

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Τίτλος

« Δομικός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης HrpA του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola του εκκριτικού συστήματος τύπου III ».

Μαριάννα Κοτζαμπασάκη

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια

Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστημίου Κρήτης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Α. Μητράκη

Τρίτη, 19 /07 /2011,

ώρα 11:00πμ - 13:00 μ

Αμφιθέατρο Β Ισόγειο,

Κτίριο Φυσικού, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Περίληψη

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS, Type three secretion system), είναι ένας εξειδικευμένος μοριακός μηχανισμός, ο οποίος καθιστά ικανά πολλά Gram-αρνητικά βακτήρια να εκκρίνουν και να διοχετεύουν τοξικές πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού ξενιστή τους. Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια το μονοπάτι έκκρισης κωδικοποιείται από τα γονίδια *hrp* (HR και pathogenicity) και *hrc* (HR και conserved).

Η παρούσα εργασία ασχολείται με τη δομική μελέτη τη πρωτεΐνης HrpA, η οποία είναι μια μικρή υδροφιλική πρωτεΐνη του T3SS της *P. syringae* pv. phaseolicola. Η HrpA είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του αγωγού (pilus) του T3SS, του οποίου η δομή μοιάζει με τις γνωστές βελονοειδείς δομές (needle) των ζωοπαθογόνων βακτηρίων, ενώ η διάμετρος του υπολογίζεται περίπου στα 6 έως 8 nm και το μήκος μέχρι 2 μm. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη HrpA αγρίου τύπου, υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική και δομική μελέτη της πρωτεΐνης, μεταβάλλοντας διάφορες παραμέτρους (pH, συγκέντρωση, χρόνο ανάπτυξης, θερμοκρασία) με μεθόδους κυκλικού διχρωισμού (CD), φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier

(FTIR), φασματοσκοπίας Raman (Raman spectroscopy), και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης υψηλής ανάλυσης (high resolution TEM).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε δομικός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός του μεταλλάγματος HrpAΔC8 σε διάφορες συνθήκες με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, CD, σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS) και high resolution TEM. Επίσης έγιναν προσπάθειες κρυστάλλωσης του μεταλλάγματος σε διάφορες συνθήκες.

Τέλος, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης του αγωγού του T3SS (pilus) από την *P. syringae* pv. phaseolicola, με σκοπό να μελετηθούν οι δομικές του ιδιότητες με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης υψηλής ανάλυσης (HRTEM) και να συγκριθούν με τις πολυμερικές ιδιότητες που έχει η ανασυνδυασμένη HrpA να σχηματίζει ινώδεις δομές με χαρακτηριστικές διαστάσεις που κυμαίνονται από την μακρο- στην μικρο-κλίμακα. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υψηλής διακριτικής ικανότητας, η πρωτεΐνη αυτό-οργανώνεται *in vitro*, σχηματίζοντας ινίδια με διαστάσεις που μοιάζουν σημαντικά με τα δομικά χαρακτηριστικά του αγωγού του T3SS της *P. syringae* pv. phaseolicola.

Συμπερασματικά, ενώ η HrpA προβλέπεται σαν α-ελικοειδής πρωτεΐνη, το φάσμα κυκλικού διχρωισμού της, παρουσιάζει χαμηλά ποσοστά α-έλικας ενώ μοιάζει πολύ με το φάσμα των αποδιπλωμένων πρωτεϊνών. Τα πειράματα φασματοσκοπίας RAMAN, FTIR και SAXS που πραγματοποιήθηκαν, επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις από το CD.

Abstract

Type III secretion systems (T3SSs) are needle-like structures used by Gram negative bacteria to translocate bacterial proteins (effectors) into eukaryotic cells. The T3SS pathway of plant pathogens is encoded by *hrp* (HR and pathogenicity) and *hrc* (HR and conserved) genes.

The structural study of the HrpA protein, a small hydrophilic protein of the T3SS of *P. syringae* pv. phaseolicola will be presented. HrpA is the major component of T3SS pilus, a needle-like structure, whose diameter is about 6-8 nm and its length up to 2 μm. Recombinant wild type HrpA was overexpressed and purified by affinity chromatography. Moreover, physicochemical and structural study of HrpA protein was performed under different parameters (pH, concentration, shelf-life and temperature) with CD, FTIR, Raman spectroscopy and high resolution TEM.

In addition, physicochemical and structural characterization of deletion mutant (HrpAΔC8) also took place under various conditions with affinity chromatography, CD, SAXS and high resolution TEM. Crystallization was also attempted with this mutant under various conditions.

Finally, the pilus of *P. syringae* pv. phaseolicola was purified in order to study its structural properties with HRTEM and to compare them with those of polymerized recombinant HrpA which forms fibre-like structures with nano- to micron scale features. According to the HRTEM observations, the *in vitro* formed fibers strongly resemble the structural parameters of T3SS pilus.

Whereas HrpA is predicted to be a highly α -helical protein, its CD spectra indicate very low α -helical content and strongly resemble those of disordered proteins. Raman spectroscopy, FTIR and SAXS also support the CD observations.

Ο Πρόεδρος του Τμήματος

Δ. Βλασσόπουλος