



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ
НА НАУКИТЕ**



ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“

ЦВЕТЕЛИНА САШКОВА ПАУНОВА-КРЪСТЕВА

**ФЕНОТИПНИ ВАРИАЦИИ СВЪРЗАНИ С
ПОЛИЗАХАРИДНИТЕ АНТИГЕНИ ПРИ
ESCHERICHIA COLI O157**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА
И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“**

**Професионално направление
„Биологически науки“ с шифър 4.3.
Научна специалност: Микробиология /01.06.12/**

**Научен ръководител:
доц. д-р Стоянка Стоицова**

**Научен консултант:
доц. д-р Радка Иванова**

София 2015

Дисертационният труд съдържа 175 страници, илюстриран е с 56 фигури и 12 таблици.

Библиографската справка включва 270 литературни източника.

Изследванията, свързани с дисертационния труд, са проведени в секция „Морфология на микроорганизмите и електронна микроскопия“ към Департамент по Обща микробиология, Институт по микробиология „Акад. Стефан Ангелов“, Българска Академия на Науките.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на съвместно заседание на Научните семинари по „Обща микробиология“ и „Патогенни микроорганизми и инфекциозна имунология“ на 17.12.2014 г. в Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на 15.04.2015 г. (сряда) от 11.00 часа в залата на Институт по микробиология „Акад. Стефан Ангелов“, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, гр. София.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология „Акад. Стефан Ангелов“, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, гр. София, както и публикувани съгласно ЗРАСРБ на адрес www.microbio.bas.bg.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „ СТЕФАН АНГЕЛОВ“

ЦВЕТЕЛИНА САШКОВА ПАУНОВА-КРЪСТЕВА

**ФЕНОТИПНИ ВАРИАЦИИ СВЪРЗАНИ С
ПОЛИЗАХАРИДНИТЕ АНТИГЕНИ ПРИ
ESCHERICHIA COLI O157**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА
И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“
Научна специалност: Микробиология /01.06.12/

Научен ръководител:

доц. д-р Стоянка Стоицова

Научно жури:

чл. кор. проф. д-р Христо Найденски, двмн, *рецензент*

чл. кор. проф. д-р Иван Митов, дмн, *рецензент*

проф. д-р Венета Грудева, *становище*

проф. д-р Марин Александров, *становище*

доц. д-р Стоянка Стоицова, *становище*

София 2015

Съкращения

CLSM – конфокална лазерна сканираща микроскопия

Con A – лектин от *Canavalia eisiformis*

EHEC - Ентерохеморагични *E. coli*

ELISA - ензим-свързан имуносорбентен тест

ELLA – ензим свързан лектинов тест

LA – локуси на локализирана адхезия

MBL – маноза (манан) свързващ лектин

qPCR - полимеразна верижна реакция в реално време

SBA - лектин от зърна на соя, *Glycine max*

UEA-I - лектин от *Ulex europaeus*

WGA - лектин от зародиши на *Triticum vulgaris*

ECA – ентеробактериален общ антиген

ECAсус - цикличен ентеробактериален общ антиген

ЛПЗ – Липополизахарид

МАМР - микробно-свързана молекулна структура

МВ – мембранни везикули

МПА – месопептонен агар

МПБ – месопептонен бульон

СЕМ – сканираща електронна микроскопия

ФР – физиологичен разтвор

MGA - химичен анализ на ацетилирани метил-гликозидази

FAME - химичен анализ на наситени метилови естери

GC-MS - газ-хроматографски мас спектрометричен анализ

кДНК – обратна транскрипция на РНК в копие ДНК

Увод

Напоследък вниманието на изследователите е привлечено от факта, че отделните клетки в генетично хомогенни микробни култури проявяват забележителна фенотипна вариабилност. Счита се, че тя обуславя адаптивността на бактериалната популация към променливи, включително стресови условия на средата.

Антигенните вариации т.е., свойството на даден щам да експресира различни фенотипове по отношение на повърхностните антигени, са от съществено значение за взаимоотношението на патогенните бактерии с макроорганизма. Те дават на част от клетките в популацията преимущества в едни или други условия на средата. Оцеляването на тези клетки е от значение за цялата популация, тъй като спомага за заемането на различни ниши в гостоприемника. Смяната на местообитания, преминаването на бариери и оцеляването въпреки ефекторните механизми на гостоприемника предполага наличието на добри стратегии за адаптация, сред които е варирането на повърхностните фенотипове в рамките на даден серотип.

Фенотипните вариации, свързани с полизахаридните антигени при *E. coli*, обаче са слабо проучени. Това определи целта на настоящия дисертационен труд. Обект на настоящата научна разработка е щам *E. coli* O157:H(-). Щамове с този серотип са сред най-разпространените причинители на хранителни инфекции, някои от които протичат с множество усложнения, в най-тежките случаи - хеморагична диария и хемолитичен-уремичен синдром. Важен участник, както при развитието на взаимоотношенията микроб-гостоприемник, така и при оцеляването и преноса на бактериите през външната среда, са повърхностните полизахаридни антигени. Във фокуса на нашето изследване са структурно-функционалните характеристики на повърхностния гликом на щама, както и ефектите от промените в условията на растеж върху варирането на бактериалния фенотип.

Цел и задачи

ЦЕЛ: Да се анализират структурно-функционалните характеристики на повърхността на бактериалните клетки и промените, свързани с полизахаридните антигени на *Escherichia coli* O157:H(-), A2CKSS във връзка с адаптациите към среди с различна плътност и при различни температури на растеж, съпътстващи преноса на бактериите при естественото им разпространение.

ЗАДАЧИ:

- Да се изследва ефектът на условията на култивиране върху растежа и някои фенотипни характеристики, свързани с бактериалната повърхност и адхезивните характеристики на щама.
- Да се изследва ефектът на растежната температура върху лектин-свързващите характеристики на щама.
- Да се извърши проверка на хипотези за начина на осъществяване на антигенното вариране на клетъчната повърхност на щама.
- Да се изолират, пречистят и охарактеризират полизахаридните антигени от щама.
- Да се проведат сравнителни изследвания върху свързващите афинитети и ролята на пречистени полизахаридни антигени от щама при разпознаването и фагоцитирането от гостоприемникови клетки.
- Да се изследва ефектът на условията на култивиране върху експресията на гени свързани със синтеза на ЕСА и O157 антигена.
- Да се направи сравнителен анализ на промените и тенденциите в бактериалната популация във връзка с адаптациите към различните среди и температури на растеж, характерни за разпространението на бактериите.

Материали и методи

1. Щамове и условия на култивиране

В проведените експерименти използвахме като моделен щам - *E. coli* O157:H(-) A2CKSS, *Stx1*⁻ и *Stx2*⁻ (шига токсин отрицателен).

Според целите на експериментите култивирахме бактериите по един от следните начини описани в Табл. 1.

Проба	Посевка	Температура	Време	Събиране на клетъчен материал
20 Б	100 µl (от 18 ч. култура) в 5 ml МПБ	20°C	24 ч.	Центрофугиране за 20 мин. при 10 000 об./мин.
20 А	100 µl (от 18 ч. култура) върху МПА	20°C	48 ч.	Смив със стерилен ФР*, центрофугиране за 20 мин. при 10 000 об./мин.
37 Б	100 µl (от 18 ч. култура) в 5 ml МПБ	37°C	18 ч.	Центрофугиране за 20 мин. при 10 000 об./мин.
37 А	100 µl (от 18 ч. култура) върху МПА	37°C	24 ч.	Смив със стерилен ФР*, центрофугиране за 20 мин. при 10 000 об./мин.

Табл. 1 Режим на култивиране на изследваните пробите. Обозначение: *0.85% NaCl (ФР).

2. Построяване на растежни криви

3. Фенотипни характеристики, свързани с повърхността на бактериалните клетки

✓ Подвижност на щама

(а) *флагеларна подвижност* - чрез посевка на бод в 0.3% МПА.

(б) придвижване чрез „роене“, чрез посевка в 0.6% МПА с добавка на 0.02% глюкоза в МПБ.

(в) *трептене* - придвижване по твърда повърхност на границата на агара с дъното на петрито, чрез посеви на бод в 1.5%.

При пробите от метод (в) след култивиране отстранихме агара и оцветихме дъното на петритата за 15 мин. с 0.1 % воден разтвор на кристал виолет с последващо неколккратно интензивно промиване с ФР.

✓ Тест за определяне наличието на индол – с реактив на Ковач

✓ Изследване на маноза-зависимата ко-агрегация, между *E. coli* O157:H(-) и *Saccharomyces cerevisiae*

✓ Адхезия върху HeLa клетки

4. Микроскопски методи

- Подготовка на мрежички за електронно микроскопско изследване
- Сканираща електронна микроскопия
- ConA аглутинация на единични колонии
- Изследване на локализацията на макромолекули чрез белязване с лектини и антитела, конюгирани с колоидно злато или флуоресцентни маркери (Табл. 2).
Отчитане чрез трансмисионна електронна микроскопия, епифлуоресценция и конфокална – лазерна сканираща микроскопия (CLSM).

Метод	Локализиращи молекули	Протокол на белязване
Лектин-голд белязване (ConA, WGA, SBA, UEA-I)	Нередуциращи маноза/глюкоза	Белязване с лектин-биотинови конюгати, последвано от инкубиране със стрептавидин-голд
	N-ацетилглюкозамин	
	Галактоза, N-ацетилгалактозамин	
	Фукоза	
Флуоресцентно имунобелязване	Маркиране на O-157 антигена	Инкубиране със заешки поликлонален анти- <i>E. coli</i> O157 серум и последващо инкубиране със анти-заешки IgG-FITC, пропидиев йодид
	Маркиране на ECA	Инкубиране със заешки поликлонален анти- <i>E. coli</i> O14 серум и последващо инкубиране със анти-заешки IgG-FITC, пропидиев йодид
	Маркиране на въглехидрат-разпознаващи сайтове по повърхността	Рекомбинантен човешки манан-свързващ лектин (MBL), биотинилиран кози анти-човешки IgG, стрептавидин -Alexa Fluor 633, Syto9®
Имуно-голд белязване	Локализация на O-157 антигена	Белязване със заешки поликлонален анти- <i>E. coli</i> O157 серум, кози анти-заешки IgG-голд
	Локализация на ECA	Белязване със заешки поликлонален анти- <i>E. coli</i> O14 серум, кози анти-заешки IgG-голд

Табл. 2 Използвани маркери и протоколи на белязване

5. Изследване на непречистени фракции на полизахаридни антигени

- Изолиране на водни и фенолни фракции по метода на Westphal & Jann (1965)
- Имуноелектрофореза

6. Пречистване на полизахаридни антигени

7. Имунологични методи

- Ензим-свързан лектинов тест (ELLA) на изолирани антигени и цели клетки
- Ензим-свързан-имуносорбентен тест (ELISA) на изолирани антигени и цели клетки

8. In vitro фагоцитоза на флуоресцентни латексови микросфери, конюгирани с антигени

Конюгиране на флуоресциращи латексови сфери с пречистени антигени; изолиране на неутрофили и провеждане на фагоцитозен тест за 30 мин. при 37°C, 5% CO₂ и непрекъснато клатене в присъствието на микросферите; флуориметричен и CLSM анализи.

9. Молекулярно биологични методи

Изследванията PCR и qPCR са проведени върху изолирана геномна ДНК или РНК. Полимеразната верижна реакция в реално време е подготвена след пречистване и обратна транскрипция на РНК в кДНК. Използвани са следните праймерни двойки (Табл. 3). Като ендогенна контрола приложихме house keeping гена *16S rRNA*. Анализът на резултатите е осъществен по метода на $\Delta\Delta Ct$.

Функция на гена/кодиране на белтък	ген	праймер	Секвенция (5'-3')
О 157 ЛПЗ (перозамин синтаза)	<i>rfbE</i>	PF8 PR8	[CGT GAT GAT GTT GAG TTG] [AGA TTG GTT GGC ATT ACT]
Интимин	<i>eae</i>	TIRF TIRR	[ACA GTC CCC AAC GCC AAC CAA] [GGA AGC CCG CCA AAG GAT AC]
Регулатор на дължината на полизахаридната верига при ECA	<i>wzzE</i>	Wz-F Wz-R	[ATGCAACYGGCCTCGTGGGATAC] [AGGCGCGGTTTCGGCAATAAG]
4- α -L-фукозил трансфераза	<i>wecF</i>	Wec-F Wec-R	[CCACCCGCGGCGATTTGAGC] [GTCGCCGGAGTTCCCCACCAGA]
UDP-N-ацетил- β -D-манозаминуринова киселинна трансфераза	<i>wecG</i>	wec-F wec-R	[GGGATCGCCAAAGCAGGAGA] [GCGAAAGCAGGCGGTAGAGC]
Глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа	<i>gapdh</i>	GAD-F GAD-R	[CGGTACCGTTGAAGTGAA] [CCAGCGGTGATGTGTTTACG]
Фактор на елонгация	<i>tuf</i>	TUF-F TUF-R	[TCTATCAAGCCGCACACCAAGTTC] [GTCGCCCGGCATTACCATCTCTAC]
16S rRNA	<i>16S rRNA</i>	IC-F IC-R	[CCT CTT GCC ATC GGA TGT G] [GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC]

Табл. 3 Олигонуклеотидни праймери използвани в PCR и qPCR изследванията (Macrogen, Холандия).

Обработка на данните

Количествените резултати са обработени и графиките са направени на програма Origin Pro 6.1 и Excell, Powerpoint (MS Office). Получаването, регистрирането и обработката на образите е осъществено с програми Axio Vision Release 4.8.2, Photoshop CS6, CorelDRAW, EZ-C1 Free Viewer Ver 390E, NIS Viewer. Получените резултати от флуоцитометричните анализи обработихме с помоща на FCS Express™Diva софтуер. Данните от сравнителната генна експресия обработихме чрез Rotor-Gene Q Series и BioRad CFX софтуери.

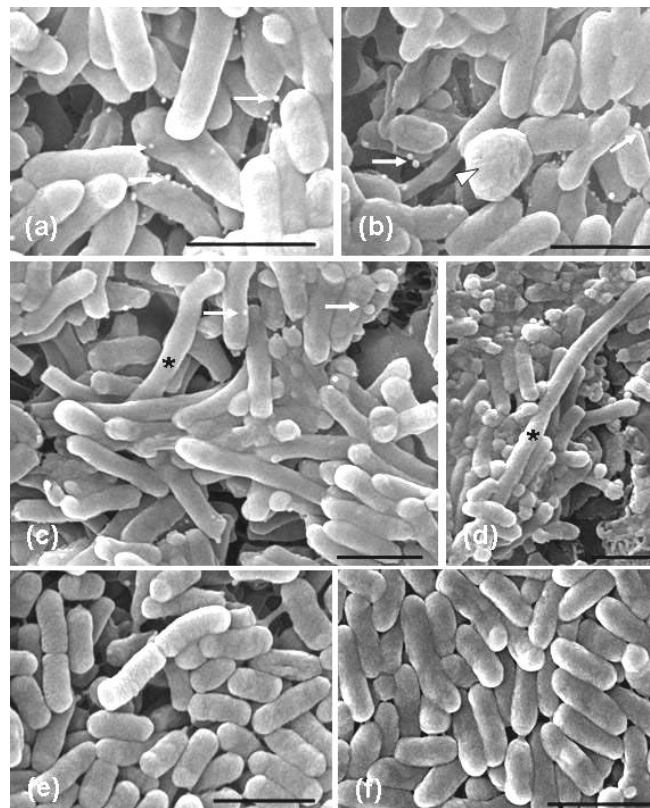
Резултати и обсъждане

Влияние на условията на култивиране върху растежа, и фенотипни характеристики свързани с клетъчната повърхност на *E. coli* O157:H(-)

Разпространението на *E. coli* O157 в естествени местообитания преминава през течни и твърди среди, с редуване на температурите на външната среда и топлокръвния гостоприемник. Изследването е съсредоточено върху възможните ефекти на естествените фактори (растежна температура при 20°C и 37°C или плътност на средата) върху клетъчната повърхност и вариациите в полизахаридните антигени.

□ Влияние на условията на култивиране върху морфологията на бактериите

За проследяване на морфологичните характеристики на щама проведохме сканираща електронна микроскопия на клетки, култивирани при описаните в Табл. 1 параметри на култивиране.



Фиг. 1 Сканираща електронна микроскопия на клетки от *E. coli* O157:H(-), A2CKSS. СЕМ изследването показва разлики в морфологията при различните условия на култивиране: (a, b) 20°C в бульон, (c, d) 37°C в бульон, (e) 20°C върху агар, (f) 37°C на агар. Със следните символи са отразени: стрелките показват наличието на мембрани везикули (MB) (a, b, c); триъгълната стрелка отразява присъствие на окръглена голяма клетка (b); звездичките показват наличие на удължени клетки (c, d). Линейна скала= 2 μ m.

От направените изследвания установихме, че при култивиране върху твърда среда (Фиг. 1 е, f) клетките са по-къси в порядъка между 1.5 до 2 μm дължина и 0.5 μm ширина. При култивиране в течна среда (Фиг. 1 а, b, c, d) клетките са по-големи, като дължината на повечето от тях варира от 2 μm до 4 μm . Като интересна находка отчетохме наличието на единични по-удължени клетки (Фиг. 1 c, d) в пробите култивирани на 37°C в бульон. Този полиморфизъм в популацията се установява само в пробите от течна среда.

В проведеното от нас изследване отчетохме наличие на МВ, секретирани от щама, култивиран в течна хранителна среда и при двете температури на култивиране, но не и в пробите от твърда хранителна среда. Таблото от СЕМ показва, че при 20°C отделянето на МВ е по-интензивно отколкото при 37°C (Фиг. 1).

□ Манозо-зависимата адхезия

Прикрепянето на патогена към гостоприемниковата клетка е първата стъпка за осъществяване на инфекциозен процес.

Посредством тест за ко-агрегация с дрожди *Saccharomyces cerevisiae*, изяснихме влиянието на условията на култивиране върху способността на щама да осъществява манозо-зависима адхезия.

Размер на агрегатите	+(2 до 5 кл.)	++(5 до 10 кл.)	+++ (10 до 20 кл.)
20°C Агар	65%	30%	5%
20°C Бульон	50%	50%	0%
37°C Агар	15%	15%	70%
37°C Бульон	55%	30%	15%

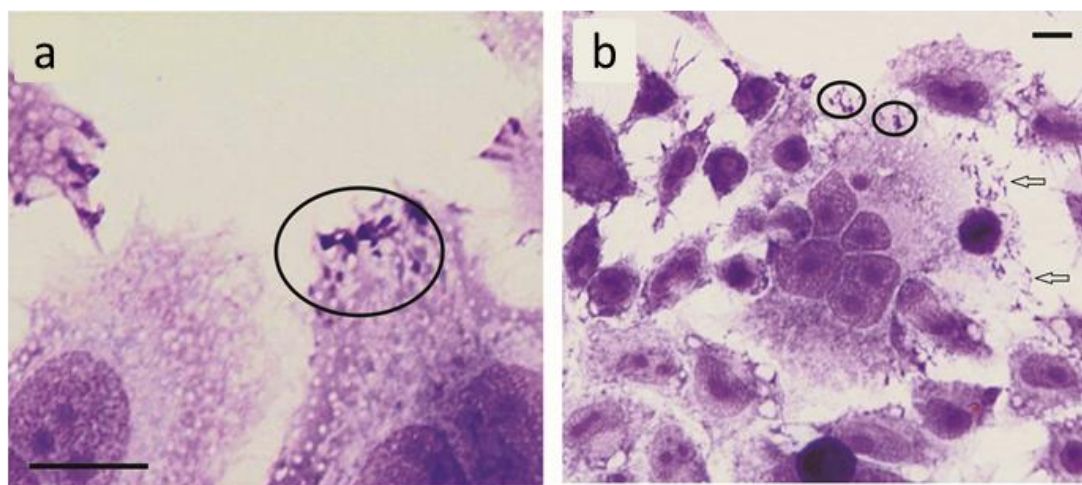
Табл. 2 Маноза-зависимата ко-агрегация, между *E. coli* O157:H(-) и *Saccharomyces cerevisiae*

В изследваните от нас проби, култивирани върху твърда среда при 37°C, установихме около 70% големи агрегати, включващи 10-12 дрождеви клетки (Табл. 4). Това сочи, че в тази проба преобладават клетки *E. coli*, съдържащи на повърхността си манозо-зависими пили. В пробите, съдържащи *E. coli* от течна среда при 37°C, също отчетохме, макар и по-малко на брой, големи агрегати. Бактериите, култивирани на 20°C, оформят с дрождите предимно агрегати, включващи не повече от 5 дрождеви клетки.

Получените от нас резултати показват не само стимулиращ ефект на температурата (37°C) върху манозо-зависимата ко-агрегация, но също така и изразен позитивен ефект на растежа върху твърда среда.

□ Взаимодействие на *E. coli* O157:H(-) с еукариотни клетки

Известно е, че ентерохеморагичните *E. coli* са способни да осъществяват локализирана адхезия. Възникна въпросът дали изследваният от нас щам адхерира към еукариотни клетки и с какъв модел на адхезия се характеризира.

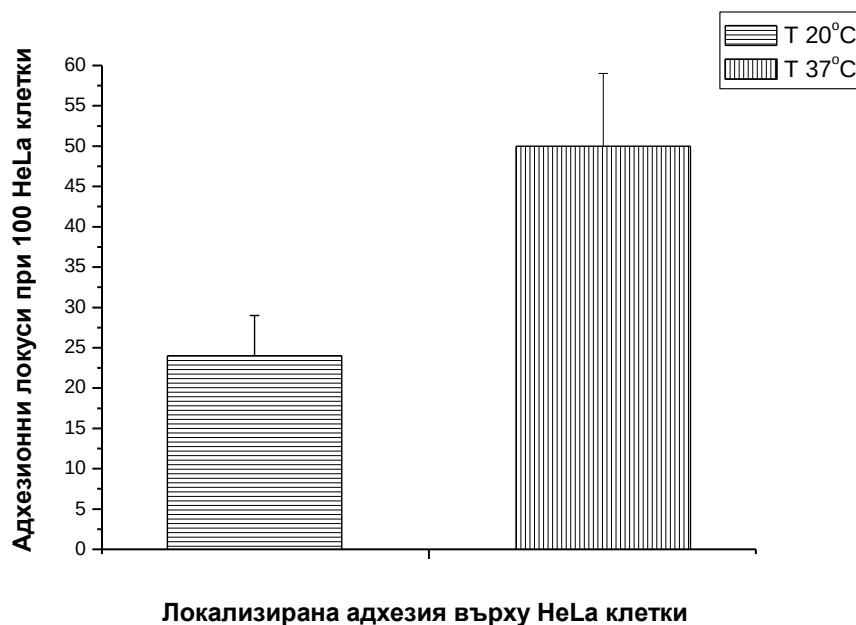


Фиг. 2 Локализирана адхезия при *E. coli* O157:H(-) върху култивирани HeLa клетки (а, b). Оцветяване с Гимза. Обградени са локусите на локализирана адхезия. Стрелките показват дифузно адхерирани бактерии. Линейна скала = 5 μ m.

Установихме, че при взаимодействието си с култивирани HeLa клетки бактериите адхерират в групи. Според класификацията на Мога и сътр. (2009) съществуват два модела адхезия. Прилепените бактерии могат да образуват компактни групи по-известни като локуси на локализирана адхезия (LA) или се разполагат в по-малки групи - т. н. локализирано-подобна адхезия. В проведеното от нас изследване ние отчетохме наличие на адхезионни локуси, съставени от малко на брой клетки (Фиг.2).

Според класификацията упомената по-горе изследваният от нас щам осъществява т. н. локализирано-подобна адхезия.

Получените резултати поставиха въпроса дали адхезията на моделния ни щам се повлиява от растежната температура.



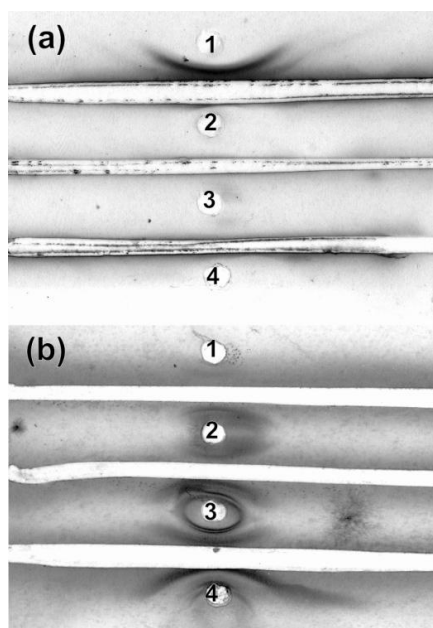
Фиг. 3 Ефект на растежната температура върху локализираната адхезията на щам *E. coli* O157:H(-) по повърхността на HeLa клетки.

Препарати от ко-култивирани HeLa клетки и бактерии от изследвания щам оцветихме с Гимза. Проведохме количествено изследване на броя адхезионни локуси (т.е. групичките адхерирали бактерии) върху 100 HeLa клетки. Установихме, че независимо от еднаквите условия на ко-култивиране, бактериите, които са се развили при 37°C оформят значително повече на брой адхезионни локуси (Фиг. 3).

Повърхностен гликом на щама: проверка на хипотези за механизмите на фенотипно вариране между индивидуалните бактериални клетки

Следващата група задачи насочихме към изучаване на повърхностния гликом на щама и възможните му промени във връзка с условията на култивиране. Изследвахме повърхностния гликом на щама чрез лектин-голд белязване с набор от лектини с различна въглехидратна специфичност. Получените данни показаха наличие на промени в маркирането в зависимост от условията на култивиране. За да изясним тези промени, предприехме изследвания върху изолирани полизахаридни фракции.

Характеристика на водни и фенолни фракции на полизахаридни антигени, изолирани от бактерии, култивирани при 20°C и 37°C



Фиг. 4 Имуноелектрофореза. В ямките се съдържа ЛПЗ от (1) водна фаза (2) фенолна фаза на клетки култивирани при 37°C, (3) водна фаза и (4) фенолна фаза на клетки, култивирани при 20°C. В жлебовете се съдържа (a) ConA (1mg/ml) в PBS с добавка на 0.2 mM CaCl₂, или (b) диагностичен поликлонален заешки анти-*E. coli* O157 серум.

Посредством метода на Westphal и Jann (1965) екстрахирахме ЛПЗ с горещ фенол. Получените водна и фенолна фази диализирахме, лиофилизирахме и изследвахме чрез имуноелектрофореза.

Резултатите показаха, че екстрактът от водна фаза на клетки, култивирани на 37°C оформя ясно изразена преципитационна дъга към ConA в сравнение с останалите проби при които това не се наблюдава (Фиг. 4, а). Имуноелектрофорезата с диагностичен анти-*E. coli* O157 серум показва, че ConA положителната проба (воден екстракт на бактерии, култивирани при 37°C) се разпознава много слабо от имунния серум (Фиг. 4, b).

Данните, получени до този етап на изследването ни, показаха, че под влияние на растежната температурата по клетъчната повърхност на щама могат да се експресират два типа полизахариди, с различен афинитет към имунен серум и ConA. Успоредно с данните за промените в лектин-свързващите характеристики на бактериалните клетки, на този първоначален етап от изследването потвърдихме, че температурата на култивиране повлиява повърхностния гликом на щама. Тези резултати бяха потвърдени и с методите ELLA и ELISA.

Във връзка с получените резултати и споменаваните в литературата механизми на вариране на клетъчната повърхност възникнаха следните три хипотези за начините на осъществяване на вариациите в клетъчната повърхност между индивидуалните клетки на щама:

1. **Фазово вариране на два антигена**
2. **Наличие на различни химично субституирани гликотипове на един единствен липополизахарид**
3. **Промени на бактериалната повърхност в резултат на разлики в експресията на повече от един повърхностен полизахарид.**

Проверка на Хипотеза 1: Фазово вариране в експресията на два антигена: ConA (+)/имунен серум (-) или ConA (-)/имунен серум (+)

Фазовите вариации са две крайни състояния на повърхностната експресия на даден антиген – наличие или отсъствие (генът е или „включен“, или „изключен“: switch on/ switch off).

В предишните ни експерименти установихме различни реактивности на водните и фенолните фракции към маркерите ConA и специфичен анти-серум. Ако тези реактивности се дължат на антигени, които се експресират на принципа на фазовите вариации, може да се очаква, че при растеж на твърда среда ще имаме два типа колонии които са:

- ☐ ConA (+)/антисерум (-)
или
- ☐ Антисерум (+)/ConA (-)

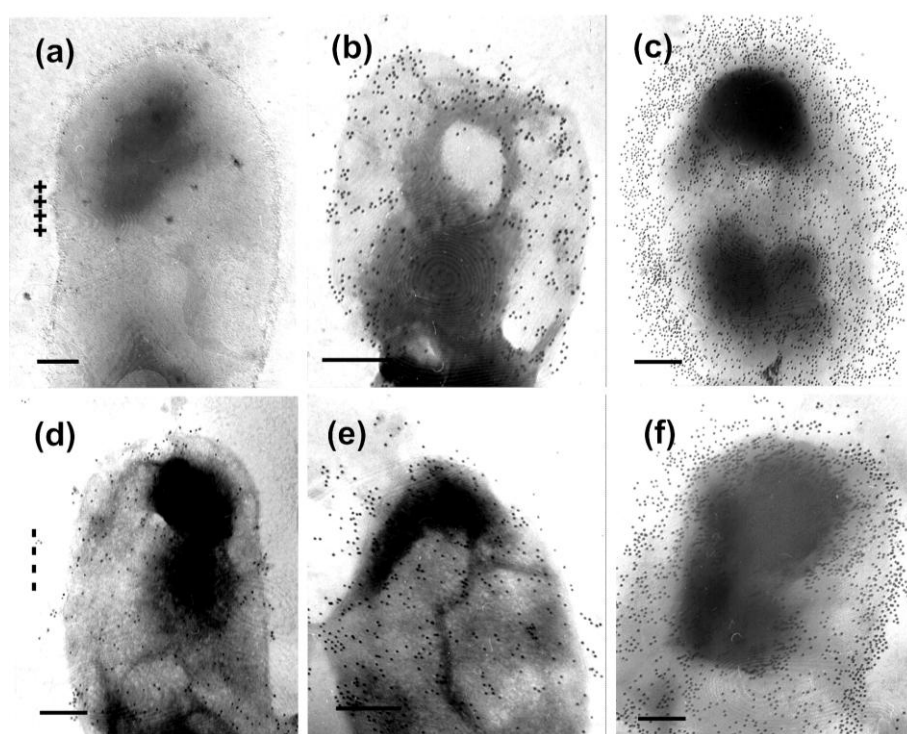
За да проверим тази работна хипотеза за фазово вариране определихме аглутинационния титър на случайно подбрани единични колонии.

Аглутинационни модели върху единични колонии	ConA- $\mu\text{g/ml}^{-1}$			
	660	330	250	170
I (++++)	+	+	+	+
II (+++)	+	+	+	-
III (++)	+	+	-	-
IV (+)	+	-	-	-
V (-)	-	-	-	-

Табл. 5. Видове титри на аглутинация върху единични колонии, култивирани при 37°C и ресуспендирани в буфер PBS/Ca⁺⁺ при намаляващи концентрации на ConA.

Резултатите демонстрираха съществуването на пет различни аглутинационни модели (Табл. 3) – от ConA- позитивни дори и при най-силното разреждане на лектина, през промени в титъра включително до изцяло нереактивни колонии.

За да проверим съществува ли някаква корелация между ConA титъра и наличието/гъстотата по клетъчната повърхност на сайтове, разпознавани от специфичен антисерум, проведохме имуноголд върху бактерии от колонии с висок или нисък конканавалинов титър в съответствие с Табл. 5.



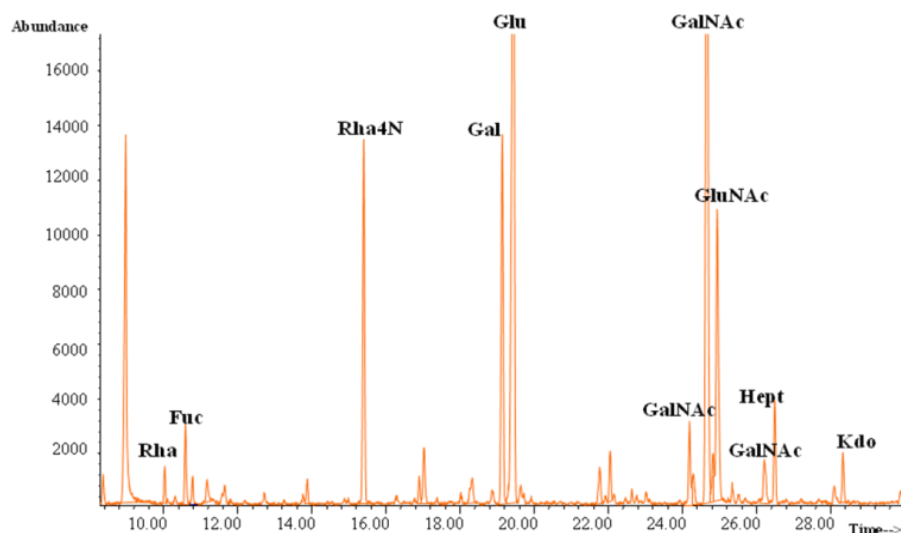
Фиг. 5 Индивидуални различия при имуноголд белязането на клетки от две избрани колонии с различни ConA титри - (от а до с /++++/) и (от d до f /- - - -/). Титруването е проведено с концентрации 660, 330, 250 и 167 $\mu\text{g/ml}$ ConA, като отчитането е отразено с един знак (/+/ за наличие и /-/ за отсъствие на аглутинция за дадената концентрация). Линейна скала = 0.2 μm .

Резултатите показаха, че независимо от лектиновия титър всяка една от пробите съдържаше различни по фенотип клетки по отношение на белязането с имунен серум: от почти пълна липса на белязване до много висока гъстота на реактивните сайтове.

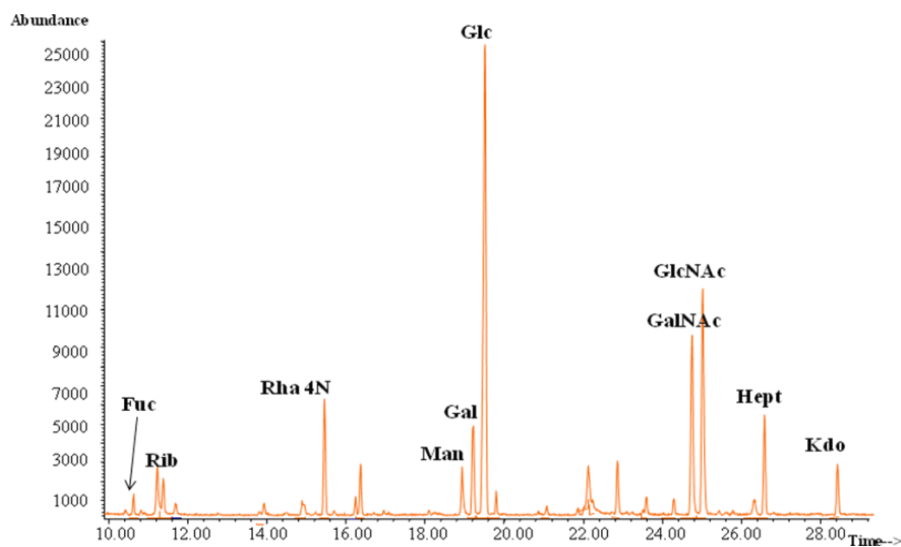
Изводът от проведените изследвания, е че няма корелация между ConA белязането и активността към имунен серум при отделните клетки. Липсата на такава корелация показва, че клетките **НЕ** варират своя фенотип на принципа “on/off” характерен за фазовите вариации.

Проверка на Хипотеза 2: Вариране на повърхността на бактериите чрез химични модификации на полизахаридите

За проверка на тази хипотеза беше проведен химичен анализ на полизахариди изолирани от водни и фенолни фракции на бактериите.



Фиг. 6 GC-MS анализ получен чрез MGA метод (изследване на захарни компоненти) на екстракти от фенолна фаза при клетки култивирани на 37°C.



Фиг. 7 GC-MS анализ получен чрез MGA метод (изследване на захарни компоненти) на екстракти от водната фаза при клетки култивирани на 37°C.

Резултатите за състава на монозахаридите получени чрез MGA (ацетилирани метил-гликозидази) и FAME (наситени метилови естери) върху непречистени лиофилизирани водни и фенолни екстракти показаха наличие на N-ацетил рамнозамин, фукоза.

Освен това бяха установени монозахаридите N-ацетил-галактозамин, потвърждаващ наличието на O157 антигена и N-ацетил-глюкозамин потвърждаващ наличието на ентеробактериален общ антиген в пробите (Фиг. 6 и Фиг. 7).

Химичните анализи на фракциите не потвърдиха хипотезата за съществуване на вариантни гликоформи на O157 антигена, показващи субституиране. Вместо това най-възможна се оказа:

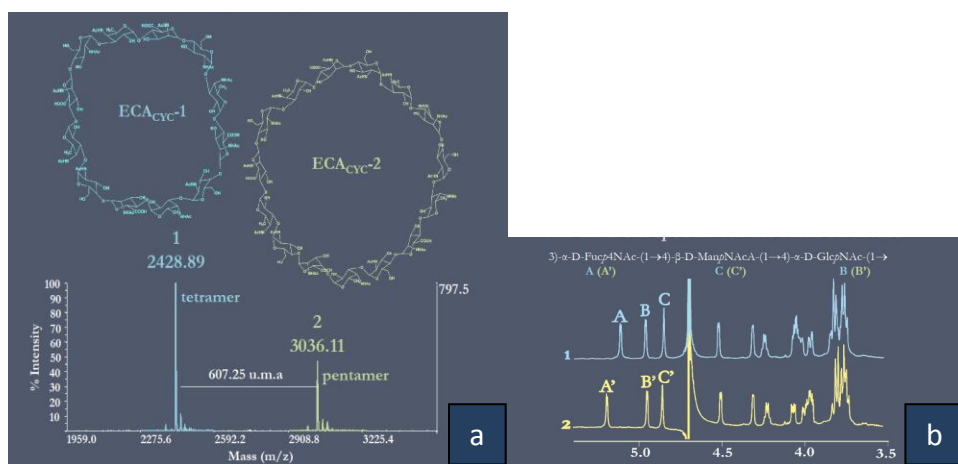
Хипотеза 3: „Промени под влияние на условията на култивиране на бактериалната повърхност в резултат на разлики в експресията на повече от един повърхностен полизахарид, а именно O157 и ECA“.

При химичния анализ на изолираните ECA се установиха както линейни, така и циклични молекули. До този момент в литературата няма данни за ECA_{сус} от патогенни *E. coli*, което ни даде основание да насочим вниманието си към тяхното охарактеризиране.

Изолиране и пречистване на цикличен ентеробактериален общ антиген

От получените бактериални екстракти за целите на по-нататъшното ни изследване подготвихме химично пречистени препарати. От бактериите, култивирани при 37°C върху агар, бяха изолирани и пречистени две различни по големина циклични форми на ECA.

Едната ECA_{сус4} (тетрамер) е съставена от четири повторени последователности [$\rightarrow 3$]- α -D-FucNAc-($1 \rightarrow 4$)- β -D-ManNAcA-($1 \rightarrow 4$)- α -D-GlcNAc-($1 \rightarrow$), а другата ECA_{сус5} е пентамер. Такива циклични форми за пръв път се изолират от патогенен щам *E. coli*, до момента съществуват данни само за ECA_{сус} изолирани от *E. coli* K-12. И при двете изолирани от нас форми не се установи химично субституиране, за разлика от съобщаваното в литературата O-ацетилиране на цикличния тетрамер от щамове *E. coli* K-12 (Kajimura *et. al.*, 2006).



Фиг. 8 Йонно-негативен MALDI-TOF MS (a) на фракция съдържаща две различни циклични форми на ECA (1) тетрамерна форма - ECA_{Cyc}4, и (2) пентамерна форма - ECA_{Cyc}5 при *E. coli* O157:H(-); (b) газ-хроматографски анализ на ECA_{Cyc} повтори в тетрамерната и пентамерна форма (Fregolino E., Ivanova R., Molinaro A., Parrilli M., **Paunova Ts.**, Stoitsova S., De Castro C. EUROCARB, Italy 2011).

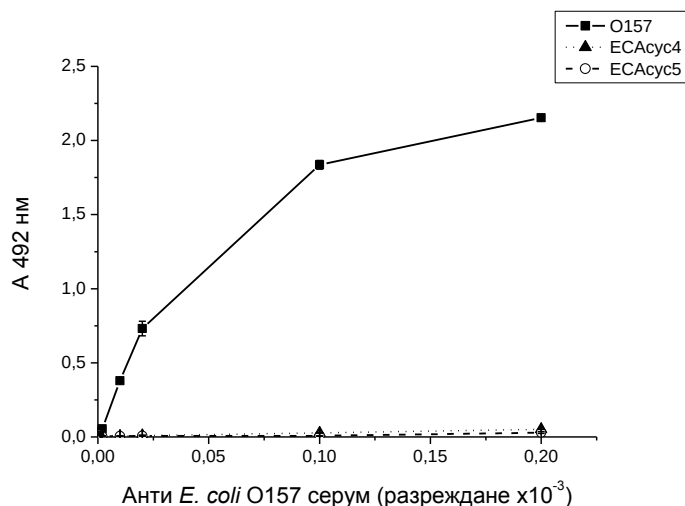
Изследвания върху възможната роля на ECA_{Cyc} като MAMP

Циклични ECA са съобщавани и за други патогенни представители на Enterobacteriaceae, но в достъпната ни литература техните функции си остават неизследвани.

За отправна точка при следващите експерименти ни послужиха данните за друг клас циклични молекули – цикличните β-глюкани, които в качеството им на микробно-свързани молекулни структури (MAMP), са от важност при взаимоотношението на представители от сем. Rhizobiaceae с техните гостоприемници.

MAMP по дефиниция представляват структури, които са характерни за бактериите, но не се откриват при гостоприемника. Поради това гостоприемникът притежава добре разработена система от рецептори за тези структури.

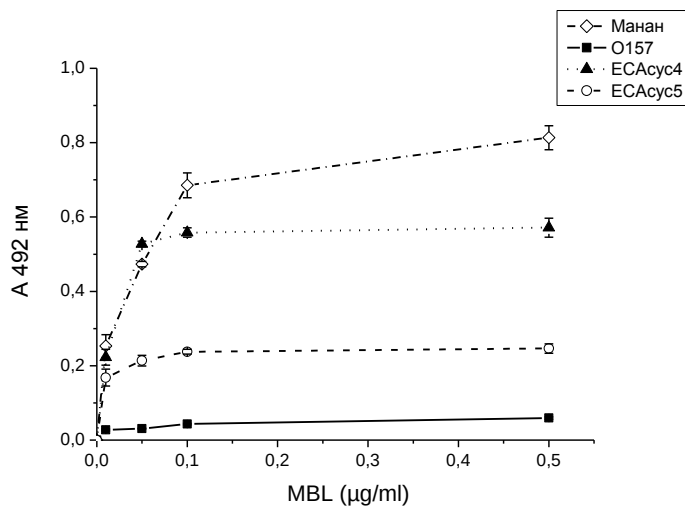
Нарастващият интерес за изясняване на значението на цикличните молекули в качеството им на MAMP в патоген-гостоприемниковите взаимоотношения насочи нашето внимание към изследване на възможната подобна роля на двете пречистени циклични форми на ECA от *E. coli* O157:H(-). Поставихме си въпроса дали тези молекули се разпознават от имунни серуми, хуморални рецептори, разпознаващи структури (лектини, C3b), както и дали активират клетъчно-свързани механизми (фагоцитозен тест). Проведохме серия от експерименти, които имаха за цел сравнително изследване на пречистените циклични ECA и O157 липополизахарида.



Фиг. 9 Сравнителен ELISA тест на взаимодействието на пречистените ECAcys4, ECAcys5 и O157 ЛПЗ с поликлонален анти-*E. coli* O157 серум.

В сравнителен план, проверихме каква е реактивността на пречистените ECAcys4, ECAcys5 и O157 ЛПЗ, натоварени върху 96-ямкова плака, спрямо заешки поликлонален анти-*E. coli* O157 серум. Като вторично анти тяло използвахме анти-заешки IgG – пероксидазен конюгат.

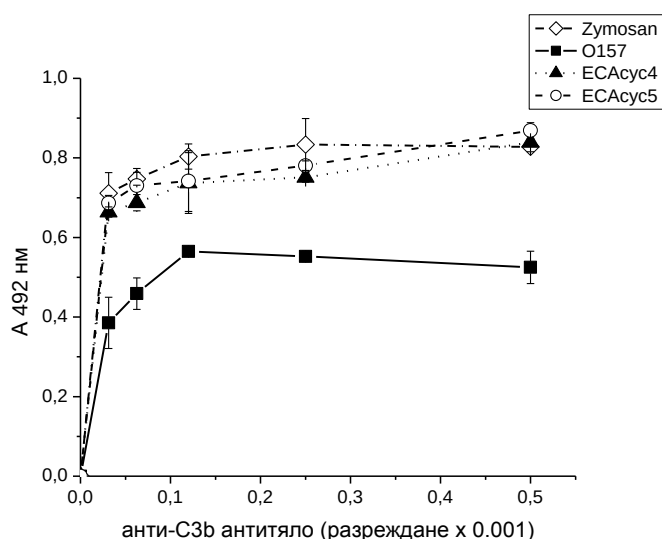
Резултатът от приложеният ELISA тест показва, че само O157 антигенът реагира с анти-*E. coli* O157 серума (Фиг. 9).



Фиг. 10 Сравнителен ELISA тест върху пречистените ECAcys4, ECAcys5 и O157 ЛПЗ с рекомбинантен MBL.

За да установим дали двете циклични форми и O157 ЛПЗ могат да представляват МАР, които се разпознават от манан-свързващ лектин (MBL), проведохме ензим-свързан имуносорбентен тест (Фиг. 10). Като положителна контрола използвахме манан от *Saccharomyces cerevisiae* успоредно с тестваните проби. Резултатите показаха, че и двете циклични форми са добри лиганди за взаимодействие с лектина. Установи се по-висок афинитет на тетрамерната в сравнение с пентамерната циклична форма към MBL. На фона на активността на двете циклични молекули, O157 ЛПЗ показва незначително свързване.

Алтернативният път на активация на комплемента е компонент от вродената имунната система. Процесите от този път се иницират от свързването на белтъка C3b с микробите. Това ни даде основание да сравним депозирането на C3b след инкубиране на 96-ямкова плака, натоварени с трите полизахаридни антигени, със свеж нормален серум.



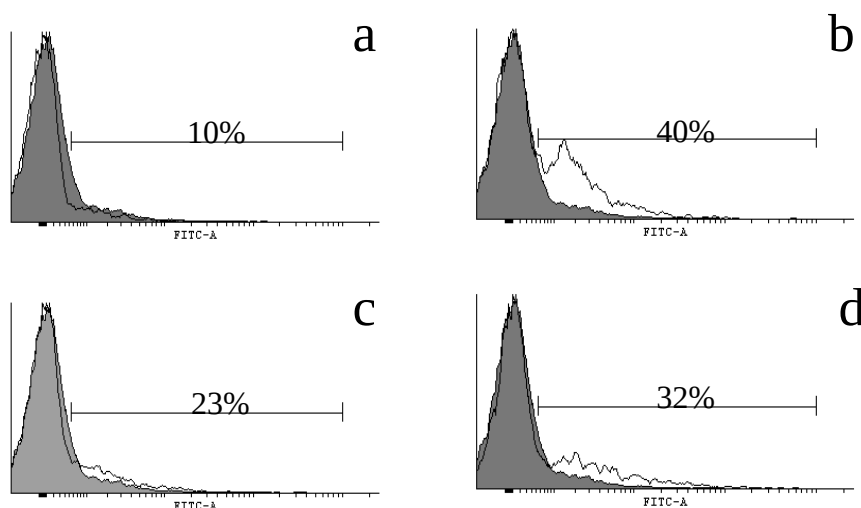
Фиг. 11 Сравнително изследване на свързването на пречистените ЕСАсус4, ЕСАсус5 и O157 ЛПЗ с анти-C3b антитяло.

Резултатите показаха, че инкубирането с нормален човешки серум води до свързване на C3b върху всички проби (Фиг. 11). Отлагането на C3b върху ЕСАсус4 и ЕСАсус5, показва стойности, съизмерими с положителната контрола (зимозан). Изненадващо, депозирането на C3b върху пробите, натоварени с O157 антигена, достигна насищане при доста по-ниска стойност на абсорбцията в сравнение с тези за двата циклични антигена. Тези данни представляват интерес, като се има предвид протичането на хемолитичен уремичен синдром причинен от *E. coli* O157.

Оказва се че при развитието на синдрома, което е свързано с увреждане на бъбреците, се наблюдава депозиране на C3b в бъбречния ендотел на пациентите, което предполага активиране на комплемента при протичане на този синдром (Noris and Remuzzi, 2005; Noris *et. al.*, 2012). В имунните комплекси, включващи C3b, може да участва както Шига-токсин, така и O157 ЛПЗ (Stahl *et. al.*, 2011). Получените от нас данни поставят по-нататък въпроса дали и доколко цикличните антигени от патогена биха имали роля в тези процеси.

За да охарактеризираме ролята на цикличните ЕСА като MAMP-сигнал за клетъчния имунитет, и съответно възможното им разпознаване от неутрофилите, проведохме сравнително изследване на процеса фагоцитоза на белязани с FITC латексови сфери натоварени с пречистени ЕСАсус4, ЕСАсус5 и O157 ЛПЗ. Конюгирането на сферите с изследваните антигени осъществихме за 48 часа. Контролирахме натоварването, като определихме по метода на DuBois (1956) количеството на захарите в изходната проба и в супернатанта, отделен от сферите след протичане на конюгацията. Установихме, че ефикасността на свързване при антигените е около $76\% \pm 3\%$.

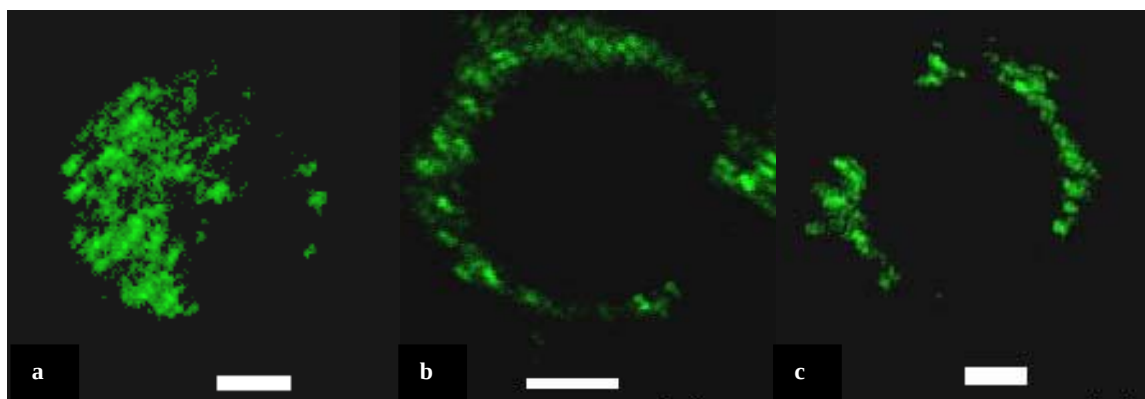
Изолирахме човешки полиморфонуклеарни левкоцити от периферна кръв. Проведохме тест за определяне на фагоцитната активност на микросферите, конюгирани с O157, ЕСАсус4 и ЕСАсус5 антигени. Пробите анализирахме посредством LSR II флуцитометър, както и чрез конфокална микроскопия.



Фиг. 12 Флуцитометрично изследване на процеса фагоцитоза с антиген-натоварени латексови сфери, флуоресцентно белязани с FITC: (a) FITC-белязани сфери без антиген; Конюгиране на сферите с: (b) O157 ЛПЗ, (c) ЕСАсус4 и (d) ЕСАсус5. Получените сигнали отразяват разпределението на неутрофилите в контролната проба, несъдържаща латексови сфери (сив цвят) съпоставен със сигналите получени във фагоцитозния тест за всяка от изследваните проби (a, b, c, d – бял цвят).

Резултатите от флуоцитрометричният анализ показаха отчетливо увеличение на флуоресцентния сигнал при фагоцитозата на сферите, конюгирани с O157 антигена (Фиг. 12 b). Този резултат може да се обясни със стимулиращото действие на O157 ЛПЗ, тъй като в рамките на изследвания кратък, 30-минутен интервал сферите сами по себе си не предизвикаха фагоцитоза (Фиг. 12 a). Много слаба е промяната на резултата при сферите белязани с двете ЕСАсус проби (Фиг. 12 c, d).

Визуалният анализ посредством конфокална лазерна сканираща микроскопия показва, че белязани клетки, макар и в малки количества, има във всички тествани проби. Изследвахме локализацията на сферите конюгирани с O157-антигена (Фиг. 13 a), ЕСАсус4 (Фиг. 13 b) и ЕСАсус5 (Фиг. 13 c) в PMN клетки.



Фиг. 13 Конфокална микроскопия на фагоцитоза при неутрофили, ко-инкубирани за 30 минути с FITC-белязани латексови сфери, натоварени: (a) O157 антигена; (b) ЕСАсус4 и (c) ЕСАсус5 антигените.

Данните от проведеното изследване, показаха че при сферите конюгирани с O157 ЛПЗ се установява стимулиране на фагоцитарната активност и вътреклетъчно разположение на флуоресцентния маркер (Фиг. 13 a). За разлика от това при натоварените с ЕСАсус4 и ЕСАсус5 сфери, наблюдавахме предимно повърхностна локализация върху неутрофилите (Фиг. 13 b, c).

Промените в повърхностния гликом под влияние на условията на култивиране - резултат от промени в ко-експресията на O157 и ЕСА антигените

След експериментите върху функциите на цикличните ЕСА, насочихме вниманието си върху проверката на Хипотеза 3 за осъществяването на междуклетъчните вариации при щама: „Промени под влияние на условията на култивиране на бактериалната повърхност в резултат на разлики в експресията на повече от един повърхностен полизахарид, а именно O157 и ЕСА”.

В тази част от нашето изследване си поставихме въпроса дали и доколко условията на култивиране могат да се отразят върху синтеза на O157 антигена и ЕСА и така да обуславят различия във фенотипните характеристики на бактериите.

За целта проведохме експерименти за сравнителен анализ на генната експресия с qPCR по метода $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001), след предварителен подбор на подходящ ген-контрола, наричан в литературата „house keeping”. Изискването, което следвахме, беше експресията на този ген да се влияе по възможност минимално спрямо изследваните условия на култивиране. Проведохме скрининг на три гена, широко прилагани като контроли при изследване на генната експресия при *E. coli*: *tuf*, *GAPDH* and *16S rRNA* (виж. Табл. 3 от Материали и Методи). Осъществихме изолиране, пречистване и обръщане на РНК в копи-ДНК изолирана от бактерии култивирани при 20°C и 37°C в бульон или върху агар и проведохме qPCR анализи.

Между трите изследвани гена, резултатите от експресията на *16S rRNA* при всички изследвани проби във връзка с проучваните параметри – растежна температура и течна/твърда среда показаха най-малко вариране в стойностите.

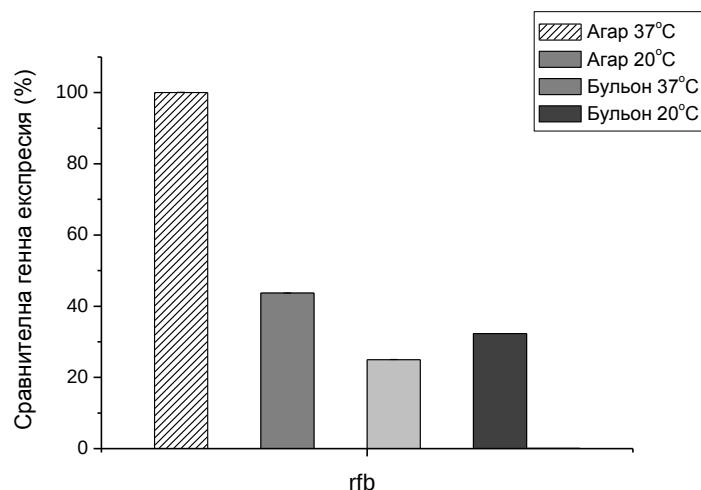
Поради това като подходяща контрола в следващите експерименти се спряхме на *16S rRNA* house keeping гена. Сравнихме генната експресия - C_t стойностите на всеки от изследваните гени и нормализирахме спрямо C_t на house keeping гена *16S rRNA*.

Накрая за всеки ген калкулирахме промяната в експресията (fold change) на таргетните гени в сравнение с „контролна група”. За провеждане на калкулацията, както и съобразно проведените qPCR експерименти, като контролна група избрахме пробите от бактерии, култивирани при 37°C върху агар, за които условно приехме че се равняват на 100%. Сравнителните данни за всяка от изследваните проби (20°C агар, 20°C бульон и 37°C бульон) сме представили като процент от "контролна група" (37°C агар).

Сравнение на генната експресия чрез qPCR на перозамин-синтазния ген (*rfbE*) при изследваните условия на култивиране

В изследвания от нас щам вниманието ни е насочено към антигените O157 и ЕСА. O157 антигенът има линейна структура от повтарящи се тетрамерни единици. В структурата му се съдържа уникална захар, 4-амино-4,6-дидеокси-D-маноза (D-перозамин):

Като маркер за проследяване на експресията на O157 ЛПЗ използвахме *rfbE* гена, който кодира експресията на ензима перозамин-синтаза.

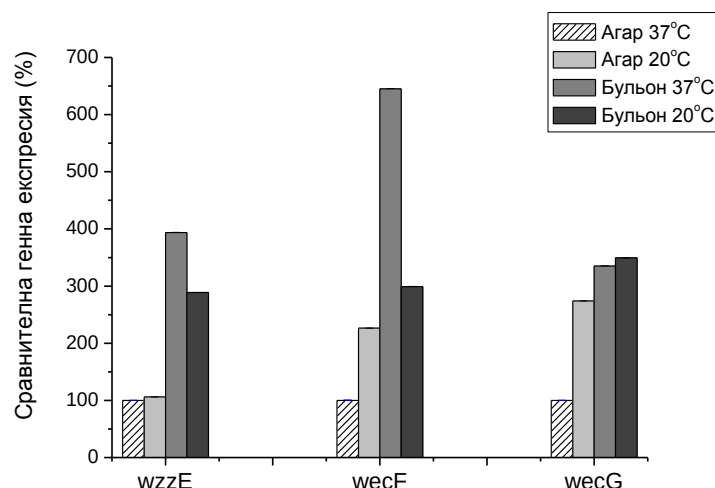


Фиг. 14 Сравнителна генна експресия на перозамин-синтазния ген, проведена чрез метода на qPCR.

Резултатите от сравнителната генна експресия на *rfbE* във връзка с ефекта от условията на култивиране са илюстрирани на Фиг. 14. В сравнителен план като контрола сме приели генната експресия при 37°C (проби от твърда среда) за 100%. В резултат на растеж при 37°C върху твърда среда експресията на изследвания ген е най-висока, като при останалите експериментални условия е установено понижение от 55% (37°C, течна среда), до 65% (20°C, течна среда) и 70% (20°C, твърда среда).

Сравнение на генната експресия чрез qPCR на гени, свързани с биосинтеза на ЕСА при изследваните условия на култивиране

За да демонстрираме как условията на култивиране променят генната експресия на ЕСА, използвахме три гена от биосинтетичния път на ентеробактериалния общ антиген: *wecG*, *wecF* и *wzzE*, кодиращи съответно UDP-N-ацетил- β -D-манозамураминаова киселинна трансфераза, 4- α -L фукозилтрансфераза и регулатор в дължината на полизахаридната верига.

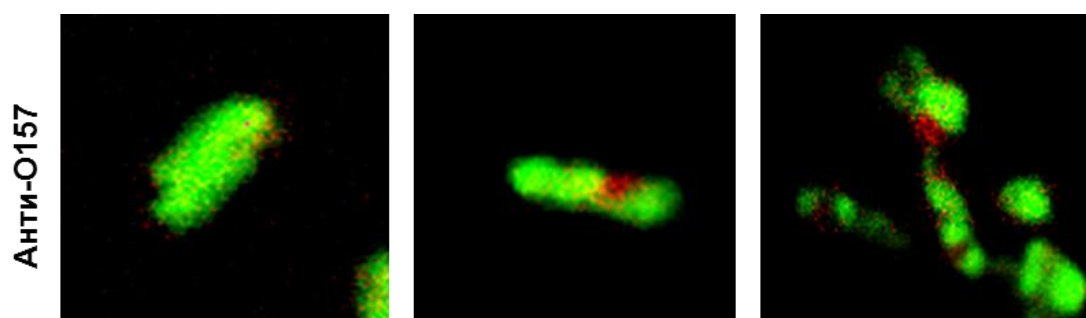


Фиг. 15 Ефект от условията на култивиране върху експресията на три гена от биосинтетичния път на ентеробактериалния общ антиген, проведена чрез qPCR

Резултатите от проведеното изследване на експресията в реално време показаха стимулиране на генната експресия и при трите експериментално тествани гени при пробите култивирани в бульон при 37°C (Фиг. 15) и, макар и в по-ниска степен, при 20°C в течна среда. Растежът върху твърда среда при 20°C също е по-благоприятен в сравнение с приетите условно за 100% проби, култивирани на твърда среда при 37°C.

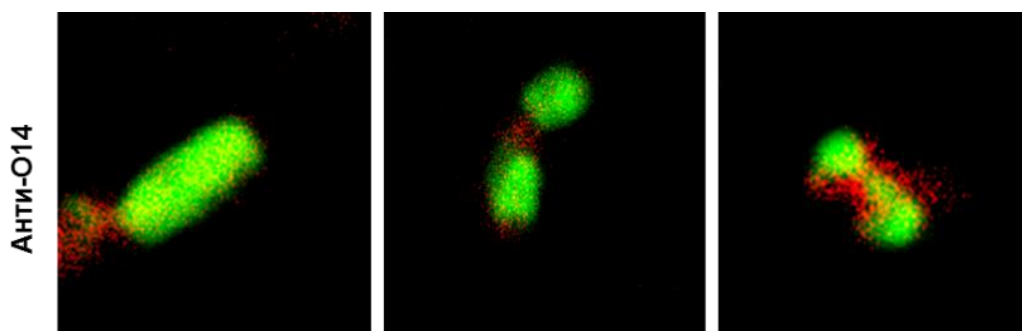
Условията на култивиране и тенденциите в O157- и ЕСА-свързаните фенотипове на бактериите в дадена популация

За да охарактеризираме разнообразието от фенотипове по отношение на количеството и разпределението на O157 антигена върху отделни бактериални клетки, приложихме методите на имунобелязането.



Фиг. 16 Имунофлуоресценция показваща локализирането на O157 ЛПЗ. За маркиране на O157 приложихме анти-*E.coli* O157 серум, като вторично антитяло е приложен анти-зешки (IgG-FITC-зелено) ДНК е белязана с пропидиев йодид (PI-червено).

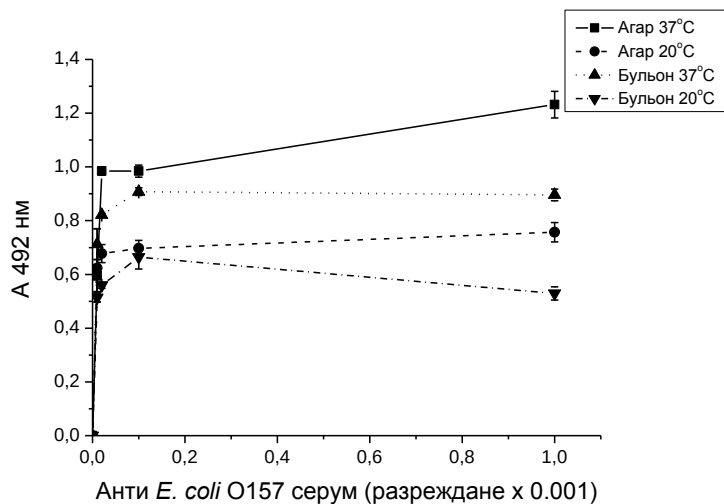
Имунофлуоресцентното изследване (Фиг. 16) показва фенотипно вариране в разпределението на O157 ЛПЗ антигена по повърхността на отделните клетки. Във всяка една от изследваните проби се установи фенотипно разнообразие: по-интензивно белязване на O-антигена при едни клетки в сравнение с други. На Фиг. 16 са показани примери за три отчетливо разграничаващи се състояния в степента на маркиране на съответния антиген: интензивно, средно или слабо белязване. Посредством метода на имунофлуоресценцията проследихме какво е разпределението на ECA сайтовете по клетъчната повърхност на индивидуални бактериални клетки.



Фиг.17 Имунофлуоресценция, показваща различно разпределение на ECA – върху цялата клетка или в двата полюса. За маркиране на ECA приложихме анти-*E.coli* O14 серум, който е визуализиран с анти-заешки IgG-FITC-зелено, ДНК е белязана с пропидиев йодид (PI-червено). Образите са регистрирани на конфокален микроскоп при режим „Averdge”

Проведеното флуоресцентно-микроскопско изследване показват отново широк диапазон на вариране във фенотипа на клетките, по отношение на свързването върху клетъчната повърхност на имунния анти-ECA серум (Фиг. 17). Методите на имунофлуоресценцията ни дадоха отговор за наличие на фенотипно вариране при разпределението на O157 и ECA антигените в индивидуалните клетки в рамките на една и съща бактериална култура.

За да проследим в сравнителен план между пробите какви са тенденциите, възникващи под влияние на условията на бактериален растеж проведохме ELISA на цели клетки.

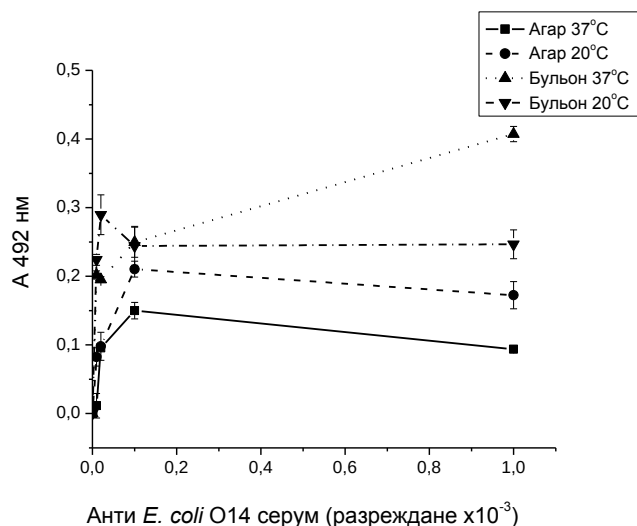


Фиг. 18 Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA), характеризиращ свързването на имуноген анти-*E. coli* O157 серум върху адхерирани цели бактериални клетки.

Данните от проведения анализ показаха свързване на повече антисерум от пробите култивирани на твърда среда при 37°C в сравнение с останалите проби (Фиг. 18). Тези резултати са напълно съпоставими с тези получени от qPCR за генната експресия на перозамин-синтазния ген.

Те сочат, че вероятно в бактериалната популация, култивирана на твърда среда при 37°C, има по-благоприятни условия за синтез и, съответно, съществено повече клетки с висока гъстота на молекулите от O157 ЛПЗ, отколкото при останалите изследвани проби.

За да проследим ефекта от условията на култивиране върху разпределението на ЕСА по повърхността на бактериите в сравняваните популации, проведохме ELISA тест с цели бактериални клетки (Фиг. 19).



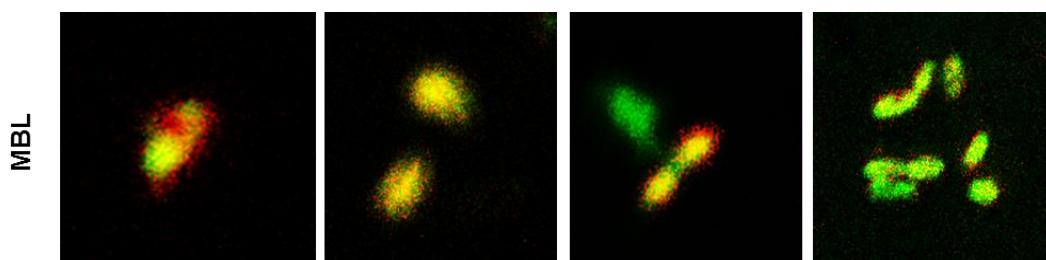
Фиг. 19 Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA), характеризиращ свързването на имунен анти-*E. coli* O14 серум върху адхерирани цели бактериални клетки.

За количествената детекция на ЕСА използвахме заешки антисерум срещу *E. coli* O14:K7L: H(-) щам, експресиращ само ЕСА по повърхността си. Резултатите показаха най-интензивно свързване на анти-*E. coli* O14 серума при бактерии култивирани в бульон при 37°C.

Това е в съответствие с данните, получени от qPCR анализа, където за два от трите изследвани гена, регулиращи синтеза на ЕСА, за тази проба се установиха най-високи стойности.

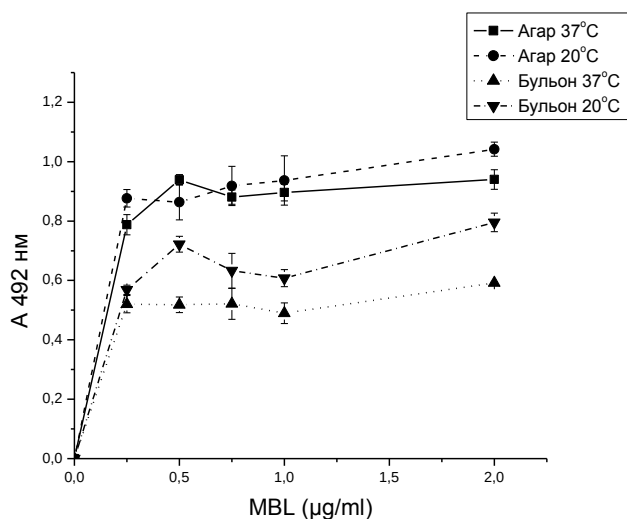
Ефекти от условията на култивиране върху взаимодействието на бактериалните клетки с манан-свързващ лектин

В допълнение на предходните резултати даващи информация за взаимодействието на бактериалните популации с имунни серуми проведохме изследване за проверка на разпознаването от една от основните молекули, участник в механизмите на вродената защита – MBL, като приложихме тристепенен протокол на белязане.



Фиг. 20 Имунофлуоресцентно демонстриране на различни степени на свързване на MBL върху индивидуални бактериални клетки.

Разпознаването на въглехидратните домени на бактериите в една и съща проба също се оказа по-интензивно при едни клетки за разлика от други (Фиг. 20). Това наблюдение сочи, че в една и съща бактериална популация не всички клетки са еднакво разпознаваеми от механизмите на вродения имунитет. За да проверим дали тези различия са случайни или се променят под влияние на условията на култивиране, приложихме ELLA на цели клетки.



Фиг. 21 Ензим-свързан лектинов тест (ELLA), за определяне на афинитета към маноза-свързващ лектин върху цели клетки от *E.coli* O157 култивирани при различни температури (20°C и 37°C) и различни среди твърда (агар) и течна (бульон).

Резултатите от ELLA теста показаха по-добро свързване на лектиновите молекули при бактериите култивирани на твърда среда при двете растежни температури (Фиг. 21). Това потвърждава становището ни, че условията на растеж на бактериите могат да се отразят върху взаимодействието на бактериалните клетки с рецепторите от вродения имунитет, разпознаващи бактериални молекулни структури.

Изводи

1. Условията на култивиране повлияват растежа, морфологията и характеристиките на клетъчната повърхност на *E. coli* O157:H(-). Тенденциите при изследваните режими сочат адаптивни механизми.
2. Клетъчната повърхност на *E. coli* O157:H(-) притежава комплексен гликом, лектин-свързващите характеристики на който се променят под влияние на условията на култивиране.
3. Проверени и отхвърлени са хипотезите за осъществяване на фенотипното вариране на повърхностния гликом на принципа на фазовите вариации или чрез химични модификации на O157 антигена. Възможната хипотеза за осъществяване на наблюдаваните вариации е, че те се осъществяват въз основа на различия между отделните клетки по отношение на количествата на двата антигена: O157 и ЕСА.
4. Култивирането на щама върху твърда среда при 37°C благоприятства синтезирането на циклични форми на ЕСА. Изолирани са два типа такива молекули – тетрамер и пентамер. Тези две молекули са изградени само от основната повтаряща се единица на ЕСА и нямат химични субституции, за разлика от описаните в литературата О-ацетилвани циклични ЕСА-тетрамери при непатогенни *E. coli* K-12.
5. Установената способност на двата циклични антигена да свързват MBL и C3b сочи, че те представляват микробно-свързани молекулни структури (MAMP), различни от вродените механизми на защита.
6. За разлика от цикличните ЕСА, единствено пречистеният O157 антиген, конюгиран с флуоресцентни латексови сфери, е в състояние да стимулира *in vitro* фагоцитоза от неутрофили.
7. Сравнителното изследване върху експресията на *rfbE* гена, маркерен за синтеза на O157 антигена, доказва, че култивирането на твърда среда при 37°C е най-благоприятно за експресията на този ген. Това е потвърдено чрез qPCR и ELISA на цели клетки.

8. Сравнителното изследване върху експресията на гените *wecF*, *wecG* и *wzzE* маркерни за биосинтеза на ЕСА, показва, че култивирането в течна среда при 37°C осигурява най-добри условия за експресия на ЕСА. Това е потвърдено чрез qPCR и ELISA на цели клетки.
9. Промените в повърхностния гликом на щама под влияние на условията на култивиране се отразяват върху взаимодействието на бактериите с MBL.
10. Имуноморфологичните резултати, получени с помощта на три маркера (поликлонални анти-O157 и анти-O14 серуми, и MBL) показаха наличие на индивидуални степенни различия между бактериалните клетки в рамките на една и съща култура. Тези данни сочат, че не всички бактерии в дадена популация от щама са еднакво разпознаваеми от гостоприемниковите рецепторни молекули

Приноси

1. Върху щам *E. coli* O157:H(-), представител на серотип с важно здравно значение, чрез комплексно структурно-функционално изследване са получени оригинални научни данни за ефекта на условията на растеж върху фенотипните характеристики на бактериалните клетки. Доказано е влиянието на култивационни условия, моделиращи тези при естествения пренос на бактериите.
2. За пръв път при този серотип са доказани фенотипни вариации в повърхностния гликом не само във връзка с промените в условията на растеж, но и между клетките в рамките на една и съща бактериална популация.
3. За пръв път от патогенен щам *E. coli* са изолирани и охарактеризирани циклични форми на ЕСА. Установяват се две форми (тетрамер и пентамер), като олигозахаридните повтори не са химично субституирани. Това ги отличава от описаните в предходни изследвания ЕСАсус от лабораторни непатогенни щамове *E. coli* K-12, които са нестехиометрично О-ацетилирани тетрамери (Kajimura *et. al.*, 2006).
4. За пръв път е доказано, че циклични ЕСА от патогенен щам представляват МАМР-лиганди, разпознаваем от хуморалните механизми на вродената защита. Това е принос към изясняване на функциите на цикличните ЕСА при Enterobacteriaceae.
5. За пръв път при представител на вида *E. coli* е изследвана ко-експресията на ЕСА и О-антигена. За пръв път се установяват ефектите на условията на култивиране върху експресията на гени, отговорни за синтеза на повърхностните полизахаридни антигени.

Научни публикации, свързани с дисертационния труд

Paunova Ts., Stoitsova S., Ivanova, R., 2010. Application of lectin cytochemistry for differential labeling of surface polysaccharides of pathogenic strains of *Escherichia coli*. *Acta Morphologica et Anthropologica*, 15, 123-127.

Paunova Ts., Ivanova R., Stoitsova S., 2010. Growth temperature-related cell surface changes of *Escherichia coli* O157:H-. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 24, 585-588.

Paunova-Krasteva T., Pavlova V., Nikolova E., Ivanova R., Stoitsova S., 2011. Phagocytosis of *E. coli* polysaccharide antigen-coated fluorescent spheres by human neutrophils. In: Youth Scientific Conference 'Kliment's Days, 22-23 Nov, Faculty of Biology, Sofia University, Conference Proceedings Second Book, pp. 57-60.

Paunova-Krasteva Ts., Pavlova V., DeCastro C., Ivanova R., Molinaro A., Nikolova E., Stoitsova S. 2014. Cyclic enterobacterial common antigens from *Escherichia coli* O157 as microbe-associated molecular patterns. *Canadian Journal of Microbiology*. 60, (3), pp 173-176.

Paunova-Krasteva Ts., Stoitsova S., Topouzova-Hristova T., Stephanova E. 2014. *Escherichia coli* O157: effects of growth temperature on concanavalin A binding and the adherence to cultured cells. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 67, (3), pp. 343-354.

Topouzova-Hristova T., Stoitsova S., **Paunova-Krusteva Ts.,** Stephanova E. 2012. Interaction of two strains of *Escherichia coli* O157 with human epithelial cells. *Science and Technologies*.2, (1), 47-50.

Участие в научни форуми

Доклади

Paunova-Krasteva Ts. Cell-surface variations in *Escherichia coli* O157 related with polysaccharide antigens. "The advantages and limitations of methods used in bacteria identification and typing". Autumn Training School COST BM1003, Faculty of Biological Science, University of Wrocław, Poland, 23rd-25th September, 2013.

Ts. Paunova-Krasteva, C. De Castro, R. Ivanova, A. Molinaro, S. Stoitsova. Phenotypic variations in cell-surface polysaccharide antigen of *E. coli* O157. 13-th Congress of Microbiologists in Bulgaria. Tryavna, 7-10 October. 2014.

Постери

Paunova Ts., Ivanova R, Stoitsova S. ICC examination of cell-to-cell differences in the exposure of specific antibody- and ConA-binding epitope at the surface of *Escherichia coli* 157. In: EMBO-FEMS-Leopoldina Symposium "Escherichia coli – facettes of a versatile pathogen". Kloster Banz, Germany, Oct. 9-12, P45.

Stoitsova S., Fe Castro C., Molinaro A., Nikolova E., Ivanova R., Pavlova V., **Paunova Ts., Kamburov V.** 2010. Two polysaccharide antigens associated with the surface of *Escherichia coli* O157:H- and their impact in interactions with the host. 12 Конгрес на микробиолозите в България, 11-15 Окт., Юндола.

Fregolino E., Ivanova R. Lanzetta R., Parilli M., **Paunova Ts., Stoitsova S., De Castro C.,** Occurrence of cyclic forms of the enterobacterial common antigen in the pathogenic strain *E. coli* O157:H-. In: 16th Eutropean Carbohydrate Symposium 'Eurocarb'2011', 03-07 July, Sorrento-Naples, Italy

Pavlova V., DeCastro C., **Paunova Ts., Molinaro A., Nikolova E., Stoitsova S.** 2011. Polysaccharide antigens ECA, ECB and O157 of *Escherichia coli* O157:H-: comparative study of the impact in MBL and complement binding and phagocytosis. XX National Congress of the Bulgarian Anatomical Society and IX International Symposium of Clinical Anatomy, 30 Sept.-02 Oct. 2011, Varna, Bulgaria, Proceedings: *Scripta Scientifica Medica* , 43 (2) 2011, pp. 142

Paunova-Krasteva Ts., Topuzova-Hristova T., Stoitsova S. 2013. *Escherichia coli* O157: Effects of growth temperature on concanavalin A binding and the adherence to cultured cells. 24th International Conference of the union of Scientists. Stara Zagora 6-7 June 2013.

Paunova-Krasteva Ts., Ugrinova I., Yusein-Myashkova S., Ivanova R., Stoitsova S., 2013. Culture conditions result in O157- and enterobacterial common antigen-related cell-surface variations in *Escherichia coli* O157. In: 3rd Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT 2013, 17-20 Sept, p. 35.

Paunova-Krasteva Ts., Ivanova R., Stoitsova S., 2013. Recognition of *Escherichia coli* O157 cells by lectins and immune serum is influenced by culture conditions. In: 8th Balkan Conference of Microbiology "Microbiologia Balkanica'2013", 2-5 Oct., Veliko Tarnovo, Program p.36.

D. Borisova, **Ts. Paunova-Krasteva, V. Jordanova, S. Stoitsova.** Culture conditions influence the morphology and the motility-related phenotypes of *Escherichia coli* O157:H(-). 13-th Congress of Microbiologists in Bulgaria. Tryavna, 7-10 October. 2014.

Награди

Награда за най-добър постер:

D. Borisova, **Ts. Paunova-Krasteva**, V. Jordanova, S. Stoitsova. Culture conditions influence the morphology and the motility-related phenotypes of *Escherichia coli* O157:H(-). 13-th Congress of Microbiologists in Bulgaria. Tryavna, 7-10 October. 2014. -

Спечелени грантове:

Ts. Paunova-Krasteva. Effects of culture conditions on the expression of genes responsible for the synthesis of polysaccharide antigens of *E. coli* O157. **World Federation of Scientists National Scholarship Competition 2013.**

Ts. Paunova. ICC examination of cell-to-cell differences in the exposure of specific antibody- and ConA-binding epitope at the surface of *Escherichia coli* 157. FEMS Young Scientists Meeting Grand (YSMG).

Изследователски проекти, свързани с работата по дисертацията

- **Ts. Paunova-Krasteva.** Effects of culture conditions on the expression of genes responsible for the synthesis of polysaccharide antigens of *E. coli* O157. **World Federation of Scientists National Scholarship Competition 2013.**
- „Фенотипни вариации в повърхностните полизахаридни антигени при патогенни щамове *Escherichia coli*”, договор Л-1402/2004 с ФНИ.
- „*Escherichia coli* O157: нови подходи към един нововъзникващ патоген”, договор ДО02-301/2008 с ФНИ.
- „Конфокален лазерен сканиращ микроскоп за оценка на български биоресурси”, договор ИФС-В-603/2007 с ФНИ.
- „Субмикронна обработка и анализ на материали и структури чрез сканираща електронна микроскопия, комбинирана с фокусиран йонен лъч”, договор ДО02-56/2008 с ФНИ.

Изказвам своята огромна благодарност към моя научен ръководител
доц. д-р Стоянка Стоицова за компетентните напътствия и
съдействие не само при изработването на дисертационния труд,
но и за цялостното ми развитие като научен кадър!

Изказвам своята благодарност към колектива от секция „Морфология на
микроорганизмите и електронна микроскопия“, както и на моя научен
консултант доц. д-р Радка Иванова, за активното участие,
отзивчивостта и помоща в хода на експерименталната работа!

Благодаря на доц. д-р Петя Димитрова и гл. ас. д-р Николина Михайлова за
любезното съдействие при обработка и интерпретация на резултатите
свързани с флоуцитометричните анализи!

Отправлям своите благодарности към доц. д-р Ива Угринова,
гл. ас. д-р Шазие Юсеин-Мяшкова и гл. ас. д-р Йордан Манасиев за
техническата помощ и безценните съвети при подготовка на
експериментите свързани с генна експресия!

Благодаря на любезните ни колаборатори
проф. Молинаро и д-р деКастро
от Университета Федерико II в Неапол,
за химичния анализ на пробите!

Посвещавам този труд на моят син,
съпруг и родители и се прекланям пред
безценната им подкрепа, обич и търпение!