGDNGCDD	720
AF542053	721	IRTIYDKLVD	EFSLNSGKQR	YEKMISGMYL	GEIVRNILID	FAKRGFLFRG	QISEPLKTRG	780
M65140	721	IRTDIDKVVVD	EYSLNSGNQR	FENMISGMYL	GEIVRNILID	FTRKRGFLFRG	QISEPLKTRG	780
AF542053	781	IFOTKMLSQI	ESDRLALLQV	RAILQQLGLN	STCDDSIIVK	TVCGVVS KRA	AQLCGAGMAA	840
M65140	781	IFETKMLSQI	ESDRLALLQV	RAILQQLGLN	STCDDSIIVK	TVCGVVS KRA	AQLCGAGMAA	840
AF542053	841	VVDKIRENRG	LDRLNVTVG	DGTLYKLHPQ	FSRIMHQTVK	ELSPKCNVSF	LLEDGSGGKG	900
M65140	841	VVDKIRENRG	LDRLNVTVG	DGTLYKLHPQ	FSRIMHQTVK	ELSPKCNVSF	LLEDGSGGKG	900
AF542053	901	AALITAVGVR	LRQEMS~S	917				
M65140	901	AALITAVGVR	LRGESAIS	918				

■ simili/similar  
■ differenti/different

AF542053 questo studio; *this study*  
M65140 (Griffin *et al.*, 1991)

Tabella 1 – Proprietà cinetiche dell'esocinasi I ricombinante in differenti specie di mammifero  
Table 1 – Kinetic properties of recombinant hexokinase I from different mammalian species.

Esocinasi I Hexokinase I	$K_m$ for MgATP (mM)	$K_m$ for glucose ( $\mu$ M)	$K_i$ for Glc 6-P ( $\mu$ M)	$K_i$ for Glc 1,6-P <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	$K_i$ for 1,5-AnG-6-P ( $\mu$ M)
HKI bovina/ <i>bovine HKI</i>	0.67 ± 0.10	72.0 ± 4.8	44.5 ± 4.5	36.0 ± 3.5	
HKI umana/ <i>human HKI</i>	1.40 ± 0.20	64.5 ± 6.0	28.5 ± 3.0	54.0 ± 5.1	
HKI di topo/ <i>mouse HKI</i>	1.02	58			88
HKI di ratto/ <i>rat HKI</i>	0.43 ± 0.07	53 ± 16			50

## BIBLIOGRAFIA- REFERENCES

- Andreoni F., Ruzzo A., Magnani M. 2000., *Biochim. Biophys. Acta* 1493: 19-26.
- Bianchi M., Serafini G., Corsi D., Magnani M. 1996., *Protein Expr. Purif.* 7: 58-66.
- Bianchi M., Serafini G., Bartolucci E., Giammarini C., Magnani M. 1998., *Mol. Cell. Biochem.* 189: 185-193.
- Griffin L.D., Gelb B.D., Wheeler D.A., Davison D., Adams V., McCabe E.R. 1991., *Genomics* 11: 1014-1024.
- Ruzzo A., Andreoni F., Magnani M. 1998., *Biochem. J.* 331: 607-613.
- White J.A. & Wilson J.E. 1997., *Arch. Biochem. Biophys.* 343: 207-214.
- Wilson J.E. 1995., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 126: 65-198.

## **BOVINE HEXOKINASE TYPE I: FULL-LENGTH cDNA SEQUENCE AND CHARACTERISATION OF THE RECOMBINANT ENZYME**

**Andreoni F. (1), Serafini G. (2), Laguardia M.E. (2), Magnani M. (1,2)**

**ABSTRACT** - This study reports the isolation of the full-length cDNA sequence of bovine hexokinase type I (HKI) obtained from Marchigiana breed. This work arises from the observation of dissimilarities between the published bovine HKI coding sequence (GenBank accession no. M65140) and an analysed portion of bovine HKI gene. Since the data have been confirmed in an additional twenty-six cattle of seven different breeds, the entire open reading frame of bovine HKI cDNA has been re-sequenced and the ends of cDNA isolated by RACE. The coding sequences, when compared with the published bovine HKI, contained a large number of mismatches that lead to changes in the resulting amino acid sequence. The revisions result in a HKI cDNA of 3619 bp that encodes a protein of 917 amino acids. The expression of the recombinant full-length enzyme demonstrated that the isolated sequence encodes for a catalytically active hexokinase.

**KEYWORDS:** Bovine, recombinant hexokinase type I, kinetic properties.

### **INTRODUCTION**

Hexokinase (HK; ATP: D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1) commits glucose to catabolism by catalysing its phosphorylation to glucose 6-phosphate (Glc 6-P) with MgATP as the phosphate donor. In mammals, there are four isoenzymes of hexokinase, HKI-IV, which vary in their tissue distribution and kinetic properties. HKI-III have a similar molecular mass (approximately 100 kDa), whereas HKIV or glucokinase is a single chain 50 kDa enzyme. Mammalian HKI-III isoenzymes are thought to have evolved through duplication and fusion of an ancestral gene encoding a 50 kDa hexokinase (Wilson, 1995). HKI isoenzyme is expressed in virtually all tissues and in particular plays a fundamental role in glucose-dependent tissues such as brain. HKI is inhibited by physiological concentrations of glucose 6-phosphate (the reaction product) and glucose 1,6-bisphosphate (Glc 1,6-P<sub>2</sub>). The catalytic function of HKI resides solely in the C-terminal domain, which binds glucose and the product Glc 6-P at distinct, neighbouring sites, whereas the N-terminal half serves regulatory functions (Bianchi *et al.*, 1998).

The structure of the genes encoding the rat (White & Wilson, 1997) and human (Ruzzo *et al.*, 1998) type I isoenzymes is known. Human HKI gene spans more than 100 kb and consists of 25 exons, which include 6 testis- and 1 erythroid-specific exons (Andreoni *et al.*, 2000). The gene encodes multiple transcripts that are generated by alternative splicing of different 5' exons.

The sequence of the coding region of bovine HKI has been reported previously (Griffin *et al.*, 1991). Since dissimilarities have been observed between the published sequence and an analysed portion of bovine hexokinase type I gene, the present paper reports the isolation of the full-length bovine cDNA including the 5' and 3' untranslated regions from Marchigiana breed. To demonstrate that the isolated mRNA encodes for a catalytically active enzyme, the recombinant protein was produced and characterised.

### **MATERIALS AND METHODS**

A portion of the bovine HKI gene was isolated by PCR amplification. 100 ng of genomic DNA was amplified using HK30 forward and HK31 reverse primers, complementary to the human HKI coding sequences (Ruzzo *et al.*, 1998), each having one mismatch with bovine HKI cDNA (Griffin *et al.*, 1991). PCR was carried out using an annealing temperature of 60°C and an extension temperature of 72°C for 40 cycles with the GeneAMP PCR Reagent kit (1.5 mM

MgCl<sub>2</sub>, 1 U of AmpliTaq). The 1.9 kb PCR product was gel-purified and direct sequenced using the ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit on the automated ABI 310 sequencer (Applied Biosystems).

Total RNA was isolated from bovine brain belonging to Marchigiana breed using TRIzol LS Reagent (Invitrogen Life Technologies). Three PCR amplifications of bovine HKI mRNA were performed, using the One-Step Reverse-Transcription PCR kit (Qiagen) with 100 ng of total RNA as a template for cDNA synthesis with bovine HKI specific primers. The 5'UTR and the 3'UTR extending into the polyadenylated region were isolated from bovine brain mRNAs by step-out RACE.

The expression of bovine recombinant HKI was obtained in BL21(DE3) *E. coli* cells (Stratagene) using the pET system (Novagen). The entire coding sequence for bovine HKI was isolated by cDNA amplification using *Pfu* polymerase (Promega) with HK20b forward (5'-AGCCCTCAACCGCCCATATGATCGCCGCGCAGC-3') and HK21b reverse (5'-CAGGCTGGGGGTCAGGATCCTTAGCTGCTCATTTC-3') degenerate primers in order to introduce NdeI and BamHI restriction sites at the nt 116 and 2872 (GenBank AF542053), respectively. The 2791 bp PCR product was then digested with NdeI and BamHI restriction enzymes obtaining a 5' 318 bp NdeI-NdeI fragment and a 3' 2438 bp NdeI-BamHI fragment, which were subsequently cloned into the NdeI/BamHI sites of pET-3a expression vector. The expression experiments and the purification of the recombinant enzyme were performed following the protocol optimised for human HKI (Bianchi *et al.*, 1996).

## RESULTS AND DISCUSSION

Based on the exon/intron structure of the human hexokinase type I gene and the high degree of homology between human and bovine HKI cDNA, particularly in their C-terminal sequences, we began a new study on the structure of the bovine HKI gene, using oligonucleotide primers complementary to the human HKI coding sequences to amplify across sequences where introns were expected to be located. A fragment containing an intron of 1.7 kb, corresponding to intron 12 of the human HKI gene, flanked by exonic sequences was isolated (GenBank AF309638-AF309639). Analysis of coding sequences (116 bp) and alignment with the bovine HKI cDNA sequence previously reported (nt 1788-1903) showed 18 mismatches, 2 of which result in amino acid changes: aa 607 Gln → Lys and aa 634 Val → Ala. To determine whether or not the observed differences represented a polymorphism, important for bovine breed characterisation, this HKI region was sequenced in other twenty-six cattle belonging to seven breeds (Marchigiana, Italian Holstein Friesian, Limousin, Charolais, Italian Simmenthal, Chianina and Italian Brown Swiss). Nucleotide sequence analysis of the HKI fragment of bovine DNA showed that all samples harboured identical sequences and all differed from the bovine HKI cDNA published by Griffin *et al.*, so therefore the hypothesis of polymorphism presence in this region of bovine HKI gene has been excluded.

The results obtained from genomic analysis, led to the isolation and re-sequencing of the entire coding region of HKI cDNA from Marchigiana breed. Three overlapping fragments spanning almost the entire coding region of bovine HKI cDNA (corresponding to nt 1-2621 of GenBank M65140 record) were isolated and examined by direct sequencing. Furthermore, the 5' and 3' ends of bovine HKI cDNA were isolated, allowing the sequencing of the complete coding region and the 5' and 3'UTR. The full-length bovine HKI cDNA resulted 3619 bp long and contained a predicted ORF of 2751 bp encoding a 917 amino acid protein as well as 117 bp and 748 bp of 5' and 3' untranslated sequences, respectively (GenBank AF542053). The alignment of the isolated bovine HKI coding sequence with the previously published bovine HKI cDNA revealed 348 mismatches corresponding to 88 amino acid substitutions (Fig. 1). Comparison of the deduced amino acid sequence of our bovine HKI with hexokinases of other mammals available in GenBank showed a high degree of homology with HKI cDNA sequences and in particular, a remarkable conservation in the functional binding domains.

In order to demonstrate that the isolated cDNA encodes for a catalytically active hexokinase type I and to exclude the possibility of a pseudogene, the full-length HKI was expressed into *E. coli* cells. The determination of specific activity of HKI, measured in bacterial lysates, revealed that the full-length HKI is expressed in bacterial cells as a soluble catalytically active form (specific activity of  $1.44 \pm 0.10$  U·mg<sup>-1</sup> of protein).

With the aim of characterising the kinetic and regulatory properties of the bovine HKI, the catalytically active recombinant full-length hexokinase was purified, using a combination of DEAE ion-exchange chromatography, followed by Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC), dye-ligand affinity chromatography and gel filtration chromatography. The full-length bovine HKI obtained was >90% pure and displayed a specific activity of 94 U·mg<sup>-1</sup> of protein. Characterisation of the recombinant enzyme indicates that it can be assimilated to the rat and human type I isoenzymes (Tab. 1), further supporting the evidence that the enzyme we have cloned and expressed is evolutionary much more conserved than previously thought based on the incorrect published cDNA sequence.