

Peter Brzezinski och Irina Smirnova, Stockholms Universitet

Lena Sarholm, FOI

Naturliga bakteriella biosensorer för detektion av landminor

TOTALFÖRSVARETS FORSKNING SINSTITUT

Vapen och skydd
147 25 Tumba

FOI-R--0876--SE

Juni 2003

ISSN 1650-1942

Teknisk rapport

Peter Brzezinski och Irina Smirnova, Stockholms Universitet

Lena Sarholm, FOI

Naturliga bakteriella biosensorer för detektion av landminor

Utgivare Totalförsvarets Forskningsinstitut - FOI Vapen och skydd 147 25 Tumba	Rapportnummer, ISRN FOI-R—0876--SE	Klassificering Teknisk rapport
	Forskningsområde 5. Bekämpning	
	Månad, år Juni 2003	Projektnummer E 2003
	Verksamhetsgren 5. Uppdragsfinansierad verksamhet	
	Delområde 51 VVS med styrda vapen	
	Författare/redaktör Peter Brzezinski, Stockholms universitet Irina Smirnova, Stockholms universitet Lena Sarholm	
Projektledare Lena Sarholm		Godkänd av
Uppdragsgivare/kundbeteckning FM		Tekniskt och/eller vetenskapligt ansvarig
Rapportens titel Naturliga bakteriella biosensorer för detektion av landminor		
Sammanfattning (högst 200 ord) En studie för att detektera minfält med hjälp av bakterier pågår. Det är ett nytt grepp att försöka få naturligt förekommande bakterier att ställa om sig till att äta explosivämnes-relaterade substanser i jorden och att därefter få bakterien att fluorescera. Ett annat användningsområde kan vara att detektera explosivämnesrester vid återställandet av gamla skjutplatser och fabriksområden.		
Nyckelord Bakterier, sensor, detektion, explosivämnen, landminor		
Övriga bibliografiska uppgifter	Språk Svenska	
ISSN 1650-1942	Antal sidor: 21 s.	
Distribution enligt missiv	Pris: Enligt prislista	

Issuing organization FOI – Swedish Defence Research Agency Weapons and Protection SE-147 25 Tumba	Report number, ISRN FOI-R—0876--SE	Report type Technical report
	Research area code 5. Combat	
	Month year June 2003	Project no. E 2003
	Customers code 5. Commissioned Research	
	Sub area code 51 Weapons and Protection	
Author/s (editor/s) Peter Brzezinski, Stockholm University Irina Smirnova, Stockholm University Lena Sarholm	Project manager Lena Sarholm	
	Approved by	
	Sponsoring agency Swedish Armed Forces	
	Scientifically and technically responsible	
Report title (In translation) Natural Bacterial biosensors for detection of land mines		
Abstract (not more than 200 words) A study has started on detection of mined areas with modified soil bacteria. It is a different type of sensor technology to use natural soil bacteria for detection of explosives and related compounds from buried mines or explosive remnants on testing ranges or manufacturing industries.		
Keywords Bacteria, sensor, detection, explosives, land mines		
Further bibliographic information	Language Swedish	
ISSN 1650-1942	Pages 21 p.	
	Price acc. to pricelist	

Innehållsförteckning

Inledning	sida 6
Projektbeskrivning	sida 7
Resultat	sida 10
Fortsatt arbete	sida 14
Appendix	sida 15

Inledning

En studie för att detektera minfält och minerade områden med hjälp av jordbakterier pågår. Det är ett helt nytt angreppssätt att försöka få naturligt förekommande bakterier att ställa om sig till att äta explosivämnesrelaterade substanser i jorden och att därefter få bakterien att fluorescera.

Ett annat användningsområde kan vara att detektera explosivämnesrester vid återställandet av gamla skjutplatser och fabriksområden. På ett flertal platser i världen finns "avfallsanläggningar" för uttjänta sprängämnen. I många fall läcker en del av de föreningar som ingår i dessa sprängämnen ut i jorden. Eftersom dessa föreningar ofta innehåller stora mängder kväve och kol utgör de en mycket attraktiv näringskälla för jordbakterier. Även giftiga organiska föreningar kan användas av bakterien för att skaffa energi för sina livsuppehållande aktiviteter

I alla jordar finns bakterier, som livnär sig på organiskt material som bryter ner t.ex. döda växter. Dessa bakterier är mycket viktiga för att upprätthålla den ekologiska balansen i naturen. När bakterierna känner av förekomsten av organiska ämnen i jorden kommer de att ställa om sin metabolism på ett sådant sätt att t ex ett sprängämne kan brytas ner.

Den metod som avses utvecklas i detta projekt bygger på användning av sådana naturliga bakterier för att detektera förekomsten av landminor i mark. Metoden bygger på att bakterier har en förmåga att mycket snabbt anpassa sig till nya livsvillkor. Om ett nytt ämne introduceras i en viss miljö och detta ämne kan utnyttjas av bakterien som föda, kommer bakterierna att snabbt ställa om sin metabolism på ett sådant sätt att det nya ämnet kan tas upp, brytas ner och infogas i bakteriens ämnesomsättning.

Detta åstadkommes genom produktion av biologiska katalysatorer, enzymer, som assisterar vid sammansmältningen av den organiska substansen, där varje steg i sammansmältningen behöver ett specifikt enzym. Enzym är proteiner som är syntetiserade av bakterien, vilket är en process som kräver energi. Eftersom en naturlig miljö för bakterien inte innehåller toxiska föreningar slösar inte bakterien energi på att bygga upp enzymer som

inte är användbara. Konsekvensen blir att syntetiseringen av enzymer börjar först när kemiska föreningar uppträder i naturen där bakterien lever. För att åstadkomma detta måste det finnas en regulatormekanism som kan initiera produktionen av enzymer när kemikalien infinner sig.

Information för att bygga proteiner i bakteriens celler finns i DNA molekyler. En uppsättning matriser som kallas bakteriens ”genomen” innehåller all informationen om alla proteiner i bakteriens celler. Matrisen kan kopieras för att spara informationen till framtida generationer av bakterien eller så kan innehållet läsas och överförs för att bygga nya proteinmolekyler. Processen att läsa informationen och bygga proteinet är strängt reglerat, det vill säga det kan initieras eller avslutas. Regulatorsubstansen är också en proteinmolekyl. När en organisk kemikalie från omgivningen kommer in i bakteriens cell binds den till regulatorproteinet, vilket orsakar en förändring i proteinets form och aktiverar detta. Under aktiveringen binds det till en specifik plats på DNA matrisen, vilket initierar inläsningsprocessen och resulterar i syntetisering av ett passande enzym, bakterien är färdig att tillägna sig den organiska föreningen.

Bakteriens förmåga att känna specifika organiska föreningar kan användas i biotekniska applikationer. Det är till exempel möjligt att ta bort matriser som är ansvariga för syntes av ett sammandragande enzym och istället sätta in olika matriser som kodar för sådana enzym som syntetiserar ett grönt fluorescerande protein (GFP). I detta fall kan den ”lurade” bakterien starta en syntes av grönt fluorescerande protein när den känner av den organiska föreningen, och bilda gröna fläckar på t.ex. en substans som kommer från ett sprängämne.

Projektbeskrivning

Målet för detta projekt är att designa en biosensor som kommer att användas för att detektera specifika föreningar som finns i sprängämnen eller relaterade föreningar. Sensorn är baserad på ett helcellsystem (fluorescerande bakterier) och är alltså distinkt skild från biosensorer som är baserade på t.ex. antikroppar mot 2,4 DNT. Ett viktigt delmål i projektet är att förbättra strukturen av ett naturligt regulatorprotein i jordbakterien *Burkholderia* DNT. Proteinets används av bakterien för att känna igen t.ex. DNT och TNT. För detta ändamål

måste proteinet extraheras från bakterien och separeras från en samling av hundratals olika biologiska molekyler. Genom att använda ett batteri av olika biokemiska och biologiska tillvägagångssätt har proteinet renats och vi har fått fram förutsättningar under vilka proteinet bildar kristaller. Detta måste göras för att kunna bestämma proteinets kristallstruktur.

Det ämne som skall brytas ner (substratet, som i detta fall är t.ex. TNT eller DNT) binder till ett sensor- och regulatorprotein. Proteinets har en bindningsficka som specifikt binder substratet. Vid bindning förändras sensorproteinets struktur och detta i sin tur gör att proteinet binder till en promotor, d v s en specifik plats på DNA-strängen som aktiverar syntesen av det enzym som bryter ner TNT eller DNT. Med andra ord har bakterien ett

återkopplat sensorsystem, som aktiveras av det ämne som skall brytas ner.

I det aktuella projektet utgår vi från en bakterie som naturligt har utvecklat det maskineri som kan bryta ner TNT/DNT. Den del av DNA-strängen som kodar för enzymet har bytts ut mot en DNA-sträng som kodar för ett annat protein, som inte är ett enzym, men som har förmågan att fluorescera. När denna bakterie kommer i kontakt med ett sprängämne, binder substratet till sensor/regulatorproteinets, som i sin tur aktiverar promotorn och initierar syntesen av det fluorescerande proteinet - hela bakterien blir fluorescerande.

En sensor måste vara specifik för de ämnen som skall detekteras och måste ha en hög känslighet. Med andra ord får sensorn inte ge utslag för ämnen som kan förekomma naturligt i jorden och som har en struktur liknande den som

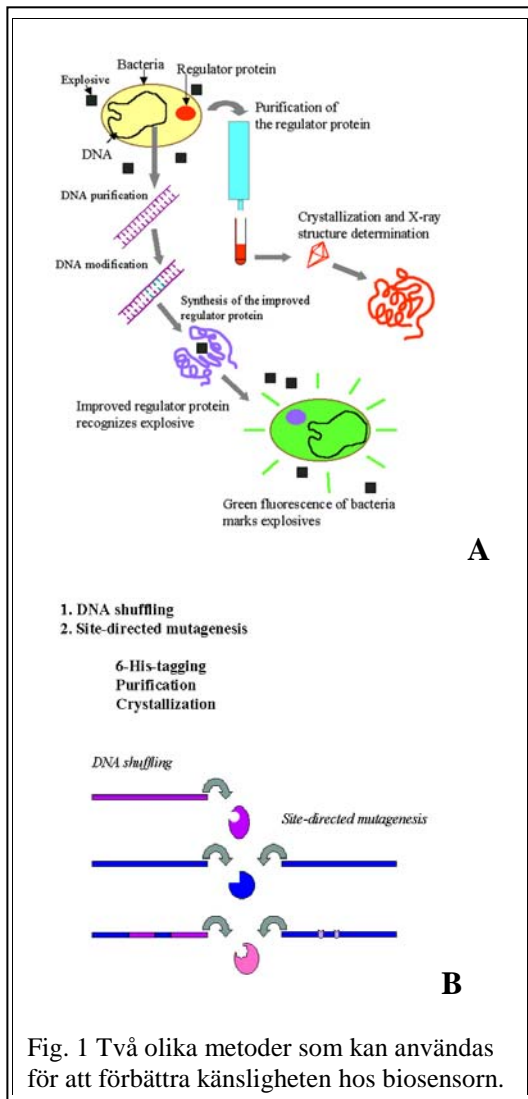


Fig. 1 Två olika metoder som kan användas för att förbättra känsligheten hos biosensorn.

TNT/DNT har.

Den bakteriestam som vi utgår från har en viss känslighet för TNT/DNT, men känsligheten är fortfarande för låg. Dessutom är stammen även känslig för salicylat, vars struktur liknar DNT/TNTs. Eftersom detta ämne kan förekomma i jordar, måste den bakteriella biosensorns känslighet för salicylat undertryckas betydligt.

Känsligheten för olika substrat är helt beroende på strukturen av den bindningsficka som binder substratet i sensorproteinet. Denna struktur kan modifieras och anpassas på olika sätt. För att uppnå detta använder vi två olika angreppssätt (Figur 1A): (1) Ett mycket stort antal varianter av strukturen tillverkas slumpmässigt. Sedan plockas selektivt de varianter ut som är mest känsliga för substratet. Förhoppningsvis är det då möjligt att hitta sådana varianter som inte bara är känsligare för substratet, men som också har mindre känslighet för andra ämnen. (2) Den tredimensionella strukturen för sensorproteinet bestäms. Denna information gör att man kan analysera den detaljerade strukturen för den bindningsficka i vilken substratet binder. Utifrån denna analys kommer vi sedan att specifikt byta ut vissa aminosyrarester för att på detta sätt förändra bindningsfickans form och egenskaper (t.ex. introducera laddade eller hydrofoba aminosyrarester). Den teknik som vi använder kallas *in vitro* mutagenes och förväntas resultera i en bakterie, d.v.s. ett helcellsystem, som är mer känslig för t.ex. DNT eller TNT.

Först måste proteinet erhållas i mycket ren form. Därefter kristalliseras proteinet varefter röntgenkristallografi kan användas för att göra en tredimensionell modell av proteinet. I bästa fall kan man identifiera bindningsstället för substratet. Om detta skulle visa sig vara svårt kan man gå vidare och kristallisera sensorproteinet i närvaro av olika substrat. I detta fall kommer substratet att synas i strukturen, vilket direkt visar var bindningsstället finns. Utifrån en sådan bild kommer vi att ”på ett intelligent sätt” kunna skapa varianter av sensorproteinet som specifikt binder substratet bättre än andra liknande molekyler.

Resultat

Under år 2002 utförde en doktorand sitt examensarbete inom projektet. Han använde molekylärbiologiska metoder (så kallad riktad evolution) för att framställa slumpmässigt ett mycket stort antal strukturvarianter av sensorproteinet för att sedan isolera de varianter som är mest känsliga för substratet, dvs TNT eller DNT (se Figur 1B). Detta arbete är ännu inte avslutat och kommer att fortsätta.

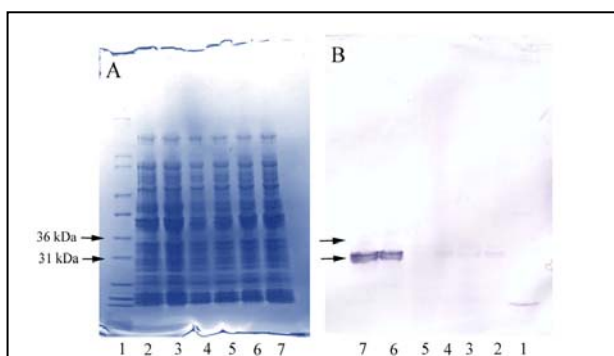
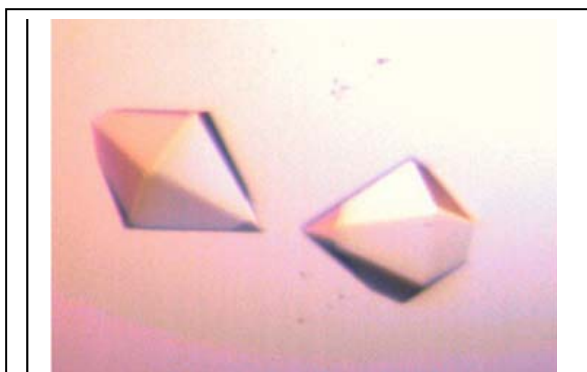


Fig.2 SDS-PAGE-analys av DntR uttryckt i en bakteriekultur

A – Coomassiefärgad gel. B – “western blot” infärgning med avseende på anti-His-tag antikroppar. 1 – referens; 2 och 3 – två parallella *E. coli* kulturer M15[pREP4] [pQE60-IRIS]; 4 and 5 – två parallella kulturer före tillsats av IPTG; 6 and 7 – samma kulturer efter tillsats av IPTG och uttryck av DntR under 5 tim



Figur 3. Kristaller av DntR

För att framställa sensorproteinet (DntR) i ren form har vi märkt proteinet med en så kallad histidinmarkör, vilket gör det möjligt att separera proteinet från alla andra proteiner i bakterien och på detta sätt erhålla ett mycket rent protein (Figur 2). Ett stort antal kristalliseringsförsök gjordes under olika villkor vilket ledde till att under år 2002 erhöles de första kristallerna. Under året samlades diffraktionsdata vid synkrotronen i Grenoble, Frankrike. Ett vanligt steg i strukturbestämning-processen är att man binder en ”tung” atom, t.ex. guld eller uran, till proteinet och använder denna atom som en referens. Denna metod visade sig inte fungera i vårt fall. Strukturen kunde bara lösas genom att märka proteinet med så kallat selenometionin. Bakterier odlas då i närvaro av denna modifierade aminosyra och denna inkorporeras i proteinet. Kristallerna prepareras vid Stockholms universitet, men för att

bestämma proteinstrukturen måste dessa belysas med Röntgenstrålning. Denna bestrålning resulterar i ett så kallat diffraktionsmönster som innehåller information om den detaljerade tredimensionella strukturen. Det visade sig att de Röntgenkällor som finns tillgängliga i Sverige inte var av tillräckligt bra kvalitet och därför inleddes ett samarbete med en forskare vid synkrotronen i Grenoble för att få tillgång till mer intensiv Röntgenstrålning av bättre kvalitet. Vi skickade ett stort antal kristaller

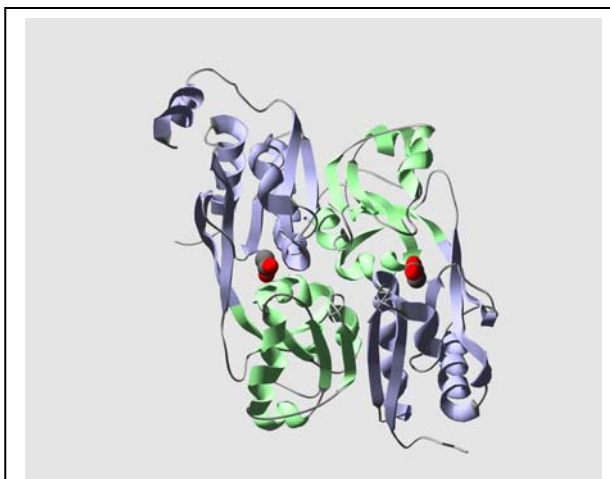


Fig. 4 A Sensorproteinets (DntR) struktur. Bindningssätet för substratet är markerat i rött (visat i detalj i B).

till Grenoble och i mitten av 2002 erhöles data från analys av det selenometioninmärkta proteinet. En första struktur kunde presenteras i oktober år 2002 (Figur 4). Denna struktur visar större delen av proteinet, men saknar den del som binder till DNA. Orsaken är sannolikt att denna del är flexibel och inte kan anta en väldefinierad struktur.

Arbete pågår med att försöka begränsa rörligheten för att få med även denna del av strukturen. Den struktur som har kunnat bestämmas är dock tillräckligt bra för att kunna identifiera bindningssätet för substratet (dvs. ämnen som härrör från nedbrytning av explosivämnen).

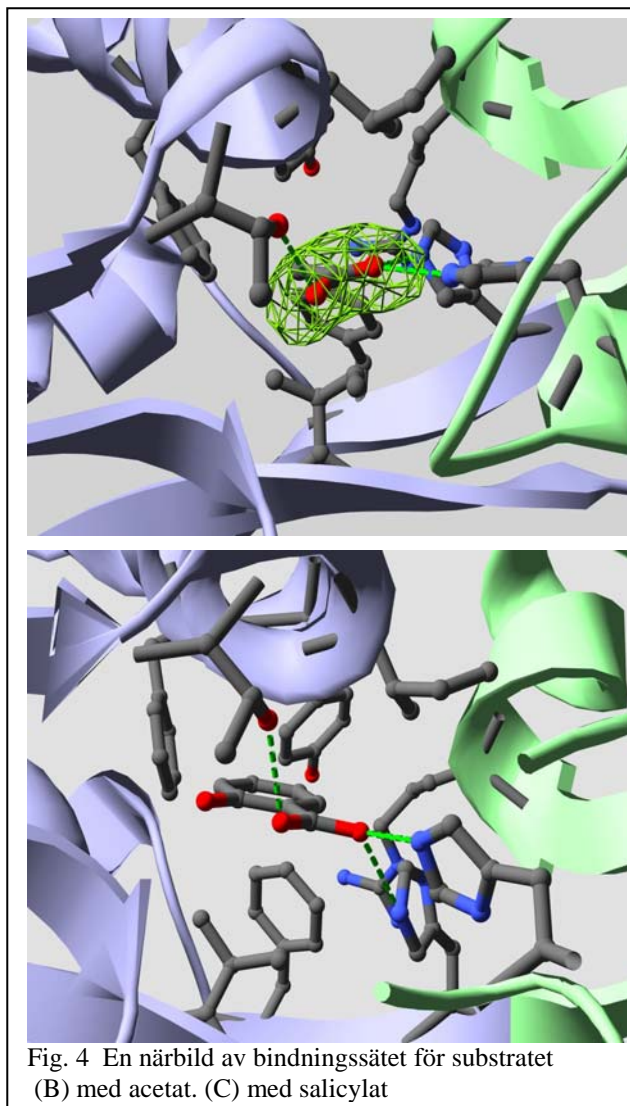
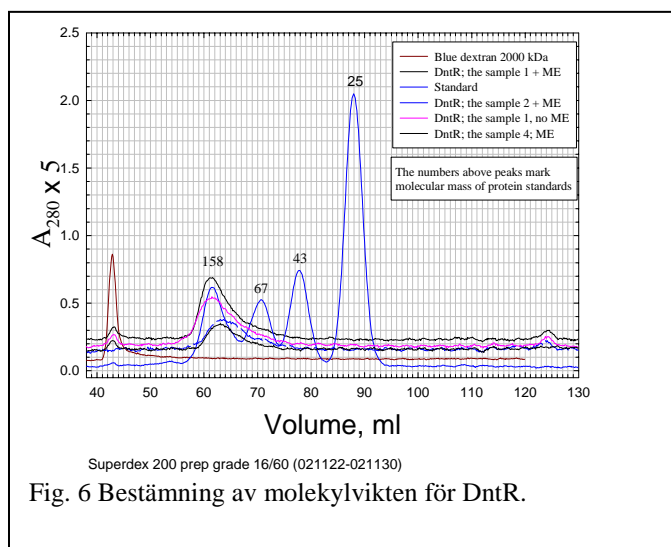
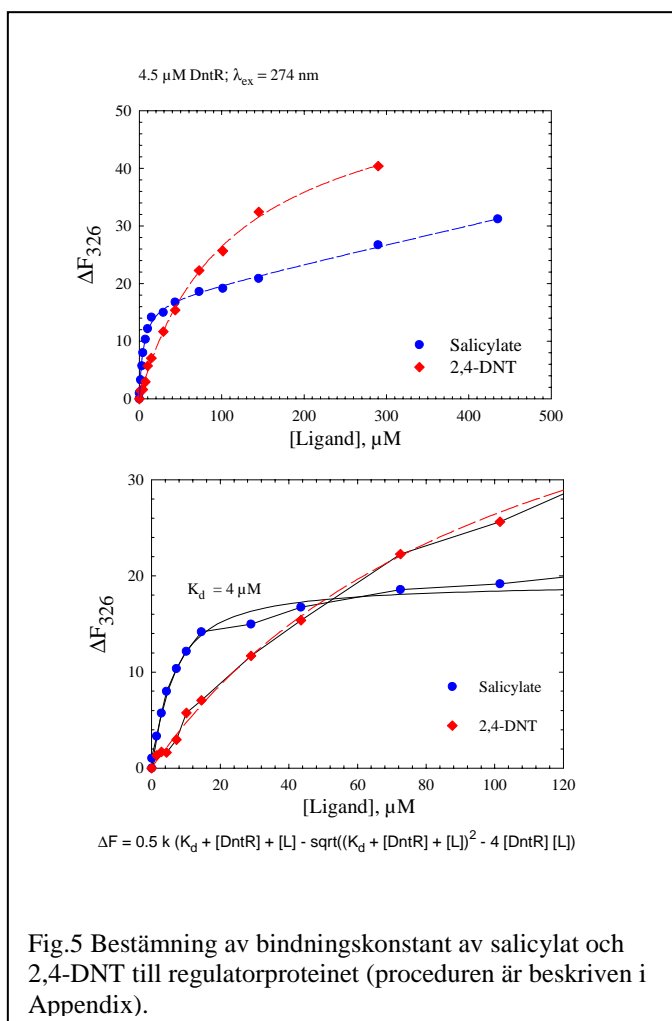


Fig. 4 En närbild av bindningssätet för substratet (B) med acetat. (C) med salicylat



För att undersöka hur effektivt olika substrat binder till sensorproteinet studerade vi ändringar i fluorescens hos proteinet som funktion av mängd tillsatt substrat (Figur 5). Denna studie gjordes för att undersöka hur mycket substrat som krävs för att denna skall binda till proteinet. Preliminära data visar att det krävs ca 4 μM salicylat (som visades binda starkt i tidigare studier vid FOI i Umeå) för att mätta bindningsstället till 50 %.

För att undersöka interaktionen mellan proteinet och substraten kristalliserades proteinet i närvaro av olika substrat (Figur 4), vilket resulterade i två nya strukturer under första delen av 2003 - en struktur med acetat i sensorproteinet bindningsficka och en struktur med tiocyanat (SCN). I båda dessa kristallformer observerades en dimer av proteinet. Baserat på en analys av interaktioner i kristallen drogs slutsatsen att proteinet förekommer som en tetramer. Detta resultat stöds av kromatografidata som visar att DntR även i lösning förekommer som en tetramer (Fig. 6). I varje monomer fann

vi en kavitet som definieras av två histidiner, en lucin och en treonin (Fig. 4C). Beroende på kristallform fanns acetat eller tiocyanat i denna kavitet. DntR med acetat bundet visas i

Fig. 4. Genom att jämföra läget för tiocyanat och acetat kunde vi identifiera hydrofoba och hydrofila delar av bindningsfickan och på detta sätt modellera in salicylat (Fig. 4B). Dessa två molekyler binder på samma ställe som substratet och deras position gör det möjligt att identifiera bindningsfickan. När strukturen för denna bindningsficka är bestämd kan vi modellera in de ämnen som skall binda i den modifierade bakterien, t.ex. DNT och TNT. Det bör observeras att varken tiocyanat eller acetat är naturliga substrat. Dessa ämnen användes i studien vid relativt höga koncentrationer helt enkelt för att identifiera bindningsfickans läge och egenskaper (identifiering av hydrofoba och hydrofila delar). Med utgångspunkt från denna information bör det vara möjligt att förutsäga vilka delar av bindningsfickan som måste ändras för att 2,4-DNT skall binda starkt, d.v.s. även vid låga koncentrationer.

För att kunna bestämma hur proteinet skall modifieras kan man använda kommersiellt tillgängliga datorprogram som t.ex. används inom läkemedelsindustrin för att skapa

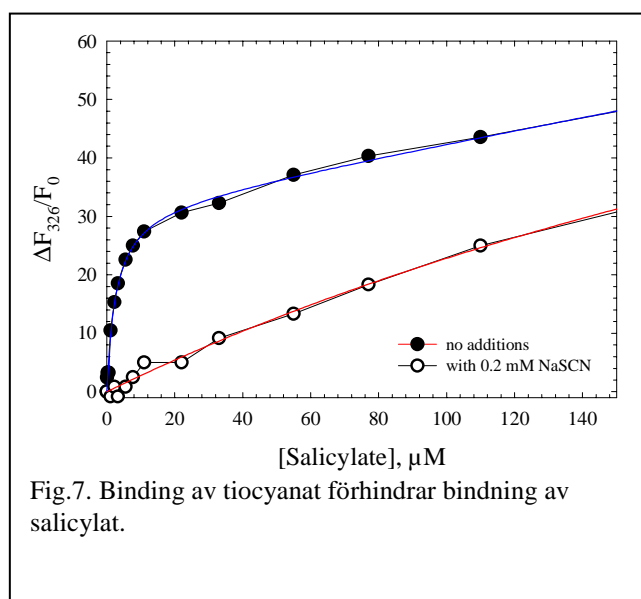


Fig. 7. Binding av tiocyanat förhindrar bindning av salicylat.

läkemedel (jfr. TNT och DNT i vårt fall) som skall passa in i bindningsfickan hos ett receptorprotein (jfr vårt regulatorprotein) hos patienten. För detta ändamål har vi köpt programmet HYPERCHEM och efter en utbildningsfas kommer vi att använda detta program för att förutsäga hur bindningsfickan i sensorproteinet skall modifieras för att optimera bindning av DNT och TNT.

Data i Fig. 7 visar att i närvaro av 0.2 M tiocyanat binder salicylat betydligt

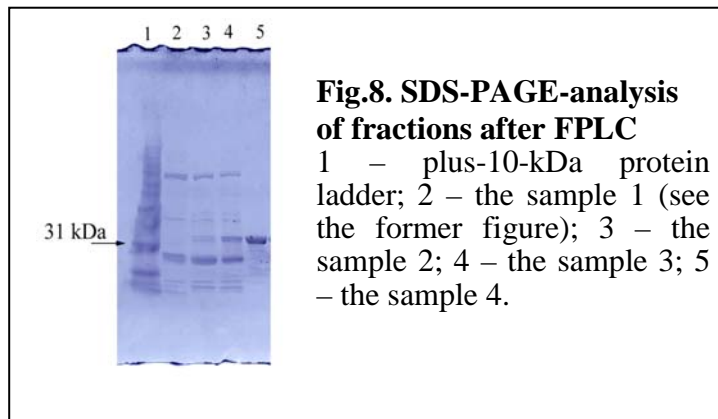
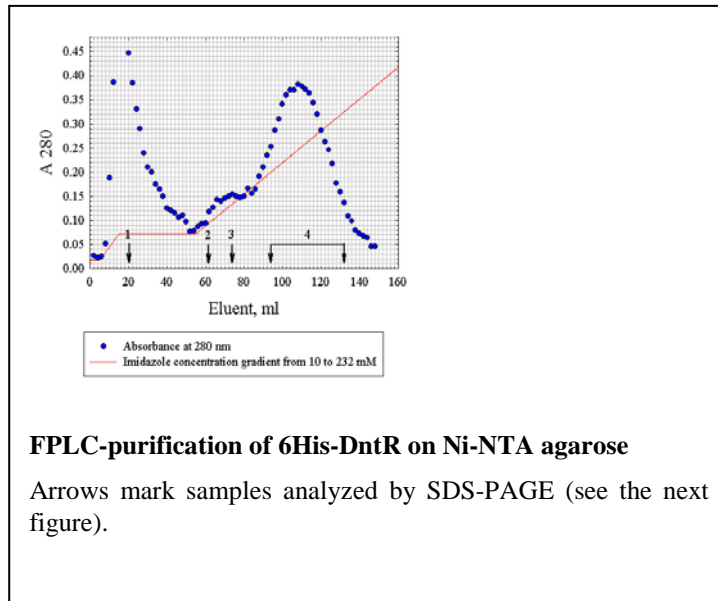
sämre. Detta visar att tiocyanat och salicylat tävlar med varandra om samma bindningsficka, d v s de binder på ungefär samma ställe. Denna studie var också ett led i utvecklingen av en teknik för att studera bindning av aktivatorer. Eftersom målet med projektet är att förbättra känslighet och specificitet hos biosensorn, måste vi ha en metod som gör det möjligt att rutinmässigt testa hur ändringar i bindningsfickan hos regulatorproteinet påverkar inbindning av olika substrat.

Fortsatt arbete

För att på sikt även kunna upplösa den del av sensorproteinets struktur som binder till DNA, planerar vi att lösa strukturen genom att kristallisera proteinet i närvaro av ett DNA-fragment. Preliminära försök visar att sensorproteinets kan binda ett DNA-fragment med ”rätt kod”.

Under arbetets gång har vi sett en ytterligare möjlighet för användning av modifierade bakteriella biosensorer. Som beskrivits ovan har den bakteriella stammen som vi utgår ifrån känslighet för TNT/DNT, men den är fortfarande för låg. Dessutom är stammen även känslig för salicylat som kan förekomma i jordar. För att komma ifrån detta problem skulle man genom att använda en luftprovtagare kunna samla in och koncentrera de explosivämnesrelaterade föreningarna som uppträder i luftfasen och på partiklar på markytan, och efter provtagningen på filtret tillsätta modifierade bakterier. Vid belysning med UV-ljus kan eventuell förekomst av explosivämnen eller relaterade substanser detekteras. Möjligheten finns att med denna metod få en enkel, billig och snabb metod för verifiering av andra detektionsmetoder eller en metod för sk ”area reduction”.

Appendix



Plasmids and strains used

P. putida KT2440 and *P.putida* KT2440[pLSN60.9], a strain holding the construct for effector-induced expression of GFP, were obtained from M. Forsman, FOI, Umeå. *E.coli* M15[pREP4] and expression plasmid pQE60 were from Qiagen.

Bacteria cultivation

E.coli M15[pREP4][pQE60Iris] were cultivated on standard LB medium with 0.1 mg/ml ampicillin and 0.025 mg/ml kanamycin in the shaker at 37°C.

P.putida KT2440[pLSN60.9] and *P.putida* KT2440 were grown on standard LB medium with ampicillin of 1 mg/ml and 0.1 mg/ml, respectively, in the shaker at 30°C.

Subcloning

According to protocol by M. Kelle with slight modifications. Plasmid pQE60 was cut with *Bgl*III and *Nco*I (2 µg DNA in 20 µl). Both the cut plasmid and the insert were separated by electrophoresis in a low melt agarose gel (Seaplaque). Gel slices with the fragments were melted at 70°C. Then ligase buffer, water and the insert containing gel were added to the plasmid containing gel. After slight cooling T4DNA ligase was added and the ligation reaction occurred overnight. Then the ligation mixture was melted, diluted with water and transformed to the host cells by electroporation.

Primers

LCN7: 5' AA AAT CAG GCA TAT GAA TAA TGG TGA GGG T 3'

LCN10 5' T CTA TCA TCT CGA GTC AAT TCT CTC TAT CC 3'

IRIS2: 5' TATCATTATCAGATCTtGCTTCAGAGAAAAGCTCGAC 3'

IRIS3: 5' TATTATCAAACCATGGCTAACGGTGAGGGTGAGGTCATG 3'

SDS-PAGE and Western blot

The samples were run in pre-cast 8-16% Tris-Glycine poly-acryl amide gels in Laemmli buffer (25 mM Tris; 192 mM Glycine; 0.1% SDS). The gels were stained with Coomassie R250.

Western blotting was performed in the Novex cell in a Towbin buffer (12 mM Tris; 96 mM Glycine; 20% methanol). Nitrocellulose membranes were from Amersham.

Immunodetection of 6His-tag on nitrocellulose membrane

The membrane was washed with TBS buffer and incubated in blocking buffer (3% BSA in TBS) for 30-40 min. Then it was washed with TBST and TBS buffers sequentially. Then the membrane was incubated in anti-His Antibody solution in TBST (Penta-His Antibody, BSA-free, Qiagen; 7.5 µl per 5 ml TBST) for 1 h. Then it was washed with TBST and TBS sequentially. The membrane was incubated with secondary antibody solution (anti-mouse IgG (H+L) AP-conjugate, Promega; 1 µl per 7.5 ml TBST) for 1 h and washed with TBST buffer. One could dry the membrane with filter paper. Developing color with AP staining solutions was performed as described in Quiagen, 3rd Edition, p.80.

TBS buffer: 20 mM Tris-HCl, pH7.5; 0.5 M NaCl.

TBST buffer: 20 mM Tris-HCl, pH7.5; 0.5 M NaCl; 0.05% Tween 20.

Treatment of the streak blot membrane

The filter with the print of bacteria was washed *i*) in 10% w/v SDS; *ii*) in 0.5 M NaOH, 1.5M NaCl; *iii*) 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4; *iv*) in 20xSSC solution (87.65 g NaCl and 50.25 g trisodium citrate·2H₂O in 0.5 L water). After this the membrane was developed as described in a previous section.

Cell growth and protein purification

The cells were grown at 37°C on LB medium supplemented with 100µg/ml ampicillin and 25 µg/ml kanamycin on a shaker at 170 r.p.m. After the cells reached optical density of 0.6-0.7 at 600 nm, the expression of DntR-6His was induced by addition of 1mM IPTG and the cells were harvested after five hours. Usually, they were frozen and stored at -80°C.

The cells pre-equilibrated at -25°C were crashed with X-Press (AB BIOX, Sweden), suspended in 0.3 M NaCl; 50 mM NaH₂PO₄-NaOH, pH 8.0 (80 ml per the pellet from the 6-L-culture) supplemented with 1 mM Mg SO₄; DNase II (Boehringer); Complete EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The cell debris and membranes were separated by centrifugation at 210 000 g (90 min). The cleared lysate was supplemented with 10 mM

imidazole and loaded on a column with Ni-NTA Superflow resin (QUIAGEN). The column was washed with 10 mM imidazole; 0.3 M NaCl; 50 mM NaH₂PO₄-NaOH, pH 8.0 until no distinguishable absorbance at 260 nm was discovered in the flow-through. The protein was eluted with Imidazole concentration gradient from 10 to 250 mM: the DntR peak was eluted at 126 mM imidazole. Fractions with a single protein band of 35 kDa on SDS-PAGE were pooled, concentrated to a half-volume and dialysed against 0.3 M NaCl; 2 mM MgSO₄; 1 mM DTT; 17% glycerol; 50 mM NaH₂PO₄-NaOH, pH 8.0. Consequently, the protein solution was concentrated to 10 mg/ml by ultra-filtration with Centricon-10 device or by ultra-filtration against 30 kDa PEG. The protein concentration was measured with Lowry assay. Purified protein was frozen and stored in liquid nitrogen.

Selenomethionyl-labeled protein production and purification

In order to resolve the structure of crystallized DntR with the multiple wavelength anomalous scattering method, we obtained selenomethionine labeled DntR.

Selenomethionine labeled protein was produced by metabolic inhibition (methionine pathway inhibition) method. Minimal M9 medium with ampicilin (100 µg/ml) and kanamycin (25 µg/ml) was inoculated with 10 ml per 1 l night culture (grown on LB medium with the same antibiotics and washed with minimal M9 medium) and incubated at 37°C at 170 r.p.m. until optical density at 600 nm reached 0.7. Then L-lysine, L-phenylalanine and L-Threonine at 100 mg/l altogether with L-isoleucine, leucine, valine and selenomethionine at 50 mg/l were added. After 20 min incubation the cells were induced with 1 mM IPTG. The cells were harvested after 11 h growth at 35°C and frozen. The purification procedure was generally the same as for the native protein except that 10 mM β-Mercaptoethanol and 0.1 mM EDTA were added to the chromatographic buffers and the dialysis buffer was flashed with nitrogen. The purified selenomethionyl-labeled protein was concentrated to 10 mg/ml by ultra-filtration, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

In the selenomethionyl-labeled protein, the selenium for sulfur substitution was proved by the mass spectroscopy (MALDI-TOF with Applied Biosystems Voyager System 4193). The protein sample was diluted in 50% acetonitrile and 0.2% trifluoroacetic acid. Sinapinic acid was used as a matrix. The native protein had an average mass 35542 Da ; the labeled

protein – 36041 Da. The observed shift corresponded to 10.6 ± 1 atoms exchanged; the calculated shift for full substitution of 12 atoms was 564 Da.

Aggregation state of DntR

In order to estimate the aggregation state of purified DntR in the solution, the size exclusion chromatography was run on Superdex 200 preparative grade column (Amersham) in 0.3 M NaCl; 2 mM MgSO₄; 10 mM β-Mercaptoethanol; 1.7% glycerol; 50 mM NaH₂PO₄-NaOH, pH 8.0. Chymotrypsinogen A (25 kDa); ovalbumin (43 kDa); bovine serum albumin (67 kDa) and aldolase (158 kDa) were used for molecular size calibration (Amersham). The elution curves for several protein samples are shown on Fig.6. The position of the DntR peak close to the aldolase peak corresponds to the molecular size of the DntR tetramer (142 kDa).

Inducer-binding properties

Quenching of the intrinsic protein fluorescence upon binding of an inducer was used as a tool for evaluation of the dissociation constant (K_d) for different inducers. The fluorescence was registered with Perkin-Elmer instrument at the excitation and emission wavelength 274 nm and 326 nm, respectively. In case of fluorescent inducers such as salicylic acid and 2,4-DNT when saturation of the quenching could not be observed, the first part of the titration curve (up to 100 μM inducer) was used for the calculation. The K_d value was estimated by the non-linear regression from the concentration dependence of the relative fluorescence quenching according to the equation:

$$\Delta F = 0.5 k (K_d + [Prot] + [L] - \sqrt{(K_d + [Prot] + [L])^2 - 4 [Prot] [L]}),$$

where: ΔF is the relative fluorescence quenching; k is an intrinsic coefficient; $[Prot]$ and $[L]$ are DntR and inducer molar concentrations, respectively.

2,4-DNT was dissolved in dimethyl sulfoxide and the fluorescence quenching caused by this solvent was subtracted during data processing.

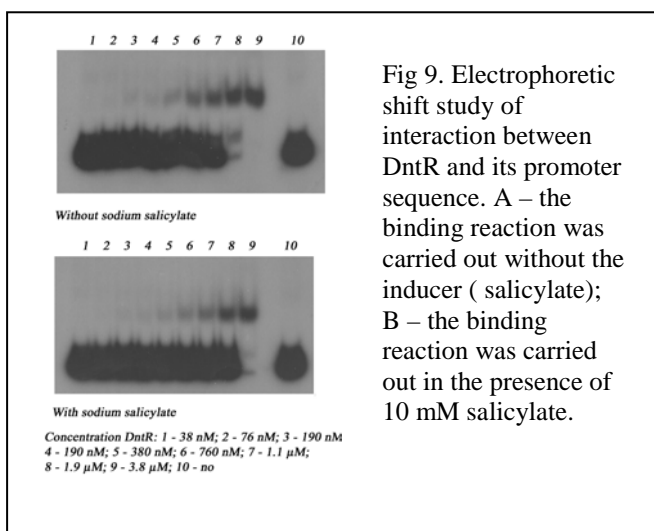
Crystallization

Native protein was crystallized by the vapor diffusion in hanging drops from the 9 mg/ml protein concentration in the presence of 0.1 M imidazole and 1.0-1.4 M sodium acetate. The protein was dissolved in 0.3 M NaCl; 2 mM MgSO₄; 1 mM DTT; 17% glycerol; 50 mM NaH₂PO₄-NaOH, pH 8.0. The selenomethionyl labeled protein was crystallized in the presence of 0.1 M imidazole and 1.8-2.0 M sodium acetate supplemented with tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride as a reductant after the streak seeding from the native protein crystals. In order to slow down oxidation of selenium, the wells before sealing were flashed with nitrogen. A different crystal form was obtained during crystallization in the presence of 0.1 M Tris-HCl (pH8.5); 0.2 M sodium tartrate; 12 % PEG 4000 and 0.2 M NaSCN as a co-precipitant.

Several attempts to co-crystallize DntR with salicylic acid were performed and the crystals were obtained, however salicylate was not observed in the structure. This work is continued with new approaches and modifications.

DntR interaction to its promoter

For electrophoretic mobility shift assay, the double strand DNA fragment (120 bp)



containing the promoter sequence was obtained by PCR and labeled with ³²P via polynucleotidekinase reaction. The DntR-promoter binding reaction was carried out in 50 mM NaCl; 0.4 mM EDTA; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 10 % glycerol; 20 mM Tris (pH 8.0) for 40 min at the room temperature in the presence of BSA (2 mg/ml) and Poly dI-dC (2 μg/ml). Electrophoresis was performed in the 6% Novex pre-cast poly-acrylamide gel in

0.5x TBE (pH 8.9) buffer. When binding was performed in the presence of the inducer (10 mM sodium salicylate), the running buffer contained the same concentration of salicylate.

DntR belongs to the LysR family of the transcriptional regulators. For several members of this family it was shown that binding to their specific promoter sequences occurred even in the absence of the specific inducers. The presence of the inducers increased the binding constants slightly (about ten folds). A transcription regulation mechanism was suggested to involve change of the DNA conformation. DNA bound to the regulator protein was suggested to be highly bended. Binding of the inducer to such a complex caused a certain relaxation of such a bend and initiated transcription. There was no data in the literature about DntR interaction to its promoter region. To elucidate this we performed electrophoretic mobility shift assay. The DntR-promoter region interaction was demonstrated. The electrophoretic mobility shift was observed starting from 190 nM DntR monomer (see Fig.9).

No improvement of the DntR-promoter interaction was observed in the presence of salicylate (see Fig.9). Oppositely, one can see that the same DntR concentrations that caused complete binding of the DNA fragment in the absence of salicylate, could not bind it in the presence of salicylate (Fig.7, wells 8 and 9). One can suggest that salicylate caused change of the oligomeric state of DntR and made its efficient concentration lower.