

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1998.11.10**

(30) Prioridade(s): **1997.11.12 US 65130 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.08.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.08.05**
219/2009

(73) Titular(es):

THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
UNIVERSITY-INDUSTRY LIAISON OFFICE 103-
6190 AGRONOMY ROAD VANCOUVER, BRITISH
COLUMBIA V5T 1Z3 CA

(72) Inventor(es):

B. BRETT FINLAY CA
BRENDAN BIOTECHNOLOGY LABORATORY KENNY CA
REBEKAH DEVINNEY CA
MARCUS STEIN IT

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **HP90: RECEPTOR MEMBRANAR DO HOSPEDEIRO PARA BACTÉRIAS**
PATOGÉNICAS CODIFICADO PELO GENE BACTERIANO TIR

(57) Resumo:

RESUMO

"HP90: RECEPTOR MEMBRANAR DO HOSPEDEIRO PARA BACTÉRIAS PATOGÉNICAS CODIFICADO PELO GENE BACTERIANO TIR"

Um polipéptido denominado Tir (receptor transportado da intimina) que é segregado por patógenos de adesão e destruição, como *E. coli* enteropatogénica (EPEC) e enterohemorrágica (EHEC). Estes patógenos bacterianos inserem os seus próprios receptores em superfícies de células de mamífero às quais o patógeno bacteriano adere, desencadeando eventos adicionais de sinalização do hospedeiro e nucleação da actina. O diagnóstico de doença causada por *E. coli* patogénica pode ser realizado utilizando anticorpos que se ligam ao Tir para detectar a proteína, ou utilizando sondas de ácidos nucleicos para detectar ácidos nucleicos que codificam o polipéptido Tir. São proporcionadas sequências de ácidos nucleicos isoladas que codificam o polipéptido Tir, péptidos Tir, um método recombinante para produzir Tir recombinante, anticorpos que se ligam ao Tir e um estojo para a detecção de *E. coli* produtora de Tir. Também é proporcionado um método de imunização de um hospedeiro com Tir para induzir uma resposta imunológica protectora ao Tir ou um segundo polipéptido de interesse. Também é proporcionado um método de rastreio de compostos que interferem na ligação de patógenos bacterianos aos seus receptores.

DESCRIÇÃO

"HP90: RECEPTOR MEMBRANAR DO HOSPEDEIRO PARA BACTÉRIAS PATOGÉNICAS CODIFICADO PELO GENE BACTERIANO TIR"

ÁREA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se genericamente à virulência de organismos patogénicos e mais especificamente a factores de virulência associados a patógenos de adesão e destruição, como *E. coli* enteropatogénica e enterohemorrágica.

CONTEXTO DA INVENÇÃO

Escherichia coli enteropatogénica (EPEC) é uma das principais causas de diarreia em lactentes e verificou-se ser a primeira *E. coli* a causar gastroenterite. A EPEC continua a ser uma causa importante de diarreia infantil em países em desenvolvimento, contribuindo para elevada morbidez e mortalidade. A EPEC forma pequenas microcolónias na superfície de células epiteliais infectadas, seguida de contacto íntimo e degeneração localizada das microvilosidades epiteliais em bordadura em escova, originando por fim uma lesão de adesão e destruição (A/E). A lesão A/E (ou em pedestal) está associada à reunião de estruturas citoesqueléticas altamente organizadas em células epiteliais imediatamente por baixo das bactérias aderentes, que incluem os componentes citoesqueléticos actina, α -actinina, cadeia leve de miosina, ezrina e talina.

A EPEC é um membro de um grupo de organismos patogénicos, colectivamente conhecidos como patógenos de adesão e destruição, que aderem a células-hospedeiro e

causam acumulação localizada de actina do hospedeiro por baixo dos organismos aderentes. Os patógenos deste grupo incluem *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC, o agente causador de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urémica) e vários outros patógenos de humanos e animais, incluindo *Citrobacter rodentium* e *Hafnia alvei*.

Um modelo em três fases descreve a patogénese por *E. coli* enteropatogénica. A uma aderência inicial localizada a células epiteliais, mediada por uma fímbria do tipo IV, segue-se a activação de vias de transdução do sinal de células epiteliais do hospedeiro e adesão íntima a células epiteliais do hospedeiro. Estes dois passos finais são colectivamente conhecidos por adesão e destruição. A transdução do sinal nas células epiteliais do hospedeiro envolve a activação da actividade de tirosina-quinase de células-hospedeiro conducente à fosforilação em tirosina de uma proteína membrana do hospedeiro de 90 quiloDalton (kDa), Hp90, e fluxos de fosfato de inositol (IP₃) e cálcio intracelulares. Após esta transdução do sinal, a bactéria adere intimamente à superfície da célula epitelial, acompanhada de danos nas microvilosidades de células epiteliais do hospedeiro e acumulação de proteínas citoesqueléticas por baixo da bactéria.

Recentemente foram identificados alguns dos componentes bacterianos envolvidos na formação do pedestal. A EPEC possui um plasmídeo de virulência que codifica a fímbria formadora de feixes e um regulador positivo do factor de virulência, Per. Todos os genes que codificam produtos necessários à formação do pedestal encontram-se numa ilha de patogenicidade par de 35 quilobases (kb) do cromossoma de *E. coli*. Na região do *Locus* de Destruição de

Enterócitos (LEE) há vários genes cujos produtos têm diferentes funções, incluindo proteínas do sistema de secreção de tipo III, moléculas efectoras segregadas e seus "chaperones", e intimina.

Os sistemas de secreção do tipo III estão a ser cada vez mais descobertos em muitos organismos patogénicos Gram-negativos, e o papel do sistema de secreção de tipo III da EPEC consiste em segregar proteínas necessárias à formação da lesão A/E. Pelo menos duas proteínas segregadas pelo sistema de secreção da EPEC, EspA e EspB, são necessárias para activar sinais induzidos pela EPEC em células epiteliais. Estes sinais incluem fluxos de fosfato de inositol e cálcio e fosforilação em tirosina da Hp90. Mutações em *espA* ou *espB*, ou as presentes no sistema de secreção de tipo III (*sep* e *cfm*), são incapazes de sinalizar ou induzir a ligação da adesina de EPEC intimina a superfícies de células epiteliais.

A intimina é o produto de um *locus* de LEE cromossómico bacteriano, *eaeA*, e é uma proteína da membrana externa da EPEC de 94 kDa necessária para a aderência íntima. Mutantes defeituosos no *eaeA* formam lesões A/E imaturas e não organizam proteínas fosfotirosina nem componentes citoesqueléticos por baixo da bactéria aderente, apesar da transdução de sinais epiteliais ainda estar activada. A intimina participa na reorganização do citoesqueleto do hospedeiro subjacente depois de outros factores bacterianos (EspA e EspB) estimularem a transdução do sinal epitelial.

A ligação da intimina a células-hospedeiro também estimula uma segunda onda de transdução do sinal no interior da célula de mamífero, incluindo fosforilação em

tirosina da fosfolipase Cy. Em células cultivadas, a intimina liga-se à forma da Hp90 fosforilada em tirosina, mas apenas se células de mamífero tiverem sido pré-infectadas com estirpes EPEC possuindo um sistema de secreção do tipo III intacto capaz de segregar EspA e EspB. No entanto, pouco era conhecido acerca da identidade da Hp90, para além de que é fosforilada em tirosina após infecção pela EPEC e de que serve de receptor da intimina. As proteínas fosfotirosina (presumivelmente a Hp90) concentram-se na ponta do pedestal imediatamente por baixo da EPEC, mas os resíduos fosfotirosina não estão expostos à superfície em células não permeabilizadas. Bioquimicamente, a Hp90 comporta-se como uma proteína membranaar integrante do hospedeiro e parece estar altamente conservada. Também parece desempenhar um papel-chave na organização de actina polimerizada por baixo da bactéria aderente depois de se ligar à intimina.

Rosenshine et al. (*EMBO J.* 15, 26 13- 2624, 1996) apresentam uma investigação de mecanismos do hospedeiro desencadeados por *E. coli* enteropatogénica (EPEC).

A entrada da base de dados da EMBL AF025311, na sua versão de 28 de Outubro de 1997, descreve os genes da proteína "chaperone" putativa e butinina (eaeA) de *E. coli*.

A entrada da base de dados da EMBL U59502, na sua versão de 27 de Junho de 1996, descreve o gene da intimina (eaeA) da estirpe de *E. coli* REPEC 84/110/1.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção está definida nas reivindicações.

A presente invenção baseia-se na descoberta de que uma proteína (Hp90) associada à formação do pedestal em bactérias de adesão e destruição, através do seu papel como receptor da intimina, é de facto produzida pelas bactérias de adesão e destruição. A presente invenção proporciona um polipéptido, denominado Tir (receptor transportado da intimina), que é segregado por *E. coli* patogénica. O diagnóstico da doença causada por *E. coli* patogénica pode ser feito por técnicas comuns, como as baseadas na utilização de anticorpos que se ligam ao Tir para detectar a proteína, bem como as baseadas na utilização de sondas de ácidos nucleicos para a detecção de ácidos nucleicos que codificam o polipéptido Tir. A invenção também proporciona sequências de ácidos nucleicos isoladas que codificam o polipéptido Tir, péptidos Tir, um método recombinante para produzir Tir recombinante, anticorpos que se ligam ao Tir e um estojo para a detecção de *E. coli* produtora de Tir. A invenção também proporciona utilizações para imunizar um hospedeiro com Tir com a finalidade de induzir uma resposta imunológica protectora ao Tir. A invenção também proporciona um método de rastreio de compostos que interferem na ligação de patogenes bacterianos aos seus receptores.

Noutro aspecto da invenção são proporcionadas proteínas de fusão. Nesta forma de realização, um polinucleótido que codifica o Tir é operativamente ligado a um segundo polinucleótido que codifica um polipéptido de interesse. Numa forma de realização preferida, o segundo polinucleótido de interesse codifica um polipéptido que confere uma resposta imunológica; todavia, o polipéptido Tir pode ser ligado a qualquer segundo polipéptido de interesse.

Noutra forma de realização, as proteínas de fusão da invenção são distribuídas numa célula-hospedeiro.

Foram identificados alguns receptores de mamífero para adesinas e invasinas bacterianas. A descoberta de que a Hp90, agora designada Tir, é uma proteína bacteriana foi inesperada. Todos os dados bioquímicos anteriores indicavam que era uma proteína membranaar integrante de mamífero. Várias bactérias patogénicas Gram-negativas usam sistemas de secreção do tipo III para causar vários efeitos nas suas células-hospedeiro. A EPEC representa o primeiro patogene que usa um sistema do tipo III para inserir um receptor bacteriano na sua célula-hospedeiro. Outros patogenes também podem utilizar esta estratégia, especialmente aqueles para os quais não foi identificado o receptor de mamífero. O Tir também representa a primeira proteína bacteriana que é fosforilada em tirosina em células-hospedeiro. Outros factores de virulência podem ser inseridos em células-hospedeiro por sistemas do tipo III e são modificados no interior da célula-hospedeiro.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

FIG. 1 mostra que anticorpos gerados contra a proteína de 78 quiloDalton (kDa) segregada por *E. coli* enteropatogénica (EPEC) reconhecem a Hp90.

FIG. 1A mostra a proteína de 78 kDa segregada presente em sobrenadantes de crescimento de EPEC.

FIG. 1B mostra uma análise "Western". Fracções membranares e insolúveis de células HeLa não infectadas ou infectadas com EPEC foram carregadas em duplicado e resolvidas por SDS-6% PAGE. Após coloração em nitrocelulose, as amostras foram sondadas com anticorpos anti-PY (PY) ou anti-EPEC 78 kDa. Os

marcadores da massa molecular estão em kDa. Ep85 é a proteína de EPEC fosforilada em tirosina de 85 kDa. (-) indica células não infectadas e (+) indica células HeLa infectadas com EPEC.

FIG. 2A mostra resultados de imunoprecipitação. A fracção membranar de células J774 não infectadas ou infectadas com mutante de intimina foi isolada, separada em duas alíquotas e depois imunoprecipitada com anticorpos anti-PY ou anti-EPEC de 78 kDa. Os imunoprecipitados resultantes e sobrenadantes límpidos foram resolvidos por SDS-6% PAGE. Após coloração em nitrocelulose, as amostras foram sondadas com anti-PY. (-) indica células não infectadas e (+) indica células J774 infectadas com CVD206.

FIG. 2B mostra uma electroforese em gel bidimensional de fracções membranares de células J774 infectadas com mutante de intimina sondadas com anticorpos anti-PY ou EPEC de 78 kDa. A fracção membranar das células J774 infectadas com mutante de intimina foi preparada como descrito e foi resolvida por focagem isoeléctrica, seguida de SDS-8%-PAGE antes da transferência para nitrocelulose para imunocoloração com anticorpos anti-PY ou anti-EPEC de 78 kDa.

A FIG. 3 mostra que a diferença na migração entre EPEC 78 segregada e Hp90 associada a membranas (Tir) se deve à fosforilação. As células HeLa foram infectadas com o mutante de intimina, CVD206, para induzir a fosforilação da Hp90. Fracções membranares utilizadas para o tratamento com fosfatase foram isoladas na ausência de inibidores de fosfatase e foram incubadas com 2 unidades de fosfatase alcalina durante 4 horas a 37°C. As amostras tratadas (+) ou não tratadas (-) com fosfatase alcalina, bem como o sobrenadante da EPEC

que continha as proteínas segregadas, foram carregados em duplicado e resolvidos por SDS-6% PAGE. Após coloração em nitrocelulose, as amostras foram sondadas com anticorpos anti-PY ou anti-EPEC de 78 kDa. Os marcadores da massa molecular estão em kDa.

FIG. 4 mostra que anticorpos anti-PY e EPEC de 78 kDa etiquetam estruturas idênticas em células de mamífero infectadas. Etiquetagem imunofluorescente de células HeLa após 3 horas de infecção com EPEC. As células fixadas e permeabilizadas foram co-etiquetadas com anticorpos anti-PY e anti-EPEC de 78 kDa (A-D), ou FITC-faloidina e anti-EPEC de 78 kDa (E-H). Os painéis D e H são sobreposições dos painéis B e C, e F e G, respectivamente. Para os painéis E-H foram seleccionados os campos que mostram células infectadas com os pedestais de actina mais desenvolvidos. As setas indicam bactérias não aderentes.

FIG. 5 mostra que a transferência de Tir para células-hospedeiro depende do sistema de secreção do tipo III e das proteínas segregadas por EPEC EspA e EspB. Células HeLa foram infectadas com EPEC ou estirpes contendo mutações em *eaeA* (intimina), *espA*, *espB*, *tir* ou *cfm-14*, e as suas fracções solúveis (membranas) e insolúveis (bactéria e citoesqueleto) em Triton X-100 foram isoladas. As amostras foram resolvidas por SDS-6% PAGE e foram transferidas para nitrocelulose antes da sondagem com anticorpos anti-EPEC de 78 kDa. As proteínas relacionadas com Tir (90, 78 kDa) estão indicadas por setas. Os marcadores da massa molecular estão em kDa.

FIG. 6 mostra a sequência de nucleótidos e proteína prevista de *tir* (A) e mapa genético (B). Na FIG. 6A, dois domínios putativos que abrangem membranas estão

sublinhados e os 6 resíduos tirosina estão sombreados. Na FIG. 6B ilustra-se a localização de *tir* no *Locus* de Destruição de Enterócitos (LEE) e a estratégia de deleção de genes.

FIG. 7 mostra a marcação de Tir com os epítomos de T7 e HSV.

FIG. 7A mostra que o mutante de Tir não causou acumulação significativa de proteínas fosfotirosina ou actina por baixo de bactérias aderentes. Células HeLa foram infectadas durante 3 horas com EPEC, Δtir ou Δtir que expressa uma proteína de fusão T7-Tir ou Tir-HSV clonada. As células infectadas foram fixadas e etiquetadas com anticorpos anti-PY, anti-T7 ou anti-HSV, seguidos de anticorpos apropriados de cabra anti-ratinho conjugados com FITC. A actina polimerizada foi corada com faloidina-Vermelho Texas. A microscopia de fluorescência de células infectadas revelou formação típica de pedestal com co-localização dos epítomos de T7 e HSV e actina em padrões característicos em ferradura.

FIG. 7B mostra que T7-Tir foi detectável em extractos de membranas de células HeLa utilizando anticorpos contra EPEC de 78 kDa, T7 e PY. Para provar que T7-Tir foi fosforilada em tirosina utilizaram-se anticorpos específicos para T7, com a finalidade de imunoprecipitar fracções membranares de células HeLa infectadas com CVD206 ou a estirpe T7-Tir. Como esperado, os anticorpos para T7 não imunoprecipitaram a proteína Tir de 90 kDa, ao passo que precipitaram a proteína de fusão T7-Tir ligeiramente maior que foi reconhecida por anticorpos contra PY, T7 ou EPEC 78. Células HeLa foram infectadas com CVD206 (1) ou Δtir que expressa a proteína de fusão T7-Tir (2). As

fracções (membranas) solúveis em Triton foram seguidamente isoladas e imunoprecipitadas com anticorpos anti-T7. Os imunoprecipitados de membranas e T7 foram carregados em triplicado e resolvidos por SDS-6% PAGE. Após coloração em nitrocelulose, as amostras foram seguidamente sondadas com anticorpos anti-PY, anti-T7 ou anti-EPEC de 78 kDa. As setas contínuas indicam a posição de migração de Tir e as setas sombreadas a de T7-Tir. A adição do marcador de T7 aumentou a massa molecular aparente da proteína fosforilada Tir em comparação com o observado com CVD206. Em contraste com T7-Tir, o próprio Tir não reagiu de forma cruzada com os anticorpos para T7.

FIG. 8 mostra que a intimina se liga a Tir de EPEC.

FIG. 8A mostra que a proteína His-T7Int se ligou especificamente a uma única banda de 78 kDa, subsequentemente identificada como sendo Tir por sondagem da mesma coloração com anticorpos anti-EPEC de 78 kDa. Esta ligação ocorreu de um modo dependente da concentração. Utilizando sistemas de sobreposição de gel, várias proteínas de fusão com intimina ligaram-se apenas a Tir mas não às integrinas β_1 de maior peso molecular (ou qualquer outra molécula da membrana epitelial). Isolaram-se sobrenadantes de crescimento de EPEC ou *tir*, fizeram-se diluições em série de 2 vezes e cada uma foi dopada com quantidades iguais de extractos membranares de HeLa. As amostras foram resolvidas por 12% SDS-PAGE e foram transferidas para nitrocelulose em duplicado antes da sobreposição com 130 μ g da proteína de fusão His-T7Int e sondagem com anticorpos específicos para T7 (painel da esquerda). Após este procedimento, a mesma coloração reagiu com anticorpos anti-EPEC de 78 kDa (painel da

direita). As diluições estão indicadas na parte superior dos géis, com a posição dos marcadores da massa molecular ao lado.

FIG. 8B mostra que a presença de níveis aproximadamente equivalentes das outras proteínas segregadas por EPEC e a ausência de Tir no sobrenadante de *tir* foram confirmadas por coloração com Coomassie e sondagem por ELISA convencional de diluições do sobrenadante com anticorpos anti-EPEC de 78 kDa ou EspB. Adicionaram-se diluições em série da proteína de fusão His-T7Int purificada à placa de ELISA revestida e detectou-se a proteína de fusão ligada utilizando anticorpos anti-T7. O perfil corado com Coomassie de proteínas segregadas derivadas de 1 mL de sobrenadante de EPEC ou *tir* utilizado em ensaios de ligação (painel da esquerda). O painel do meio demonstra a ligação dependente da dose da fusão His-T7Int a Tir. Adicionaram-se a cavidades de ELISA 100 μ L de sobrenadante de EPEC ou *tir* (em triplicado), tendo sido incubadas com diluições em série do péptido His-T7Int. A ligação da proteína His-T7Int foi detectada espectrofotometricamente (A_{490}) utilizando anticorpos específicos para T7, como descrito no EXEMPLO VII. Como mostrado no painel do meio, His-T7Int ligou-se apenas às cavidades que continham Tir no sobrenadante de crescimento. Esta ligação ocorreu de um modo dependente da dose, ocorrendo ligação quase de saturação a 75 ng/cavidade (25 nM). O painel da direita demonstra que a ligação de uma quantidade constante de His-T7Int (75 ng/cavidade) a sobrenadantes de EPEC contendo Tir é inibida de forma competitiva por quantidades crescentes de MBP-Int, mas não de MBP. Apresentam-se os resultados \pm desvio

padrão. A ligação de His-T7Int (75 ng/cavidade) a sobrenadantes de EPEC imobilizada foi inibida, de um modo dependente da dose, por concentrações crescentes do péptido de fusão proteína de ligação à maltose (MBP)-intimina, mas não pela MBP isoladamente. Ocorreu 50% de inibição da ligação com quantidades molares aproximadamente iguais de ambas as proteínas de fusão (25 nM). Mais uma vez, estes resultados salientam que a intimina se pode ligar a Tir não fosforilado de um modo específico.

FIG. 9 mostra a semelhança de sequências entre polipéptidos Tir de EPEC (ID SEQ NO: 2) e EHEC (ID SEQ NO: 4).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um polipéptido como definido nas reivindicações, denominado Tir (receptor transportado da intimina), que é segregado pelo patogene de adesão e destruição *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC).

Estes patogenes bacterianos inserem os seus próprios receptores em superfícies de células de mamífero, às quais o patogene bacteriano então adere para desencadear eventos adicionais de sinalização do hospedeiro, como nucleação de actina. O diagnóstico de doença causada por patogenes produtores de Tir pode ser feito por técnicas comuns, como as baseadas na utilização de anticorpos que se ligam ao Tir para detectar a proteína, bem como as baseadas na utilização de sondas de ácidos nucleicos para detectar ácidos nucleicos que codificam o polipéptido Tir. A invenção também proporciona sequências de ácidos nucleicos isoladas que codificam o polipéptido Tir, péptidos Tir, um método recombinante para produzir Tir recombinante,

anticorpos que se ligam ao Tir e um estojo para a detecção de organismos produtores de Tir. A invenção também proporciona a utilização para imunizar um hospedeiro com Tir com a finalidade de induzir uma resposta imunológica protectora ao Tir. A invenção também proporciona um método de rastreio de compostos que interferem na ligação de patógenos produtores de Tir ao Tir.

Os pormenores das formas de realização preferidas da presente invenção estão apresentados nas reivindicações dependentes.

Polipéptido Tir

A invenção proporciona um polipéptido receptor transportado da intimina (Tir) substancialmente purificado que se liga à intimina. Tal como é aqui utilizado, o termo "Tir" (receptor transportado da intimina) refere-se a um polipéptido segregado que se liga à intimina.

A descoberta de que a Hp90, agora designada Tir, é uma proteína bacteriana foi inesperada. Todos os dados bioquímicos anteriores indicavam que era uma proteína membrana integrante de mamífero. O único meio de detecção consistia em anticorpos anti-PY. Tinha sido previamente presumido que estava na forma não fosforilada em células não infectadas e, assim, era indetectável. No entanto, o Tir foi descoberto em todos os tipos examinados de células de mamífero infectadas com EPEC, e comportou-se como uma proteína conservada.

Vários tipos de evidências demonstram agora a origem bacteriana do Tir. Em primeiro lugar, anticorpos policlonais contra a proteína Tir segregada por EPEC

reconhecem e procedem à depleção imunológica de membranas de Tir. Em segundo lugar, experiências de focagem isoelectrica e microscopia de fluorescência com anticorpos para PY e Tir demonstram a sua identidade. Em terceiro lugar, a identificação e deleção do gene *tir* de EPEC e a geração de proteínas de fusão de Tir marcadas com epítomos demonstram que a proteína Tir bacteriana se torna fosforilada em tirosina e se comporta como Hp90. Por fim, a intimina interage de forma directa e específica com a proteína Tir segregada de EPEC.

A distribuição de Tir em células-hospedeiro requer EspA, EspB e o sistema de secreção do tipo III. Em estirpes sem EspA nem EspB, um Tir fosforilado em tirosina não é detectável em HeLa. Se a distribuição de Tir é suficiente para activar os outros sinais observados em células infectadas com EPEC (como fluxos de cálcio e fosfato de inositol, fosforilação da cadeia leve de miosina, rearranjo de actina), ou se EspA e EspB medeiam estes sinais via mecanismos adicionais ainda não é claro. Presentemente, estes processos variados não podem ser desacoplados. Por contacto com células epiteliais, a EspB adopta uma forma resistente a proteases associada a membranas epiteliais, que pode facilitar a distribuição de Tir na membrana da célula-hospedeiro.

O Tir tem pelo menos três funções identificadas. Uma função é como receptor da intimina de EPEC em superfícies de células de mamífero, ligando-se à intimina na superfície bacteriana. Esta ligação, pelo menos nas condições *in vitro* descritas aqui, não requer fosforilação em tirosina, pois a proteína de fusão de intimina His-T7Int ligou-se à forma do Tir não fosforilada segregada pela bactéria de um modo

específico. Estirpes sem EspA, EspB ou Tir são incapazes de induzir a ligação mediada pela intimina que é necessária para aderência íntima, presumivelmente por serem incapazes de distribuir o Tir na superfície da célula-hospedeiro. Vários tipos de evidências mostram que o Tir está localizado na membrana plasmática e funciona como uma proteína membrana epitelial integrante. A proteína de fusão com intimina só se liga a células epiteliais fixadas que foram pré-infectadas com estirpes de EPEC que distribuem o Tir na célula-hospedeiro, o que sugere que o Tir está exposto à superfície. O Tir está co-localizado com os extractos de membranas celulares epiteliais e não pode ser extraído destes extractos com elevado teor de sal. É improvável que o Tir esteja noutra membrana, devido à sua co-localização por baixo de bactérias aderentes na superfície celular (FIG. 4) e à sua capacidade para se ligar à intimina. O Tir é sensível a proteólise superficial limitada em células não permeabilizadas. Dados de microscopia de fluorescência demonstraram que anticorpos anti-EPEC de 78 quiloDalton (kDa) apenas se ligam a membranas não permeabilizadas de células infectadas com mutante de intimina, mas não a células infectadas com *tir* ou não infectadas, também corroborando uma localização exposta na superfície da membrana plasmática. Por fim, anticorpos para fosfotirosina só reconhecem Tir em células permeabilizadas, indicando uma orientação membrana transepitelial com resíduos fosforilados em tirosina na face citoplasmática.

Uma segunda função do Tir consiste em nucleação da actina após ligação de intimina. Estirpes sem intimina ou Tir são incapazes de localizar actina por baixo de bactérias aderentes, apesar de haver uma acumulação

pronunciada de actina na vizinhança geral de bactérias ligadas. Uma vez que o Tir está localizado na ponta do pedestal em células de mamífero e que a actina não fica organizada por baixo de bactérias se não ocorrer a ligação Tir-intimina, é provável que o Tir esteja envolvido na ligação de actina directa ou indirectamente à membrana do hospedeiro, desse modo formando o pedestal.

Uma terceira função do Tir (que está provavelmente relacionada com a organização de actina) refere-se à transmissão de sinais adicionais a células-hospedeiro depois de ocorrer a interacção Tir-intimina. A ligação mediada pela intimina a células epiteliais desencadeia a fosforilação em tirosina de fosfolipase C γ e outras proteínas do hospedeiro. Estes sinais seguem-se à fosforilação do Tir e a outros eventos precoces de sinalização e ligação de intimina. Foram identificadas poucas proteínas que se ligam a membranas com actina, e o Tir representa um novo candidato a essa função, dada a sua origem bacteriana. No entanto, duas outras moléculas bacterianas de *Listeria monocytogenes* e espécies *Shigella* patogénicas, Acta e IcsA, são capazes de proceder à nucleação de actina através de vários agentes citoesqueléticos de formação de ligações cruzadas, não obstante a partir de uma localização citoplasmática. No entanto, as estruturas citoesqueléticas induzidas por EPEC são mais reminiscentes de microvilosidades; desse modo, a EPEC proporciona um modelo único para estudar a reunião dessas estruturas.

Um resultado inesperado desta invenção é a descoberta de que a intimina não se liga a integrinas β_1 . Os 280 resíduos C-terminais da intimina não se ligam a integrinas

β_1 . Foi detectada a ligação de MBP-Int (cuja construção está descrita no EXEMPLO VII) a células epiteliais quando as células foram pré-infectadas com EPEC, mas não a células não infectadas ou às infectadas com mutantes de secreção do tipo III ou de sinalização, que são células que ainda expressam integrinas β_1 . No entanto, quando se utiliza MBP-Int para precipitar a forma de 90 kDa do Tir a partir de membranas epiteliais, as integrinas β_1 não são co-precipitadas apesar da sua presença no extracto da membrana epitelial utilizado para as precipitações. Adicionalmente, utilizando sistemas de sobreposição de gel (descrito no EXEMPLO VII), várias proteínas de fusão de intimina ligaram-se apenas ao Tir, mas não às integrinas β_1 de maior peso molecular ou a qualquer outra molécula da membrana epitelial (FIG. 8A). Estes resultados mostram que o Tir, e não integrinas β_1 , é o principal receptor da intimina em células cultivadas de mamífero.

O polipéptido Tir proporcionado pela invenção pode ser produzido por qualquer organismo. Especificamente, o polipéptido Tir proporcionado pela invenção pode ser produzido por bactérias. Várias bactérias patogénicas Gram-negativas utilizam sistemas de secreção do tipo III para causar vários efeitos nas suas células-hospedeiro. A EPEC representa apenas o primeiro patogene que utiliza um sistema do tipo III para inserir um receptor bacteriano na sua célula-hospedeiro. É esperado que outros patogenes utilizem esta estratégia, especialmente aqueles patogenes cujo receptor de mamífero não foi identificado. O Tir também representa a primeira proteína bacteriana que é fosforilada em tirosina em células-hospedeiro. É esperado que outros factores de virulência sejam inseridos em células-hospedeiro por sistemas do tipo III, possivelmente

sendo depois modificados no interior da célula-hospedeiro. A EPEC é um membro de um grupo de patógenos relacionados que causam lesões A/E. Dada a semelhança das várias intiminas, EspA, EspB e os sistemas de secreção do tipo III presentes nestes patógenos, é de esperar que patógenos de adesão e destruição sigam uma estratégia semelhante para mediar a aderência de intimina. De facto, sequências relacionadas a montante de *orfU* de EPEC, RDEC e estirpes de *Citrobacter* têm fases de leitura aberta parciais homólogas à sequência C-terminal do Tir de EPEC.

O polipéptido Tir proporcionado pela invenção pode ser produzido por bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas são um grupo diversificado de organismos e incluem *Spirochaetes*, como *Treponema* e *Borrelia*, bacilos Gram-negativos, incluindo *Pseudomonadaceae*, *Legionellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae*, cocos Gram-negativos, tais como *Neisseriaceae*, Bacteróides anaeróbicos e outras bactérias Gram-negativas, incluindo *Rickettsia*, *Chlamydia* e *Mycoplasma*.

Os bacilos (varetas) Gram-negativos são importantes em medicina clínica. Incluem (1) *Enterobacteriaceae*, uma família que compreende muitos géneros patogénicos importantes, (2) géneros *Vibrio*, *Campylobacter* e *Helicobacter*, (3) organismos oportunistas (por exemplo, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e outros) e (4) géneros *Haemophilus* e *Bordetella*. Os bacilos Gram-negativos são os principais organismos presentes em infecções das vísceras abdominais, peritонеu e tracto urinário, bem como invasores secundários dos tractos respiratórios, pele queimada ou traumatizada e sítios de resistência decrescida do hospedeiro. Presentemente, são a causa mais frequente de

bacteremia com risco de vida. Exemplos de bacilos patogénicos Gram-negativos são *E. coli* (diarreia, infecção do tracto urinário, meningite nos recém-nascidos), espécies *Shigella* (disenteria), *Salmonella typhi* (febre tifóide), *Salmonella typhimurium* (gastroenterite), *Yersinia enterocolitica* (enterocolite), *Yersinia pestis* (peste negra), *Vibrio cholerae* (cólera), *Campylobacter jejuni* (enterocolite), *Helicobacter jejuni* (gastrite, úlcera péptica), *Pseudomonas aeruginosa* (infecções oportunistas incluindo em queimaduras, tracto urinário, tracto respiratório, infecções em feridas e infecções primárias da pele, olhos e ouvidos), *Haemophilus influenzae* (meningite em crianças, epiglottite, otite média, sinusite e bronquite) e *Bordetella pertussis* (tosse convulsa). *Vibrio* é um género de bactérias Gram-negativas móveis em forma de vareta (família *Vibrionaceae*). *Vibrio cholerae* causa cólera em humanos; outras espécies de *Vibrio* causam doenças em animais. *E. coli* coloniza os intestinos de humanos e animais de sangue quente, onde fazem parte da flora comensal, mas há tipos de *E. coli* que causam doenças intestinais em humanos e animais. Incluem *E. coli* enteroagregada (EaggEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). *E. coli* uropatogénica (UPEC) causam infecções do tracto urinário. Também pode mencionar-se *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC). Para além de causarem em animais infecções semelhantes a algumas causadas em humanos, há doenças específicas de animais, incluindo: septicemia de vitelos, mastite bovina, doença de edema porcino e micoplasmose em aves domésticas.

Foi clonado um gene *tir* homólogo em EHEC (ID SEQ NO: 3). No entanto, a EHEC não causa fosforilação em tirosina do seu receptor, indicando que há diferenças entre estes dois patógenes. Assim, a invenção proporciona um método científico útil para investigar patogénese por biologia celular.

O facto do Tir de EPEC, mas não Tir de EHEC, ser fosforilado em tirosina proporciona um método para diferenciar estes dois patógenes que contêm factores de virulência muito semelhantes. Assim, as bactérias podem ser sondadas com anticorpos anti-fosfotirosina e anti-Tir. Tal como é aqui utilizado, anticorpos "anti-fosfotirosina" são aqueles anticorpos que se ligam a um epítopo em que o epítopo tem uma tirosina fosforilada. Anticorpos anti-fosfotirosina ligam-se a proteínas com tirosina fosforilada, mas não a tirosina que não esteja fosforilada. A detecção da ligação de anticorpos anti-fosfotirosina e tir a bactérias pode ser feita por imunofluorescência ou colorações "Western". A EPEC será positiva para a ligação anti-fosfotirosina e anti-tir. A EHEC será positiva para a ligação anti-Tir e negativa para a ligação anti-fosfotirosina.

As bactérias patogénicas do grupo dos cocos aeróbicos Gram-negativos incluem *Neisseria*, *Moraxella* (*Branhamella*) e *Acinetobacter*. O género *Neisseria* inclui dois patógenes humanos importantes, *Neisseria gonorrhoeae* (uretrite, cervicite, salpingite, proctite, faringite, conjuntivite, faringite, doença inflamatória pélvica, artrite, doença disseminada) e *Neisseria meningitides* (meningite, septicemia, pneumonia, artrite, uretrite). Outros cocos aeróbicos Gram-negativos que foram previamente considerados

inofensivos incluem *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* (bronquite e broncopneumonia em pacientes com doença pulmonar crónica, sinusite, otite média), tendo sido recentemente mostrado ser uma causa comum de infecções em humanos.

O polipéptido Tir proporcionado pela invenção pode ser segregado por bactérias Gram-negativas através do sistema de secreção do tipo III. Bactérias Gram-negativas utilizam maquinaria especializada para exportar moléculas através das suas duas membranas, um processo crítico para mover factores de virulência para a superfície bacteriana, onde podem interagir com componentes do hospedeiro. A secreção Gram-negativa foi dividida em quatro grandes vias. Em primeiro lugar, a secreção de Tipo I é utilizada por uma pequena família de toxinas, de que hemolisina de *E. coli* é o protótipo. Em segundo lugar, o sistema de secreção do tipo II é a principal via de exportação utilizada pela maior parte das bactérias Gram-negativas para exportar muitas moléculas, incluindo alguns factores de virulência; partilha homologia com mecanismos de resistência a fármacos de mamíferos. Em terceiro lugar, o sistema de secreção do tipo IV está codificado no interior do produto segregado, que sofre ele próprio clivagem como parte do mecanismo de secreção: o protótipo deste sistema é a protease de IgA de *Neisseria*. Em quarto lugar encontra-se a via de secreção descoberta mais recentemente, a via do tipo III.

Os sistemas de secreção do tipo III foram originalmente descritos como sistema de secreção de proteínas de virulência segregadas de *Yersinia*, YOPs, que são críticas para a virulência de *Yersinia*. Um sistema de secreção homólogo foi então identificado em vários

patógenos de plantas, incluindo *Pseudomonas syringae*, *P. solanacearum* e *Xanthomonas campestris*. Estes patógenos de plantas utilizam esta via de secreção para segregar factores de virulência (estruturas em grampo e outras) que são necessários para causar doenças em plantas. Apesar do sistema de secreção ser semelhante, estruturas em grampo e YOPs (isto é, os factores de virulência segregados) não são polipéptidos homólogos. Vários outros sistemas de secreção do tipo III necessários à virulência foram mais recentemente identificados noutros patógenos. Estes sistemas incluem os sistemas de invasão que *Salmonella* e *Shigella* utilizam para entrar em células e causar doença. Foi identificado em *Salmonella* outro sistema de secreção do tipo III que é crítico para doença, apesar dos produtos segregados desta via e os mecanismos de virulência ainda não terem sido determinados. *Pseudomonas aeruginosa* tem um sistema de secreção do tipo III necessário para a secreção da Exoenzima S, um potente factor de virulência.

Numa forma de realização, o polipéptido Tir pode ser segregado pelo patógeno de adesão e destruição (A/E), EHEC. O Tir de EPEC é necessário para activar a transdução do sinal de células epiteliais, contacto íntimo e formação de lesões de adesão e destruição, processos correlacionados com doença. Exemplos de células epiteliais são células dos intestinos, células da linha de células HeLa e células da linha celular J774.

Numa forma de realização, o Tir tem um peso molecular de cerca de 78 kDa determinado por SDS-PAGE, mas quando é obtido de células epiteliais (Hp90) tem um peso molecular de cerca de 90 kDa, determinado por SDS-PAGE. Apesar de se prever que a proteína Tir segregada por EPEC codifica uma

proteína de 56,8 kDa, observou-se uma massa molecular de cerca de 78 kDa para a proteína segregada, que pode reflectir alguma modificação bacteriana adicional ou migração anormal devido à composição de aminoácidos ou características estruturais. Prevê-se que o Tir tenha dois domínios transmembranares com os seis resíduos tirosina, substratos de quinases potenciais, na metade C-terminal.

Os polipéptidos Tir incluídos na invenção podem ter uma das sequências de aminoácidos de Tir de *E. coli* patogénica, por exemplo, a sequência de aminoácidos da ID SEQ NO: 4.

Tal como é aqui utilizado, o termo "polipéptido" abrange qualquer variante alélica respectiva de ocorrência natural, bem como formas recombinantes preparadas. Os polipéptidos Tir abrangem formas de ocorrência natural e recombinantes, isto é, formas de ocorrência não natural da proteína e do péptido que são suficientemente idênticas ao péptido Tir de ocorrência natural para terem uma função semelhante de ligação ao receptor da intimina ou do tipo intimina. Exemplos desses polipéptidos incluem os polipéptidos Tir de *E. coli* entero-hemorrágica, mas não se limitam a estes. Proteínas e polipéptidos incluem derivados, análogos e péptido-miméticos e proteínas de fusão. Alternativamente, os péptidos Tir podem ser sintetizados quimicamente utilizando procedimentos de síntese conhecidos do profissional. Preferivelmente utiliza-se um sintetizador de péptidos automático com aminoácidos N^αFmoc numa resina de enxerto de polietilenoglicol-poliestireno (PEGPS). Podem utilizar-se agentes de ligação adequados, como agente de ligação

péptido amida (PAL), por exemplo, para criar grupos terminais carboxamida.

Fragments de Tir também são úteis, para além da sequência polipeptídica completa do Tir. Também se descrevem fragmentos de polipéptidos Tir que retêm pelo menos uma actividade ou epítopo específico do Tir. Por exemplo, um fragmento do polipéptido Tir contendo, por exemplo, pelo menos 8 - 10 aminoácidos pode ser utilizado como imunogene na produção de anticorpos específicos para o Tir.

O fragmento pode conter, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que está conservada no Tir. Diferentes fragmentos do Tir são úteis para induzir uma resposta imunológica a patógenos produtores de Tir. Por exemplo, diferentes anticorpos para diferentes fragmentos do Tir são úteis para bloquear diferentes interacções entre o Tir e outras moléculas, como a intimina. É bem conhecido dos profissionais da área da imunologia que um conjunto de anticorpos para diferentes aspectos de uma molécula é mais útil do que um único anticorpo para um aspecto da molécula. Para além da sua utilização como imunógenos peptídicos, os fragmentos de Tir acima descritos podem ser utilizados em imunoensaios, como ELISAs, para detectar a presença de anticorpos específicos para o Tir em amostras. Além disso, fragmentos de Tir são úteis para interferir na ligação entre o polipéptido Tir completo e a intimina. Descreve-se abaixo um método de rastreio de polipéptidos Tir e outros compostos que interferem na ligação do polipéptido Tir à intimina.

Adicionalmente, o polipéptido Tir ou respectivos fragmentos que retêm a actividade biológica de permitir a distribuição numa célula-hospedeiro podem ser úteis como mecanismo de distribuição para proteínas de fusão. Como mencionado acima, o Tir é inserido em membranas de células-hospedeiro pela EPEC. Uma vez que o Tir acaba por residir em células-hospedeiro, isto levanta a oportunidade de explorar o Tir como sistema de distribuição de proteínas de fusão estranhas fundidas ao Tir a serem distribuídas em células-hospedeiro. Este sistema pode ser utilizado para alterar a resposta imunológica a proteínas estranhas; por exemplo, uma resposta mediada por células/de células T será induzida por antigene fundido ao Tir e apresentada na superfície de células, e assim o antigene será apresentado por uma célula própria ou do hospedeiro em vez de o ser como proteína segregada. Alternativamente, o Tir pode funcionar como adjuvante quando fundido a sequências estranhas, desse modo induzindo uma resposta de células B, melhorando a resposta imunológica relativamente a péptidos isolados.

O termo "substancialmente purificado" é aqui utilizado para descrever uma molécula, como um polipéptido (por exemplo, um polipéptido Tir, ou respectivo fragmento) que está substancialmente livre de outras proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e outros materiais biológicos aos quais está naturalmente associado. Por exemplo, uma molécula substancialmente purificada, como um polipéptido, pode consistir em pelo menos 60% por peso seco da molécula de interesse. O profissional pode purificar polipéptidos Tir utilizando métodos comuns de purificação de proteínas, e a pureza dos polipéptidos pode ser determinada utilizando métodos comuns, incluindo, por

exemplo, electroforese em gel de poliacrilamida (por exemplo, SDS-PAGE), cromatografia em coluna (por exemplo, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)) e análise de sequências de aminoácidos amino-terminais.

Também estão incluídos na invenção polipéptidos com sequências que são substancialmente idênticas à sequência de um polipéptido Tir. Uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica é uma sequência que difere de uma sequência de referência apenas por uma substituição de aminoácidos conservativa, nomeadamente substituição de um aminoácido por outro da mesma classe (por exemplo, substituição de um aminoácido hidrófobo, como isoleucina, valina, leucina ou metionina, por outro, ou substituição de um aminoácido polar por outro, como a substituição de lisina por arginina, ácido aspártico por ácido glutâmico ou asparagina por glutamina), ou por uma substituição não conservativa, deleção ou inserção, desde que o polipéptido retenha pelo menos uma actividade específica do Tir ou um epítopo específico do Tir. Por exemplo, um aminoácido pode ser deletado de um polipéptido Tir, originando uma modificação da estrutura do polipéptido sem alterar significativamente a sua actividade biológica. Por exemplo, pode remover-se um aminoácido amino- ou carboxi-terminal que não é necessário para a actividade biológica do Tir. Essas modificações podem originar o desenvolvimento de polipéptidos Tir activos mais pequenos.

Também se descrevem polipéptidos Tir com sequências de aminoácidos que são pelo menos 50% idênticas à sequência de aminoácidos de um polipéptido Tir, como a ID SEQ NO: 2 e a ID SEQ NO: 4. A extensão da comparação na determinação da homologia das sequências de aminoácidos pode ser, por

exemplo, pelo menos 15 aminoácidos, por exemplo, pelo menos 20, 25 ou 35 aminoácidos. A homologia pode ser medida utilizando "software" comum de análise de sequências (por exemplo, Sequence Analysis Software Package do Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705; ver também Ausubel *et al.*, *supra*).

Os polipéptidos Tir da invenção podem ser obtidos utilizando qualquer um de vários métodos comuns. Por exemplo, podem produzir-se polipéptidos Tir em sistemas comuns de expressão recombinante (ver abaixo), quimicamente sintetizados (esta abordagem pode limitar-se a pequenos fragmentos de péptidos Tir) ou purificados de bactérias onde são naturalmente expressos (ver, por exemplo, Ausubel *et al.*, *supra*).

Proteínas de fusão nas quais polipéptidos Tir completos, como definido nas reivindicações, estão fundidos a uma proteína não relacionada também pertencem ao âmbito da invenção e podem ser concebidos com base nas sequências de nucleótidos de *tir* e de aminoácidos de Tir reveladas nesta secção e na secção acima. A proteína de fusão também pode ser manipulada de modo a conter um sítio de clivagem localizado entre uma sequência Tir e a sequência da proteína diferente de Tir, de modo que o polipéptido Tir possa ser removido da fracção diferente de Tir por clivagem. Essas proteínas ou polipéptidos de fusão incluem mas não se limitam a fusão com IgFc, que pode estabilizar a proteína Tir *in vivo*, ou fusão com uma enzima, proteína fluorescente, um segundo polipéptido de interesse ou proteína luminescente, que conferem uma função marcadora. O polipéptido de interesse pode ser um antígeno para o qual

se deseja induzir uma resposta imunológica ou induzir imunidade selectiva.

Polinucleótido Tir

A invenção também proporciona polinucleótidos isolados que codificam os polipéptidos Tir descritos acima. Por exemplo, polinucleótidos isolados podem codificar os polipéptidos Tir com a sequência de aminoácidos da ID SEQ NO: 4. Estes polinucleótidos podem conter sequências de nucleótidos de ocorrência natural, ou sequências que diferem das sequências dos ácidos nucleicos de ocorrência natural que codificam o Tir mas que codificam os mesmos aminoácidos, devido à degenerescência do código genético. Os ácidos nucleicos da invenção podem conter nucleótidos de DNA ou RNA, ou combinações ou modificações destes.

Por "polinucleótido isolado" pretende-se significar um polinucleótido, por exemplo, uma molécula de DNA ou RNA, que não é imediatamente contíguo às sequências flanqueadoras 5' e 3' às quais normalmente é imediatamente contíguo quando presente no genoma de ocorrência natural do organismo de onde deriva. Assim, o termo descreve, por exemplo, um ácido nucleico que está incorporado num vector, como um vector plasmídico ou viral, um ácido nucleico que está incorporado no genoma de uma célula heteróloga (ou no genoma de uma célula homóloga mas num sítio diferente daquele onde ocorre naturalmente) e um ácido nucleico que existe na forma de uma molécula separada, por exemplo, um fragmento de DNA produzido por amplificação por PCR ou digestão com enzimas de restrição, ou uma molécula de RNA produzida por transcrição *in vitro*. O termo também descreve um ácido nucleico recombinante que faz parte de um gene híbrido que codifica sequências polipeptídicas adicionais

que podem ser utilizadas, por exemplo, na produção de uma proteína de fusão.

Tal como é aqui utilizado, o termo "amplificar" refere-se a aumentar o número de cópias de um polinucleótido específico. Por exemplo, a reacção em cadeia de polimerase (PCR) é um método de amplificação de uma sequência polinucleotídica utilizando uma polimerase e dois "primers" oligonucleotídicos, um complementar a um dos dois filamentos polinucleotídicos numa extremidade da sequência a ser amplificada e o outro complementar ao outro dos dois filamentos polinucleotídicos na outra extremidade. Uma vez que os filamentos de DNA sintetizados de novo podem subsequentemente servir de modelos adicionais para as mesmas sequências de "primers", rondas sucessivas de hibridização dos "primers", alongamento dos filamentos e dissociação produzem uma amplificação rápida e altamente específica da sequência desejada. Também pode utilizar-se PCR para detectar a existência da sequência definida numa amostra de DNA. Numa forma de realização específica, a invenção proporciona um método para amplificar e, assim, detectar o polinucleótido *tir*.

As moléculas de ácidos nucleicos da invenção podem ser utilizadas como modelos em métodos comuns de produção de produtos genéticos de Tir (por exemplo, RNAs de Tir e polipéptidos Tir; ver abaixo). Adicionalmente, as moléculas de ácidos nucleicos que codificam polipéptidos Tir (e respectivos fragmentos) e ácidos nucleicos relacionados, tais como (1) ácidos nucleicos contendo sequências que são complementares ou que hibridizam com ácidos nucleicos que codificam polipéptidos Tir, ou respectivos fragmentos (por exemplo, fragmentos contendo pelo menos 12, 15, 20 ou 25 nucleótidos), e (2) ácidos nucleicos contendo sequências

que hibridizam para sequências que são complementares a ácidos nucleicos que codificam polipéptidos Tir, ou respectivos fragmentos (por exemplo, fragmentos contendo pelo menos 12, 15, 20 ou 25 nucleótidos), podem ser utilizadas em métodos centrados nas suas propriedades de hibridização. Por exemplo, como descrito mais pormenorizadamente abaixo, essas moléculas de ácidos nucleicos podem ser utilizadas nos métodos seguintes: métodos de PCR para sintetizar ácidos nucleicos de Tir, métodos para detectar a presença de um ácido nucleico de Tir numa amostra, métodos de rastreio para identificar ácidos nucleicos que codificam novos membros da família Tir e métodos terapêuticos.

A invenção também inclui métodos, como definido nas reivindicações, para identificar moléculas de ácidos nucleicos que codificam membros da família de polipéptidos Tir para além dos polipéptidos Tir apresentados na FIG. 9. Nestes métodos, uma amostra, por exemplo, uma biblioteca de ácidos nucleicos, como uma biblioteca de cDNA, que contém um ácido nucleico que codifica um polipéptido Tir é rastreada com uma sonda específica para Tir, por exemplo, uma sonda de ácido nucleico específica para Tir. Sondas de ácidos nucleicos específicas para Tir são moléculas de ácidos nucleicos (por exemplo, moléculas que contêm nucleótidos de DNA ou RNA, ou respectivas combinações ou modificações) que hibridizam especificamente para ácidos nucleicos que codificam polipéptidos Tir, ou para respectivas sequências complementares. O termo "sonda específica para Tir", no contexto deste método da invenção, refere-se a sondas que se ligam a ácidos nucleicos que codificam polipéptidos Tir, ou a respectivas sequências complementares, numa extensão maior, de forma detectável,

do que a ácidos nucleicos que codificam outros polipéptidos, ou a respectivas sequências complementares. Assim, o termo "sonda específica para Tir" inclui sondas que podem ligar-se a ácidos nucleicos que codificam polipéptidos Tir (ou a respectivas sequências complementares).

A invenção facilita a produção de sondas de ácidos nucleicos específicas para Tir. Podem conceber-se métodos para obter essas sondas com base nas semelhanças de sequências de sequências polinucleotídicas que codificam polipéptidos Tir, cujos alinhamentos de sequências de aminoácidos estão apresentados na FIG. 9. As sondas, que podem conter pelo menos 12, por exemplo, pelo menos 15, 25, 35, 50, 100 ou 150 nucleótidos, podem ser produzidas utilizando qualquer um de vários métodos comuns (ver, por exemplo, Ausubel *et al.*, *supra*). Por exemplo e preferivelmente, as sondas são geradas utilizando métodos de amplificação por PCR. Nestes métodos concebem-se "primers" que correspondem a sequências conservadas de Tir, que podem incluir aminoácidos específicos de Tir, e o produto de PCR resultante é utilizado como sonda para rastrear uma biblioteca de ácidos nucleicos.

Identificaram-se sequências de nucleótidos que codificam Tir de EHEC (ID SEQ NO: 3) seguindo genericamente este processo com base na análise das sequências da ID SEQ NO: 1. As semelhanças de sequências entre a proteína codificada e o polipéptido Tir de EPEC estão apresentadas na FIG. 9.

Como é conhecido na área, os "primers" de PCR são tipicamente concebidos de modo a conterem pelo menos quinze

nucleótidos, por exemplo, 15 - 30 nucleótidos. Descreve-se a seguir a concepção de "primers" específicos para Tir contendo vinte e um nucleótidos que codificam péptidos Tir contendo sete aminoácidos. Preferivelmente, a maior parte ou todos os nucleótidos dessa sonda codificam aminoácidos conservados em Tir, incluindo aminoácidos específicos de Tir. Por exemplo, podem utilizar-se "primers" contendo sequências que codificam péptidos contendo pelo menos 40% de aminoácidos conservados em Tir. Esse "primer", contendo vinte e um nucleótidos, pode incluir sequências que codificam que codificam pelo menos três aminoácidos conservados em Tir. Assim, o "primer" pode conter sequências que codificam pelo menos um aminoácido específico de Tir, por exemplo, até sete aminoácidos específicos de Tir. Depois de sequências de aminoácidos específicos de Tir serem selecionadas como modelos contra os quais se pretende conceber as sequências de "primers", os "primers" podem ser sintetizados utilizando, por exemplo, métodos químicos comuns. Como descrito acima, devido à degenerescência do código genético, esses "primers" devem ser concebidos de modo a incluírem sequências degeneradas apropriadas, como pode ser facilmente determinado pelo profissional.

Tal como é aqui utilizado, o termo "*tir*" refere-se ao polinucleótido que codifica o polipéptido Tir. Estes polinucleótidos incluem sequências de DNA, cDNA e RNA que codificam o Tir. Todos os polinucleótidos que codificam a totalidade ou uma porção do Tir estão também aqui incluídos. Esses polinucleótidos incluem polinucleótidos de ocorrência natural, sintéticos e intencionalmente manipulados. Por exemplo, um polinucleótido *tir* pode ser sujeito a mutagénese dirigida a sítios. A sequência do

polinucleótido *tir* também inclui sequências anti-sentido. Todas as sequências de nucleótidos degeneradas estão incluídas na invenção desde que a sequência de aminoácidos do péptido Tir codificado pela sequência de nucleótidos se mantenha funcionalmente inalterada.

Tal como é aqui utilizado, o termo "ácido nucleico" abrange RNA bem como DNA e cDNA de filamentação simples e dupla. O polinucleótido que codifica o Tir inclui a ID SEQ NO: 3, bem como sequências de ácidos nucleicos complementares a essa sequência. Uma sequência complementar pode incluir um nucleótido anti-sentido. Quando a sequência consiste em RNA, os desoxinucleótidos A, G, C e T da ID SEQ NO: 3 são substituídos pelos ribonucleótidos A, G, C e U, respectivamente. Também estão incluídos na invenção fragmentos das sequências de ácidos nucleicos descritas acima que têm pelo menos 15 bases de comprimento, o que é suficiente para permitir que o fragmento hibridize selectivamente para DNA que codifica a proteína da ID SEQ NO: 4 em condições fisiológicas.

Em reacções de hibridização de ácidos nucleicos, as condições utilizadas para se atingir um nível particular de restrição irão variar, dependendo da natureza dos ácidos nucleicos a serem hibridizados. Por exemplo, pode considerar-se o comprimento, grau de complementaridade, composição da sequência de nucleótidos (por exemplo, teor de GC *versus* AT) e tipo de ácido nucleico (por exemplo, RNA *versus* DNA) das regiões de hibridização dos ácidos nucleicos na selecção de condições de hibridização. Uma consideração adicional é se um dos ácidos nucleicos está imobilizado, por exemplo, num filtro.

Um exemplo de condições de restrição progressivamente maior é o seguinte: 2 x SSC/0,1% SDS a cerca da temperatura ambiente (condições de hibridização); 0,2 x SSC 0,1% SDS a cerca da temperatura ambiente (condições de restrição baixa); 0,2 x SSC/0,1% SDS a cerca de 42°C (condições de restrição moderada), e 0,1 x SSC a cerca de 68°C (condições de restrição elevada). A lavagem pode ser efectuada utilizando apenas uma destas condições, por exemplo, condições de restrição elevada, ou pode utilizar-se cada uma das condições, por exemplo, durante 10 - 15 minutos cada, na ordem listada acima, repetindo qualquer um ou todos os passos listados. No entanto, como mencionado acima, as condições óptimas irão variar dependendo da reacção de hibridização particular envolvida, e podem ser determinadas empiricamente.

Podem obter-se sequências de DNA da invenção por vários métodos. Por exemplo, o DNA pode ser isolado utilizando técnicas de hibridização que são bem conhecidas na área. Estas incluem mas não se limitam a (1) hibridização de bibliotecas com sondas para detectar sequências de nucleótidos homólogas, (2) reacção em cadeia de polimerase (PCR) em DNA utilizando "primers" capazes de hibridizar para a sequência de DNA de interesse e (3) rastreio com anticorpos de bibliotecas de expressão para detectar fragmentos de DNA clonados com características estruturais partilhadas.

Os procedimentos de rastreio que se baseiam na hibridização de ácidos nucleicos permitem isolar qualquer sequência genética de qualquer organismo, desde que seja disponibilizada a sonda apropriada. Sondas oligonucleotídicas que correspondem a uma parte da

sequência que codifica a proteína em questão podem ser sintetizadas quimicamente ou produzidas por fragmentação da sequência nativa. A síntese química requer que sejam conhecidas pequenas extensões oligopeptídicas da sequência de aminoácidos. A sequência de DNA que codifica a proteína pode ser deduzida do código genético, todavia a degenerescência do código genético deve ter tomada em consideração. É possível realizar uma reacção de adição misturada quando a sequência é degenerada. Isto inclui uma mistura heterogénea de DNA de filamentação dupla desnaturado. Para esse rastreio, a hibridização é preferivelmente realizada em DNA de filamentação simples ou DNA de filamentação dupla desnaturado. Quando utilizado em combinação com a tecnologia da reacção em cadeia de polimerase, podem mesmo ser clonados produtos de expressão raros.

A invenção proporciona sequências de ácidos nucleicos que codificam os polipéptidos Tir, vectores e células-hospedeiro que os contêm e métodos de expressão. Depois de isolado um péptido de Tir, ácidos nucleicos que codificam o péptido podem ser isolados por métodos bem conhecidos na área. Estes ácidos nucleicos isolados podem ser ligados em vectores e introduzidos em células-hospedeiro adequadas para expressão. Métodos de ligação e expressão de ácidos nucleicos em células são bem conhecidos na área (ver Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989, incorporado aqui por referência). No EXEMPLO V construíram-se os "primers" MS 102+ (ID SEQ NO: 8) e MS 103- (ID SEQ NO: 9) utilizando esses métodos.

A invenção proporciona vectores contendo polinucleótidos que codificam o polipéptido Tir. Tal como é aqui utilizado, "vectores" inclui plasmídeos, vectores virais de DNA e RNA, vectores de baculovírus, vectores para utilização em levedura e outros vectores bem conhecidos dos profissionais. Vários tipos de vectores estão comercialmente disponíveis e podem ser utilizados para implementar esta invenção. Exemplos de vectores úteis na prática desta invenção incluem vectores tão amplamente variados tais como o vector de pequeno número de cópias pMW118, o vector suicida de selecção positiva pCVD442 e o pBluescript II SK(+) comercialmente disponível (Stratagene, La Jolla, CA). Por exemplo, utilizaram-se pCVD442 e pBluescript no EXEMPLO V.

Quando o vector é um plasmídeo, normalmente contém uma variedade de componentes, incluindo promotores, sequências de sinal, genes de selecção fenotípica, origens de sítios de replicação e outros componentes necessários, como é conhecido dos profissionais. Os promotores mais habitualmente utilizados em vectores procarióticos incluem o sistema promotor de *lacZ*, o promotor de *phoA* de fosfatase alcalina, o promotor de bacteriófago λ PL (um promotor sensível à temperatura), o promotor de *tac* (um promotor híbrido de *trp-lac* regulado pelo repressor de *lac*), o promotor do triptofano e o promotor de bacteriófago T7. Por exemplo, o vector de pequeno número de cópias pMW118 está sob o controlo do promotor de *lacZ*.

Uma sequência de sinal encontra-se tipicamente imediatamente a 5' do ácido nucleico que codifica o péptido e, assim, será transcrita no terminal amino da proteína de fusão.

Genes típicos de selecção fenotípica são aqueles que codificam proteínas que conferem resistência a antibióticos na célula-hospedeiro. Por exemplo, o gene de resistência à ampicilina (*amp*) e o gene de resistência à tetraciclina (*tet*) são facilmente empregues para esta finalidade. Num exemplo diferente, a cassette *aphA-3* que codifica um gene de resistência à canamicina (*kan*) pode ser clonada na região do vector que contém polinucleótidos que codificam o polipéptido Tir para selecção do vector em placas de canamicina.

A construção de vectores adequados contendo polinucleótidos que codificam o polipéptido Tir é feita utilizando procedimentos comuns de DNA recombinante bem conhecidos dos profissionais. Os polinucleótidos isolados que codificam o polipéptido Tir a serem combinados para formarem o vector são clivados e ligados em conjunto numa ordem e orientação específicas para gerar o vector desejado.

A invenção proporciona uma célula-hospedeiro que contém um vector contendo um polinucleótido que codifica o polipéptido Tir. Os polinucleótidos da presente invenção podem ser utilizados para produzir células transformadas ou transfectadas para produção aumentada do Tir expresso. O Tir pode ser isolado de células transformadas por métodos comuns bem conhecidos dos profissionais. A proteína pode ser isolada, por exemplo, utilizando purificação por imunoafinidade.

As sequências de DNA que codificam o Tir podem ser expressas *in vitro* por transferência de DNA para uma célula-hospedeiro adequada. Tal como é aqui utilizado,

"células-hospedeiro" são células nas quais um vector se pode propagar e o seu DNA pode ser expresso. O termo também inclui qualquer progenitura da célula-hospedeiro em questão. Entende-se que toda a progenitura poderá não ser idêntica à célula paterna, pois podem ocorrer mutações durante a replicação. No entanto, essa progenitura está incluída quando se usa o termo "célula-hospedeiro". Conhecem-se na área métodos de transferência estável, significando que o DNA estranho é continuamente mantido no hospedeiro.

A invenção também proporciona um método de produção do polinucleótido *tir*, em que as sequências do polinucleótido *tir* podem ser inseridas num vector de expressão recombinante. O termo "vector de expressão recombinante" refere-se a um plasmídeo, vírus ou outro veículo conhecido na área que foi manipulado por inserção ou incorporação das sequências genéticas de Tir. Esses vectores de expressão contêm uma sequência promotora que facilita a transcrição eficiente da sequência genética inserida do hospedeiro. O vector de expressão contém tipicamente uma origem da replicação, um promotor, bem como genes específicos que permitem a selecção fenotípica das células transformadas.

Sequências polinucleotídicas que codificam o Tir podem ser expressas em procariotas ou eucariotas. Os hospedeiros podem incluir organismos microbianos, de levedura, insecto e mamífero. Conhecem-se na área métodos de expressão de sequências de DNA que têm sequências eucarióticas ou virais em procariotas. Conhecem-se na área vectores de DNA virais e plasmídicos biologicamente funcionais capazes de sofrerem expressão e replicação num hospedeiro. Esses vectores são utilizados para incorporar sequências de DNA da invenção.

Em sistemas bacterianos, alguns vectores de expressão podem ser vantajosamente seleccionados, dependendo da utilização pretendida do produto genético do Tir a ser expresso. Por exemplo, quando se pretende produzir uma grande quantidade dessa proteína, por exemplo, para gerar composições farmacêuticas do polipéptido Tir ou para induzir anticorpos para o polipéptido Tir, poderão ser desejáveis vectores que dirigem a expressão de níveis elevados de produtos de proteína de fusão que são facilmente purificados. Esses vectores incluem mas não se limitam ao vector de expressão de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, *EMBO J.* 2: 1791), no qual a sequência codificadora do produto genético de Tir pode ser ligada individualmente no vector na estrutura com a região codificadora *lac z* de modo a ser produzida uma proteína de fusão; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109) e afins. Também podem utilizar-se vectores pGEX para expressar um polipéptido estranho na forma de proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). Em geral, essas proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas de células submetidas a lise por adsorção em esférulas de glutathione-agarose, seguida de eluição na presença de glutathione livre. Os vectores pGEX são concebidos de modo a incluírem sítios de clivagem por proteases de trombina ou factor Xa, de modo que o produto genético alvo clonado possa ser libertado da fracção de GST.

Um sistema alternativo de proteínas de fusão permite a purificação fácil de proteínas de fusão não desnaturadas expressas em linhas de células humanas (Janknecht, et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8972-8976). Neste sistema, o gene de interesse é subclonado num plasmídeo de

recombinação de vacínia, de modo que a fase de leitura aberta do gene fique fundida, por translação, a um marcador amino-terminal que consiste em seis resíduos de histidina. Extractos de células infectadas com o vírus vacínia recombinante são carregados em colunas de Ni^{2+} ácido nitriloacético-agarose, e as proteínas marcadas com histidina são selectivamente eluídas com tampões contendo imidazolo.

A transformação de uma célula-hospedeiro com DNA recombinante pode ser efectuada por técnicas convencionais, como é bem conhecido dos profissionais. Quando o hospedeiro for procariótico, como *E. coli*, células competentes capazes de captação de DNA podem ser preparadas a partir de células recolhidas após a fase de crescimento exponencial e subsequentemente tratadas pelo método de CaCl_2 utilizando procedimentos bem conhecidos na área. Alternativamente pode utilizar-se MgCl_2 ou RbCl . A transformação também pode ser realizada após a formação de um protoplasto da célula-hospedeiro, se desejado. Noutro exemplo, pode utilizar-se conjugação triparental para introduzir geneticamente o vector em *E. coli*. As células transformadas são seleccionadas por crescimento num antibiótico, habitualmente tetraciclina (*tet*) ou ampicilina (*amp*), para os quais se tornaram resistentes devido à presença no vector dos genes de resistência *tet* ou *amp*.

Quando o hospedeiro é um eucariota podem utilizar-se métodos de transfecção de DNA tais como co-precipitados com fosfato de cálcio, procedimentos mecânicos convencionais como microinjecção, electroporação, inserção de um plasmídeo encerrado em lipossomas ou vectores virais. As células eucarióticas também podem ser co-transformadas com

sequências de DNA que codificam o Tir da invenção, e uma segunda molécula de DNA estranho que codifica um fenótipo seleccionável, como o gene da timidina-quinase de herpes simplex. Outro método consiste em utilizar um vector viral eucariótico, como o vírus símio 40 (SV40) ou vírus papiloma bovino, para infectar ou transformar células eucarióticas de forma transitória e expressar a proteína. Ver, por exemplo, "Eukaryotic Viral Vectors", Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman, editor (1982).

O isolamento e purificação do polipéptido microbiano expresso, ou respectivos fragmentos, proporcionado pela invenção podem ser efectuados por meios convencionais, incluindo cromatografia preparativa e separações imunológicas envolvendo anticorpos monoclonais ou policlonais.

De entre os organismos procarióticos que podem servir de células-hospedeiro contam-se a estirpe JM101 de *E. coli*, a estirpe K12 de *E. coli* 294 (número da ATCC 31,446), a estirpe W3110 de *E. coli* (número da ATCC 27,325), X1776 de *E. coli* (número da ATCC 31,537), XL-1 Blue de *E. coli* (Stratagene) e *E. coli* B; no entanto, também podem utilizar-se muitas outras estirpes de *E. coli*, como HB101, NM522, NM53 8, NM539, e muitas outras espécies e géneros de procariotas. Para além das estirpes de *E. coli* listadas acima podem utilizar-se como hospedeiros bacilos como *Bacillus subtilis*, outras *enterobacteriaceae*, como *Salmonella typhimurium* ou *Serratia marcesans*, e várias espécies de *Pseudomonas*. Numa forma de realização específica, a célula-hospedeiro procariótica é *E. coli* enteropatogénica.

Adicionalmente, estirpes de bactérias atenuadas ou não patogénicas podem ser úteis na distribuição de polipéptidos de fusão na mucosa intestinal. Por exemplo, estirpes vivas atenuadas (por exemplo, com EspA ou EspB deletado) contendo uma proteína de fusão ou vector que codifica um polipéptido de fusão com Tir podem ser utilizadas para distribuir o polipéptido de fusão num hospedeiro. Deste modo, a bactéria atenuada pode proporcionar a proteína de fusão a um hospedeiro em que a proteína de fusão é apresentada pela célula-hospedeiro de modo a conferir uma resposta imunológica específica.

De entre os organismos eucarióticos que podem servir de células-hospedeiro contam-se estirpes de levedura, como PS23-6A, W301-18A, LL20, D234-3, INVSC1, INVSC2, YJJ337. Sequências promotoras e intensificadoras, como *gal1* e pEFT-1, são úteis. Vra-4 também proporciona uma sequência intensificadora adequada. Sequências úteis como origens da replicação funcionais incluem o plasmídeo circular *arsI* e 2 μ .

Tal como são aqui utilizados, os termos "espA", "espB" e "eaeA" referem-se a genes diferentes de *tir* que codificam proteínas segregadas por *E. coli* patogénica. Tal como são aqui utilizados, os termos "EspA", "EspB" e "intimina" referem-se às proteínas codificadas pelos genes *espA*, *espB* e *eaeA*, respectivamente. A intimina é o produto de um locus LEE cromossómico bacteriano, *eaeA*, e é uma proteína da membrana externa de EPEC de 94 kDa que é necessária para a aderência íntima. EspA, EspB e intimina são segregadas pela EHEC bem como pela EPEC.

Anticorpos e Métodos Imunológicos

Os polipéptidos Tir da invenção também podem ser utilizados para produzir anticorpos que reagem imunologicamente ou se ligam a epítomos dos polipéptidos Tir. São proporcionados anticorpos que consistem essencialmente em anticorpos monoclonais reunidos com diferentes especificidades para epítomos, bem como preparações de anticorpos monoclonais distintos. Os anticorpos monoclonais são preparados por métodos bem conhecidos na área a partir de fragmentos que contêm antígenos da proteína (Kohler, et al., *Nature* 256: 495 (1975); "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel, et al., editores, (1989)).

O termo "anticorpo", tal como é utilizado nesta invenção, inclui moléculas intactas bem como respectivos fragmentos, tais como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv e anticorpos de cadeia simples que se podem ligar ao epítomo. Estes fragmentos de anticorpos retêm alguma capacidade para se ligarem selectivamente ao seu antígeno ou receptor.

Conhecem-se na área métodos de preparação destes fragmentos (ver, por exemplo, Harlow e Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (edição actual), aqui incorporado por referência). No EXEMPLO I geraram-se anticorpos policlonais de ratinho e rato para a proteína da EPEC de 78 kDa por esses métodos.

Um epítomo é qualquer determinante antigénico de um antígeno ao qual se liga o paratopo de um anticorpo. Os epítomos consistem habitualmente em agrupamentos de superfície quimicamente activos de moléculas, como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcares, e habitualmente têm características estruturais

tridimensionais específicas, bem como características específicas de carga.

Se necessário, os anticorpos policlonais ou monoclonais podem ser suplementarmente purificados, por exemplo, por ligação e eluição de uma matriz à qual está ligado o péptido ou um péptido contra o qual são dirigidos os anticorpos. Os profissionais conhecem várias técnicas comuns na área da imunologia para a purificação e/ou concentração de anticorpos policlonais, bem como anticorpos monoclonais (ver, por exemplo, Coligan, *et al.*, Unidade 9, "Current Protocols in Immunology", Wiley Interscience, edição actual, incorporado por referência).

A invenção também proporciona epítomos peptídicos para utilização na concepção de sondas nucleotídicas específicas de *tir* ou anticorpos anti-Tir. Essas sondas ou anticorpos podem ser utilizados para identificar proteínas ou genes que possam estar envolvidos na virulência de outros patógenos, incluindo mas não se limitando a polipéptidos ou polinucleótidos de bactérias Gram-negativas.

Os anticorpos da invenção, incluindo anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos de cadeia simples e afins, têm capacidade para se ligarem com especificidade imunológica elevada às proteínas Tir, péptidos ou sequências de nucleótidos da invenção, ou respectivos fragmentos. Estes anticorpos podem não ser etiquetados ou ser adequadamente etiquetados. Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para purificação por afinidade de Tir, por exemplo. Os anticorpos da invenção podem ser empregues em procedimentos imunológicos conhecidos para a detecção qualitativa ou

quantitativa destas proteínas ou péptidos em células, amostras de tecido, preparações para amostragem ou fluidos. Os anticorpos da invenção podem ser empregues em procedimentos imunológicos conhecidos para a detecção qualitativa ou quantitativa das sequências de nucleótidos, ou respectivas porções.

A invenção proporciona um método para detectar um polipéptido Tir numa amostra, que inclui contactar uma amostra de um sujeito com um anticorpo como definido nas reivindicações e detectar a ligação do anticorpo ao polipéptido Tir. A ligação é indicadora da presença do polipéptido Tir na amostra. Tal como é aqui utilizado, o termo "amostra" inclui material derivado de um mamífero ou sujeito humano ou outro animal. Essas amostras incluem mas não se limitam a cabelo, amostras de pele, amostra de tecido, células cultivadas, meios de células cultivadas e fluidos biológicos. Por exemplo, o polipéptido Tir pode ser detectado numa cultura de células HeLa (por exemplo, humanas). No EXEMPLO II detectou-se a Hp90 em células do tipo macrófagos J774 utilizando esses métodos.

Tal como é aqui utilizado, o termo "tecido" refere-se a uma massa de células agrupadas (por exemplo, tecido do SNC, tecido neural ou tecido ocular) derivada de um ser humano ou outro animal, e inclui o material agrupado e o material líquido associado às células. Tal como é aqui utilizado, o termo "fluido biológico" refere-se a material líquido derivado de um ser humano ou outro animal. Esses fluidos biológicos incluem mas não se limitam a sangue, plasma, soro, derivados do soro, biliar, mucosidades, saliva, transpiração, fluido amniótico e fluido cérebro-espinhal (CSF), como CSF lombar ou ventricular.

Tal como é aqui utilizado, o termo "amostra" também inclui soluções que contêm o polipéptido isolado, meios nos quais foi segregado o polipéptido e meios contendo células-hospedeiro que produzem o polipéptido Tir. Por exemplo, uma amostra pode ser uma amostra de proteínas a ser resolvida por SDS-PAGE e transferida para nitrocelulose para análise de imunocoloração "Western". A quantidade de amostra necessária para se obter uma reacção pode ser determinada pelo profissional por técnicas laboratoriais comuns. A quantidade óptima da amostra pode ser determinada por diluição em série.

Numa forma de realização, a presença do polipéptido Tir na amostra é indicadora de infecção por *E. coli* enterohemorrágica.

As proteínas da invenção são projectadas de modo a terem numerosas utilizações, incluindo aplicações de prognóstico, terapêuticas, de diagnóstico ou de concepção de fármacos. As proteínas da invenção proporcionarão a base para a preparação de anticorpos monoclonais e policlonais que reagem imunologicamente de forma específica com as proteínas da invenção. Numa forma de realização, a invenção proporciona uma utilização para imunizar um hospedeiro susceptível de contrair doença causada por *E. coli* produtora de Tir por administração a um hospedeiro do polipéptido da reivindicação 1 e indução de uma resposta imunológica protectora no hospedeiro ao polipéptido Tir. Desse modo previne-se a infecção do hospedeiro pelo organismo produtor de Tir. Numa forma de realização mais específica, o organismo produtor de Tir é uma estirpe de *E. coli*. Numa forma de realização ainda mais específica, a

estirpe de *E. coli* é *E. coli* enteropatogénica ou entero-hemorrágica.

Noutra forma de realização, a invenção proporciona uma utilização para melhorar uma doença causada por um organismo produtor de Tir por imunização de um hospedeiro com o polipéptido Tir como definido nas reivindicações e indução de uma resposta imunológica no hospedeiro ao polipéptido Tir. Numa forma de realização mais específica, o organismo produtor de Tir é uma estirpe de *E. coli*. Numa forma de realização ainda mais específica, a estirpe de *E. coli* é *E. coli* enteropatogénica ou entero-hemorrágica.

Numa forma de realização, o hospedeiro imunizado é um ser humano. Os humanos podem ser imunizados por qualquer um dos protocolos comuns bem conhecidos dos profissionais da medicina. *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) é a principal causa de diarreia em lactentes e foi a primeira *E. coli* que se verificou causar gastroenterite. A EPEC continua a ser uma causa importante de diarreia infantil em países em desenvolvimento, contribuindo para elevada morbidez e mortalidade. Usando voluntários humanos foi mostrado que a intimina é necessária para a virulência completa da EPEC (Donnenberg *et al.*, *J. Clin. Inv.* 92: 1412-7 (1993)). Vários modelos animais documentaram o papel da intimina na virulência. As interacções íntimas que ocorrem entre proteínas segregadas pela EPEC e a superfície de células-hospedeiro salientam a complexidade das interacções hospedeiro-patogene e proporcionam ferramentas de valor para explorar e estudar a função celular e doença bacteriana, para além de potenciais utilizações em terapêutica.

Noutra forma de realização, o hospedeiro imunizado é um bovino. O gado *vacum* pode ser imunizado por qualquer um dos protocolos comuns bem conhecidos dos profissionais da veterinária. O gado *vacum* é então vacinado com *Tir*, *EspA*, *EspB*, *intimina*, ou combinações destes. A aderência da EHEC a vacas vacinadas é bloqueada pela resposta imunológica bovina. Em consequência, o gado *vacum* vacinado não se torna portador de EHEC.

A EHEC foi ligada a muitos surtos alimentares e casos esporádicos de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urémica em todo o mundo. O alimento mais habitualmente associado a epidemiologia é carne de vaca picada. A EHEC não causa sintomas de doença no gado *vacum*, mas os bovinos de criação transportam a EHEC nos seus tractos intestinais. A contaminação das carcaças ocorre durante as operações da matança. A utilização de gado *vacum* vacinado é útil para reduzir a ocorrência de carne contaminada por *E. coli* entero-hemorrágica.

A invenção proporciona um método como definido nas reivindicações para detectar o polinucleótido *tir* numa amostra por contacto de uma amostra suspeita de conter o polinucleótido *tir* com uma sonda de ácido nucleico que hibridiza para o polinucleótido *tir* e detecção da hibridização da sonda com o polinucleótido *tir*. A detecção da hibridização é indicadora da presença do polinucleótido *tir* na amostra.

Métodos Genéticos Recombinantes

A invenção proporciona um método recombinante como definido nas reivindicações para produzir um polinucleótido *tir* que inclui inserir um ácido nucleico que codifica um

marcador seleccionável no polinucleótido que codifica o polipéptido Tir. O polinucleótido resultante codifica um polipéptido Tir recombinante que contém o marcador seleccionável. Tal como é aqui utilizado, um "marcador seleccionável" pode ser qualquer sequência genética diferente de uma sequência *tir* que pode ser detectada ou que codifica uma sequência de aminoácidos que pode ser detectada. Por exemplo, um marcador seleccionável pode ser um marcador do vírus herpes simplex (HSV), para o qual há anticorpos comercialmente disponíveis. No EXEMPLO VI construíram-se duas fusões genéticas ligando a sequência que codifica os epítomos de T7 ou HSV ao 5' ou 3' de *tir*, respectivamente, utilizando esses métodos.

A invenção proporciona um método para produzir proteínas de fusão. Uma vez que o Tir é uma proteína segregada, é útil como parceiro de fusão para a clonagem e expressão de outros péptidos e proteínas. Por exemplo, Tir fundido a uma proteína de interesse é produzido de forma recombinante numa célula-hospedeiro, por exemplo, *E. coli*, e a proteína de fusão é segregada para o meio de cultura onde cresce o hospedeiro transformado. A proteína de fusão pode ser isolada por anticorpos anti-Tir, seguida da clivagem do Tir do péptido ou proteína de interesse. Pode utilizar-se ELISA, ou outros métodos de imunoafinidade, para identificar a proteína de fusão com Tir. A invenção proporciona um método para produzir uma proteína de fusão com Tir, que inclui fazer crescer uma célula-hospedeiro contendo um polinucleótido que codifica o Tir operativamente ligado a um polinucleótido que codifica um polipéptido ou péptido de interesse, em condições que permitam a expressão e secreção dos polipéptidos de fusão, e isolar o polipéptido de fusão. O termo "operativamente

ligado ou associado" refere-se à ligação funcional entre uma sequência promotora e o gene ou genes estruturais no caso de uma proteína de fusão, regulada pela sequência de ácido nucleico promotora. O promotor operativamente ligado controla a expressão do polipéptido codificado pelo gene estrutural (por exemplo, a proteína de fusão).

Organismos preferidos onde se podem implementar os métodos recombinantes da invenção incluem mas não se limitam a bactérias. Noutra forma de realização, o organismo utilizado para gerar uma mutação num polinucleótido que codifica o polipéptido Tir é *E. coli*. De entre as *E. coli* que podem ser transformadas contam-se *E. coli* enteropatogénica e entero-hemorrágica.

A invenção proporciona um método recombinante para produzir um polipéptido Tir fazendo crescer uma célula-hospedeiro contendo um polinucleótido que codifica o polipéptido Tir em condições que permitam a expressão e secreção do polipéptido Tir, e isolando o polipéptido. Métodos de produção recombinante de polipéptidos e péptidos pertencem ao âmbito desta invenção. Tal como é aqui utilizado, o termo "condições que permitam a expressão e secreção" refere-se a condições adequadas de modo que o ácido nucleico seja transcrito e traduzido, e o isolamento do polipéptido produzido desse modo. O polipéptido produzido pode ser uma proteína segregada para o meio. Meio inclui um fluido, substância ou organismo onde pode ocorrer crescimento microbiano ou onde podem existir micróbios. Esses ambientes podem ser, por exemplo, tecidos ou fluidos corporais de animais, água e outros líquidos, alimentos, produtos alimentares ou extractos alimentares, e certos objectos inanimados. Por exemplo, os micróbios podem

crescer em meio Luria-Bertani (LB). Não é necessário que o ambiente promova o crescimento do micróbio, apenas que permita a sua subsistência.

Agentes que Interferem na Ligação Entre Tir e Intimina

Noutra forma de realização, a presente invenção refere-se a agentes que interferem na ligação entre Tir e intimina. Esses agentes de ligação podem interferir por inibição competitiva, por inibição não competitiva ou por inibição incompetitiva. A interferência na ligação normal entre o Tir e a intimina pode originar um efeito farmacológico útil.

Também se descreve um método para identificar uma composição que se liga ao Tir. O método inclui incubar componentes compreendendo a composição e Tir em condições suficientes para permitir que os componentes interajam e medir a ligação da composição ao Tir. Composições que se ligam ao Tir incluem péptidos, péptido-miméticos, polipéptidos, compostos químicos e agentes biológicos.

A incubação inclui condições que permitem o contacto entre a composição de teste e o Tir. O contacto inclui contacto em solução e em fase sólida. O ligando/composição de teste pode opcionalmente ser uma biblioteca combinatorial para rastrear uma pluralidade de composições. As composições identificadas no método da invenção podem ser suplementarmente avaliadas, detectadas, clonadas, sequenciadas e afins, quer em solução quer após ligação a um suporte sólido, por qualquer método habitualmente aplicado à detecção de uma sequência de DNA específica, como PCR, restrição de oligómeros (Saiki et al., *Bio/Technology* 3: 1008-1012 (1985)), análise de sondas

oligonucleotídicas específicas para alelos (Conner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 278 (1983)), ensaios de ligação de oligonucleótidos (OLAs) (Landegren *et al.*, *Science* 241: 1077 (1988)) e afins. Técnicas moleculares para análise de DNA foram revistas por Landegren *et al.*, *Science* 242: 229-237 (1988).

Para determinar se uma composição pode complexar funcionalmente com a proteína receptora, a indução do gene exógeno é monitorizada por monitorização de alterações dos níveis proteicos da proteína codificada pelo gene exógeno, por exemplo. Quando se verificar que uma composição pode induzir a transcrição do gene exógeno, conclui-se que esta composição se pode ligar à proteína receptora codificada pelo ácido nucleico que codifica a composição de teste de amostra inicial.

A expressão do gene exógeno pode ser monitorizada por um ensaio funcional ou ensaio quanto a um produto proteico, por exemplo. Em consequência, o gene exógeno é um gene que proporcionará um produto de expressão apto a ser testado/medido para permitir a detecção da expressão do gene exógeno. Esses genes exógenos incluem mas não se limitam a genes repórter, como o gene da cloranfenicol acetil-transferase, um gene de fosfatase alcalina, beta-galactosidase, um gene luciferase, um gene de proteína verde fluorescente, guanina xantina fosforribosil-transferase, fosfatase alcalina e genes de resistência a antibióticos (por exemplo, neomicina fosfotransferase).

A expressão do gene exógeno é indicadora da ligação composição-receptor; assim, a composição de ligação ou bloqueio pode ser identificada e isolada. As composições da

presente invenção podem ser extraídas e purificadas do meio de cultura ou de uma célula utilizando técnicas conhecidas de purificação de proteínas habitualmente empregues, como extracção, precipitação, cromatografia de permuta iónica, cromatografia de afinidade, filtração em gel e afins. As composições podem ser isoladas por cromatografia de afinidade utilizando o domínio extracelular da proteína receptora modificada ligado a uma matriz de coluna, ou por cromatografia em heparina.

No método de rastreio descrito também estão incluídos métodos de química combinatorial para identificar compostos químicos que se ligam ao Tir. Assim, o método de rastreio também é útil para identificar variantes, agentes de ligação ou bloqueio, etc., que actuam funcionalmente, se não mesmo fisicamente (por exemplo, de forma estérica) como antagonistas ou agonistas, consoante o desejado.

A invenção proporciona um método como definido nas reivindicações para identificar um composto que interfere na ligação de um polipéptido Tir à intimina. Mede-se a ligação de um polipéptido Tir à intimina em condições padrão bem conhecidas dos profissionais da bioquímica. Determina-se a afinidade de ligação do polipéptido Tir à intimina. Em seguida, um composto candidato suspeito de interferir na ligação do polipéptido Tir à intimina é adicionado a uma mistura ou solução do polipéptido Tir e intimina. Depois mede-se a ligação do polipéptido Tir à intimina nas condições padrão. Determina-se a afinidade de ligação do polipéptido Tir à intimina na presença do composto. O ensaio compara a ligação do polipéptido Tir à intimina na presença do composto com a ligação do polipéptido Tir na ausência do composto. Os compostos que

interferem na ligação do polipéptido Tir à intimina são úteis no tratamento de patógenos em que a ligação do polipéptido Tir à intimina está envolvida na patogénese, incluindo patógenos tais como EPEC e EHEC. Além disso, as sequências polipeptídicas ou de nucleótidos da invenção podem ser utilizadas para identificar compostos ou composições que interagem (por exemplo, se ligam) com aquelas e afectam a sua actividade biológica. Esses efeitos incluem inibição ou estimulação da actividade ou secreção do Tir.

A invenção proporciona um método como definido nas reivindicações para utilizar o sistema Tir-intimina para a distribuição celular. Tal como é aqui utilizado, um "veículo de distribuição celular" é um composto, capaz de conter um segundo composto de interesse, que pode ser absorvido por uma célula. Numa forma de realização, as células são infectadas com um mutante da intimina, desse modo distribuindo o Tir nas células infectadas. Numa forma de realização mais específica, as células estão *in vivo*. Noutra forma de realização específica, as células estão *in vitro*. Numa forma de realização alternativa, o patógeno de adesão e destruição é um mutante da intimina. Mutantes da intimina (eaeA) foram descritos por Kenny e Finlay, *Infection & Immunity* 65(7) 2528-2536 (1997). Noutra forma de realização alternativa, o Tir é expresso numa célula por métodos genéticos recombinantes descritos *supra*.

As moléculas de interesse podem ser dirigidas selectivamente para células que contêm Tir utilizando um veículo de distribuição celular que contêm intimina. Tal como é aqui utilizado, "células que contêm Tir" são células que contêm Tir. Por exemplo, células epiteliais podem

conter Hp90. Tal como é aqui utilizado, um "veículo de distribuição celular que contém intimina" inclui um veículo de distribuição celular que compreende intimina ou um fragmento da intimina capaz de se ligar ao Tir na superfície do veículo de distribuição. Numa forma de realização, o veículo de distribuição celular que contém intimina é uma esférula.

O veículo de distribuição celular que contém intimina pode ser um lipossoma. Os lipossomas podem ser modificados utilizando métodos bem conhecidos na área para ligação aos mesmos, directa ou indirectamente, tal como através de ligandos específicos para o alvo, como intimina, de modo a conferir especificidade para o órgão ou célula-alvo, como descrito por Malone *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 6077, (1989), e Gregoriadis, *Immunology Today*, 11(3): 89 (1990).

Várias substâncias biologicamente activas podem ser incorporadas nos lipossomas por encapsulação. Estas substâncias incluem fármacos, bem como outros tipos de materiais farmacêuticos, como DNA, RNA, proteínas de vários tipos, hormonas proteicas, como insulina, factores de crescimento, citoquinas, monoquinas, linfoquinas, e proteínas e hidratos de carbono que servem de imunogenes para vacinação.

Substâncias biologicamente activas eficazes para usos cosméticos também podem ser incorporadas em lipossomas por encapsulação. Estas incluem hidratantes, vitaminas, enzimas e essências. Adicionalmente, herbicidas, pesticidas, fungicidas, etc., são exemplos de substâncias

biologicamente activas com aplicações agrícolas que podem ser encapsuladas em lipossomas.

A gama de dosagem apropriada para utilização *in vivo* em seres humanos da substância biologicamente activa em lipossomas inclui a gama de 0,001 - 6 000 mg/m² de área superficial corporal. Não obstante doses fora da gama de doses anterior poderem ser administradas, esta gama abrange a amplitude de utilização de praticamente todas as substâncias biologicamente activas. No entanto, para um agente terapêutico particular, a concentração preferida pode ser facilmente determinada como previamente descrito.

O veículo de distribuição celular que contém intimina pode ser administrado por qualquer via desejada, por exemplo, intratumoral, intra-articular (em articulações), intramuscular, intratecal, intraperitoneal, subcutânea, intravenosa, intralinfática, oral e submucosa.

A invenção proporciona um método como definido nas reivindicações para detectar o citoesqueleto de uma célula, por contacto do citoesqueleto celular com o polipéptido Tir e detecção da ligação do polipéptido Tir ao citoesqueleto celular. Tal como é aqui utilizado, o termo "citoesqueleto" refere-se a uma rede de filamentos moleculares (como actina, microtúbulos, etc.) que proporciona uma estrutura para o citoplasma de uma célula eucariótica. A lesão A/E (ou em pedestal) está associada à reunião de estruturas citoesqueléticas altamente organizadas em células epiteliais imediatamente por baixo da bactéria aderente, que incluem os componentes citoesqueléticos actina, α -actinina, cadeia leve de miosina, ezrina e talina. O Tir liga-se ao citoesqueleto. A detecção da ligação do

polipéptido Tir ao citoesqueleto pode ser feita por vários métodos. Numa forma de realização, a ligação do Tir é detectada por ligação subsequente ao Tir de anticorpos anti-Tir. Exemplos desta forma de realização são apresentados no EXEMPLO I. Noutra forma de realização detecta-se a ligação do Tir ao citoesqueleto por ligação subsequente de intima ao Tir. Exemplos desta forma de realização são apresentados no EXEMPLO VII. Ainda noutra forma de realização, o polipéptido Tir que se liga ao citoesqueleto é uma proteína de fusão.

Estojos

Esta invenção inclui um estojó que contém um ou mais anticorpos da invenção, bem como um estojó à base de nucleótidos. Numa forma de realização, o estojó é útil para a detecção do polipéptido Tir e consiste num meio transportador separado em compartimentos de modo a encerrar de forma confinada um recipiente que contém um anticorpo que se liga ao polipéptido Tir. Tal como é aqui utilizado, um "recipiente" inclui frascos, tubos e afins, em que cada um dos recipientes compreende um dos elementos separados a serem utilizados no método.

Numa forma de realização, o anticorpo que se liga ao polipéptido Tir é etiquetado de forma detectável. Numa forma de realização mais específica, a etiqueta é seleccionada do grupo que consiste num isótopo radioactivo, um composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, um composto fluorescente, um quelato metálico e uma enzima.

Noutra forma de realização, o estojó é útil para a detecção de um polinucleótido *tir* e consiste num meio

transportador separado em compartimentos de modo a encerrar de forma confinada um recipiente que contém a sonda de ácido nucleico como definida nas reivindicações que hibridiza para o polinucleótido *tir*. Numa forma de realização, a sonda de ácido nucleico que hibridiza para o polinucleótido *tir* é etiquetada de forma detectável. Numa forma de realização mais específica, a etiqueta é seleccionada do grupo que consiste num isótopo radioactivo, um composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, um composto fluorescente, um quelato metálico e uma enzima.

Outro estojo é definido nas reivindicações e é útil para a detecção de um polinucleótido *tir* e consiste num meio transportador separado em compartimentos de modo a encerrar de forma confinada um recipiente que contém um primeiro recipiente que contém uma primeira sonda de ácido nucleico que hibridiza para um de dois filamentos do polinucleótido *tir*, e um segundo recipiente que contém uma segunda sonda de ácido nucleico que hibridiza para o outro de dois filamentos do polinucleótido *tir*. O estojo pode ser utilizado para amplificar uma sequência polinucleotídica *tir*, por exemplo, por métodos de PCR. Numa forma de realização específica, o primeiro "primer" é complementar a um de dois filamentos numa extremidade da sequência *tir* a ser amplificada, e o segundo "primer" é complementar ao outro de dois filamentos na outra extremidade do polinucleótido *tir*. Uma vez que os filamentos de DNA sintetizados de novo podem servir subsequentemente de modelos adicionais para as mesmas sequências de "primers", rondas sucessivas de hibridização dos "primers", alongamento dos filamentos e dissociação originam

amplificação rápida e altamente específica da sequência desejada.

Pretende-se que os exemplos seguintes ilustrem mas não limitem a invenção. Não obstante serem típicos dos que poderão ser utilizados, outros procedimentos conhecidos dos profissionais podem ser alternativamente utilizados.

Referência **EXEMPLO I**

**ANTICORPOS PARA UMA PROTEÍNA SEGREGADA PELA EPEC DE 78 kDa
REAGEM DE FORMA CRUZADA COM A Hp90**

A finalidade deste EXEMPLO é mostrar que anticorpos para uma proteína segregada pela EPEC de 78 kDa reagem de forma cruzada com a Hp90. Durante as tentativas para purificar a Hp90 foi descoberto que um anti-soro de coelho policlonal dirigido contra a EPEC reconheceu uma proteína que co-migrou de forma precisa com a Hp90 enriquecida de membranas de células de mamífero. Esta banda reactiva de forma cruzada não estava presente quando células HeLa foram infectadas com mutantes defeituosos para a secreção de tipo III, que também não causam fosforilação em tirosina da Hp90. Após infecções que utilizaram condições de etiquetagem radioactiva que procedem à etiquetagem específica de proteínas da EPEC mas não de HeLa, anticorpos anti-fosfotirosina (PY) efectuaram a imunoprecipitação de uma proteína etiquetada de forma radioactiva que co-migrou com a Hp90. Em contraste, nenhuma Hp90 etiquetada de forma radioactiva precipitou quando proteínas de células HeLa foram etiquetadas. Estas descobertas preliminares sugeriram a hipótese da Hp90 poder ser de origem bacteriana.

Se a Hp90 fosse de origem bacteriana, a EPEC deveria conseguir segregar esta proteína. A EPEC segrega várias proteínas que estão envolvidas na activação de sinais de células-hospedeiro e outros eventos necessários para a ligação íntima. A EPEC não aparenta segregar qualquer proteína visível de 90 kDa, a massa molecular da Hp90. A secreção de proteínas da EPEC foi otimizada de modo que, em condições especiais de cultura, a EPEC segregue duas proteínas adicionais de 72 e 78 kDa, para além da EspA (25 kDa), EspB (37 kDa), EspC (110 kDa) e duas outras proteínas de 39 e 40 kDa. As condições de cultura estão descritas em Kenny e Finlay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7991-5 (1995). As bandas de 72 e 78 kDa tinham a mesma sequência amino-terminal (PIGNLGNNVNGNHLIPFAPPLPSQTDGAAR; ID SEQ NO: 7), que não estava relacionada com nenhuma proteína conhecida da EPEC. A sequência amino-terminal foi determinada do modo seguinte: as proteínas foram transferidas para papel de PVDF, foram visualizadas com vermelho Ponceau e excisadas para análise.

Adicionalmente, anticorpos dirigidos contra as outras proteínas segregadas pela EPEC não reconheceram estas proteínas. Ocorreram níveis elevados das proteínas de 72 e 78 kDa segregadas quando se utilizaram múltiplas cópias do regulão Per-positivo e condições especiais de crescimento. Obtiveram-se níveis elevados de secreção de proteínas de EPEC diluindo EPEC/CVD450 que cresceram em LB 1:50 em meio mínimo M9 contendo NaHCO₃ 44 mM e crescendo durante 7 horas. O plasmídeo pCVD450 que codifica o regulão Per foi mantido utilizando tetraciclina (concentração final de 25 µg/mL). As bactérias cresceram durante a noite em caldo LB a 37°C sem agitação antes da infecção. Concentraram-se os sobrenadantes por adição de ácido tricloroacético (10%

volume/volume). Geraram-se anticorpos policlonais de ratinho e rato para a proteína de EPEC de 78 kDa com a finalidade de determinar se estes anticorpos podiam reconhecer a Hp90.

Os anticorpos policlonais de ratinho e rato para a proteína de EPEC de 78 kDa foram gerados do modo seguinte. Induziram-se níveis elevados de secreção de proteínas de EPEC como acima e concentraram-se os sobrenadantes por adição de sulfato de amônio 40% (peso/volume) durante a noite. Após centrifugação, o grânulo resultante foi novamente suspenso em solução salina tamponada com fosfato (PBS) mais fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF, concentração final de 0,1 mM) e foi dialisado contra PBS. As proteínas concentradas foram novamente suspensas em tampão de carga e foram resolvidas por SDS-12% PAGE. Depois de transferidas para nitrocelulose, as proteínas foram visualizadas por vermelho Ponceau, foram excisadas, fragmentadas por sonicação e utilizadas para imunizar ratinhos e ratos. Avaliou-se o título por análise de imunocoloração contra proteínas segregadas por EPEC/CVD450. Utilizaram-se anti-soros a 1:2 000 - 1:5 000 em análise de imunocoloração, e a 1:100 - 1:200 para microscopia de imunofluorescência. As células HeLa infectadas com EPEC foram fraccionadas de acordo com o método de Kenny e Finlay, *Infection & Immunity* 65 (1997), utilizando saponina para libertar proteínas citoplasmáticas e Triton X-100 para solubilizar proteínas membranares, e estas fracções foram sondadas com anticorpos anti-PY (para detectar a Hp90) e anti-proteína de EPEC de 78 kDa. As células HeLa (CCL 2, ATCC) foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado de Dulbecco contendo soro fetal de vitelo 10%.

Os dois anticorpos reagiram com proteínas que se comportaram como a Hp90 na fracção de membranas celulares de mamífero de células infectadas, mas não de células não infectadas (FIG. 1B). Os dois anticorpos também reagiram com uma proteína de 90 kDa na fracção insolúvel (bactéria e citoesqueleto), que representa Hp90 ligada a bactérias. Adicionalmente, anticorpos anti-PY reconheceram a Ep85, uma proteína de EPEC fosforilada em tirosina de 85 kDa, na fracção insolúvel. Os anticorpos anti-EPEC de 78 kDa, mas não os anticorpos anti-PY, também reagiram com a forma bacteriana da proteína de 78 kDa na fracção insolúvel que contém bactérias.

Em consequência, os anticorpos para uma proteína segregada pela EPEC de 78 kDa reagem de forma cruzada com a Hp90, evidenciando que a Hp90 é uma proteína segregada pela EPEC.

Referência **EXEMPLO II**

Hp90 É A FORMA FOSFORILADA EM TIROSINA DA PROTEÍNA SEGREGADA PELA EPEC DE 78 kDa

A finalidade das experiências de imunoprecipitação deste EXEMPLO foi mostrar que a Hp90 é a forma fosforilada em tirosina da proteína segregada pela EPEC de 78 kDa.

Uma vez que se detectam níveis elevados de Hp90 em células do tipo macrófagos J774 (TIB 67, ATCC), células J774 foram infectadas com o mutante da intimina, CVD206, para maximizar os níveis membranares da Hp90, foram fraccionadas, e a fracção membranares solúvel em Triton X-100 foi imunoprecipitada com anticorpos anti-PY ou anti-CPCC de 78 kDa. As células J774 A.1 foram cultivadas em Meio de

Eagle Modificado de Dulbecco contendo soro fetal de vitelo 10%. A imunoprecipitação foi realizada como descrito por Kenny e Finlay, *Infection & Immunity* 65 (1997). Os imunoprecipitados e sobrenadantes pós-imunoprecipitados foram então resolvidos por SDS-PAGE, foram transferidos para nitrocelulose e sondados com anticorpos anti-PY (FIG. 2A). Utilizando este procedimento a Hp90 foi removida da fracção membranar de células infectadas com ambos os anticorpos (sobrenadante na FIG. 2A), e reconheceu-se no imunoprecipitado com ambos os anticorpos uma proteína de co-migração de 90 kDa.

Obtiveram-se evidências adicionais de que ambos os anticorpos reconheceram a mesma proteína realizando electroforese em gel bidimensional. Realizou-se electroforese em gel bidimensional do modo seguinte. Prepararam-se fracções membranares solúveis em Triton X-100 de células J774 como descrito por Rosenshine *et al.*, *EMBO J.* 15: 2613-2624 (1996). As membranas foram suplementarmente purificadas por aquecimento a 90°C durante 5 minutos, seguido de ultracentrifugação a 50 000 x g, 30 minutos, 4°C. O volume de 100 µL da proteína membranar solubilizada foi precipitado utilizando CHCl₃/acetona/H₂O, foi novamente suspenso em 12,5 µL de tampão de amostra de gel 2D e foi resolvido em géis de focagem isoeléctrica na primeira dimensão utilizando géis de focagem mini-isoeléctrica de poliacrilamida (BioRad) 4% (p/v) contendo anfolinas 2% (0,4% pH 3 - 10, 1,6% pH 5 - 7) a 700 V, 3,5 horas. Realizou-se electroforese na segunda dimensão em géis de 8% SDS-poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose para imunocoloração com os anti-soros apropriados. As membranas que continham Hp90 foram isoladas de J774 infectadas com CVD206 e as proteínas

foram separadas por focagem isoeléctrica, seguida de SDS-PAGE. Amostras duplicadas foram transferidas para nitrocelulose e foram sondadas com anticorpos anti-PY ou anti-EPEC de 78 kDa (FIG. 2B).

A sondagem com os anticorpos anti-EPEC de 78 kDa e anti-PY revelou que a Hp90 consistia realmente em várias proteínas relacionadas de peso molecular semelhante mas com pontos isoeléctricos variáveis. Depois das colorações terem sido separadas e novamente sondadas com o outro anticorpo exibiram o mesmo padrão de manchas, indicando que as proteínas Hp90 e segregada pela EPEC de 78 kDa eram a mesma proteína. Com base nestes resultados e no facto da Hp90 fosforilada em tirosina ser o receptor da intimina, esta proteína foi denominada Tir, receptor transportado da intimina.

O Tir em membranas de células-hospedeiro tem uma massa molecular prevista significativamente diferente da proteína segregada pela bactéria (90 kDa versus 78 kDa em SDS-PAGE). A diferença deveu-se à fosforilação em tirosina da proteína de 78 kDa na célula-hospedeiro, que não é reconhecida pelos anticorpos para PY na sua forma segregada pela bactéria de 78 kDa (FIG. 3). Para mostrá-lo, extractos membranares preparados a partir das células HeLa infectadas com o mutante da intimina CVD206 foram tratados com fosfatase alcalina, que deve remover todos os grupos fosfato. Efectuou-se uma imunocoloração com a amostra tratada por sondagem com anticorpos anti-EPEC de 78 kDa e anti-PY. O fraccionamento celular e o tratamento com fosfatase alcalina foram efectuados como descrito por Kenny e Finlay, *Infection & Immunity* 65 (1997). Em resumo, células HeLa cultivadas foram infectadas com EPEC, foram lavadas e

tratadas com saponina 0,2%, para libertar a fracção citoplasmática solúvel na presença de inibidores de fosfatases e proteases. Utilizou-se Triton X-100 a um por cento para solubilizar as proteínas membranares da restante fracção insolúvel que contém bactérias aderentes, núcleos do hospedeiro e citoesqueleto. Para o tratamento com fosfatase alcalina, fracções membranares foram isoladas na ausência de inibidores de fosfatases e foram incubadas com 2 U de fosfatase alcalina (NEB) durante 4 horas a 37°C.

Como mostrado na FIG. 3, os anticorpos anti-PY reconheceram apenas a forma fosforilada (90 kDa) da Tir em membranas não tratadas. Em contraste, os anticorpos para EPEC 78 reconheceram a Tir de 90 kDa em membranas não tratadas e também uma banda da mesma massa molecular como proteína de EPEC segregada de 78 kDa nas fracções membranares tratadas com fosfatase. Também se detectou uma banda de menor peso molecular que pode ser um produto de degradação devido a digestão prolongada.

O tratamento da proteína segregada por EPEC de 78 kDa com fosfatase alcalina não afectou a sua migração.

Estes resultados indicam que as proteínas Hp90 e segregada pela EPEC de 78 kDa eram a mesma proteína. A diferença das massas moleculares entre estas duas formas da Tir deve-se a uma modificação sensível à fosfatase alcalina, presumivelmente fosforilação em tirosina e possivelmente serina ou treonina.

Referência **EXEMPLO III**

ANTICORPOS ANTI-EPEC DE 78 kDa SÃO CO-LOCALIZADOS COM A Hp90 EM CÉLULAS DE MAMÍFERO

A finalidade deste EXEMPLO foi mostrar que anticorpos anti-EPEC de 78 kDa são co-localizados com a Hp90 em células de mamífero. Uma vez que estes anticorpos contra PY e proteínas de EPEC de 78 kDa reconhecem a mesma proteína, examinou-se se etiquetavam células HeLa infectadas de modo semelhante utilizando microscopia de imunofluorescência.

Proteínas fosforiladas em tirosina, presumivelmente Hp90 (isto é, Tir fosforilada em tirosina), apresentam estruturas distintas em ferradura na ponta de pedestais ricos em actina por baixo de bactérias aderentes. Os anticorpos PY só reconhecem esta proteína se células HeLa infectadas forem permeabilizadas, indicando que resíduos PY não estão expostos na superfície celular. Quando células HeLa infectadas foram co-etiquetadas com anticorpos contra PY (FIG. 4B) e a proteína EPEC de 78 kDa (FIG. 4C), o padrão de etiquetagem ficou completamente sobreposto (FIG. 4D). Os anticorpos anti-EPEC de 78 kDa só coraram áreas das células HeLa imediatamente por baixo da bactéria e não etiquetaram bactéria livre (ver setas na FIG. 4C). Quando células HeLa infectadas foram etiquetadas com anti-EPEC de 78 kDa e FITC-faloidina para corar a actina (FIGS. 4E-H), a coloração de anti-EPEC de 78 kDa ficou localizada na ponta do pedestal de actina, directamente por baixo da bactéria, em vez de corar todo o pedestal de actina (FIG. 4H). Este padrão de coloração é idêntico ao observado por co-etiquetagem com anti-PY e FITC-faloidina.

Estes resultados também mostram que a Tir é fosforilada na célula-hospedeiro.

Referência **EXEMPLO IV**

O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III E AS SUAS PROTEÍNAS SEGREGADAS, EspA E EspB, FACILITAM A DISTRIBUIÇÃO DE TIR EM CÉLULAS-HOSPEDEIRO

A finalidade deste EXEMPLO foi examinar o papel do sistema de secreção do tipo III e as suas proteínas segregadas na distribuição de Tir em células HeLa. Estirpes contendo mutações em genes que codificam o sistema de secreção do tipo III (*sep* e *cfm*) ou proteínas segregadas, EspA ou EspB (*espA* ou *espB*) não produzem Tir fosforilada em tirosina em células-hospedeiro. No entanto, a forma da Tir não fosforilada em tirosina ainda poderá ser distribuída na célula-hospedeiro. Extractos membranares de células HeLa infectadas com EPEC ou mutante foram isolados e sondados com anticorpos anti-PY e anti-EPEC de 78 kDa (FIG. 5).

A forma da Tir de 90 kDa fosforilada em tirosina só foi detectada com anticorpos anti-PY nas membranas infectadas com EPEC e CVD206. Os anticorpos anti-EPEC de 78 kDa reconheceram a mesma banda de 90 kDa em extractos membranares de EPEC e CVD206, mas as estirpes contendo mutações em *espA*, *espB* ou *cfm-14* não continham níveis detectáveis de Tir nas fracções membranas (FIG. 4) ou citoplasmática. A forma de 78 kDa da Tir em células infectadas com EPEC ou CVD206 não foi detectada, sugerindo uma modificação rápida em 90 kDa. A forma bacteriana da proteína Tir de 78 kDa estava presente na fracção insolúvel contendo bactérias aderentes de todas estas estirpes. Apenas a fracção insolúvel de células HeLa infectadas com EPEC continha a forma de 90 kDa da Tir, que fica localizada nesta fracção devido à sua interacção com a intimina.

Em consequência, EspA e EspB, ambas segregadas pelo sistema do tipo III, são necessárias para a distribuição eficiente de Tir na fracção membranar do hospedeiro.

Referência **EXEMPLO V**

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO GENE QUE CODIFICA A Tir

A finalidade deste EXEMPLO foi efectuar uma caracterização genética do gene bacteriano que codifica a Tir. Utilizou-se a sequência amino-terminal da proteína de EPEC de 78 kDa para conceber um oligonucleótido sintético, utilizando as preferências de localização de codões do *Locus* de Destruição de Enterócitos (LEE), para identificar a sequência de DNA homóloga. Examinaram-se os fragmentos de DNA sobrepostos na região LEE porque esta região é capaz de induzir fosforilação de Tir em tirosina quando clonada e expressa em *E. coli* não patogénica.

O oligonucleótido sintético hibridizou para um único fragmento de DNA na região LEE a montante do gene *eaeA* da intimina, que então foi clonado e sequenciado (FIG. 6A). A clonagem e análise de sequências de DNA do *tir* foram realizadas do modo seguinte. Com base nos dados da sequência proteica N-terminal do Tir concebeu-se um oligonucleótido degenerado, tendo-se utilizado este oligonucleótido em hibridização "Southern" em condições restritas para identificar e depois clonar um fragmento *EcoRI* de 3800 pares de bases da região LEE no vector Bluescript SK(+) pSK-*tir*. O vector resultante foi digerido com Exonuclease III (Erase-a Base; Promega) para se obter um conjunto de deleções encaixadas, que foram utilizadas para determinar a sequência de DNA do *tir* utilizando o Estojo de Sequenciação de Ciclos Taq DyeDeoxy™ Terminator

da Applied Biosystems. A iniciação das reacções de sequenciação de DNA empregou o "Primer" Directo M13 e o "Primer" T3. As estirpes de EPEC E2348/69, CVD206, cfm 14-2-1 (1) e UMD872 (*espA*), UMD864 (*espB*) foram descritas por Donnenbarg *et al.*, *Infection & Immunity* 60: 3953-61 (1990); Donnenberg *et al.*, *Trends Microbiol.* 5: 109-114 (1993); Foubister *et al.*, *Infection & Immunity* 62: 3038-40 (1994); Foubister *et al.*, *J. Exp. Med.* 179: 993-8 (1994); Jerse *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7839-43 (1990); Kenny e Finlay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7991-5 (1995), e Rosenshine *et al.*, *EMBO J.* 11: 3551-60 (1992).

O gene *tir* (ID SEQ NO: 1; número de acesso da Genbank AF013122) está localizado a montante de *eaeA*, com uma fase de leitura aberta previamente descrita, *orfU*, entre *caeA* e *tir* (FIG. 6B). Fases de leitura aberta parciais contendo homologias com *orfU* e o terminal C de Tir estão presentes na EPEC e nos outros patógenos de adesão e destruição EHEC, RDEC e *Citrobacter rodentium* (anteriormente *C. freundii* biótipo 4280) (números de acesso da Genbank M58154, U32312, U60002, L11691). A sequência amino-terminal da proteína purificada correspondeu exactamente à sequência proteica prevista, com a excepção da metionina amino-terminal não estar presente na proteína de EPEC segregada. As proteínas que são segregadas por sistemas de secreção do tipo III retêm os seus resíduos metionina amino-terminais. Uma vez que Tir não tem esta metionina, o Tir pode não utilizar directamente o sistema de secreção do tipo III para a sua secreção, apesar da sua transferência eficiente para células-hospedeiro depender da EspA, EspB e da via de secreção do tipo III (FIG. 5).

Nem o gene *tir* nem o seu produto, Tir, exibiram homologia significativa com quaisquer genes ou proteínas conhecidos utilizando uma pesquisa de homologia por BLAST. Apesar de se prever que a proteína Tir codifique uma proteína de 56,8 kDa, observou-se uma massa molecular de cerca de 78 kDa para a proteína segregada, que pode reflectir alguma modificação bacteriana adicional ou migração anormal devido à composição de aminoácidos ou características estruturais. A Tir contém duas sequências previstas que abrangem membranas com seis resíduos tirosina na metade C-terminal da proteína, que podem servir de substratos para a fosforilação (FIG. 6A). Prevê-se que a Tir tinha dois domínios transmembranares (previsão de TM, ISREC, Suíça) com os seis resíduos tirosina, potenciais substratos de quinases, na metade C-terminal. Tal como previsto para EspA e EspB, a Tir aparenta ser ligeiramente acídica (pI previsto de 5,16), o que foi verificado por análise de electroforese em gel bidimensional.

Para mostrar o papel desta proteína na formação do pedestal construiu-se uma deleção cromossómica no gene *tir* (FIG. 6B). O mutante de deleção cromossómica foi construído do modo seguinte. Os "primers":

MS 102 + (5'-AAAGTCGACAAGAACCTGAGAACCCAG-3'; ID SEQ NO: 8) e
 MS 103 - (5'-TTTGTCTGACTTATGTTTGTGAAGGTAGTGG-3'; ID SEQ NO: 9)
 foram utilizados para criar uma deleção 5' de 795 pares de bases entre os pares de bases 149 e pares de bases 795 do gene *tir* utilizando amplificação por PCR inversa de pSK-*tir*. O oligonucleótido MS 103 também introduziu um sítio de restrição *SalI* no produto de PCR e um codão de terminação para terminar a tradução da proteína. O fragmento de deleção resultante de *tir SalI/SacI* de 3000 pares de bases foi clonado no vector suicida de selecção positiva pCVD442

(*SalI/SacI*) e foi utilizado para construir o mutante de deleção por permuta alélica.

A estirpe mutante resultante não expressou a proteína de EPEC de 78 kDa nem transferiu Tir para células HeLa (FIG. 5). Adicionalmente, este mutante não causou acumulação significativa de proteínas fosfotirosina ou actina por baixo de bactérias aderentes (FIG. 7A), apesar de alguma actina se ter agregado na vizinhança da bactéria aderente de modo semelhante ao observado com mutantes de intimina. A mutação de deleção não afectou a secreção das outras proteínas segregadas por EPEC nem preveniu a expressão de intimina. Quando células HeLa não permeabilizadas foram coradas com o anticorpo anti-EPEC de 78 kDa, ocorreu etiquetagem de superfícies de células HeLa infectadas com o mutante de intimina (que não sequestra Tir por baixo de bactérias), mas não se observou coloração com células não infectadas ou com as infectadas com o mutante de *tir*, indicando que epítomos de Tir estão expostos na superfície de células HeLa infectadas.

Estes resultados mostram que a Tir é uma proteína nova e que *tir* é um polipéptido novo.

Referência **EXEMPLO VI**

MARCAÇÃO DE EPÍTOPOS DA Tir

A finalidade deste EXEMPLO foi confirmar que a proteína fosforilada em tirosina de 90 kDa em membranas epiteliais era a proteína Tir de EPEC. Construíram-se duas fusões genéticas ligando a sequência que codifica os epítomos de T7 ou HSV ao 5' ou 3' do *tir*, respectivamente.

A construção das fusões T7-*tir* e *tir*-HSV foi feita do modo seguinte. Em resumo, o gene *tir* foi amplificado por PCR, introduzindo sítios únicos de restrição para permitir fusões na estrutura com as sequências de T7 ou HSV no conjunto de vectores pET28a e pET27b (Novagen). O gene *tir* marcado, sem a cauda de His, foi então clonado num vector baseado em pACYC184 para expressão. Os plasmídeos resultantes foram transformados na estirpe de deleção alélica de *tir* de EPEC e foram utilizados para infectar células HeLa. A microscopia de fluorescência de células infectadas revelou a formação típica do pedestal com co-localização dos epítomos de T7 e HSV e actina em padrões característicos em ferradura (FIG. 7A). Esta complementação fenotípica com a construção *tir*-HSV, que codifica *tir* mas não o gene *orfU* a jusante, indica que o fenótipo da mutação de deleção de *tir* não se deve a um efeito polar no produto genético de *orfU*.

As fracções membranares de células infectadas com EPEC expressando Tir marcado com T7 também foram comparadas com as infectadas com o mutante de intimina CVD206. O T7-Tir foi detectável em extractos de membranas de células HeLa utilizando anticorpos contra EPEC de 78 kDa, T7 e PY (FIG. 7B). A adição do marcador de T7 aumentou a massa molecular aparente da proteína Tir fosforilada em comparação com o observado com CVD206. Em contraste com o T7-Tir, o próprio Tir não reagiu de forma cruzada com os anticorpos para T7 (FIG. 7B). Utilizaram-se anticorpos específicos para T7 para imunoprecipitar fracções membranares de células HeLa infectadas com CVD206 ou a estirpe T7-Tir. Como esperado, os anticorpos para T7 não imunoprecipitaram a proteína Tir de 90 kDa, ao passo que precipitaram a proteína de fusão

T7-Tir ligeiramente maior que foi reconhecida por anticorpos contra PY, T7 ou EPEC 78 (FIG. 7B).

Isto prova que T7-Tir está fosforilada em tirosina e é de origem bacteriana.

Referência **EXEMPLO VII**

A INTIMINA LIGA-SE À Tir DE EPEC POR EXPERIÊNCIAS DE SOBREPOSIÇÃO DE GEL

A finalidade deste EXEMPLO foi determinar se a intimina consegue ligar-se directamente à Tir segregada por EPEC.

Realizaram-se experiências de sobreposição de gel utilizando sobrenadantes de EPEC que cresceram em condições que expressam a Tir. As sobreposições de gel foram realizadas do modo seguinte. As amostras foram resolvidas por 12% SDS-PAGE e foram transferidas para nitrocelulose antes do bloqueio em leite magro 5% em Hyb75 (HEPES 20 mM [pH 7,7]; KCl 75 mM; EDTA 0,1 mM; MgCl₂ 2,5 mM; DTT 1 mM; NP40 0,05%) durante 2 horas à temperatura ambiente. A His-T7Intimina foi incubada durante a noite em 1% BSA/TBS (solução salina tamponada com Tris), foi lavada e a fusão ligada foi detectada por anticorpos para T7 (1:5000 em 1% BSA/TBS) seguido de peroxidase de rábano bravo de cabra anti-ratinho (1:10 000 em 1% BSA/TBS mais 0,1% Tween-20) utilizando o sistema de detecção ECL (Amersham).

Estes sobrenadantes foram sondados com a proteína de fusão His-T7Int purificada que contém os 280 resíduos C-terminais da intimina. A proteína de fusão foi construída do modo seguinte. A fusão genética MBP-Int foi construída e MBP e as fusões MBP-Intimina foram purificadas como

descrito noutro lugar (Frankel *et al.*, 1994). A mesma porção de intimina foi clonada em pET28a, para preparar uma fusão na estrutura His-T7Int, e foi purificada utilizando uma coluna de agarose-níquel como descrito pelo fornecedor (Novagen).

Assim, o sobrenadante da cultura de crescimento de EPEC foi diluído em série, dopado com uma quantidade constante de extracto membranar de HeLa não infectadas, foi resolvido por SDS-PAGE e transferido para nitrocelulose antes de se adicionar o péptido His-T7Int e detectar a proteína de fusão ligada com anticorpos anti-T7. A FIG. 7A mostra que a proteína His-T7Int se ligou especificamente a uma única banda de 78 kDa, subseqüentemente identificada como sendo Tir por sondagem da mesma coloração com anticorpos anti-EPEC de 78 kDa. Esta ligação ocorreu de um modo dependente da concentração. O nível de Tir presente no sobrenadante, mesmo à concentração mais elevada utilizada, foi inferior à detecção com Azul de Coomassie.

Os 280 resíduos C-terminais da intimina não se ligam a integrinas β_1 . Detectou-se ligação de MBP-Int a células epiteliais quando as células foram pré-infectadas com EPEC, mas não a células não infectadas nem às infectadas com mutantes de secreção do tipo III ou de sinalização, células que ainda expressam integrinas β_1 . Quando se utiliza MBP-Int para precipitar a forma da Tir de 90 kDa a partir de membranas epiteliais, as integrinas β_1 não são co-precipitadas apesar da sua presença no extracto de membranas epiteliais utilizado para as precipitações. Adicionalmente, utilizando sistemas de sobreposição de gel, várias proteínas de fusão com intimina ligaram-se apenas à Tir mas não às integrinas β_1 de maior peso molecular (ou a

qualquer outra molécula da membrana epitelial) (FIG. 8A). A Tir extraída de membranas epiteliais foi sondada com anticorpos policlonais dirigidos contra integrinas β_1 , não se tendo detectado reactividade cruzada. As integrinas β_1 não estão co-localizadas por baixo de EPEC aderente em células epiteliais (apesar da Tir estar), e a EPEC adere fortemente à superfície apical de células epiteliais polarizadas que não contêm integrinas β_1 conhecidas. Os motivos destas discrepâncias permanecem por resolver, mas os resultados sugerem fortemente que a Tir é o principal receptor da intimina em células cultivadas de mamífero.

Estes dados mostram que a intimina não se liga a nenhuma molécula das membranas de células HeLa, mostram que, nestas condições, a intimina pode ligar-se a Tir não fosforilada e mostram que outras proteínas segregadas por EPEC não são necessárias para facilitar esta ligação.

Referência **EXEMPLO VIII**

A INTIMINA LIGA-SE À Tir DE EPEC POR ELISA

A finalidade deste EXEMPLO foi desenvolver um ensaio ELISA para examinar a especificidade de interacções da intimina com Tir segregada por EPEC.

Conduziram-se ELISAs como previamente descrito por Kenny *et al.*, *Infection & Immunity* 65 (1997). Para ELISAs de ligação/competitivos, 100 μ L de EPEC ou sobrenadante de *tir* que cresceram em condições que induzem a secreção de Tir foram adicionados a placas de 96 cavidades Immulon (Dynatech Laboratories, Inc.). Após bloqueio com 200 μ L de 0,1% Tween-20/PBS, as cavidades foram incubadas com a) 100 μ L de His-T7Int (0,75 μ g/mL em PBS) ou diluições em série

de 2 vezes em PBS ou b) 100 μ L de His-T7Int (0,75 μ g/mL em PBS) contendo 170 μ g/mL de MBP-Int ou 85 μ g/mL de MBP, para além de diluições em série de 4 vezes em PBS contendo 0,75 μ g/mL de His-T7Int. A ligação da fusão de His-T7Int foi detectada com anticorpos para T7 e foi visualizada espectrofotometricamente ao comprimento de onda de absorvância A490, como previamente descrito por Kenny *et al.*, *Infection & Immunity* 65 (1997).

As cavidades de ELISA foram revestidas com sobrenadante de crescimento de EPEC ou o mutante de *tir* isogénico. A presença de níveis aproximadamente equivalentes das outras proteínas segregadas por EPEC e a ausência de Tir no sobrenadante de *tir* foram confirmadas por coloração com Coomassie e sondagem por ELISA convencional de diluições de sobrenadantes com os anticorpos anti-EPEC de 78 kDa ou EspB (FIG. 8B). Diluições em série da proteína de fusão His-T7Int purificada foram adicionadas à placa de ELISA revestida e a proteína de fusão ligada foi detectada utilizando anticorpos anti-T7. Como mostrado na FIG. 8B (painel do meio), a His-T7Int ligou-se apenas às cavidades que continham Tir no sobrenadante de crescimento. Esta ligação ocorreu de um modo dependente da dose, ocorrendo ligação quase de saturação a 75 ng/cavidade (25 nM). A ligação de His-T7Int (75 ng/cavidade) a sobrenadantes de EPEC imobilizada foi inibida, de uma forma dependente da dose, por concentrações crescentes do péptido de fusão proteína que se liga à maltose (MBP)-intimina, mas não pela MBP isoladamente (FIG. 8B, painel da direita). Ocorreu 50% de inibição da ligação com quantidades molares aproximadamente iguais de ambas as proteínas de fusão (25 nM).

Estes resultados salientam novamente que a intimina se pode ligar à Tir não fosforilada de um modo específico.

EXEMPLO I

Tir ISOLADA DE EHEC

A finalidade deste EXEMPLO foi investigar a estrutura da Tir em *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC). O gene *tir* foi clonado e as suas sequências foram comparadas com as da *E. coli* enteropatogénica (EPEC). A homologia das sequências de aminoácidos entre os polipéptidos Tir está apresentada na FIG. 9.

A clonagem e análise de sequências de genes *tir* foram feitas do modo seguinte. O fragmento de DNA que codifica o *tir* de EHEC foi obtido por PCR de DNA cromossómico de EHEC utilizando "primers" derivados da sequência publicada de *E. coli* enteropatogénica. Utilizou-se DNA polimerase Vent para PCR com a finalidade de amplificar DNA cromossómico de estirpes EHEC. A reacção de PCR foi realizada durante trinta ciclos de desnaturação a 94°C durante um minuto, hibridização a 55°C durante um minuto e alongamento a 72°C durante dois minutos. O produto resultante foi ligado no plasmídeo pBluescript comercialmente disponível e sequenciaram-se ambos os filamentos. A sequenciação de DNA foi feita do modo seguinte. O fragmento de DNA que codifica os genes *tir* foi amplificado por PCR utilizando os "primers" e DNA cromossómico de EHEC como modelo de DNA. O fragmento de extremidades planas resultante foi digerido com *SalI* e clonado no sítio *SalI-SmaI* do plasmídeo pBluescript-II SK(+) comercialmente disponível. Determinou-se a sequência de DNA do *tir* de EHEC utilizando o estojo Taq DyeDeoxy comercialmente disponível. Encontraram-se

fases de leitura aberta nas regiões clonadas, e estas duas sequências de DNA eram semelhantes ao *tir* de EPEC.

Estes resultados mostram que a EHEC codifica um gene *tir* e que o polipéptido Tir previsto está altamente conservado em EPEC e EHEC.

Referência **EXEMPLO IX**

MODELO DE COELHO PARA VIRULÊNCIA DE EPEC

A finalidade deste EXEMPLO foi mostrar que a EspA e EspB são críticas para a virulência. Utilizando voluntários humanos foi mostrado que a intimina é necessária para a virulência completa de EPEC (Donnenberg et al., *J. Clin. Inv.* 92: 1412-7 (1993)), e vários modelos animais documentaram o papel da intimina na virulência. Utilizou-se um modelo de coelho natural de infecção com EPEC para demonstrar que a EspA e EspB são críticas para a virulência.

Inocularam-se RDEC-1 e suas estirpes mutantes em *espA* e *espB* pela via orogástrica em coelhos jovens. Uma semana pós-infecção, a maior parte da RDEC-1 estava presente no ceco e no cólon. No entanto, o número de qualquer uma das estirpes mutantes estava grandemente decrescido nestes tecidos em comparação com a estirpe paterna. A RDEC-1 aderiu especificamente ao *sacculus rotundus* (epitélio associado ao folículo) e também se observou colonização bacteriana no ceco, indicando que o *sacculus rotundus* no ceco é um sítio de colonização importante para este patogene. Os níveis de aderência das estirpes EspA⁻ e EspB⁻ ao *sacculus rotundus* foram 70 e 8000 vezes inferiores aos da estirpe paterna. Estes resultados mostram que a capacidade de aderência e tropismo em tecidos da RDEC-1

dependem das duas proteínas Esp segregadas. Além disso, a EspB parece desempenhar um papel mais crítico do que a EspA na colonização e patogênese bacterianas. Esta é a primeira demonstração de que as proteínas segregadas por *E. coli* enteropatogénica, EspA e EspB, que estão envolvidas no desencadeamento de vias de transdução do sinal de células-hospedeiro, também são necessárias para a colonização e virulência.

Realizaram-se infecções em animais do modo seguinte. Culturas bacterianas efectuadas durante a noite foram recolhidas por centrifugação e foram novamente suspensas em um mL de solução salina tamponada com fosfato. Coelhos brancos da Nova Zelândia (pesos desde 1,0 até 1,6 kg) jejuaram durante a noite e depois inocularam-se no estômago, utilizando tubos orogástricos, cinco mL de bicarbonato de sódio esterilizado 2,5% e um mL de RDEC-1 ou das estirpes *espA* ou *espB* ($2,5 \times 10^{10}$). No dia seguinte, cada coelho foi inoculado com a mesma dosagem da bactéria.

Realizaram-se avaliações clínicas do modo seguinte. Cada coelho foi pesado diariamente e recolheram-se os dejectos fecais de bactéria por esfregaços rectais e grânulos de fezes. Os esfregaços rectais foram enrolados sobre metade da superfície de placas MacConkey que continham ácido nalidíxico. Cinco grânulos fecais ou a mesma quantidade de fezes líquidas foram recolhidos de cada coelho, foram novamente suspensos em três mL de solução salina tamponada com fosfato e 0,1 mL de cada suspensão de fezes foram plaqueados em placas MacConkey que continham ácido nalidíxico. O crescimento de colónias resistentes ao ácido nalidíxico foi pontuado do modo seguinte: 0, ausência de crescimento; 1, colónias muito espaçadas; 2, colónias

proximamente espaçadas; 3, crescimento confluyente de colónias.

A amostragem e preparação dos tecidos foram realizadas do modo seguinte. Os tecidos foram excisados imediatamente após o sacrifício por injeção intravenosa de cetamina e sobredosagem de fenobarbital sódico.

A quantidade de colonização bacteriana em tecidos intestinais foi avaliada do modo seguinte. Os segmentos intestinais (10 cm), excepto o ceco, foram duplamente ligados nas suas extremidades próxima e distal e foram dissecados entre as partes duplamente ligadas, depois foram enxaguados com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato gelada. Adicionou-se um grama do conteúdo viscoso do ceco a 9 mL de solução salina tamponada com fosfato. As suspensões resultantes em solução salina tamponada com fosfato foram diluídas e plaqueadas em placas MacConkey que continham ácido nalidíxico.

A quantidade de aderência bacteriana a tecidos intestinais foi avaliada do modo seguinte. Amostras de tecidos foram excisadas utilizando uma punção de cortiça de 9 mm de diâmetro, foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato, adicionadas a dois mL de solução salina tamponada com fosfato gelada e homogeneizadas com um homogeneizador, depois amostras diluídas em série foram plaqueadas em placas MacConkey. O número de bactérias aderentes a cada tecido por centímetro quadrado foi calculado do modo seguinte: $CFU/cm^2 = \text{número bacteriano/placa} \times \text{factor de diluição} \times 2 \text{ mL} / -0,452$.

Estes dados indicam que estas moléculas e as funções que desempenham são críticas para a patogénese. As interacções íntimas que ocorrem entre proteínas segregadas por EPEC e a superfície das células-hospedeiro salientam a complexidade das interacções hospedeiro-patogene e proporcionam ferramentas de valor para explorar e estudar a função celular e doença bacteriana, para além de potenciais utilizações terapêuticas.

EXEMPLO II

DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA BOVINA CONTRA A EHEC

A finalidade deste EXEMPLO é proporcionar uma vacina bovina contra *E. coli* entero-hemorrágica.

A EHEC foi ligada a muitos surtos alimentares e casos esporádicos de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urémica em todo o mundo. Um surto em 1993, na costa ocidental dos Estados Unidos, envolveu mais de 500 casos e a morte de várias crianças. A EHEC é a terceira causa mais frequente de doenças alimentares nos E.U.A. O alimento mais habitualmente associado a epidemiologia é carne de vaca picada. A EHEC não causa sintomas de doença no gado vacum, mas os bovinos de criação transportam a EHEC nos seus tractos intestinais. A contaminação das carcaças ocorre durante as operações da matança.

O gado vacum é vacinado com Tir, EspA, EspB, intimina, ou combinações destas. A aderência da EHEC a vacas vacinadas é bloqueada pela resposta imunológica bovina. Em consequência, o gado vacum vacinado não se torna portador de EHEC.

A utilização de gado vacum vacinado reduz a ocorrência de carne contaminada por *E. coli* entero-hemorrágica. Em consequência, a introdução reduzida de alimentos contaminados no mercado reduz, e talvez mesmo elimine, a incidência de doenças associadas a alimentos com EHEC e os respectivos fardos económicos associados.

EXEMPLO III

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO PARA RASTREAR INIBIDORES DA LIGAÇÃO DO POLIPÉPTIDO Tir À INTIMINA

A finalidade deste EXEMPLO é proporcionar um ensaio de rastreio de um composto que interfere na ligação de um polipéptido Tir à intimina.

A ligação do polipéptido Tir à intimina é medida em condições padrão. Gera-se um gráfico de Scatchard da ligação para determinar a afinidade de ligação do polipéptido Tir à intimina.

Em seguida, um composto candidato suspeito de interferir na ligação do polipéptido Tir à intimina é adicionado a uma mistura ou solução de polipéptido Tir e intimina. Depois mede-se a ligação do polipéptido Tir à intimina em condições padrão. Gera-se um gráfico de Scatchard da ligação para determinar alterações da ligação do polipéptido Tir à intimina.

O ensaio compara a ligação do polipéptido Tir à intimina na presença do composto com a ligação do polipéptido Tir na ausência do composto. Os compostos que interferem na ligação do polipéptido Tir à intimina são úteis no tratamento de patógenos nos quais a ligação do

polipéptido Tir à intimina está envolvida na patogénese, incluindo patógenes como EPEC e EHEC.

EXEMPLO IV

MÉTODO DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE EPEC E EHEC

A finalidade deste EXEMPLO é demonstrar um método de diferenciação entre patógenes que contêm factores de virulência muito semelhantes. Uma estirpe isolada de um patógeno de adesão e destruição, EPEC ou EHEC, é utilizada para infectar células de cultura de tecidos. As células de cultura de tecidos são sondadas com anticorpos anti-fosfotirosina e anti-Tir. A ligação dos anticorpos anti-fosfotirosina e anti-Tir à bactéria nas células de cultura de tecidos infectadas é detectada por imunofluorescência ou colorações "Western".

A EPEC nas células de cultura de tecidos infectadas exibe uma resposta positiva à ligação de ambos os anticorpos anti-fosfotirosina e anti-Tir. A EHEC nas células de cultura de tecidos infectadas exibe uma resposta positiva à ligação do anticorpo anti-Tir e uma resposta negativa à ligação a anti-fosfotirosina.

Referência **EXEMPLO X**

DISTRIBUIÇÃO CELULAR DIRIGIDA

A finalidade deste EXEMPLO é utilizar o sistema Tir-intimina para distribuição celular dirigida. Células HeLa em cultura de tecidos são infectadas com uma estirpe de EPEC eaeA (mutante de intimina). Um veículo de distribuição que contém intimina é construído e introduzido na cultura. O veículo de distribuição é um lipossoma que encapsula β -

galactosidase. Após incubação apropriada, as células são lavadas e coradas com X-gal. Uma cor azul indica que a β -galactosidase é distribuída na célula pelo lipossoma. Células de controlo tratadas com lipossoma que não contém intimina encapsulando β -galactosidase são coradas com uma intensidade menor detectável.

Os resultados deste EXEMPLO mostram que o Tir é distribuído nas células e que um veículo que dirige o Tir pode distribuir compostos bioquímicos nestas células.

Apesar da invenção ter sido descrita com referência às formas de realização presentemente preferidas, deve entender-se que se podem fazer várias modificações.

Em conformidade, a invenção é limitada apenas pelas reivindicações seguintes.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

<120> HP90: RECEPTOR MEMBRANAR DO HOSPEDEIRO PARA BACTÉRIAS PATOGENICAS CODIFICADO PELO GENE BACTERIANO TIR

<130> E 1730 EP

<140> EP 98 95 4076.0

<141> 1998-11-10

<150> US 60/065,130<151> 1997-11-12

<160> 10

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 1920

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 1

```

cggtgcata cgttacgtc atagtaatat aaaggaacgt gtcaaatttc taaataaaaag      60
gatatatgta tgctattgg taaccttgggt aataatgtaa atggcaatca ttaattccc      120
cctgcgcgcg cactaccttc acaaacagac ggcgcggcac ggggagggaac tggtcattcta      180
attagctcta caggagcatt aggatctcgt tcattgtttt ctcccctgag aaattctatg      240
gctgattctg tcgattccag agatattcca ggacttccta caaaccctac gaggcttgct      300
gcagctacat ctgagacatg cttgcttgga ggatttgaag ttctccatga taaggggcca      360
cttgatattc tcaatacgca aattggaccc tctgcatttc gtgttgaagt gcaggcagat      420
ggtaactcatg ccgctattgg agaaaaaaat ggtttggagg ttagcgttac attaagtcct      480
caagaatgga gcagcttgca atctattgat actgagggtg aaaaacagatt tgtttttacc      540
gggggacgtg gcggtagtgg gcatccgatg gtcactgtcg catcagatat cgcggaagct      600
cgtacgaaaa tactggccaa attagaccca gacaatcatg gaggacgtca acccaaggac      660
gttgatacgc gttctgttgg tgttggcagc gcttcgggaa tagatgatgg cgttggttagc      720
gaaacccata cttcaacaac aaattccagc gttcgtcag atcctaaatt ctgggtttct      780
gtcggcgcaa ttgctgctgg tttagcggga ctggcgga ca ctggtattgc acaggcgttg      840
gcttlgacac cggaaaccgga tgatcctaca accaccgatc ctgatcaggc cgcasatgct      900
gcagaaagtg caacaaaaga tcagttaacg caagaagcat tcaagaaccc tgagaaccag      960
aaagttaaca tcgatgcaaa cggaaatgct attccgtctg gggaattaaa agatgatatt      1020
gttgagcaaa tagcacaaca agctaaagag gctgggtgagg tggccagaca gcaggctgtt      1080
gaaagcaatg cacaggcgca gcagcgatat gaggatcagc atgccagacg tcaggaggaa      1140
ttacagcttt catcgggtat tggttacggc ctcagcagtg cattgattgt tgctggggga      1200
attggtgctg gtgtaacgac tgcgctccat agacgaaatc agccggcaga acagacaact      1260
actacaacaa cacatacggg agtgcagcaa cagaccggag ggatacccca gcacaagggtg      1320
gcactgatgc cacaagagcg aagacgcttc tctgatagac gtgatccgca ggggagtggt      1380
gcctcgacac actggtcaga ttctcttagc gaagtgggta atccatatgc tgaagttggg      1440
ggggctcgga atagtctatc ggctcatcag ccagaagagc atatttatga tgaggctcgt      1500
gcagatccctg gttatagcgt tattcagaat ttttcaggga gcggccagc taccggaagg      1560
ttaataggaa ctccagggca aggtatccaa agtacttatg cgcttctggc aaacagcggc      1620
ggattgcgtt taggtatggg aggatatacg agtgggtggc agacggcagt aagttctgta      1680
aatgccgcac caacgcaggg accagtagct ttcggtttaa tatatctgtg agtatttagt      1740
tgagggtggg gtgggtggg ggggcgtttt actagcgtta atgtttcaga gaacaacgtt      1800
gcagcatggg taactcttga acttctgtta ttataatcaa ttaagagaaa ttataatgtc      1860
atcaagatct gaacttttat tagatagggt tgcggaaaaa attgggtgtg gatctatttc      1920

```

<210> 2

<211> 549

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 2

Met	Pro	Ile	Gly	Asn	Leu	Gly	Asn	Asn	Val	Asn	Gly	Asn	His	Leu	Ile
1				5					10				15		
Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Leu	Pro	Ser	Gln	Thr	Asp	Gly	Ala	Ala	Arg	Gly
			20					25					30		
Gly	Thr	Gly	His	Leu	Ile	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Ser
		35					40					45			
Leu	Phe	Ser	Pro	Leu	Arg	Asn	Ser	Met	Ala	Asp	Ser	Val	Asp	Ser	Arg
50						55					60				
Asp	Ile	Pro	Gly	Leu	Pro	Thr	Asn	Pro	Ser	Arg	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr
65					70					75					80
Ser	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Val	Leu	His	Asp	Lys	Gly
			85						90					95	
Pro	Leu	Asp	Ile	Leu	Asn	Thr	Gln	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Phe	Arg	Val
			100					105					110		
Glu	Val	Gln	Ala	Asp	Gly	Thr	His	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Lys	Asn	Gly
		115					120					125			
Leu	Glu	Val	Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Trp	Ser	Ser	Leu	Gln
130						135					140				
Ser	Ile	Asp	Thr	Glu	Gly	Lys	Asn	Arg	Phe	Val	Phe	Thr	Gly	Gly	Arg
145					150					155					160
Gly	Gly	Ser	Gly	His	Pro	Met	Val	Thr	Val	Ala	Ser	Asp	Ile	Ala	Glu
			165						170					175	
Ala	Arg	Thr	Arg	Ile	Leu	Ala	Lys	Leu	Asp	Pro	Asp	Asn	His	Gly	Gly
			180					185					190		
Arg	Gln	Pro	Lys	Asp	Val	Asp	Thr	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Gly	Ser	Ala
		195					200					205			
Ser	Gly	Ile	Asp	Asp	Gly	Val	Val	Ser	Glu	Thr	His	Thr	Ser	Thr	Thr
	210					215					220				
Asn	Ser	Ser	Val	Arg	Ser	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Ser	Val	Gly	Ala
225					230					235					240
Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Thr	Gly	Ile	Ala	Gln	Ala
			245						250					255	
Leu	Ala	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Asp	Asp	Pro	Thr	Thr	Thr	Asp	Pro	Asp
			260					265					270		
Gln	Ala	Ala	Asn	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	Thr	Lys	Asp	Gln	Leu	Thr	Gln
		275					280					285			
Glu	Ala	Phe	Lys	Asn	Pro	Glu	Asn	Gln	Lys	Val	Asn	Ile	Asp	Ala	Asn
	290					295					300				
Gly	Asn	Ala	Ile	Pro	Ser	Gly	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Ile	Val	Glu	Gln
305					310					315					320
Ile	Ala	Gln	Gln	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	Val	Ala	Arg	Gln	Gln	Ala
			325						330					335	


```

Val Glu Ser Asn Ala Gln Ala Gln Gln Arg Tyr Glu Asp Gln His Ala
      340      345      350
Arg Arg Gln Glu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Gly Ile Gly Tyr Gly Leu
      355      360      365
Ser Ser Ala Leu Ile Val Ala Gly Gly Ile Gly Ala Gly Val Thr Thr
      370      375      380
Ala Leu His Arg Arg Asn Gln Pro Ala Glu Gln Thr Thr Thr Thr Thr
      385      390      395      400
Thr His Thr Val Val Gln Gln Gln Thr Gly Gly Ile Pro Gln His Lys
      405      410      415
Val Ala Leu Met Pro Gln Glu Arg Arg Arg Phe Ser Asp Arg Arg Asp
      420      425      430
Ser Gln Gly Ser Val Ala Ser Thr His Trp Ser Asp Ser Ser Ser Glu
      435      440      445
Val Val Asn Pro Tyr Ala Glu Val Gly Gly Ala Arg Asn Ser Leu Ser
      450      455      460
Ala His Gln Pro Glu Glu His Ile Tyr Asp Glu Val Ala Ala Asp Pro
      465      470      475      480
Gly Tyr Ser Val Ile Gln Asn Phe Ser Gly Ser Gly Pro Val Thr Gly
      485      490      495
Arg Leu Ile Gly Thr Pro Gly Gln Gly Ile Gln Ser Thr Tyr Ala Leu
      500      505      510

Leu Ala Asn Ser Gly Gly Leu Arg Leu Gly Met Gly Gly Leu Thr Ser
      515      520      525
Gly Gly Glu Thr Ala Val Ser Ser Val Asn Ala Ala Pro Thr Pro Gly
      530      535      540
Pro Val Arg Phe Val
      545

```

<210> 3

<211> 1723

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 3

```

atgectattg gtaaccttgg tcataatccc aatgtgaata attcaattcc tccgtcacct 60
ccattacctt cacaaccgga cgggtgcaggg gggcgtggtc agctcattaa ctctacgggg 120
ccgttgggat ctcggtgcgt atttacgcct gtaaggaatt ctatggctga ttctggcgac 180
aatcggtcca gtgatgttcc tggacttcct gtaaatccga tggcctggc gggtctgag 240
ataacactga atgatggatt tgaagttcct catgatcatg gtccgctcga tactcttaac 300
aggcagattg gctcttcggt atttcgagtt gaaactcagg aagatggtaa acatattgct 360
gtcggtcaga ggaatgggtg tgagacctct gttgttttaa gtgatcaaga gtacgctcgc 420
ttgcagtcca ttgatcctga aggtaaagac aaatttgtat ttactggagg ccgtgggtgg 480
gctgggcatg ctatggtcac cgttgcttca gatatacagg aagcccgcca aaggatactg 540
gagctgttag agcccaaagg gaccggggag tccaaagggt ctggggagtc aaaaggcgtt 600
ggggagttga gggagtcaaa tagcgggtgcg gaaaacacca cagaactca gacctcaacc 660
tcaacttcca gccttcgttc agatcctaaa ctttgggttg cgttggggac tgttgctaca 720
ggtctgatag ggttggcggc gacgggtatt gtacaggcgc ttgcattgac gccggagccg 780
gatagcccaa ccacgaccga cctgatgca gctgcaagtg caactgaaac tgcgacaaga 840
gatcagttaa cgaaagaagc gttccagaac ccagataatc aaaaagttaa tatcgatgag 900
ctcggaatg cgattcgtc aggggtattg aaagatgatg ttgttgcgaa tatagaagag 960
caggctaaaq cagcaggcga agaggccaaa cagcaagcca ttgaaaataa tgctcaggcg 1020
caaaaaaat atgatgaaca acaagctaaa cgccaggagg agctgaaagt ttcatcgggg 1080
gctggctacg gtcttagtgg cgcattgatt cttggtgggg gaattgggtg tgcctgcacc 1140
gctgcgcttc atcgaaaaaa tcagccggta gaacaacaa caacaactac tactacaact 1200
acaactacaa gcgcacgtac ggtagagaat aagcctgcaa ataatacacc tgcacagggc 1260
aatgtagata cccctgggtc agaagatacc atggagagca gacgtagctc gatggctagc 1320
acctcgtcga ctttctttga cacttccagc atagggaccg tgcagaatcc gtatgctgat 1380
gttaaaacat cgctgcattg ttgcagggtg ccgacttcta attctaatac gtctgttcag 1440
aatatgggga atacagattc tgttgtatat agcaccattc aacatcctcc ccgggatact 1500
actgataacg gcgcacgggt attaggaat ccaagtgcgg ggattcaaag cacttatgcg 1560
cgtctggcgc taagtgggtg attacgccat gacatgggag gattaacggg ggggagtaat 1620
agcgtgtgta atacttcgaa taaccaccca gcgcggggat cccatcgctt cgtctaaata 1680
tatccataat cattttattt agagggaggg aggggggaag tct 1723

```

<210> 4

<211> 558

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 4

```

Met Pro Ile Gly Asn Leu Gly His Asn Pro Asn Val Asn Asn Ser Ile
1      5      10      15
Pro Pro Ala Pro Pro Leu Pro Ser Gln Thr Asp Gly Ala Gly Gly Arg
20      25      30
Gly Gln Leu Ile Asn Ser Thr Gly Pro Leu Gly Ser Arg Ala Leu Phe
35      40      45
Thr Pro Val Arg Asn Ser Met Ala Asp Ser Gly Asp Asn Arg Ala Ser
50      55      60
Asp Val Pro Gly Leu Pro Val Asn Pro Met Arg Leu Ala Ala Ser Glu
65      70      75      80
Ile Thr Leu Asn Asp Gly Phe Glu Val Leu His Asp His Gly Pro Leu
85      90      95
Asp Thr Leu Asn Arg Gln Ile Gly Ser Ser Val Phe Arg Val Glu Thr
100     105     110
Gln Glu Asp Gly Lys His Ile Ala Val Gly Gln Arg Asn Gly Val Glu

```


<211> 1460

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 5

```
aattctgttg ctgatgctgc tgattctcgt gccagtgata ttccccggact tcctacaaat      60
ccactgcgct ttgctgcgtc cgaggctatct ttgcatgggtg cgcttgaagt tcttcatgat      120
```

```
aaaggggggc ttgatactct taactctgct attggatctt cgttattccg tgttgaaact      180
cgggatgatg gcagccatgt tgctatcggg caaaaaaatg gcctcgagac cactgttgtt      240
ttaagtgagc aagagttttc tagcttacag tcccttgatc ctgaaggtaa aaacaaattt      300
gtatttactg gaggccgcgg tggcccaggg catgctatgg tcacggttgc ttcagatata      360
gccgaagccc gtcagaggat aatagataaa ttagaaccaa aggatacaaa ggagacgaag      420
gagccagggg atccaaatag tggcgagggg aaaatcattg aaattcatac ctcaacctca      480
acttctagcc tccgtgcaga tcctaaactt tggttgtcat tggggactat tgctgcaggt      540
ctgataggga tggctgcgac ggggattgca caggctgttg cgttgactcc agagccggat      600
gacccaatca ctaccgacct tgatgctgca gcaaacacag ctgaagcagc ggcaaaagat      660
cagttaacga aagaagcatt ccagaaccca gataaccaga aagttaatat cgatgagaac      720
ggaaatgcaa ttccgtccgg ggaactaaaa gatgatgttg ttgcgcaaat agcagaacaa      780
gctaagcggc cgggtgaaca ggccagacag gaagctattg aaagtaattc tcaggcgagc      840
caaaaatatg atgaacagca tgctaaacgc gaacaggaaa tgtctctttc atcggggggt      900
ggctacggta ttagtggtgc gctgattctt ggcgggggaa ttggtgccgg tgttactgct      960
gctcttcata ggaaaaacca accggcagaa caaacaatca ctacacgtac ggtagtcgat      1020
aatcagccca cgaataacgc atctgcgcag ggcaatactg acacaagtgg gccagaagag      1080
tccccggcga gcagacgtaa ttcgatgcc agcctcgcat cgaacgggtc tgacacctcc      1140
agcacgggca cggtagagaa tccgtatgct gacgttggaa tgcccagaaa tgattcactg      1200
gctcgcattt cagaggaacc tatttatgat gaggtcgctg cagatcctaa ttatagcgtc      1260
attcaacatt tttcagggaa cagcccagtt accggaaggt tagtgggaac cccagggcaa      1320
ggatccaaa gtacttatgc gcttctggca agcagcggcg gattgcgttt aggtatggga      1380
ggattaacgg ggggtggcga gacgcagta agtactgcc aatgccgacc aacgcgggga      1440
cccgcacgtt tcgtttaaat
```

<210> 6

<211> 485

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 6

Asn	Ser	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Asp	Ser	Arg	Ala	Ser	Asp	Ile	Pro	Gly		
1				5					10					15			
Leu	Pro	Thr	Asn	Pro	Leu	Arg	Phe	Ala	Ala	Ser	Glu	Val	Ser	Leu	His		
			20					25					30				
Gly	Ala	Leu	Glu	Val	Leu	His	Asp	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Thr	Leu	Asn		
		35					40					45					
Ser	Ala	Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Phe	Arg	Val	Glu	Thr	Arg	Asp	Asp	Gly		
	50					55				60							
Ser	His	Val	Ala	Ile	Gly	Gln	Lys	Asn	Gly	Leu	Glu	Thr	Thr	Val	Val		
65					70					75					80		
Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Phe	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Asp	Pro	Glu	Gly		
			85						90					95			
Lys	Asn	Lys	Phe	Val	Phe	Thr	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Pro	Gly	His	Ala		
			100					105					110				
Met	Val	Thr	Val	Ala	Ser	Asp	Ile	Ala	Glu	Ala	Arg	Gln	Arg	Ile	Ile		
		115					120					125					
Asp	Lys	Leu	Glu	Pro	Lys	Asp	Thr	Lys	Glu	Thr	Lys	Glu	Pro	Gly	Asp		
	130					135					140						
Pro	Asn	Ser	Gly	Glu	Gly	Lys	Ile	Ile	Glu	Ile	His	Thr	Ser	Thr	Ser		
145					150					155					160		
Thr	Ser	Ser	Leu	Arg	Ala	Asp	Pro	Lys	Leu	Trp	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr		
			165						170					175			
Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Met	Ala	Ala	Thr	Gly	Ile	Ala	Gln	Ala		
		180					185					190					
Val	Ala	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Asp	Asp	Pro	Ile	Thr	Thr	Asp	Pro	Asp		
	195						200					205					
Ala	Ala	Ala	Asn	Thr	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Asp	Gln	Leu	Thr	Lys		
	210					215					220						
Glu	Ala	Phe	Gln	Asn	Pro	Asp	Asn	Gln	Lys	Val	Asn	Ile	Asp	Glu	Asn		
225					230					235				240			
Gly	Asn	Ala	Ile	Pro	Ser	Gly	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Val	Val	Ala	Gln		
			245						250					255			
Ile	Ala	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Glu	Gln	Ala	Arg	Gln	Glu	Ala		
		260						265					270				

```

Ile Glu Ser Asn Ser Gln Ala Gln Gln Lys Tyr Asp Glu Gln His Ala
      275      280      285
Lys Arg Glu Gln Glu Met Ser Leu Ser Ser Gly Val Gly Tyr Gly Ile
      290      295      300
Ser Gly Ala Leu Ile Leu Gly Gly Gly Ile Gly Ala Gly Val Thr Ala
305      310      315      320
Ala Leu His Arg Lys Asn Gln Pro Ala Glu Gln Thr Ile Thr Thr Arg
      325      330      335
Thr Val Val Asp Asn Gln Pro Thr Asn Asn Ala Ser Ala Gln Gly Asn
      340      345      350
Thr Asp Thr Ser Gly Pro Glu Glu Ser Pro Ala Ser Arg Arg Asn Ser
      355      360      365
Asn Ala Ser Leu Ala Ser Asn Gly Ser Asp Thr Ser Ser Thr Gly Thr
      370      375      380
Val Glu Asn Pro Tyr Ala Asp Val Gly Met Pro Arg Asn Asp Ser Leu
385      390      395      400
Ala Arg Ile Ser Glu Glu Pro Ile Tyr Asp Glu Val Ala Ala Asp Pro
      405      410      415
Asn Tyr Ser Val Ile Gln His Phe Ser Gly Asn Ser Pro Val Thr Gly
      420      425      430
Arg Leu Val Gly Thr Pro Gly Gln Gly Ile Gln Ser Thr Tyr Ala Leu
      435      440      445
Leu Ala Ser Ser Gly Gly Leu Arg Leu Gly Met Gly Gly Leu Thr Gly
      450      455      460
Gly Gly Glu Ser Ala Val Ser Thr Ala Asn Ala Ala Pro Thr Pro Gly
465      470      475      480
Pro Ala Arg Phe Val
      485

```

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 7

```

Pro Ile Gly Asn Leu Gly Asn Asn Val Asn Gly Asn His Leu Ile Pro
1      5      10      15
Pro Ala Pro Pro Leu Pro Ser Gln Thr Asp Gly Ala Ala Arg
      20      25      30

```

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> SEQUÊNCIA DE "PRIMER"

<400> 8 aaagtcgaca agaacctgag aaccag 26

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> SEQUÊNCIA DE "PRIMER"

<400> 9 ttgtcgact tatgtttgtg aaggtagtgg 30

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 10

Met	Ser	Ser	Arg	Ser	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Arg	Phe	Ala	Glu	Lys	Ile
1				5					10					15	
Gly	Val	Gly	Ser	Ile	Ser										
				20											

Lisboa, 3 de Novembro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido receptor transportado da intimina (Tir) que se liga à intimina, em que o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos que é seleccionada do grupo que consiste em:
 - (a) a sequência de aminoácidos apresentada na ID SEQ NO: 4;
 - (b) uma sequência de aminoácidos que é substancialmente idêntica à sequência apresentada na ID SEQ NO: 4, em que o polipéptido Tir tem um resíduo de aminoácido da ID SEQ NO: 4 substituído por um aminoácido conservativo, e
 - (c) uma sequência de aminoácidos que é substancialmente idêntica à sequência apresentada na ID SEQ NO: 4, em que o polipéptido Tir tem um aminoácido deletado ou inserido na ID SEQ NO: 4.
2. Polipéptido Tir da reivindicação 1, em que o referido polipéptido também tem uma actividade seleccionada do grupo que consiste (a) na capacidade para proceder à nucleação de actina numa célula-hospedeiro, e (b) na capacidade para activar uma via da transdução do sinal da célula-hospedeiro.
3. Polipéptido Tir da reivindicação 1, em que o referido polipéptido também tem capacidade para se ligar especificamente a um anticorpo específico para o Tir.
4. Polipéptido Tir da reivindicação 1, em que o referido polipéptido também tem capacidade para induzir uma

resposta imunológica num hospedeiro contra uma *E. coli* entero-hemorrágica.

5. Polinucleótido seleccionado do grupo que consiste em:
 - (a) um polinucleótido compreendendo a sequência de ácido nucleico apresentada na ID SEQ NO: 3;
 - (b) um polinucleótido de (a) em que T é U;
 - (c) um polinucleótido compreendendo a sequência de ácido nucleico complementar a (a) ou (b);
 - (d) um polinucleótido que codifica um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na ID SEQ NO: 4.
6. Vector compreendendo o polinucleótido da reivindicação 5.
7. Célula-hospedeiro compreendendo o vector da reivindicação 6.
8. Anticorpo anti-Tir, ou respectivo fragmento, que se liga com elevada especificidade imunológica ao polipéptido de qualquer uma das reivindicações 1 até 4.
9. Anticorpo da reivindicação 8, em que o anticorpo é monoclonal ou policlonal.
10. Método para detectar um polipéptido Tir numa amostra, que compreende:
 - (a) contactar a amostra com o anticorpo da reivindicação 8 ou 9, e

(b) detectar a ligação do anticorpo ao polipéptido Tir, em que a ligação é indicadora da presença do polipéptido Tir na amostra.

11. Método da reivindicação 10, em que a amostra consiste em tecido ou um fluido biológico.
12. Método da reivindicação 10 ou 11, em que a presença do polipéptido Tir na amostra é indicadora de infecção por uma *E. coli* entero-hemorrágica.
13. Composição farmacêutica compreendendo o polipéptido de qualquer uma das reivindicações 1 até 4, o polinucleótido da reivindicação 5 ou o vector da reivindicação 6.
14. Utilização do polipéptido de qualquer uma das reivindicações 1 até 4, do polinucleótido da reivindicação 5 ou do vector da reivindicação 6 para a preparação de uma composição farmacêutica destinada a melhorar uma doença causada por infecção de um hospedeiro por um organismo produtor de Tir.
15. Utilização do polipéptido de qualquer uma das reivindicações 1 até 4, do polinucleótido da reivindicação 5 ou do vector da reivindicação 6 para a preparação de uma composição farmacêutica destinada a induzir uma resposta imunológica contra um organismo produtor de Tir.
16. Utilização da reivindicação 14 ou 15, em que o hospedeiro é um ser humano ou um bovino.

17. Utilização de qualquer uma das reivindicações 14 até 16, em que o organismo produtor de Tir é *E. coli*.
18. Utilização da reivindicação 17, em que a *E. coli* produtora de Tir é uma *E. coli* entero-hemorrágica.
19. Método para detectar um polinucleótido Tir numa amostra, que compreende:
 - (a) contactar uma amostra com uma sonda de ácido nucleico que hibridiza em condições restritas para o polinucleótido da reivindicação 5, e
 - (b) detectar a hibridização da sonda com o polinucleótido Tir, em que a detecção de hibridização é indicadora da presença do polinucleótido Tir na amostra,em que a referida sonda é um fragmento do polinucleótido da reivindicação 5 que tem pelo menos 15 bases nucleotídicas de comprimento.
20. Método da reivindicação 19, que também compreende amplificar o polinucleótido Tir.
21. Método recombinante para produzir um polinucleótido Tir, que compreende inserir um ácido nucleico que codifica um marcador seleccionável no polinucleótido da reivindicação 5 de modo que o polinucleótido resultante codifique um polipéptido Tir recombinante compreendendo o marcador seleccionável.
22. Método recombinante para produzir um polipéptido Tir, que compreende:

- (a) fazer crescer uma célula-hospedeiro recombinante compreendendo o polinucleótido da reivindicação 5 que codifica um polipéptido Tir em condições que permitam a expressão e secreção do polipéptido Tir, e
- (b) isolar o polipéptido Tir.

23. Método para produzir uma proteína de fusão de Tir, que compreende:

- (a) fazer crescer uma célula-hospedeiro compreendendo um polinucleótido que codifica um polipéptido Tir de qualquer uma das reivindicações 1 até 4 operativamente ligado a um polinucleótido que codifica um polipéptido ou péptido de interesse em condições que permitam a expressão e secreção da proteína de fusão, e
- (b) isolar a proteína de fusão.

24. Proteína de fusão de Tir produzida pelo método da reivindicação 23, em que o polipéptido de fusão de Tir compreende a sequência de aminoácidos da ID SEQ NO: 4 fundida a uma sequência proteica diferente de Tir.

25. Método para identificar um composto que interfere na ligação de um polipéptido Tir de qualquer uma das reivindicações 1 até 4 à intimina, em que o método compreende comparar a ligação do polipéptido Tir à intimina na presença do composto com a ligação do polipéptido Tir na ausência do composto.

26. Método de diferenciação de patógenos de adesão e destruição, que compreende:

(a) contactar bactérias de adesão e destruição obtidas de uma célula-hospedeiro infectada com um anticorpo da reivindicação 8 ou 9, e

(b) contactar as bactérias de adesão e destruição com um anticorpo anti-fosfotirosina.

27. Utilização de um veículo de distribuição celular contendo intimina que compreende um composto de interesse para a preparação de uma composição farmacêutica ou cosmética destinada a distribuir um composto de interesse numa célula contendo um polipéptido de qualquer uma das reivindicações 1 até 4.

28. Método para detectar o citoesqueleto de uma célula, que compreende:

(a) contactar um citoesqueleto celular com um polipéptido Tir de qualquer uma das reivindicações 1 até 4, e

(b) detectar a ligação do referido polipéptido Tir ao citoesqueleto celular.

29. Estojo útil para a detecção de um polipéptido Tir, que compreende um meio transportador separado em compartimentos de modo a encerrar de forma confinada um ou mais recipientes compreendendo um recipiente que contém um anticorpo da reivindicação 2 ou 9 que se liga ao polipéptido Tir.

30. Estojo da reivindicação 29, em que o anticorpo é etiquetado de forma detectável.

31. Estojo da reivindicação 30, em que a etiqueta é seleccionada do grupo que consiste num isótopo radioactivo, um composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, um composto fluorescente, um quelato metálico e uma enzima.
32. Estojo útil para a detecção de um polinucleótido *tir*, que compreende um meio transportador separado em compartimentos de modo a encerrar de forma confinada um ou mais recipientes compreendendo um recipiente que contém uma sonda de ácido nucleico que hibridiza para o polinucleótido da reivindicação 5, em que a referida sonda contém pelo menos 35 nucleótidos.
33. Estojo da reivindicação 32, em que a sonda é etiquetada de forma detectável.
34. Estojo da reivindicação 33, em que a etiqueta é seleccionada do grupo que consiste num isótopo radioactivo, um composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, um composto fluorescente, um quelato metálico e uma enzima.
35. Estojo útil para a detecção de um polinucleótido *tir*, que compreende um meio transportador separado em compartimentos de modo a encerrar de forma confinada dois ou mais recipientes compreendendo:
- (a) um primeiro recipiente que contém uma primeira sonda de ácido nucleico que hibridiza para um de dois filamentos do polinucleótido da reivindicação 5, e

(b) um segundo recipiente que contém uma segunda sonda de ácido nucleico que hibridiza para o outro de dois filamentos do polinucleótido da reivindicação 5,

em que a referida primeira sonda e a referida segunda sonda contêm pelo menos 12 nucleótidos e em que a hibridização é realizada em condições de restrição elevada.

36. Bactéria atenuada, em que a bactéria não tem uma proteína EspA ou EspB e em que a bactéria compreende um polinucleótido que codifica uma proteína de fusão compreendendo o polipéptido de qualquer uma das reivindicações 1 até 4 operativamente ligado ao polipéptido de interesse, para induzir uma resposta imunológica mediada por células a um polipéptido de interesse.
37. Bactéria atenuada da reivindicação 36, em que o polipéptido de interesse é um antígeno.
38. Bactéria atenuada da reivindicação 36 ou 37, em que a bactéria é *E. coli*.
39. Composição farmacêutica da reivindicação 13, em que a composição induz uma resposta imunológica contra uma *E. coli* produtora de Tir.

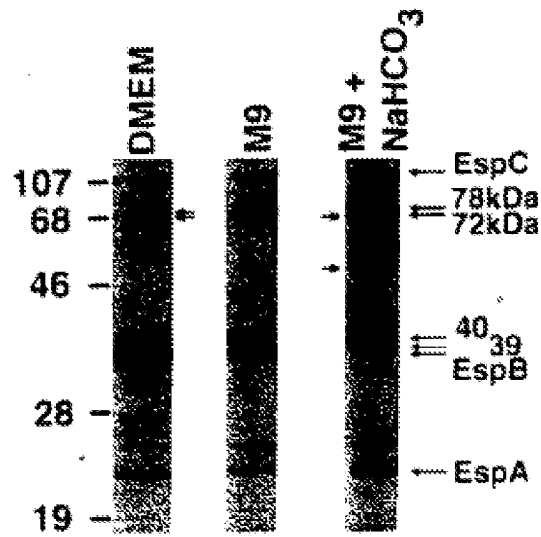


FIG. 1A

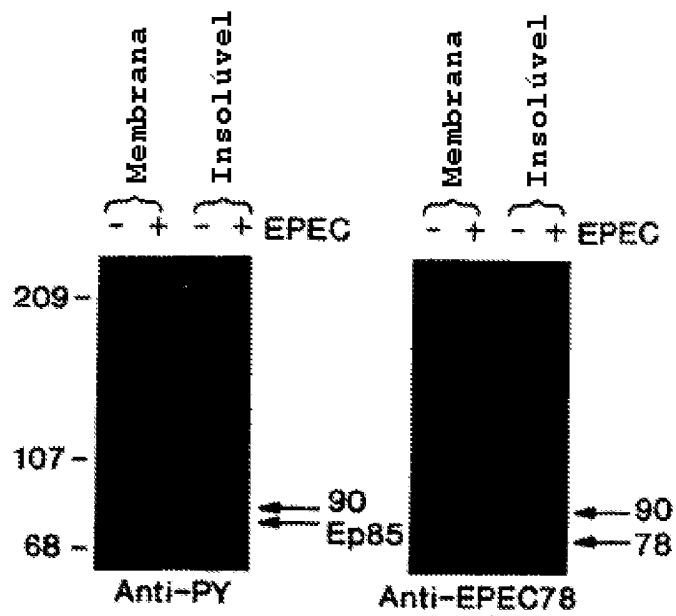


FIG. 1B

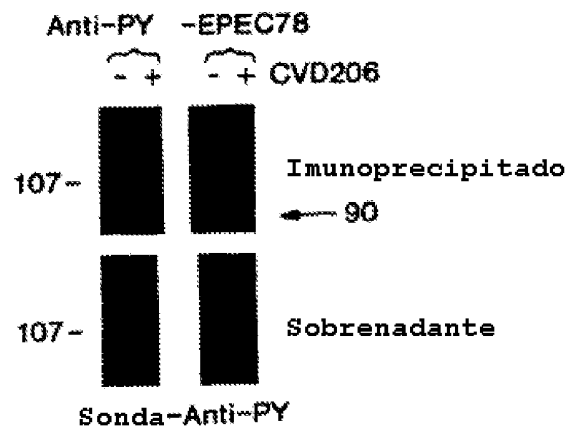


FIG. 2A

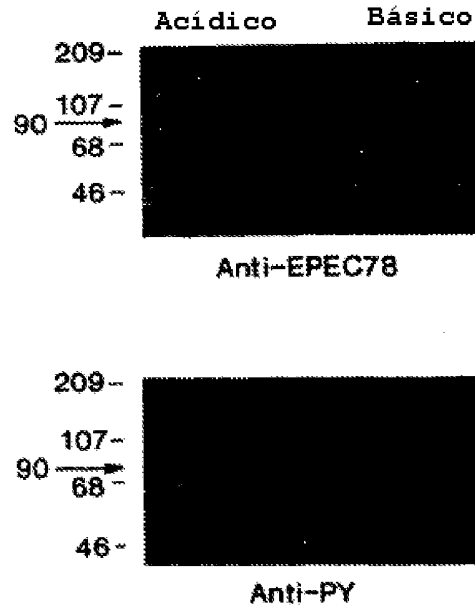


FIG. 2B

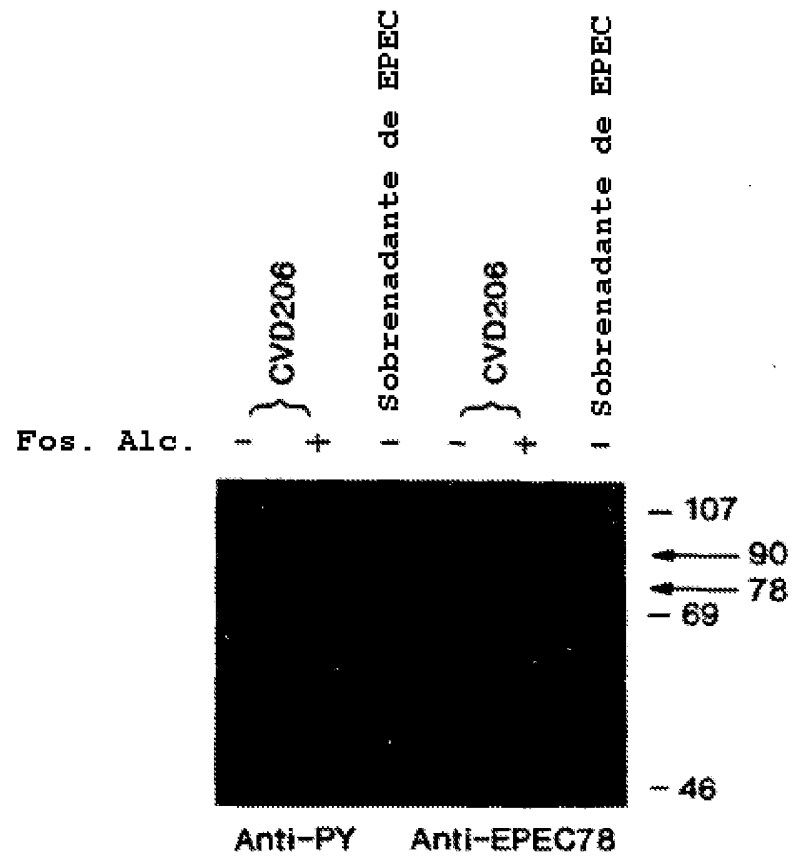


FIG. 3

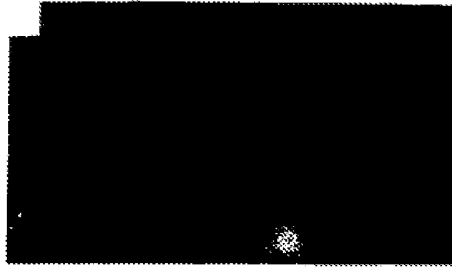


FIG. 4A

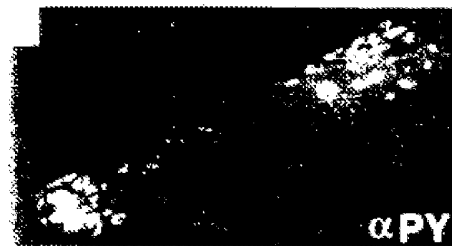


FIG. 4B



FIG. 4C



FIG. 4D

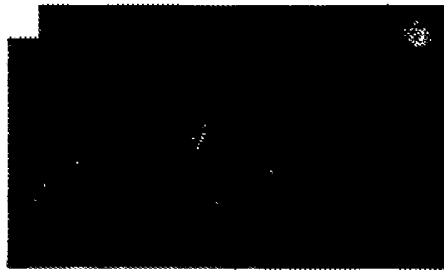


FIG. 4E



FIG. 4F



FIG. 4G



FIG. 4H

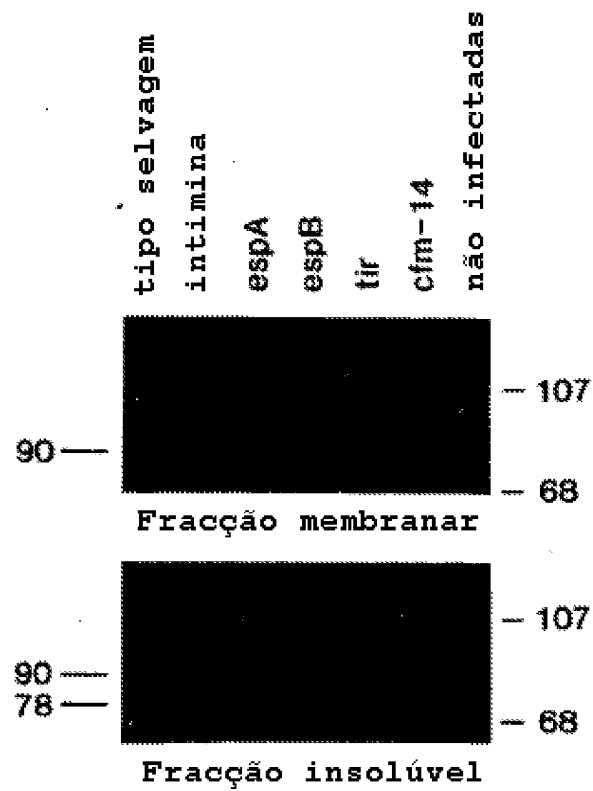


FIG. 5

```

cggtctatccgttacgtcatagtaataataaaggaacgtgtcaatttctaaataaag 60
tir ---
gatatatgtatgctatttgetancetttgetaataatgetaamtgccaatcattttaattccc 120
      M P I G N L G N N V N G N H L I P
cctecggccgcaactagcttcacaaacagacggcgggacggggaggaacttgcattcta 180
P A P P L P S Q T D G A A R G G T G H L
attagctciacagagcattagatctcgttcattgttttctcccctgagaaattctatg 240
I S S T G A L G S R S L F S P L R N S H
gctgattcttctgattccagagatattccagacttctcacaacccatcgagcttgcct 300
A D S V D S R D I P G L P T N P S R L A
gcagctacatctgagacatgcttgccttgagagatttgasttctcctatgataaggggcca 360
A A T S E T C L L G G F E V E H D K G P
cttgatattctcaatagcgaatttgacccctctccatttctgcttgaatgtaggcagat 420
L D I L N T Q I G P S A F R V E V Q A D
ggtactcagccgctatttgagaaaaaatttcttgaggttagcgttacattangtct 480
G T H A A I G E K N G L E V S V T L S P
caagatggagcagcttgcaattctattgatactgaggttaaaacagatttgttttacc 540
Q E W S S L Q S I D T E G K N R F V F T
ggggagctggcgttagtgccatcgatggtcactgtgcacatcagatctcgggaagct 600
G G R G G S G H P N V T V A S D I A E A
cgtacgaaatactggcgaatttagaccacagacatcatggagacgtcaacccagggac 660
R T K T L A K L D P D N H G G R Q P K D
gttgatacggcttctgttgggttgagagcgtttgggaatagatgagcgttggtagc 720
V D T R S V G V G S A S G I D D G V V S
gaaacccatacttcacacaaattccagcgttgcctcagatcctaaattctgggttct 780
E T H T S I T H S S V R S D P K E W V S
gtcgggcaattgcttctgtttaggggactggggcactgctattgcacagcgttg 840
V G A I A A G L A G L A A T G I A Q A L
gctttgacacgggaacggatgctctacacccacccatcctgacagggccgaattgct 900
A L T P E P D D P T T T D P D Q A A N A
gcagaaatgcaacaaagatcagtttaadcgagagcattcaagaaacctgagaaaccag 960
A E S A T K D Q L T Q E A F K N P E H Q
aaagttaacatcgatgggaacggaattgctattcgtctggggaattaaagatgatt 1020
K V H I D A N G N A I P S G E L K D I
gttgagcaatagcacaacagctaaagagcctggtgaggtggccagacacagcctgtt 1080
V E Q I A Q Q A K E A G E V A R Q Q A V
gaaagcaatgcacagggccagcagcgaatgagatcagatgcacagcgtcagagga 1140
E S N A Q A Q Q R [X] E D Q H A R R Q E E
ttacagctttcatgggtattggttacggcctcagcagtgctattgattgttgcctggggga 1200
L Q L S S G I G [Y] G L S S A L I V A G G

```

FIG. 6A-1

```

ATTGTCCTGGGTAAAGACTGGCTCCATAGACAAATCAGCCGBCAGAACAGACAAC 1260
I G A G V T T A L H R R N Q P A E Q T T
ACTACAAACACATACGGTAGTGCAGCAACAGACCGGAGGATACCCGAGCAAGGTG 1320
T T T T H T V V Q Q Q T G G I P Q H K V
GCAGTGCACACAAGAGCGAAGAGCTTCTCTGATAGACGTGATTCCAGGGGAGTGT 1380
A L N P Q E R R R F S D R R D S Q G S V
GCATCGACACACTGCTCAGATTCTCTAGCGAAGTGGTTAATCCATATGCTGAAGTTGG 1440
A S T H W S D S S S E V V N P [Y] A E V G
GGGGCTGGAAATAGTCTATCGGCTCATCAGCCAGAGACATATTTATGATGAGTGGCT 1500
G A R N S L S A H Q P E E H I [Y] D E V A
GCAGATCCTGGTATAGCGTTATTGAAATTTTCAGGGAGCGGCCAGTTACCGAAGG 1560
A D P G [Y] S V I Q N F S G S G P V T G R
TTAATAGGAATCCAGGCAAGGTATCCAAAGTACTTATGCGCTTCTGGCAACAGCGGC 1620
L I G T P G Q G I Q S T [Y] A L L A N S G
GGATTGCGTTTAGGTATGGAGGATTACGAGTGGTGGAGAGCGGAGTAAGTTCTGTA 1680
G L R L G N G G L T S G G E T A V S S V
AATGCGGACCAACGCGGGGACGAGTACGTTTCGTTTAAatatactgtgagtatttagt 1740
N A A P T P G P V R F V *
tgaggttggggtggggtggggtggggttttactagcgttaatgtttcagagaaacggtt 1800
                                or PU ---
gcagcatgggtaactcttgaacttctgttattataatcaattaagagaaattataATGTC 1860
                                H S
ATCAAGATCTGAACTTTATTAGATAGGTTTGGGAAAAATTGGTGTGGATCTATTTC 1920
S R S E L L D R F A E K I G V G S I S

```

FIG. 6A-2

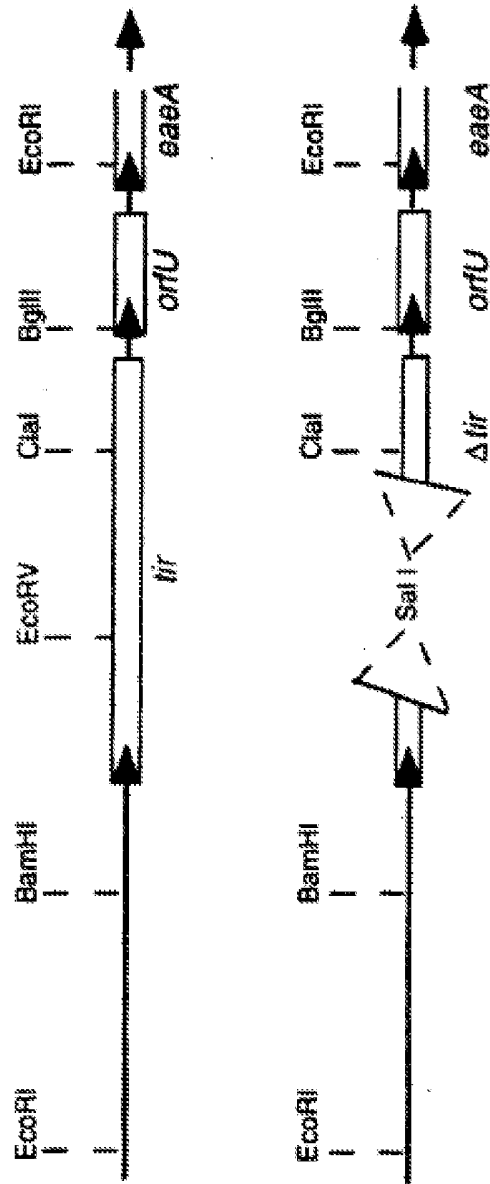


FIG. 6B

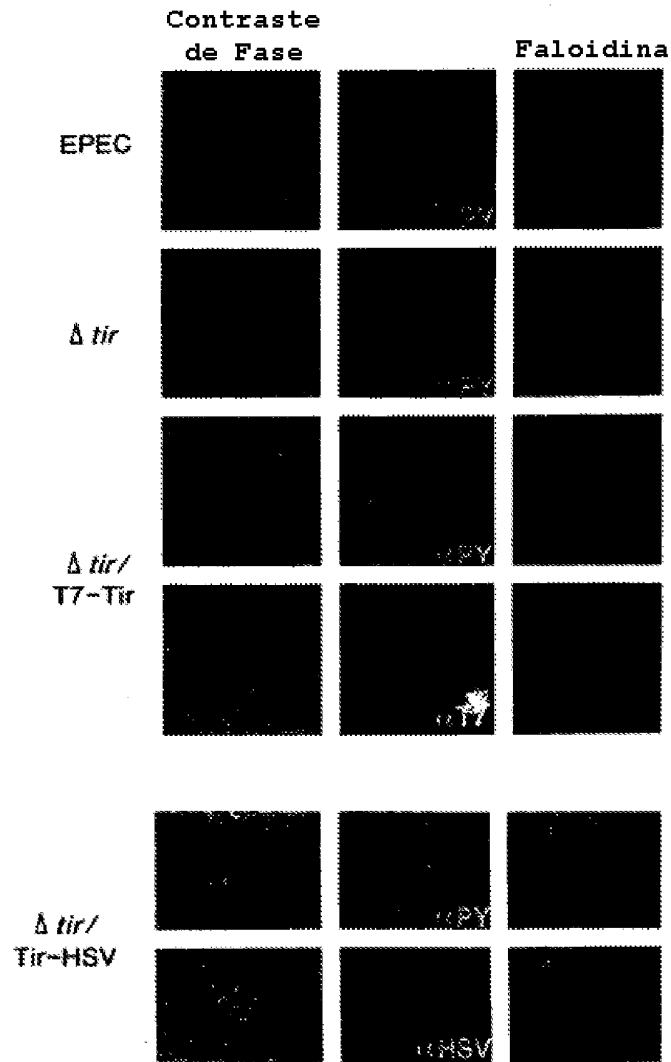


FIG. 7A

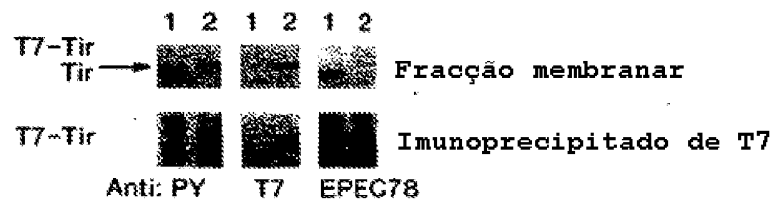


FIG. 7B

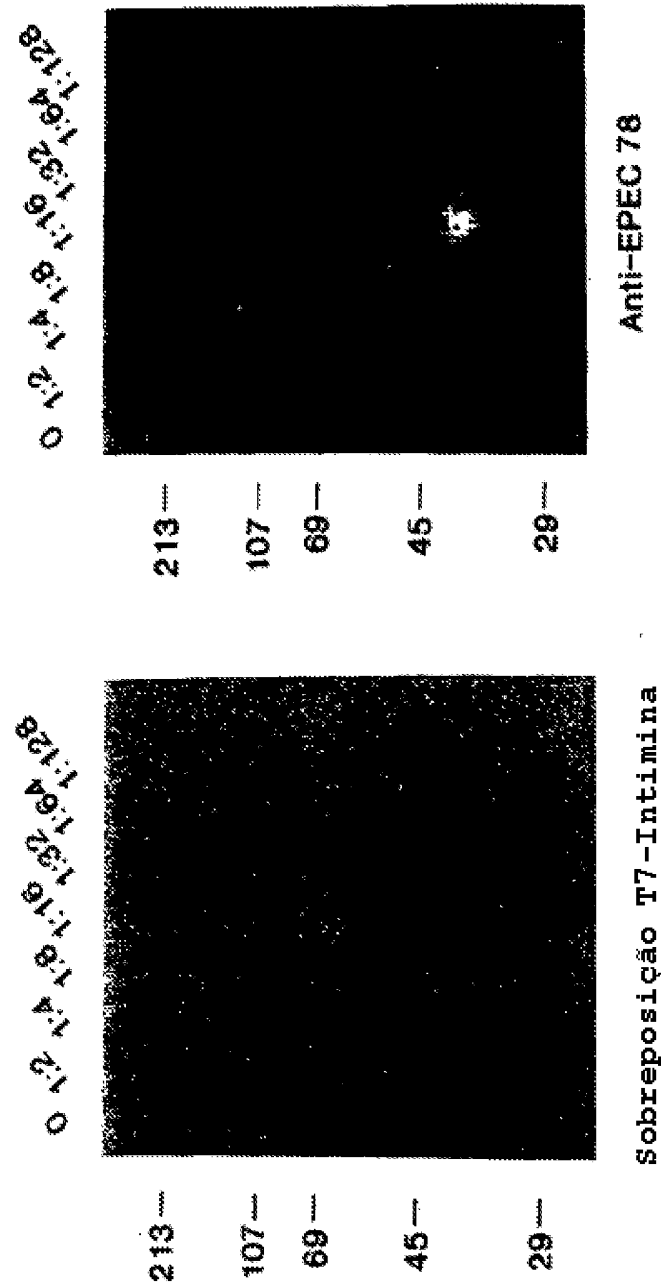


FIG. 8A

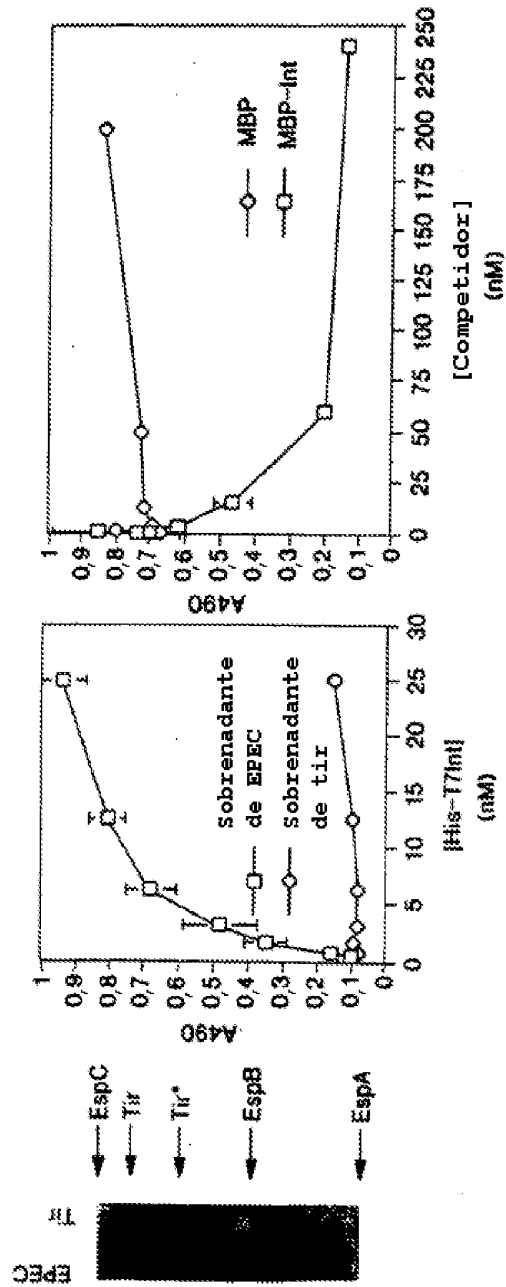


FIG. 8B

EPEC	1	M	P	I	G	N	L	G	N	N	V	N	G	N	H	L	I	P	P	A	P	P	L	P	S	Q	T	D	G	A	A	R	G	G	T	G	H	L	I	S	S	T	G	
EHEC	1	M	P	I	G	N	L	G	N	N	P	N	V	N	S	I	P	P	A	P	P	L	P	S	Q	T	D	G	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
RDEC-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
EPEC	43	A	L	G	S	R	S	L	F	S	P	L	R	N	S	M	A	D	S	V	D	S	R	-	-	D	I	P	G	L	P	T	N	P	S	R	L	A	A	A	T	S	E	
EHEC	41	P	L	G	S	R	A	L	F	T	P	V	R	N	S	M	A	D	S	G	D	N	R	A	S	D	V	P	G	L	P	P	V	N	P	M	R	L	A	A	S	-	-	E
RDEC-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
EPEC	83	T	C	L	L	G	G	F	E	V	L	H	D	K	G	P	L	D	I	L	N	T	O	I	G	P	S	A	F	R	V	E	V	Q	A	D	G	T	H	A	I	G		
EHEC	81	I	T	L	N	D	G	F	E	V	L	H	D	H	G	P	L	D	T	L	N	R	Q	I	G	S	S	V	F	R	V	E	T	Q	E	D	G	K	H	I	N	V	G	
RDEC-1	29	V	S	L	H	G	A	L	E	V	L	H	D	K	G	C	L	D	T	L	N	S	A	I	C	S	S	L	F	R	V	E	T	R	D	D	O	S	H	V	A	I	G	
EPEC	125	E	K	N	G	L	E	V	S	V	T	L	S	P	Q	E	N	S	S	L	Q	S	I	D	T	E	G	K	N	R	F	V	F	T	O	G	R	G	G	S	G	H	P	
EHEC	123	Q	R	N	G	V	E	T	S	V	V	L	S	D	Q	E	Y	A	R	L	Q	S	I	D	P	E	G	K	D	K	F	V	F	T	G	G	R	G	G	A	G	H	A	
RDEC-1	71	Q	K	N	G	L	E	T	T	V	V	L	S	E	Q	E	F	S	S	L	Q	S	L	D	P	E	C	K	N	K	F	V	F	T	G	G	R	G	G	P	G	H	A	
EPEC	167	M	V	T	V	A	S	D	I	A	E	A	R	T	K	I	L	A	K	L	D	P	D	N	H	G	G	R	Q	P	K	D	V	O	T	R	S	V	G	V	G	S	A	
EHEC	165	M	V	T	V	A	S	D	I	T	E	A	R	Q	R	I	L	E	L	L	E	P	K	G	T	G	-	E	S	K	G	A	G	E	S	K	G	V	G	E	L	R	E	
RDEC-1	113	M	V	T	V	A	S	D	I	A	E	A	R	Q	R	I	I	D	K	L	E	P	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
EPEC	209	S	G	I	D	D	G	V	V	S	E	T	H	T	S	T	T	N	S	S	V	R	S	D	P	K	F	M	V	S	V	G	A	I	A	A	G	L	A	G	L	A	A	
EHEC	206	S	N	S	G	A	E	N	T	T	E	T	Q	T	S	T	S	T	S	S	L	R	S	D	P	K	L	M	L	A	L	G	T	V	A	T	G	L	I	G	L	A	A	
RDEC-1	145	P	N	S	G	E	C	K	I	I	E	I	H	T	S	T	S	T	S	S	L	R	A	D	P	K	L	M	L	S	L	G	T	I	A									

FIG. 9A

```

EPEC 293 N P P E N Q K V N I D A N G N A I P S G E L K D D I V E Q I A Q Q A K E A G E E V A R Q
EHEC 290 N P D N Q K V N I D E L G N A I P S G V L K D D V V A N I E E Q Q A K A A G E E A K O
RDEC-1 229 N P D N Q K V N I D E N G N A I P S G E L K D D V V A Q I A E Q A K A A G E Q A R Q

EPEC 335 Q A V E S N A Q A Q Q R Y E D Q H A R R Q E E L Q L S S G I G Y G L S S A L I V A G
EHEC 332 Q A I E S N N A Q A Q K K Y D E Q Q A K R Q E E L K V S S G A C Y G L S S G A L I L G G
RDEC-1 271 E A I E S N S Q A Q Q K Y D E Q H A K R E Q E M S L S S Q V C Y G I S G A L I L G G

EPEC 377 G I G A G V T T A L H R R N Q P A E Q T T T T T T - - - H T V V Q Q Q T C G
EHEC 374 G I G V A V T A A L H R K N Q P V E Q T T T T T T T T T T S A R T V E N K P A N N
RDEC-1 313 G I G A G V T A A L H R K N Q P A E Q T I T T R T - - - V V D N Q P T N N

EPEC 412 I P Q H K V A L M P Q E R R R F S D R R D S Q G S V A S T H W S D S S S - E V V N P
EHEC 416 T P A Q G N V D T P Q S E E D T M E S R R S S M A S T S S T F P D T S S I G T V Q N P
RDEC-1 347 A S A Q G N T D T S G P E E S P A S R R N S N A S L A S N G S D T S S T G T V E N P

EPEC 453 V A B V G G A R N S L S A H Q P E E H Y D E V A A D P G - - - S V I Q N P S - G
EHEC 458 V A D V K T S L H D S Q V P T S N S N T S V Q N M G N T D S V V Y S T I Q H P P R D
RDEC-1 389 V A D V G M P R N D S L A R I S E E P I Y D E V A A D P N - - - Y S V I Q H F S - G

EPEC 491 S G P V T G R L I G T P G Q G I Q S T Y A L L A N S G G L R L G M G G L T S G G E T
EHEC 500 T T D N G A R L L G N P S A G I Q S T Y A R L A L S G G L R R H D M G G L T G G S N S
RDEC-1 427 N S P V T G R L V G T P Q Q G I Q S T Y A L L A S S G G L R L G M G G L T Q G Q E S

EPEC 533 A V S S V N A A P T P G P V R F V
EHEC 542 A V N T S N N P P A P G S H R F V
RDEC-1 469 A V S T A N A A P T P G P A R F V

```

FIG. 9B