



(51) МПК

C12N 15/31 (2006.01)*C07K 14/24* (2006.01)*A61K 39/02* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2006118803/10, 29.10.2004**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.10.2004

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
31.10.2003 US 60/515,703(43) Дата публикации заявки: **10.12.2007** Бюл. № 34(45) Опубликовано: **27.10.2012** Бюл. № 30(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 6365723 B1, 02.04.2002. DATABASE: UniProtKB/TrEMBL, Q8XAJ5, 01.03.2002. RU 2043771 C1, 20.09.1995. RU 2127121 C1, 10.03.1999.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **31.05.2006**(86) Заявка РСТ:
CA 2004/001891 (29.10.2004)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2005/042746 (12.05.2005)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

**ФИНЛЕЙ Бретт (СА),
ГРЮНХЕЙД Саманта (СА),
ДЭН Ваньинь (СА),
ВАЛЛАНС Брюс (СА),
ПУЭНТЕ Хосе Л. (МХ)**

(73) Патентообладатель(и):

**ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ БРИТИШ
КОЛАМБИЯ (СА),
УНИВЕРСИДАД НАСЬОНАЛЬ
АУТОНОМА ДЕ МЕКСИКО (МХ)****(54) БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Представлены варианты рекомбинантных вирулентных полипептидов и кодирующие их молекулы нуклеиновых кислот с последовательностями, раскрытыми в описании, используемые для получения вакцинной композиции против А/Е-патогена. Описана композиция вакцины для индукции против А/Е-патогена у животных, содержащая указанный полипептид; указанную молекулу нуклеиновой кислоты; супернатант клеточной культуры, содержащий указанный полипептид; и/или

бактерию или ее препарат, имеющей мутацию в своем геноме в указанной молекуле нуклеиновой кислоты, приводящую к ослаблению вирулентности, или имеющей делецию гена *pleA*, в сочетании с физиологически приемлемым носителем. Предложен способ ослабления вирулентности А/Е-патогена, включающий делетирование гена *pleA* в А/Е-патогене или делетирование одной или более указанных нуклеиновых кислот в геноме А/Е-патогена. Изобретение позволяет получить вакцину против А/Е-патогена. 4 н. и 20 з.п. ф-лы, 2 табл., 27 ил., 9 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)*C07K 14/24* (2006.01)*A61K 39/02* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2006118803/10, 29.10.2004**(24) Effective date for property rights:
29.10.2004

Priority:

(30) Convention priority:
31.10.2003 US 60/515,703(43) Application published: **10.12.2007 Bull. 34**(45) Date of publication: **27.10.2012 Bull. 30**(85) Commencement of national phase: **31.05.2006**(86) PCT application:
CA 2004/001891 (29.10.2004)(87) PCT publication:
WO 2005/042746 (12.05.2005)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

**FINLEJ Brett (CA),
GRJuNKheJD Samanta (CA),
DEhN Van'in' (CA),
VALLANS Brjus (CA),
PUEhNTE Khose L. (MX)**

(73) Proprietor(s):

**DZE JuNIVERSITI OF BRITISH KOLAMBIA
(CA),
UNIVERSIDAD NAS'ONAL' AUTONOMA DE
MEKSIKO (MX)**(54) **BACTERIAL VIRULENCE FACTORS AND VERSIONS FOR APPLYING IT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there are presented versions of recombinant virulent polypeptides and nucleic molecules coding them with the sequences disclosed in the description, used to prepare a vaccine composition for A/E-pathogen. What is described is a vaccine composition for inducing a response on A/E-pathogen in animals containing said nucleic acid molecule; a cell culture supernatant containing said polypeptide; and/or a bacterium or its preparation

having a mutation in its genome in said nucleic acid molecule inducing virulence attenuation, or having nleA gene deletion in a combination with a physiologically acceptable carrier. What is presented is a method for virulence attenuation of A/E-pathogen, involving nleA gene deletion in A/E-pathogen or deletion of one or more said nucleic acids in the A/E-pathogen genome.

EFFECT: invention provides producing the effective vaccine.

24 cl, 2 tbl, 27 dwg, 9 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к бактериальным патогенам. Более конкретно, изобретение частично относится к секретируемым белкам бактериальных патогенов и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Escherichia coli представляет собой исключительно изменчивый организм. В дополнение к тому, что она является представителем нормальной кишечной флоры, штаммы *E. coli* могут также вызывать инфекции мочевого пузыря, менингит и диарею. Вызывающие диарею *E. coli* включают, по меньшей мере, пять типов *E. coli*, которые вызывают различные симптомы, варьирующие от холероподобной диареи до острого колита. Каждый тип вызывающих диарею *E. coli* обладает конкретным набором факторов вирулентности, включая адгезины, инвазины и/или токсины, которые отвечают за индукцию конкретного типа диареи.

Энтеропатогенная *E. coli* (ЕРЕС) представляет собой преобладающую причину детской диареи во всем мире. Заболевание ЕРЕС характеризуется водянистой диареей различной тяжести, с рвотой и лихорадкой, часто сопровождающимися потерей жидкости. В дополнение к отдельным вспышкам в дневных медицинских и детских учреждениях в развивающихся странах ЕРЕС представляет серьезную угрозу здоровью младенцев (<6 месяцев). По всему миру ЕРЕС представляет собой ведущую причину опосредованной бактериями диареи у младенцев, и, по оценкам, ЕРЕС является причиной гибели нескольких сотен тысяч детей в год.

Энтерогеморрагическая *E. coli*, также называемая продуцирующей шигатоксин *E. coli* (STEC) или продуцирующей веротоксин *E. coli* (VTEC), вызывает более тяжелую диарею, чем ЕРЕС (энтероколит) и примерно в 10% случаев данное заболевание прогрессирует в заболевание почек - гемолитико-уремический синдром (HUS), который зачастую является фатальным. ЕНЕС O157:H7 представляет собой наиболее распространенный серотип в Канаде и Соединенных Штатах, и ассоциирован с загрязнением пищи и воды (3). Другие серотипы ЕНЕС также вызывают значительные проблемы в Азии, Европе и Южной Америке, и, в меньшей степени, в Северной Америке. ЕНЕС колонизирует крупный рогатый скот и вызывает повреждения А/Е, но не вызывает заболевание у взрослых животных, и вместо этого микроорганизмы выбрасываются в окружающую среду. Однако это вызывает серьезные проблемы здравоохранения, поскольку для инфицирования людей достаточно относительно небольшого количества ЕНЕС.

В отличие от диареи другого происхождения, вызываемой *E. coli*, например, вызываемых *E. coli*, образующими энтеротоксины, диарея, вызванная ЕНЕС и ЕРЕС, не опосредована токсином. Вместо этого, ЕРЕС и ЕНЕС связываются с поверхностью кишечника (ЕРЕС с тонким кишечником, ЕНЕС с толстым кишечником) и вызывают характерный гистологический очаг повреждения, называемый очагом прикрепления и сглаживания (А/Е) (8).

Очаги А/Е отмечаются растворением поверхности ресничного эпителия кишечника и потерей эпителиальных микроворсинок (сглаживание) в участках прикрепления бактерий. Связавшись, бактерии остаются на чашевидных выступах или ложах. В основе данного ложа в эпителиальной клетке лежат некоторые компоненты цитоскелета, включая актин и ассоциированные с актином цитоскелетные белки. Образование очагов А/Е и богатых актином лож под прикрепленными бактериями является гистопатологическим признаком А/Е патогенов (1, 2).

Данная патология может имитироваться на культивируемых клетках *in vitro*, и образование лож может наблюдаться путем флуоресцентного окрашивания актина (2, 11). Образование А/Е-очагов может быть ответственным за разрушение ресничного слоя и микроворсинок, секреции жидкости и диареи.

ЕРЕС и ЕНЕС принадлежат к семейству А/Е-патогенов, включая несколько ЕРЕС-подобных животных патогенов, которые вызывают заболевания у кроликов (РЕРЕС), свиней (РЕРЕС) и мышей (*Citrobacter rodentium*). Данные патогены содержат островки патогенности (РАI), которые кодируют специализированные системы секреции и секретируемые факторы вирулентности, критичные в плане развития заболевания. Гены, требуемые для образования А/Е-очагов, как полагают, кластеризованы вместе в один хромосомный островок патогенности, известный как локус сглаживания энтероцитов (LEE), которые включают регуляторные элементы, систему секреции III типа (TTSS), секретируемые эффекторные белки и связанные с ними шапероны (4-8).

LEE содержит 41 ген, что делает его одним из наиболее сложных РАI. Основная функция LEE TTSS представляет собой доставку эффекторов в клетки-хозяина, где они нарушают функции клеток-хозяев и опосредуют заболевание (9, 10, 34).

Идентифицировано пять кодируемых LEE эффекторов (Tir, EspG, EspF, Map и EspH) (35-40). Tir (перемещаемый рецептор интимина) перемещается в клетки-хозяина, где он связывается с цитоскелетными и сигнальными белками хозяина и инициирует полимеризацию актина в участке прикрепления бактерии (31, 44), что приводит к образованию ложеобразных актиновых структур, лежащих под прикрепленными бактериями, которые непосредственно взаимодействуют с внеклеточной петлей Tir посредством белка внешней мембраны бактерии интимина. CesT играет роль в качестве шаперона для стабильности и секреции Tir (18, 19).

В А/Е-патогенах охарактеризованы четыре других кодируемых в LEE TTSS-перемещаемых эффектора: EspH усиливает удлинение актиновых лож (40); EspF играет роль в разъединении плотных контактов между кишечными эпителиальными клетками (38); EspG родственен связанному с микротрубочками *Shigella* эффектору VirA (36, 55); и Map локализован в митохондриях (37), но также играет роль в динамике актина (48). Ler (кодируемый в LEE регулятор) является единственным идентифицированным кодируемым в LEE регулятором.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение, в частности, основано на идентификации нескольких новых общих секретируемых белков А/Е-патогенов.

В одном аспекте изобретение относится к композициям, включающим полипептид или его фрагмент, или его вариант, или надосадочную жидкость культуры клеток, включающую такой полипептид, где по существу чистый полипептид включает аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности любой одной или несколькими из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагментам, или вариантам. Изобретение также относится к композициям, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, где молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, по существу идентичную любой одной или несколькими последовательностям из SEQ ID NO: 1-21 или 60-72; и к композициям, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, по существу идентичный любой одной или несколькими последовательностями из SEQ ID NO: 22-43, или их фрагментам. Композиции могут дополнительно включать физиологически приемлемый носитель, или дополнительно включать адъювант.

Композиции могут также включать полипептид или молекулу нуклеиновой кислоты, такую как EspA, EspB, EspD, EspP, Tir, шигатоксин 1, шигатоксин 2, или интимин. Полипептиды или молекулы нуклеиновой кислоты могут быть по существу чистыми.

В альтернативных аспектах изобретение также относится к бактериям или к их препаратам, где бактерия включает мутацию в гене, таком как nleA, nleB, nleC, nleD, nleE, nleF, nleG, nleH, или в их гомологе, или включает мутацию в бактериальном геноме в нуклеотидной последовательности, которая является по существу идентичной в отношении SEQ ID NO: 1-21 или 60-72. В некоторых вариантах осуществления бактерия может представлять собой А/Е-патоген, например энтерогеморрагическую *E. coli* (ЕНЕС; например, ЕНЕС O157:H7 или ЕНЕС O157:NM), энтеропатогенную *E. coli* (ЕРЕС; например, ЕРЕС O127:H6) или *Citrobacter rodentium*. В некоторых вариантах осуществления мутация может ослаблять вирулентность или может происходить в нуклеотидной последовательности в геноме А/Е-патогена, которая по существу идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-21 или 60-72. Бактерия может предоставляться в виде композиции, в комбинации с адъювантом. В некоторых вариантах осуществления бактерия может быть живой. В некоторых вариантах осуществления бактерия может быть убитой. Способ введения может быть пероральным или парентеральным.

В альтернативных вариантах изобретение также относится к способу выявления А/Е-патогена в образце путем предоставления образца; и выявления нуклеотидной последовательности, по существу идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-21 или 60-72, или ее фрагменту, или варианту; нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность, по существу идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или полипептида, включающего аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22-43, 59 или 73-84, или ее фрагменту, или варианту, где присутствие нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности указывает на присутствие А/Е-патогена в образце (например, в яйце, фекалиях, крови или кишечнике). Выявление может включать в себя контакт нуклеотидной последовательности с зондом или праймером, по существу идентичным последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-21 или 60-72, или нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность, по существу идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их части, или может включать в себя контакт аминокислотной последовательности с антителом, которое специфически связывается с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или его фрагментом, или вариантом.

В альтернативных вариантах изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа против А/Е-патогена или его компонента, или для снижения колонизации А/Е-патогеном или выделения А/Е-патогена из животного (например, человека; жвачного, такого как овцы, козы, крупный рогатый скот, и т.д.; или любого другого животного, такого как свиньи, кролики, домашняя птица (например, утки, куры, индейки) и т.д.), путем идентификации животного, инфицированного А/Е-патогеном или имеющего риск инфицирования им; и введения животному эффективного количества композиции, включающей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности

любой одной или нескольких SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84; нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, по существу идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84; молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, по существу идентичную последовательности любой одной или нескольких из SEQ ID NO: 1-21 или 60-72; или надосадочную жидкость клеточной культуры, содержащую такие полипептиды, что, таким образом, вызывает иммунный ответ или снижает колонизацию А/Е-патогеном или выделение А/Е-патогена из животного.

В альтернативных аспектах изобретение также относится к способу ослабления вирулентности А/Е-патогена, путем предоставления А/Е-патогена; и мутации гена, такого как *nleS*, *nleB*, *nleC*, *nleD*, *nleE*, *nleF*, *nleG*, или *nleH*, или их гомолога в А/Е-патогене, или мутации одной или нескольких нуклеотидных последовательностей в геноме А/Е-патогена, где нуклеотидная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 1-21 или 60-72, с ослаблением за счет этого вирулентности.

В альтернативных аспектах изобретение также относится к способу скрининга соединения, которое ослабляет вирулентность А/Е-патогена, путем предоставления системы (например, клетки, например, клетки ЕНЕС, ЕРЕС или *C. rodentium*, экспериментального животного или системы *in vitro*), включающей: полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности любой одной или нескольких из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагменту, или варианту; нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, по существу идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагменту, или варианту; или молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, по существу идентичную любой одной или нескольких последовательностей из SEQ ID NO: 1-21, или 60-72, или их варианту, или фрагменту; предоставления тестируемого соединения; и определения того, модулирует ли тестируемое соединение экспрессию, секрецию или биологическую активность полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты, где изменение, например снижение экспрессии, секреции, или биологической активности полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты, указывает на соединение, которое ослабляет вирулентность А/Е-патогена.

В альтернативных вариантах изобретение также относится к способу продукции фактора вирулентности А/Е-патогена путем предоставления рекомбинантной клетки, включающей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по существу идентичную любой из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагменту, или варианту; нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, по существу, идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагмента, или варианта; или молекулу нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, по существу идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-21, или 60-72, или их фрагменту, или варианту; выращивания рекомбинантной клетки в условиях, которые обеспечивают экспрессию и/или секрецию полипептида, и, необязательно, выделения полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид может секретироваться из клетки.

В альтернативных вариантах изобретение также относится к способу лечения или профилактики инфекции, вызываемой А/Е-патогеном, путем идентификации млекопитающего, имеющего инфекцию, вызванную А/Е-патогеном или имеющего риск такой инфекции; и введения млекопитающему эффективного количества

соединения, которое ослабляет вирулентность А/Е-патогена, где соединение ингибирует экспрессию или секрецию полипептида, включающего аминокислотную последовательность, по существу идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагменту, или варианту. В некоторых вариантах осуществления соединения может представлять собой бессмысловую молекулу нуклеиновой кислоты, комплементарную в отношении нуклеотидной последовательности, по существу идентичной любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-21, или 60-72, или их фрагменту, или варианту, или может представлять собой siРНК.

В альтернативных вариантах изобретение также относится к рекомбинантному полипептиду, включающему аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, по существу идентичную последовательности SEQ ID NO: 1-21 или 60-72; и/или к вектору, включающему такие нуклеотидные последовательности; и/или к клетке-хозяину (например, к А/Е-патогену, такому как энтерогеморрагическая *E. coli* (EHEC), энтеропатогенная *E. coli* (EPEC) или *Citrobacter rodentium*), включающей такие векторы. Вектор может иметь способность интегрироваться в геном А/Е-патогена или может не обладать такой способностью.

В альтернативных аспектах изобретение также относится к применению композиций, бактерий, полипептидов, или молекул нуклеиновой кислоты по изобретению, для получения лекарственного средства для индукции иммунного ответа против А/Е-патогена, или его компонента, или для снижения выделения, или колонизации А/Е-патогена у животного.

В альтернативных аспектах изобретение также относится к наборам, включающим реагент для выявления в образце А/Е-патогена и вкладыш в упаковку с инструкциями для выявления в образце А/Е-патогена. Реагент может включать в себя зонд, или праймер-зонд, или праймер, по существу идентичный в отношении: нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из одной или нескольких из последовательностей SEQ ID NO: 1-21, или 60-72, или их фрагмента, или варианта, или нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, по существу идентичный одной или нескольким последовательностям SEQ ID NO: 22-43, 59, 73-84, или их фрагменту, или варианту, или антителу, которое специфически связывается с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из одной или нескольких последовательностей из SEQ ID NO: 22-43, 59, 73-84, или их фрагмента, или варианта.

«А/Е-патоген» представляет собой патоген, например патогенную бактерию *E. coli*, который может связываться с поверхностями кишечника животного, например млекопитающего, например крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, кроликов, собак, кошек, и т.д., или видов птиц, например кур, уток, индеек, и т.д., и вызывать появление характерного гистологического очага повреждения, называемого очагом прикрепления и сглаживания (А/Е) (8). В целом, инфекция, вызванная А/Е-патогеном, может приводить к диарее, энтероколиту, заболеванию почек (например, к гемолитико-уремическому синдрому).

Однако инфекция, вызываемая А/Е-патогеном, не обязательно проявляется в симптомах заболевания; млекопитающее-хозяин, инфицированное А/Е-патогеном, может являться носителем патогена и оставаться здоровым и не больным. Таким образом, млекопитающие, инфицированные А/Е-патогеном или имеющие риск

такого инфицирования, включают животных, например сельскохозяйственных животных, таких как домашняя птица, например кур, индеек, уток, или жвачные, например крупный рогатый скот, овцы, козы, и т.д., или других сельскохозяйственных животных, например свиней, у которых не проявляются симптомы заболевания, а также включают людей, чувствительных к тяжелому кишечному заболеванию в результате инфекции, вызываемой А/Е-патогеном.

Неограничивающие примеры А/Е-патогенов включают энтерогеморрагическую *E. coli* (ЕНЕС) (также известную как продуцирующая шигатоксин *E. coli* (STEC) или продуцирующая веротоксин *E. coli* (VTEC)), например серотипы ЕНЕС 0157 (например, ЕНЕС0157:H7, геномная последовательность которой описана в инвентарных номерах AE005594, AE005595, AP002566, AE 005174, NC_002695 или NC_002655) или 0158, 05, 08, 018, 026, 045, 048, 052, 055, 075, 076, 078, 084, 91, 0103, 0104, 0111, 0113, 0114, 0116, 0118, 0119, 0121, 0125, 028, 0145, 0146, 0163, 0165; энтеропатогенную *E. coli* (ЕРЕС); а также патогенную *E. coli*, инфицирующую мышей (например, *Citrobacter rodentium*); свиней; овец; собак; и других млекопитающих.

Многие штаммы А/Е-патогенов коммерчески доступны, например, посредством American Type Culture Collection (ATCC), Manassus, Виргиния, США. А/Е-патогены могут также выделяться из инфицированных субъектов, например, непосредственным высеиванием на сорбитный агар MacConkey, дополненный цефиксимом и теллуридом, или путем иммуномагнитного обогащения с последующим высеиванием на ту же среду (72, 107, 108).

«Белок», «пептид» или «полипептид» представляет собой любую цепь из двух или нескольких аминокислот, включающих встречающиеся в природе или неприродные аминокислоты или аналоги аминокислот, вне зависимости от посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования или фосфорилирования).

«Аминокислотная последовательность», «полипептид», «пептид» или «белок» по изобретению могут включать пептиды или белки, которые имеют аномальные связи, перекрестные связи или концевое экпирование, непептидные связи или альтернативные модифицирующие группы. Такие модифицированные пептиды также входят в объем изобретения. Термин «модифицирующие агенты», как подразумевается, включает структуры, непосредственно присоединенные к пептидной структуре (например, ковалентным присоединением), а также те, которые непрямым образом присоединены к пептидной структуре (например, путем стабильной нековалентной ассоциации или путем ковалентного присоединения к дополнительным аминокислотным остаткам, или их миметики, аналоги или производные, которые могут фланкировать центральную пептидную структуру). Например, модифицирующая группа может присоединяться к N-концу или к С-концу пептидной структуры или к области пептида или пептидомиметика, фланкирующего центральный домен.

Альтернативно, модифицирующая группа может присоединяться к боковой цепи, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка пептидной структуры или к области пептида или пептидомиметика, фланкирующего центральный домен (например, через эпислон-аминогруппу остатка(-ов) лизина, через карбоксигруппу остатка(-ов) аспарагиновой кислоты или остатка(-ов) глутаминовой кислоты, через гидроксигруппу остатка(-ов) тирозина, остатка(-ов) серина или остатка(-ов) треонина или другой подходящей реакционноспособной группы боковой цепи аминокислоты). Модифицирующие группы, ковалентно связанные с пептидной

структурой, могут присоединяться посредством и с использованием способов, хорошо известных в данной области, для связывания химических структур, включающих, например, связи амида, алкиламино, карбамата или мочевины.

5 Термины «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» охватывают РНК (плюс- и минус-цепи) и ДНК, включающую кДНК, геномную ДНК, и синтетическую (например, химически синтезированную) ДНК. Нуклеиновая кислота может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Когда нуклеиновая кислота одноцепочечная, она может являться смысловой цепью или антисмысловой
10 цепью. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой любую цепь из двух или большего числа ковалентно связанных нуклеотидов, включая встречающиеся в природе или неприродные нуклеотиды, или аналоги или производные нуклеотидов. «РНК» означает последовательность двух или большего числа ковалентно связанных, встречающихся в природе или модифицированных
15 рибонуклеотидов. Одним из примеров модифицированной РНК, включенной в данный термин, является фосфотиоатная РНК. Под «ДНК» подразумевается последовательность двух или большего числа ковалентно связанных, встречающихся в природе или модифицированных рибонуклеотидов. Под «кДНК»
20 подразумевается комплементарная или копия ДНК, продуцированная с РНК-матрицы под действием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). «Клон кДНК» означает дуплексную последовательность ДНК, комплементарную интересующей молекуле РНК, которая включена в клонирующий вектор. Под «комплементарностью» подразумевается, что две нуклеиновые
25 кислоты, например ДНК или РНК, содержат достаточное число нуклеотидов, которые способны образовывать пары оснований Уотсона-Крика, образуют область двухцепочечности двух нуклеиновых кислот. Таким образом, аденин в одной цепи ДНК или РНК образует пару с тиминном в противоположной
30 комплементарной цепи ДНК или с урацилом в противоположащей комплементарной цепи РНК. Следует понимать, что каждый нуклеотид в молекуле нуклеиновой кислоты не обязательно должен образовывать точную пару оснований Уотсона-Крика с нуклеотидом в противоположащей комплементарной цепи с образованием дуплекса. Молекула нуклеиновой кислоты «комплементарна» в отношении другой
35 молекулы нуклеиновой кислоты, если она гибридизуется, в условиях высокой жесткости, со второй молекулой нуклеиновой кислоты.

Используемый здесь термин «надосадочная жидкость клеточной культуры» в основном относится к надосадочной жидкости, полученной в результате
40 культивирования бактерии или другого организма (например, дрожжей) или клетки (например, клетки насекомых), которая способна секретировать один или несколько полипептидов, включающих аминокислотную последовательность, по существу, идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, 59, 73-84, или их
45 фрагменту, или варианту, или их иммуногенной части, в клеточную культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления надосадочная жидкость культуры клеток является по существу чистой, т.е., по существу, лишенной бактериальных клеток или лизата таких клеток.

В некоторых вариантах осуществления надосадочная жидкость клеточной культуры также может содержать один или несколько из полипептидов EspA, EspB, EspD, Tir, интимина, шигатоксина 1 или 2, или EspP, или их фрагментов, или агрегатов.

Бактерия может представлять собой А/Е-патоген, например ЕНЕС, ЕРЕС

или *Citrobacter rodentium*, которая, в некоторых вариантах осуществления может модифицироваться или мутироваться, или преимущественно экспрессировать или секретировать описанные здесь белки, или может представлять собой некоторую другую бактерию, например непатогенную бактерию, например непатогенную *E. coli*, такую как HB101, или не-A/E-патоген, который был модифицирован или мутирован, например, рекомбинантным или другим способом, так что он стал секретировать один или несколько описанных здесь белков, например полипептид, включающий аминокислотную последовательность, по существу идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, 59, 73-84, или их фрагменту, или варианту, или его иммуногенную часть, в клеточную культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления бактерия не является ЕНЕС или ЕРЕС.

В некоторых вариантах осуществления, в которых бактерия является А/Е-патогеном, она также может нести дальнейшую модификацию, которая ослабляет ее способность экспрессировать или секретировать полипептид (например, EspA, EspB, EspD, Tir, интимин, шигатоксин 1 или 2, или EspP), который в норме будет секретировать его в отсутствие модификации. В некоторых вариантах осуществления другой организм (например, дрожжи) или клетка (например, клетка насекомого) модифицированы или мутированы, например, рекомбинантным или другим способом, так что они секретируют один или несколько описанных здесь белков, например полипептид, включающий аминокислотную последовательность, по существу идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, или ее иммуногенной части, в клеточную культуральную среду.

Соединение является «по существу чистым» или «выделенным», когда оно отделено от компонентов, которые сопутствуют ему в природе. Обычно соединение является по существу чистым, когда оно составляет, по меньшей мере, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, или 60%, или, более обычно, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% по массе от всего материала образца.

Таким образом, полипептид, который химически синтезирован или продуцирован рекомбинантной технологией, в основном по существу лишен ассоциированных с ним в природе компонентов. Полипептид также в основном является, по существу чистым, если он отделен от ассоциированных с ним в природе компонентов физическими методами, такими как центрифугирование, преципитация, колоночная хроматография, гель-электрофорез, ВЭЖХ, и т.д.

Молекула нуклеиновой кислоты, в основном, является по существу чистой или «выделенной», когда она не является непосредственно слитой (т.е. ковалентно связанной) с кодирующей последовательностью, к которой она обычно прилегает в имеющемся в природе геноме организма, из которого происходит ДНК по изобретению. Поэтому «выделенный» ген или молекула нуклеиновой кислоты, как подразумевается, означает ген или молекулу нуклеиновой кислоты, которая не фланкирована молекулами нуклеиновой кислоты, которые обычно (в природе) фланкируют ген или молекулу нуклеиновой кислоты (как в геномных последовательностях), и/или полностью или частично очищена от других транскрибируемых последовательностей (например, в библиотеке кДНК или РНК). Например, выделенная нуклеиновая кислота по изобретению может быть по существу выделена от комплексной клеточной среды, в которой он присутствует в природе. В некоторых случаях выделенный материал образует часть композиции (например, неочищенный экстракт содержит другие вещества), буферной системы или смеси реагентов.

В других обстоятельствах материал может очищаться до достаточной гомогенности, что, например, определяется путем электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE) или колоночной хроматографии, такой как ВЭЖХ. Поэтому данный термин включает в себя, например, рекомбинантную нуклеиновую кислоту, введенную в вектор, такой как автономно реплицирующаяся плаزمиды или вирус; или в геномную ДНК прокариота или эукариота, или ту, которая существует в отдельной молекуле (например, фрагменте кДНК или геномной ДНК, продуцированной путем ПЦР или обработки рестрикционной эндонуклеазой), независимо от других последовательностей. Она также включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая является частью гибридного гена, кодирующего дополнительных полипептидных последовательностей. Предпочтительно, выделенная нуклеиновая кислота включает в себя, по меньшей мере, примерно 50, 80 или 90 процентов (на основе молярного соотношения) всех присутствующих видов макромолекул. Таким образом, выделенный ген или молекула нуклеиновой кислоты может включать ген или молекулу нуклеиновой кислоты, которая синтезирована химически или рекомбинантными способами. Рекомбинантные ДНК, содержащиеся в векторе, включены в используемое здесь определение «выделенный». Также выделенные молекулы нуклеиновой кислоты включают молекулы рекомбинантной ДНК в гетерологичных клетках-хозяевах, а также частично или по существу очищенные молекулы ДНК в растворе. Полученные *in vivo* и *in vitro* РНК-транскрипты молекул ДНК по настоящему изобретению также относятся к «выделенным» молекулам нуклеиновой кислоты. Такие выделенные молекулы нуклеиновой кислоты могут использоваться в производстве кодируемого полипептида, в качестве зонда для выделения гомологичных последовательностей (например, из других видов млекопитающих), для картирования гена (например, путем гибридизации *in situ* с хромосомами), или для выявления экспрессии гена в ткани (например, в человеческой ткани, такой как периферическая кровь), например, путем анализа нозерн-блоттингом.

По существу чистое соединение может быть получено, например, экстракцией из природного источника; экспрессией рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидное соединение; или путем химического синтеза. Чистота может измеряться с использованием любого подходящего способа, такого как колоночная хроматография, гель-электрофорез, ВЭЖХ, и т.д.

По существу чистый препарат клетки, например бактериальной клетки, представляет собой препарат клетки, в которой контаминирующие клетки, которые не имеют требуемого мутантного генотипа, или не экспрессируют или не секретируют требуемый полипептид в подходящих количествах, составляют менее 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% общего количества клеток в препарате.

Различные гены и последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению может представлять собой рекомбинантные последовательности. Термин «рекомбинантный» означает, что нечто подлежало рекомбинации, так что при ссылке на конструкцию нуклеиновой кислоты термин относится к молекуле, которая составлена последовательностями нуклеиновой кислоты, которые объединены вместе или продуцированы посредством способов молекулярной биологии. При ссылке термина «рекомбинантный» на белок или полипептидную молекулу данный термин означает, что белковая или полипептидная молекула экспрессирована с использованием рекомбинантной конструкции нуклеиновой кислоты, созданной

посредством способов молекулярной биологии. При ссылке термина «рекомбинантный» на генетическую композицию данный термин относится к гамете или к потомству с новыми комбинациями аллелей, которые не присутствовали в исходных геномах. Конструкции рекомбинантной нуклеиновой кислоты могут

5 включать нуклеотидную последовательность, которая лигирована с последовательностью нуклеиновой кислоты, с которой она не лигирована в природе или с которой она лигирована в природе в другом положении, или данная нуклеиновая кислота подвергается манипуляциям, приводящим к такому

10 лигированию. Поэтому ссылка на конструкцию нуклеиновой кислоты как на «рекомбинантную» указывает на то, что молекула нуклеиновой кислоты подвергалась манипуляциям с использованием генной инженерии, т.е. за счет человеческого вмешательства.

Рекомбинантные конструкции нуклеиновой кислоты могут, например, вводиться в

15 клетку-хозяина путем трансформации. Такие рекомбинантные конструкции нуклеиновой кислоты могут включать последовательности, происходящие из одного вида клеток-хозяев или из различных видов клеток-хозяев, которые могут выделяться и повторно вводиться в клетки вида хозяина. Последовательности

20 рекомбинантных конструкций нуклеиновой кислоты могут становиться интегрированными в геном клетки-хозяина, в результате исходной трансформации клеток-хозяев, или в результате последующих событий рекомбинации и/или репарации.

Используемый здесь термин «гетерологичный» в отношении нуклеиновой

25 кислоты или белка представляет собой молекулу, с которой манипулировали за счет человеческого вмешательства, так что она локализуется в месте, отличном от места, в котором она находится в природе. Например, последовательность нуклеиновой кислоты из одного вида может вводиться в геном другого вида, или

30 последовательность нуклеиновой кислоты из одного геномного локуса может перемещаться в другой геномный или внехромосомный локус того же вида. Гетерологичный белок включает, например, белок, экспрессированный с гетерологичной кодирующей последовательности или белок, экспрессированный с рекомбинантного гена в клетке, которая в природе не экспрессирует данный белок.

«По существу идентичная» последовательность представляет собой

35 аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая отличается от последовательности сравнения только одной или несколькими консервативными заменами, описанными выше, или одной или несколькими неконсервативными

40 заменами, делециями или вставками, расположенными в тех положениях последовательности, которые не отменяют биологической функции аминокислотной молекулы или молекулы нуклеиновой кислоты. Такая последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей любое целое число от 10% до 99%, или, более конкретно, по меньшей мере, от 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55% или 60%,

45 или, по меньшей мере, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95%, или, как минимум 96%, 97%, 98%, или 99%, в отношении аминокислотной последовательности или последовательности нуклеотидов, использованной для сравнения, с применением, например, программы Align (96) или FASTA. Для полипептидов длина

50 последовательностей сравнения может составлять, по меньшей мере, 2, 5, 10, или 15 аминокислот, или, по меньшей мере, 20, 25, или 30 аминокислот. В альтернативных вариантах осуществления длина последовательностей сравнения может составлять, по меньшей мере, 35, 40, или 50 аминокислот, или свыше 60, 80, или 100 аминокислот.

Для молекул нуклеиновой кислоты длина последовательностей сравнения может составлять, по меньшей мере, 5, 10, 15, 20, или 25 нуклеотидов, или, по меньшей мере, 30, 40, или 50 нуклеотидов. В альтернативных вариантах осуществления длина последовательностей сравнения может составлять, по меньшей мере, 60, 70, 80, или 90 нуклеотидов, или свыше 100, 200, или 500 нуклеотидов. Идентичность по последовательности может легко измеряться с использованием программного обеспечения для анализа последовательности (например, пакета программного обеспечения Sequence Analysis Software Package от Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, или программного обеспечения BLAST, доступного от National Library of Medicine, или как описано здесь).

Примеры подходящего программного обеспечения включают в себя программы Pile-up и PrettyBox. Такое программное обеспечение ищет сходные последовательности путем оценки гомологии различных замен, делеций и других модификаций.

Альтернативно или дополнительно, две последовательности нуклеиновой кислоты могут быть «по существу идентичными», если они гибридизуются в условиях высокой жесткости. В некоторых вариантах осуществления условия высокой жесткости представляют собой, например, условия, которые обеспечивают гибридизацию, сравнимую с гибридизацией, которая происходит с использованием ДНК-зонда, по меньшей мере, 500 нуклеотидов в длину, в буфере, содержащем 0,5M NaHPO_4 , pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA (фракция V), при температуре 65°C, или в буфере, содержащем 48% формамида, 4,8× SSC, 0,2M Tris-Cl, pH 7,6, 1× раствор Denhardt, 10% декстран-сульфат, и 0,1% SDS, при температуре 42°C. (Это обычные жесткие условия для нозерн- или саузерн-гибридизации.) Гибридизации можно проводить в течение периода примерно от 20 до 30 минут, или примерно от 2 до 6 часов, или примерно от 10 до 15 часов, или свыше 24 часов или более. Условия гибридизации высокой жесткости обеспечивают успех многих способов, рутинно выполняемых молекулярными биологами, например ПЦР высокой жесткости, секвенирования ДНК, анализа одноцепочечного конформационного полиморфизма, и гибридизации *in situ*. В отличие от нозерн- и саузерн-гибридизации, данные способы рутинно выполняются с относительно короткими зондами (например, обычно 16 нуклеотидов или длиннее для ПЦР или секвенирования и примерно 40 нуклеотидов или более для гибридизации *in situ*). Условия высокой жесткости, используемые в данных способах, хорошо известны специалистам в области молекулярной биологии (61).

По существу идентичная последовательность может, например, представлять собой аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагменту, или варианту, или нуклеотидную последовательность, по существу идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-21, или 60-72, или их фрагменту, или варианту. В некоторых вариантах осуществления по существу идентичная последовательность может, например, представлять собой нуклеотидную последовательность, комплементарную любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-21, или 60-72, или их фрагменту, или варианту, или последовательность, гибридизующуюся с ними. В некоторых вариантах осуществления по существу идентичная последовательность может быть получена из А/Е-патогена.

«Зонд» или «праймер» представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК или РНК с определенной последовательностью, которая может образовывать пару со второй молекулой ДНК или РНК, которая содержит комплементарную последовательность (мишень). Стабильность полученной в результате гибридной молекулы зависит от степени образования пар оснований, которое происходит, и подлeжит влиянию параметров, таких как степень комплементарности между зондом и целевой молекулой, и степени жесткости условий гибридизации. Степень жесткости гибридизации подлeжит влиянию параметров, таких как температура, концентрация соли и концентрация органических молекул, таких как формамид, и определяется способами, известными специалистам в данной области. Зонды или праймеры, специфичные в отношении описанных здесь последовательностей нуклеиновой кислоты или их частей, могут варьировать по длине на число нуклеотидов, равное любому целому числу, по меньшей мере, от 8 нуклеотидов до числа свыше 500 нуклеотидов, включая любое значение между ними, в зависимости от цели и условий применения зонда или праймера. Например, зонд или праймер может составлять, по меньшей мере, 8, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов в длину, или может составлять, по меньшей мере, 30, 40, 50 или 60 нуклеотидов в длину, или может составлять свыше 100, 200, 500 или 1000 нуклеотидов в длину. Зонды или праймеры, специфичные в отношении описанных здесь молекул нуклеиновой кислоты, может характеризоваться идентичностью, равной любому целому числу примерно от 10% до 99% или, в более общем плане, по меньшей мере, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55% или 60% или, по меньшей мере, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95%, или как минимум 96%, 97%, 98%, или 99% в отношении описанных здесь последовательностей нуклеиновой кислоты, которая определена с использованием, например, программы Align (96).

Зонды или праймеры могут быть радиоактивно или нерадиоактивно меченными, с возможностью детектирования посредством способов, которые известны специалистам в данной области. Зонды или праймеры могут использоваться в способах, действующих гибридизацию нуклеиновой кислоты, например, при секвенировании нуклеиновой кислоты, амплификации нуклеиновой кислоты путем полимеразной цепной реакции, анализе одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP), анализе полиформизма длин рестрикционных фрагментов, саузерн-гибридизации, нозерн-гибридизации, гибридизации *in situ*, анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) и других способов, которые известны специалистам в данной области. Зонды или праймеры могут происходить из геномной ДНК или кДНК, например, путем амплификации, или из клонированных сегментов ДНК, или могут быть химически синтезированы.

«Мутация» включает какое-либо изменение последовательности ДНК, т.е. генома организма, по сравнению с родительским штаммом. Изменение может возникать спонтанно или за счет воздействия на организм мутагенного стимула, например мутагенного химиката, энергии, излучения, рекомбинантных способов, конъюгации или любых других способов, применяемых для изменения ДНК. Мутация может включать изменение в любой из описанных здесь нуклеотидных последовательностей или может включать изменение в нуклеотидной последовательности, кодирующей любой из описанных здесь полипептидов.

Мутация может «ослаблять вирулентность», если в результате мутации уровень вирулентности мутантной клетки снижается, по меньшей мере, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%, при сравнении с родительскими штаммами.

Снижение вирулентности также может измеряться снижением, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%, экспрессии полипептида, например полипептида, включающего аминокислотную последовательность, по существу идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, 59 или 73-84, или их фрагменту, или варианту, в мутантном штамме по сравнению с родительским штаммом. Вирулентность А/Е-патогена может измеряться, как описано здесь, или, как известно в данной области. Снижение вирулентности может также измеряться изменением, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%, биологической активности полипептида, например полипептида, включающего аминокислотную последовательность, по существу идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагменту, или варианту.

«Модулирование» или «модулирует» означает изменение, за счет повышения или снижения. Повышение или снижение может являться изменением на любое целое число от 10% до 90% или на любое целое число от 30% до 60% или может представлять собой свыше 100%, по сравнению с контролем, или образцом, или соединением сравнения.

«Тестируемое соединение» представляет собой любое встречающееся в природе химическое соединение или соединение искусственного происхождения. Неограничивающие примеры тестируемых соединений могут включать пептиды, полипептиды, синтетические органические молекулы, встречающиеся в природе органические молекулы и молекулы нуклеиновой кислоты. Тестируемое соединение может «конкурировать» с известным соединением, таким как любой из полипептидов или молекул нуклеиновой кислоты, описанных здесь, например, препятствуя вирулентности или препятствуя любой биологической реакции, индуцируемой известным соединением.

В общем тестируемое соединением может характеризоваться любым значением степени модулирования от 10% до 200% или свыше 500%, по сравнению с контрольным соединением. Например, тестируемое соединение может характеризоваться, по меньшей мере, любым положительным или отрицательным целым числом от 10% до 200% модулирования, или, по меньшей мере, любым положительным или отрицательным целым числом от 30% до 150% модулирования, или, по меньшей мере, любым положительным или отрицательным целым числом от 60% до 100% модулирования, или, по меньшей мере, любым положительным или отрицательным целым числом свыше 100% модулирования. Соединение, которое представляет собой отрицательный модулятор, в общем снижает модулирование относительно известного соединения, в то время как соединение, которое представляет собой позитивный модулятор, в общем, повышает модулирование относительно известного соединения.

«Вектор» представляет собой молекулу ДНК, происходящую, например, из плазмиды, бактериофага, или вируса млекопитающего или насекомого, или искусственной хромосомы, в которую может встраиваться молекула нуклеиновой кислоты, например, нуклеотидная последовательность, по существу идентичная любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-21, или 60-72, или их фрагменту, или варианту. Вектор может содержать один или несколько уникальных сайтов рестрикции и может быть способен к автономной репликации в определенном хозяине, таким образом, что клонированная последовательность воспроизводится. Вектор может представлять собой экспрессирующий ДНК-вектор, т.е. любой

автономный элемент, способный направлять синтез рекомбинантного полипептида, и таким образом может использоваться для экспрессии полипептида, например, полипептида, включающего аминокислотную последовательность, по существу идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, 59 или 73-84, или их фрагменту, или варианту, в клетке-хозяине. Экспрессирующие ДНК-векторы включают бактериальные плазмиды и фаги, плазмиды и вирусы млекопитающих и насекомых. Вектор может быть способным интегрироваться в геном клетки-хозяина, так что любая модификация, вводимая в геном клетки-хозяина посредством вектора становится частью генома клетки-хозяина. Вектор может быть неспособным интегрироваться в геном клетки-хозяина, поэтому оставаться в виде автономно реплицирующейся единицы, такой как плаزمид.

Антитело «специфически связывается» с антигеном, когда оно распознает и связывает антиген, например полипептид, включающий аминокислотную последовательность, по существу, идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22-43, 59, или 73-84, или их фрагменту или варианту, но, по существу, не распознает и не связывает другие молекулы в образце. Такое антитело характеризуется, например, сродством в отношении антигена, которое, по меньшей мере, в 10, 100, 1000 или 10000 раз выше сродства антитела в отношении другой молекулы сравнения в образце.

«Образец» может представлять собой любой орган, ткань, клетку или клеточный экстракт, выделенный из субъекта, например образец, выделенный из животного, инфицированного А/Е-патогеном, или из животного, которому ввели один или несколько полипептидов или нуклеиновых кислот по изобретению, или их иммуногенных фрагментов. Например, неограничивающие примеры образца могут включать ткань (например, из биопсии или аутопсии), клетки, кровь, сыворотку, молоко, мочу, кал, слюну, экскременты, яйца, культуру клеток млекопитающих или культуральную среду, или любой другой образец, или любой экстракт данных материалов, полученный от пациента (человека или животного), тестируемого субъекта или экспериментального животного. Неограничивающие примеры образца могут также включать продукты, продуцируемые в клеточной культуре нормальными или трансформированными клетками (например, путем технологии рекомбинантной ДНК или моноклональных антител). «Образец» может также представлять собой клетку или клеточную линию, созданную в экспериментальных условиях, которые не выделены непосредственно из субъекта. Образец также может быть лишенным клеток, искусственно полученным или синтезированным.

Образец может анализироваться для выявления гена, генома, полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты, происходящей из А/Е-патогена, или для выявления мутации в гене, происходящем из А/Е-патогена или для выявления уровней экспрессии гена или полипептида, происходящего из А/Е-патогена, или для определения биологической функции гена или полипептида, происходящего из А/Е-патогена, с использованием способов, известных в данной области и/или описанных здесь. Например, такие способы, как секвенирование, анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) или анализ длин рестрикционных фрагментов (RFLP) продуктов ПЦР, происходящих из образца, может использоваться для выявления мутации в гене; ELISA или вестерн-блоттинг может использоваться для измерения уровней полипептида или сродства антител; нозерн-блоттинг может использоваться для измерения уровней мРНК, или ПЦР может использоваться для измерения уровня молекулы нуклеиновой кислоты.

«Иммунный ответ» включает в качестве неограничивающих примеров одну или несколько следующих реакций млекопитающего: индукцию антител, В-клеток, Т-клеток (включая хелперные Т-клетки, супрессорные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, $\gamma\delta$ -Т-клетки), специфично направленных на антиген(-ы) в композиции или вакцине, после введения композиции или вакцины. Таким образом, иммунный ответ на композицию или вакцину включает развитие в млекопитающем-хозяине клеточного или опосредованного антителами ответа на интересующую композицию или вакцину. В целом, данный иммунный ответ будет приводить к предотвращению или снижению инфекции, вызываемой А/Е-патогеном; к устойчивости кишечника к колонизации А/Е-патогеном; или к снижению выделения А/Е-патогена.

«Иммуногенный фрагмент» полипептида или нуклеиновой кислоты относится к аминокислотной последовательности или к последовательности нуклеиновой кислоты, которая вызывает иммунный ответ. Таким образом, иммуногенный фрагмент может включать в себя без ограничений, любую часть любой из описанных здесь последовательностей, или последовательность, по существу, идентичную ей, которая включает один или несколько эпитопов (участок, распознаваемый специфичной клеткой иммунной системы, такой как Т-клетка или В-клетка). Например, иммуногенный фрагмент может включать в себя без ограничений пептиды любой длины от 6 до 60 или свыше 60 аминокислот, например пептиды любой длины от 10 до 20 аминокислот или от 20 до 40 аминокислот, происходящие из любой из описанных здесь последовательностей. Такие фрагменты могут идентифицироваться с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области, например способов картирования эпитопов, или графиков антигенности или гидрофобности, с использованием, например, программы Omega version 1.0 от Oxford Molecular Group (см., например, патент США № 4708871) (76, 77, 81, 92, 73).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1А-Е показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности NleA из *S. rodentium*, ЕРЕС и ЕНЕС (SEQ ID NO: 1-3 и 22-24).

На фиг. 2А-Е показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности NleB и NleB2 из *S. rodentium*, ЕРЕС и ЕНЕС (SEQ ID NO: 4-7 и 25-29 & 60).

На фиг. 3А-Е показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности NleC из *S. rodentium*, ЕРЕС и ЕНЕС (SEQ ID NO: 8-10 и 30-32).

На фиг. 4А-Е показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности NleD из *S. rodentium*, ЕРЕС и ЕНЕС (SEQ ID NO: 11-13 и 33-35).

На фиг. 5А-Е показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности NleE из *S. rodentium*, ЕРЕС и ЕНЕС (SEQ ID NO: 14-17 и 36-39).

На фиг. 6А-Е показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности NleF из *S. rodentium*, ЕРЕС и ЕНЕС (SEQ ID NO: 18-21 и 40-43).

На фиг. 7 показано выравнивание аминокислотной последовательности 7 *S.*

rodentium Orf11/GrlA (SEQ ID NO: 56) с положительным регулятором трансляции CaiF (SEQ ID NO: 57) и с предсказанной аминокислотной последовательностью неохарактеризованного белка *Salmonella* (SEQ ID NO: 58). Подчеркнут предсказанный мотив спираль-поворот-спираль, характерный для ДНК-связывающих белков. Идентичные аминокислотные последовательности показаны *, в то время как консервативные изменения показаны +.

На фиг. 8 показана комплементация *S. rodentium* Δ orf11 посредством orf11 из *S. rodentium* (pCRorf11), ЕНЕС (pENorf11) или ЕРЕС (pEPorf11) и комплементация

двойного мутанта *C. rodentium* Δ ler- Δ orf11 посредством *C. rodentium* ler или orf11.

Фиг.9 представляет собой схематичную диаграмму, на которой показано относительное расположение О-островков, содержащих 6 впервые идентифицированных эффекторных генов генома EHEC O157:H7. Также показанное
5 расположение генов шигатоксина (stx), LEE, и inv-spa TTSS. Отмечается ассоциация многих из данных генов с профагами (CP-933 и BP-933).

На фиг. 10А-В показан протеомный анализ секретируемых белков EHEC. А. Одномерный гель SDS-PAGE общих секретируемых белков из EHEC дикого типа (wt) и мутанта секреции III типа (escN-). Миграция маркеров молекулярной массы (в кДа)
10 показана слева от геля. В. Двумерный гель общих секретируемых белков из EHEC дикого типа. Миграция маркеров молекулярной массы (в кДа) показана слева, и примерные значения pI показаны вверху геля. Белковые пятна, анализированные путем масс-спектро스코пии (см. таблицу I), обведены кружком и пронумерованы.

На фиг. 11А-С показана геномная организация, распределение и консервативность NleA. А. Графическое представление области, окружающей nleA в геноме EHEC. Направление транскрипции каждой ORF отмечено стрелкой. Аннотация ORF модифицирована из (3). NleA выделен жирным шрифтом. В. Анализ
15 путем саузерн-блота геномной ДНК из EPEC, EHEC, REPEC, *Citrobacter rodentium* (Citro.) и непатогенного штамма *E. coli* HB101. Каждый образец геномной ДНК расщепляли BamHI (дорожки 1, 4, 7, 10, 13), EcoRI (дорожки 2, 5, 8, 11, 14), и PstI (дорожки 3, 6, 9, 12, 15). С. Множественное выравнивание белковой последовательности NleA из EHEC, профага интимин-позитивного, не относящегося
25 к O157 штамма EHEC (O84:H4), EPEC и *Citrobacter rodentium*. Идентичные остатки представлены точками (.), аминокислоты, отсутствующие в конкретной последовательности, представлены тире (-). Два гидрофобных участка, которые могут представлять собой предполагаемые трансмембранные домены, выделены
30 жирным шрифтом в последовательности EHEC.

На фиг.12 показан вестерн-блот-анализ секретируемых белков (левые дорожки) и бактериальных сгустков (правые дорожки) дикого типа (wt) EHEC и мутанта секреции III типа (escN-), экспрессирующего pNleA-NA и нетрансформированных контролей. Блоты зондировали посредством NA(A.), анти-DnaK (B.), анти-Tir (C.).
35

На фиг. 13А-В показана секреция III типа и транслокация в Δ nleA EHEC. А. Гель SDS-PAGE общих секретируемых белков из EHEC дикого типа (wt) и мутанта Δ nleA. Миграция маркеров молекулярной массы (в кДа) показан слева от геля. В. Вестерн-блот-анализ секретируемых белков из EHEC дикого типа (wt) и мутанта Δ nleA с антисывороткой Δ NleA. Миграция маркеров молекулярной массы (в кДа)
40 показана слева от геля.

На фиг. 14А-В показан вестерн-блот-анализ фракций инфицированных клеток-хозяев. А. Клетки HeLa инфицировали EHEC дикого типа (wt) или escN- EHEC, экспрессирующую меченную NA NleA и подвергали субклеточному
45 фракционированию путем дифференциального центрифугирования. Анализированные фракции представляли собой: бактерии, неразрушенные клетки и цитоскелет (осадок, полученный с низкой скоростью), цитозоль клетки-хозяина (цитозоль хозяина) и мембраны клеток-хозяев (мембраны хозяина). Фракции анализировали путем вестерн-блота с использованием анти-NA, анти-DnaK, антител против кальнексина и антител против тубулина. В. Выделяли фракции мембран из клеток, инфицированных EHEC дикого типа, экспрессирующей меченный NA NleA. Затем мембранные фракции экстрагировали на льду при высокой концентрации
50

соли (1M NaCl), высоком pH (pH 11,4), нейтральном pH и изотонической соли (контроль) или нейтральном pH и изотонической соли, содержащей 1% triton x100 (Triton X100), и повторно центрифугировали с получением растворимых (S) и нерастворимых фракций мембран (P). Данные фракции подвергали вестерн-блот-анализу посредством антител против НА (верхняя панель), антител против кальнексина (средняя панель) и антител против кальретикулина (нижняя панель).

На фиг. 15A-D показаны исследования вирулентности *Citrobacter rodentium* на мышах. А. Вестерн-блот общих бактериальных экстрактов из *C. rodentium* дикого типа (wt) и мутанта Δ nleA, тестируемых антисывороткой против NleA. Миграция маркеров молекулярной массы (в кДа) показана слева от геля. В. Графики выживания для мышей C3H/HeJ, инфицированных *C. rodentium* дикого типа (черные квадраты), Δ nleA *C. rodentium* (незакрашенные кружки), и мышей, ранее инфицированных мутантом Δ nleA и впоследствии стимулированных *C. rodentium* дикого типа (вертикальные полосы). Мышей подвергали мониторингу ежедневно в течение курса инфекции, и когда мышь начинала погибать, ее немедленно фиксировали. Показан процентная доля мышей от исходного числа мышей в каждой группе, которые были жизнеспособны на каждые сутки. С. Титры *C. rodentium* из кишечника инфицированных швейцарских мышей NIH. Мышей инфицировали *C. rodentium* дикого типа (черные кружки) или штаммом Δ nleA (незакрашенные кружки) и фиксировали на 10 сутки после инфицирования. Ткань кишечника и сгустки фекалий гомогенизировали и высевали на агар MacConkey для определения общей нагрузки *C. rodentium* в кишечнике мыши на время фиксации. Каждая мышь в эксперименте представляет единичную точку. Среднее в каждой группе указано на графике горизонтальными полосками. D. Массы кишечника и селезенки инфицированных швейцарских мышей NIH. Мышей инфицировали *C. rodentium* дикого типа (черные кружки и треугольники) или штаммом Δ nleA (незакрашенные квадраты и треугольники) и фиксировали на 10 сутки после инфицирования. Кишки (квадраты) и селезенки (треугольники) рассекали и взвешивали. Каждая мышь в эксперименте была представлена одной точкой. Среднее в каждой группы указано на графике горизонтальными полосками.

На фиг. 16A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности гомолога NleG из EHEC (SEQ ID NO: 61 и 73).

На фиг. 17A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности NleH1 из EHEC (SEQ ID NO: 62 и 74).

На фиг. 18A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности NleH2 из EHEC (SEQ ID NO: 63 и 75).

На фиг. 19A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2076 из EHEC (SEQ ID NO: 64 и 76).

На фиг. 20A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2149 из EHEC (SEQ ID NO: 65 и 77).

На фиг. 21A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2150 из EHEC (SEQ ID NO: 66 и 78).

На фиг. 22A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2151 из EHEC (SEQ ID NO: 67 и 79).

На фиг. 23A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2337 из EHEC (SEQ ID NO: 68 и 80).

На фиг. 24A-B показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2338 из EHEC (SEQ ID NO: 69 и 81).

На фиг. 25А-В показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2339 из ЕНЕС (SEQ ID NO: 70 и 82).

На фиг. 26А-В показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2560 из ЕНЕС (SEQ ID NO: 71 и 83).

На фиг. 27А-В показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности Z2976 из ЕНЕС (SEQ ID NO: 72 и 84).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения идентифицировали несколько новых секретируемых белков А/Е патогенов (таблица 2) с использованием позитивного регулятора LEE (глобальный регулятор активатора LEE, или GrlA), который может применяться для значительного повышения секреции, и позволил авторам провести функциональный скрининг на предмет белков, секретируемых посредством кодируемого LEE TTSS с использованием подхода, основанного на протеомике. Данные новые белки, названные Nle (не кодируемый LEE эффектор) от А до Н, присутствуют в содержащих LEE патогенах, и отсутствуют в непатогенных штаммах *E. coli*, и в не имеющих LEE патогенах кодируются снаружи от LEE посредством 3 PAI, которые присутствуют в А/Е-патогенах, и эволюционируют совместно с LEE (3,8). Идентификация данных белков в некоторых случаях обеспечивала придание функции ORF с ранее неизвестной функцией. Типовой белок NleA (p54) представляет собой эффектор III типа в А/Е-патогенах, включая *C. rodentium*, ЕРЕС и ЕНЕС, и играет критическую роль в вирулентности. NleA кодируется в ассоциированном с фагом островке патогенности в геноме ЕНЕС, отдельном от LEE. Кодируемый в LEE-TTSS направляет транслокацию NleA в клетки-хозяина, где он локализуется в аппарате Гольджи. nleA присутствует в содержащих LEE патогенах и отсутствует в непатогенных штаммах *E. coli* и в не содержащих LEE патогенах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения данные полипептиды и нуклеиновые кислоты, кодирующие данные полипептиды или их части, могут использоваться в качестве вакцин, терапевтических средств, диагностических средств, или инструментов для скрининга лекарственных средств против инфекций, вызываемых А/Е-патогенами, или в качестве реагентов.

Полипептиды и тестируемые соединения

Соединения по изобретению включают, без ограничений, полипептиды и молекулы нуклеиновой кислоты, описанные, например, в SEQ ID NO: 1-56, 59-84, и их фрагменты, аналоги и варианты. Соединения по изобретению также включают продукты генов orf11/grlA, nleA, nleB, nleB2, nleC, nleD, nleE, nleF, nleG, nleH (nle H1 и/или nle H2) или их гомологи.

Соединения по изобретению также включают полипептиды и молекулы нуклеиновой кислоты, описанные, например, в геномной последовательности ЕНЕС (например, AE005174) под номерами Z0985 (NleB2), Z0986 (NleC), Z0990 (NleD), Z6020 (NleF), Z6024 (NleA), Z4328 (NleB), Z4329 (NleE), Z6025 (гомолог NleG), Z6021 (NleH1), Z0989 (NleH2), Z2076, Z2149, Z2150, Z2151, Z2337, Z2338, Z2339, Z2560, Z2976 или L0043 (Orf11/GrlA) (инвентарный № AF071034) и их фрагменты, аналоги и варианты.

Соединения могут быть получены, например, заменой, делецией или вставкой аминокислотного остатка в любое положение описанного здесь полипептида, другими консервативными аминокислотными остатками, т.е. остатками, имеющими сходные физические, биологические или химические свойства, и путем скрининга, например, на способность соединения усиливать вирулентность. В некоторых

вариантах осуществления изобретения соединения по изобретению включают антитела, которые специфически связываются с описанными здесь полипептидами, например с SEQ ID NO: 22-43, 59 или 73-84.

В данной области хорошо известно, что некоторые модификации и изменения могут быть сделаны в структуре полипептида без существенного изменения биологической функции такого пептида с получением биологически эквивалентного полипептида. В одном из аспектов изобретения полипептиды по настоящему изобретению также расширены до биологически эквивалентных пептидов или «вариантов», которые отличаются от части последовательности полипептидов по настоящему изобретению консервативными аминокислотными заменами, или отличаются неконсервативными заменами, которые не изменяют биологической функции, например вирулентности. Применяемый здесь термин «консервативная аминокислотная замена» относится к замене одной аминокислоты на другую в данном положении пептида, причем замена может быть проведена без существенной потери соответствующей функции. При проведении таких замен подобные аминокислоты могут замещаться на основе относительного сходства заместителей боковых цепей, например, их размера, заряда, гидрофобности, гидрофильности и тому подобного, и такие замены могут анализироваться на предмет их влияния на функцию пептида путем рутинного тестирования.

Применяемый здесь термин «аминокислоты» означает те L-аминокислоты, которые обычно находятся во встречающихся в природе белках, D-аминокислоты и такие аминокислоты при их модификации. В соответствии с этим, аминокислоты по изобретению могут включать, например: 2-аминоадипиновую кислоту; 3-аминоадипиновую кислоту; бета-аланин; бета-аминопропионовую кислоту; 2-аминомасляную кислоту; 4-аминомасляную кислоту; пиперидиновую кислоту; 6-аминокапроновую кислоту; 2-аминогептановую кислоту; 2-аминоизомасляную кислоту; 3-аминоизомасляную кислоту; 2-аминопимелиновую кислоту; 2,4-диаминомасляную кислоту; десмозин; 2,2'-диаминопимелиновую кислоту; 2,3-диаминопропионовую кислоту; N-этилглицин; N-этиласпарагин; гидроксизин; алло-гидроксизин; 3-гидроксипролин; 4-гидроксипролин; изодесмозин; алло-изолейцин; N-метилглицин; саркозин; N-метилизолоейцин; 6-N-метиллизин; N-метилвалин; норвалин; норлейцин; и орнитин.

В некоторых вариантах осуществления могут проводиться консервативные аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток замещен на другой, имеющий сходный уровень гидрофобности (например, в пределах значения плюс или минус 2,0, или плюс или минус 1,5, или плюс или минус 1,0, или плюс или минус 0,5), где следующей может быть аминокислота, имеющая индекс гидропатичности примерно -1,6, например Tyr (-1,3) или Pro (-1,6), а аминокислотным остаткам назначены следующие индексы (как подробно описано в патенте США № 4554101, включенном в данное описание в качестве ссылки): Arg (+3,0); Lys (+3,0); Asp (+3,0); Glu (+3,0); Ser (+0,3); Asn (+0,2); Gln (+0,2); Gly (0); Pro (-0,5); Thr (-0,4); Ala (-0,5); His (-0,5); Cys (-1,0); Met (-1,3); Val (-1,5); Leu (-1,8); Ile (-1,8); Tyr (-2,3); Phe (-2,5) и Trp (-3,4).

В альтернативных вариантах осуществления могут проводиться консервативные аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток замещен на другой, имеющий сходный гидропатический индекс (например, в пределах значения плюс или минус 2,0, или плюс или минус 1,5, или плюс или минус 1,0, или плюс или минус 0,5). В таких вариантах осуществления каждому аминокислотному остатку

может назначаться гидропатический индекс на основе характеристик гидрофобности и заряда, следующим образом: Ile (+4,5); Val (+4,2); Leu (+3,8); Phe (+2,8); Cys (+2,5); Met (+1,9); Ala (+1,8); Gly (-0,4); Thr (-0,7); Ser (-0,8); Trp (-0,9); Tyr (-1,3); Pro (-1,6); His (-3,2); Glu (-3,5); Gln (-3,5); Asp (-3,5); Asn (-3,5); Lys (-3,9); и Arg (-4,5).

В альтернативных вариантах могут проводиться консервативные аминокислотные замены с использованием общедоступных семейств матриц сходства (60, 70, 102, 103, 94, 104, 86). Матрица РАМ основана на коэффициентах, полученных из эволюционной модели, в то время как матрица Blosum использует коэффициенты, происходящие из высококонсервативных блоков при выравнивании. Коэффициент сходства выше нуля в матрицах РАМ или Blosum может использоваться для получения консервативных аминокислотных замен.

В альтернативных вариантах осуществления могут быть сделаны консервативные аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток замещается другим того же класса, где аминокислоты подразделяются на классы неполярных, кислых, основных и нейтральных, следующим образом: неполярные Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Met; кислые Asp, Glu; основные Lys, Arg, His; нейтральные Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr.

Консервативные аминокислотные замены могут включать в себя замену L-аминокислоты соответствующей D-аминокислотой, консервативной D-аминокислотой, или встречающейся в природе не кодируемой генетически формой аминокислоты, а также консервативной заменой L-аминокислоты. Встречающаяся в природе не кодируемые в геноме аминокислоты включают бета-аланин, 3-аминопропионовую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, альфа-аминоизомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, N-метилглицин (саркозин), гидроксипролин, орнитин, цитруллин, трет-бутилаланин, трет-бутилглицин, N-метилизолейцин, фенилглицин, циклогексилаланин, норлейцин, норвалин, 2-нафтилаланин, пиридилаланин, 3-бензотиенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 2-фторфенилаланин, 3-фторфенилаланин, 4-фторфенилаланин, пеницилламин, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, бета-2-тиенилаланин, метионинсульфоксид, гомоаргинин, N-ацетиллизин, 2-аминомасляную кислоту, 2-аминомасляную кислоту, 2,4-диаминомасляную кислоту, п-аминофенилаланин, N-метилвалин, гомоцистеин, гомосерин, цистеиновую кислоту, эпсилон-аминогексановую кислоту, дельта-аминовалериановую кислоту или 2,3-диаминомасляную кислоту.

В альтернативных вариантах осуществления консервативные аминокислотные замены включают замены, основанные на соображениях гидрофильности или гидрофобности, размера или объема, или заряда. Аминокислоты могут в общем характеризоваться гидрофобностью или гидрофильностью, в первую очередь, в зависимости от боковой цепи аминокислоты. Гидрофобная аминокислота характеризуется гидрофобностью выше нуля, а гидрофильная аминокислота характеризуется гидрофильностью ниже нуля, основываясь на нормализованной консенсусной шкале гидрофобности Eisenberg et al. (71). Кодируемые генами гидрофобные аминокислоты включают в себя Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Pro, Met и Trp, и кодируемые генами гидрофильные аминокислоты включают в себя Thr, His, Glu, Gln, Asp, Arg, Ser и Lys. Не кодируемые генами гидрофобные аминокислоты включают трет-бутилаланин, тогда как не кодируемые генами гидрофильные аминокислоты включают цитруллин и гомоцистеин.

Гидрофобные и гидрофильные аминокислоты могут далее подразделяться на

основе характеристик их боковых цепей. Например, ароматическая аминокислота представляет собой гидрофобную аминокислоту с боковой цепью, содержащей, по меньшей мере, одно ароматическое или гетероароматическое кольцо, которое

5 как -OH, -SH, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -NO, -

NH₂, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -C(O)OR, -C(O)NH₂, -C(O)NHR, -C(O)NRR, и т.д., где R независимо представляет собой (C₁-C₆)-алкил, замещенный (C₁-C₆)-алкил, (C₁-C₆)-алкенил, замещенный (C₁-C₆)-алкенил, (C₁-C₆)-алкинил, замещенный (C₁-C₆)-

10 алкинил, (C₅-C₂₀)-арил, замещенный (C₅-C₂₀)-арил, (C₆-C₂₆)-алкиларил, замещенный (C₆-C₂₆)-алкиларил, 5-20-членный гетероарил, замещенный 5-20-

членный гетероарил, 6-26-членный алкилгетероарил, или замещенный 6-26-членный

алкилгетероарил. Кодированные генами ароматические аминокислоты включают Phe, Туг, и Trp, в то время как не кодируемые генами аминокислоты включают

15 фенилглицин, 2-нафтилаланин, бета-2-тиенилаланин, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, 4-хлорфенилаланин, 2-фторфенилаланин, 3-фторфенилаланин, и 4-фторфенилаланин.

Неполярная аминокислота представляет собой гидрофобную аминокислоту с

20 боковой цепью, которая не изменена при физиологическом pH и которая имеет связи, в которых пары электронов, общие для двух атомов, в равной степени удерживаются каждым из двух атомов (т.е. боковые цепи неполярны). Кодированные генами неполярные аминокислоты включают Gly, Leu, Val, Ile, Ala и Met, в то время как не кодируемые генами неполярные аминокислоты включают циклогексилаланин.

25 Неполярные аминокислоты могут далее подразделяться таким образом, что будут включать алифатические аминокислоты, которые представляют собой гидрофобные аминокислоты, имеющие алифатическую углеводородную боковую цепь.

Кодируемые генами алифатические аминокислоты включают в себя Ala, Leu, Val

30 и Ile, тогда как не кодируемые генами алифатические аминокислоты включают норлейцин.

Полярная аминокислота представляет собой гидрофильную аминокислоту с

35 боковой цепью, которая не заряжена при физиологическом pH, но которая имеет одну связь, в которой пара электронов, общая для двух атомов, удерживается ближе к одному из атомов. Кодированные генами полярные аминокислоты включают Ser, Thr, Asn и Gln, тогда как не кодируемые генами полярные аминокислоты включают цитруллин, N-ацетиллизин и метионинсульфоксид.

Кислая аминокислота представляет собой гидрофильную аминокислоту со

40 значением pK_a боковой цепи менее 7. Кислые аминокислоты обычно имеют отрицательно заряженные боковые цепи при физиологическом pH вследствие потери иона водорода. Кислые аминокислоты, кодируемые генами, включают Asp и Glu.

Основная аминокислота представляет собой гидрофильную аминокислоту со

45 значением pK_a боковой цепи выше 7. Основные аминокислоты обычно имеют положительно заряженные боковые цепи при физиологическом pH вследствие ассоциации с ионом гидрония. Основные аминокислоты, кодируемые генами,

включают Arg, Lys и His, тогда как не кодируемые генами основные аминокислоты включают нециклическую аминокислоту орнитин, 2,3-диаминопропионовую

50 кислоту, 2,4-диаминомасляную кислоту и гомоаргинин.

Специалисту в данной области понятно, что указанные выше классификации не абсолютны и что аминокислота может классифицироваться более чем в одну категорию. Кроме того, аминокислоты могут классифицироваться на основе их

известного поведения и/или характерных химических, физических или биологических свойств, на основе конкретных тестов или по сравнению с ранее идентифицированными аминокислотами. Аминокислоты могут включать бифункциональные радикалы, имеющие подобные аминокислотам боковые цепи.

Консервативные замены также могут включать замену химически дериватизированного радикала на недериватизированный остаток, например, путем реакции функциональной боковой группы аминокислоты. Таким образом, данные замены могут включать соединения, свободные аминогруппы которых дериватизированы с образованием гидрохлоридов амина, п-толуолсульфонильных групп, карбобензоксигрупп, трет-бутилоксикарбонильных групп, хлорацетильных групп или формильных групп. Сходным образом, свободные карбоксильные группы могут дериватизироваться с образованием солей, сложных эфиров метила и этила или других типов сложных эфиров или гидразидов, и боковые цепи могут дериватизироваться с образованием О-ацил- или О-алкилпроизводных свободных гидроксильных групп или N-им-бензилгистидина для азота имидазола гистидина. Пептидные аналоги также включают аминокислоты, которые были химически изменены, например, путем метилирования, амидирования С-концевой аминокислоты алкиламином, таким как этаноламин или этилендиамин, или ацилирования или метилирования боковой цепи аминокислоты (например, ацилирование эпсилон-аминогруппы лизина). Пептидные аналоги также могут включать замену амидной связи пептида замещенным амидом (например, группами формулы $-C(O)-NR$, где R представляет собой (C_1-C_6) -алкил, (C_1-C_6) -алкенил, (C_1-C_6) -алкинил, замещенный (C_1-C_6) -алкил, замещенный (C_1-C_6) -алкенил, или замещенный (C_1-C_6) -алкинил) или изостерамидной связи (например, $-CH_2NH-$, $-CH_2S$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$ (цис и транс), $-C(O)CH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, или $-CH_2SO-$).

Соединения могут быть ковалентно связаны, например, полимеризацией или конъюгацией, с образованием гомополимеров или гетерополимеров. Могут использоваться спейсеры и линкеры, обычно состоящие из малых нейтральных молекул, таких как аминокислоты, которые незаряжены в физиологических условиях. Связи могут достигаться несколькими путями. Например, остатки цистеина могут добавляться к концам пептидов, и множественные пептиды могут ковалентно связываться путем контролируемого окисления. Альтернативно, могут использоваться гетеробифункциональные средства, такие как образующие дисульфид/амид агенты или тиоэфир/амид агенты. Соединение также может связываться с другим соединением, которое, например, может модулировать иммунный ответ. Соединение также может быть напряженным, например, за счет наличия циклических частей.

Пептиды или пептидные аналоги могут синтезироваться стандартными химическими способами, например путем автоматического синтеза с использованием раствора или методологии твердофазного синтеза. Автоматические пептидные синтезаторы являются коммерчески доступными, и в них используются способы, хорошо известные в данной области. Пептиды или пептидные аналоги могут также быть получены с использованием рекомбинантной ДНК-технологии с использованием стандартных способов, таких как описаны, например, в Sambrook, et al. (110) или Ausubel et al. (111). В общем, соединения-кандидаты идентифицированы в больших библиотеках природных продуктов или синтетических (или полусинтетических) экстрактах или химических библиотеках способами, известными в данной области. Специалисты в области обнаружения и разработки лекарственных

средств понимают, что конкретный источник тестируемых экстрактов или соединения не является критичным в отношении способа(-ов) по изобретению. В соответствии с этим по существу любое количество химических экстрактов или соединений могут подвергаться скринингу с использованием описанных здесь типовых способов. Примеры таких экстрактов или соединений включают в себя, в качестве неограничивающих примеров, основанные на растениях, грибах, прокариотах или животных экстракты, бульоны ферментации и синтетические соединения, а также модификацию существующих соединений. Многие способы также доступны для случайного или направленного синтеза (например, полусинтеза или полного синтеза) любого числа химических соединений, включая в качестве неограничивающих примеров соединения на основе сахаров, липидов, пептидов и нуклеиновых кислот. Коммерчески доступны синтетические библиотеки соединений. Альтернативно, коммерчески доступны библиотеки природных соединений в виде бактериальных, грибных, растительных или животных экстрактов из ряда источников, включая Biotics (Sussex, Великобритания), Xenova (Slough, Великобритания), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, Флорида, США), и PharmaMar, Массачусетс, США. Кроме того, натуральные и синтетически продуцированные библиотеки, например полипептиды патогена А/Е, продуцируются, если требуется, способом, известным в данной области, например стандартными способами экстракции и фракционирования. Более того, если требуется, любая библиотека или соединение легко модифицируется с использованием стандартных химических, физических или биохимических способов.

Когда обнаруживают, что грубый экстракт модулирует вирулентность, необходимо дальнейшее фракционирование позитивного экстракта-кандидата для выделения химических составляющих, ответственных за наблюдаемый эффект. Так, целью процесса экстракции, фракционирования и очистки является тщательная характеристика и идентификация химической сущности в неочищенном экстракте, обладающем свойствами по модулированию вирулентности. Те же анализы, что описаны здесь для детекции видов активности в смесях соединений, могут использоваться для очистки активного компонента и для тестирования его производных. Способы фракционирования и очистки таких гетерогенных экстрактов известны в данной области. Если требуется, соединения, которые, как показано, могут использоваться в качестве лекарственных средств, химически модифицируют способами, известными в данной области. Соединения, идентифицированные как обладающие терапевтической, профилактической, диагностической или иной ценностью, могут впоследствии анализироваться с использованием *Citrobacter* или модели инфекции, вызываемой А/Е-патогеном на крупном рогатом скоте, или любой другой модели инфекции, вызываемой А/Е-патогеном на животных.

Вакцины

«Вакцины» являются соединениями, включающими в себя материалы, которые вызывают требуемый иммунный ответ. Вакцина может выделять, активировать или использовать память В- и Т-клеток иммунной системы для, например, включения механизмов удаления из организма инфекционных агентов, таких как А/Е патогены или их компоненты. В некоторых вариантах осуществления вакцина включает соответствующий носитель, такой как адъювант, который является агентом, действующим неспецифическим способом для повышения иммунного ответа на специфичный антиген или на группу антигенов, вызывая уменьшение количества антигена при назначении любой дозы вакцины или уменьшение частоты введения

вакцины, необходимой для получения требуемого иммунного ответа. Требуемый иммунный ответ может включать полную или частичную защиту от заражения (присутствует в экскрементах инфицированного животного, например

инфицированного животного, например млекопитающего) А/Е патогеном.

Например, требуемый иммунный ответ может включать любую степень, от 10% до 100%, например 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% защиты от заражения или образования колоний А/Е патогеном вакцинированного животного в сравнении с невакцинированным животным.

Вакцины, относящиеся к изобретению, могут включать в себя полипептиды и нуклеиновые кислоты, описанные здесь, или их иммуногенные фрагменты, и могут назначаться с использованием любой известной или описанной здесь формы введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина может

включать в себя живой А/Е патоген, мертвый А/Е патоген или их компоненты. Живой А/Е патоген, который может быть назначен в форме пероральной вакцины, может содержать невосстановимое генетическое повреждение, снижающее вирулентность А/Е патогена, но не его способность вызывать иммунный ответ.

Живая вакцина может быть способна заселять кишечник вакцинированного животного, например, млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления, полипептиды и молекулы нуклеиновых кислот, описанные здесь, или их иммуногенные фрагменты, или мутировавшие бактерии (например, ослабленные бактерии), описанные здесь, могут вводиться птицам, например, цыплятам, уткам, индейкам и др., чтобы вызвать иммунный ответ, например, повышение уровня антител, у птиц. Яйца или их продукты, полученные от таких птиц, проявляющие иммунный ответ против полипептидов и молекул нуклеиновых кислот, описанных здесь, или против их иммуногенных фрагментов, могут быть назначены животным, например, человеку, крупному и мелкому рогатому скоту, овцам и др., чтобы вызвать иммунный ответ на полипептиды и молекулы нуклеиновых кислот, описанные здесь, или их иммуногенные фрагменты, у животных. Способы повышения уровня антител у птиц и применения таких антител описаны, например, в патенте США 5750113, выданном Cook 12 мая 1998 года; в патенте США 6730822, выданном Ivarie, et al. 4 мая 2004 года; и публикациях 113-117, приводимых здесь.

Вакцины, относящиеся к изобретению, могут быть в дальнейшем дополнены добавлением рекомбинантных или очищенных антигенов, таких как EspA, EspB, EspD, EspP, Tir, шигатоксин 1 или 2 и/или интимин, с использованием известных стандартных способов. Например, получение и использование рекомбинантных белков ЕНЕС О157:Н7, таких как EspA, Tir, EspB и интимин, было описано (публикация РСТ № WO 99/24576; 51).

Клеточная культура

А/Е патогены могут выращиваться в соответствии с любыми известными или описанными здесь способами. Например, А/Е патогены могут сначала выращиваться на среде Luria-Bertani (LB) в течение примерно от 8 до 48 часов или примерно от 12 до 24 часов и затем разводиться примерно от 1:5 до 1:100, например 1:67, или примерно от 1:5 до 1:25, или примерно 1:10, в минимальной среде М-9, дополненной 20-100 мМ NaHCO₂ или NaHCO₃, или примерно 30-50 мМ, или примерно 44 мМ NaHCO₂ или NaHCO₃; 4-20 мМ MgSO₄, или примерно 5-10 мМ; или примерно от 0,8 мМ до 8 мМ MgSO₄, от 0,1 до 1,5% глюкозы, или примерно от 0,2%

до 1%, или примерно 0,4% глюкозы и от 0,05 до 0,5% казаминовых кислот, или примерно от 0,07 до 0,2%, или примерно 0,1% казаминовых кислот. Культуры в основном поддерживаются при примерно 37°C, возможно в 2-10% CO₂ или примерно в 5% CO₂, и выращиваются до оптической плотности примерно 600 нм от 0,7 до 0,8.

Целые клетки затем удаляются любым пригодным способом, например микрофилтрацией или центрифугированием, и супернатант может быть концентрирован, например, в 10-1000 раз или более, например в 100 раз, с использованием диализа, ультрафилтрации или подобных способов. Общий белок легко определяется с использованием хорошо известных в науке способов.

Супернатанты клеточных культур могут быть получены с использованием культур любых А/Е патогенов, включая дикий тип или мутантные А/Е патогены, например, ЕНЕС, как описано здесь или известно научным специалистам. В общем, А/Е патоген культивируется в пригодной среде, в условиях, способствующих секреции антигена типа III (патенты США № 6136554 и 6165743) (51, 74).

Изолирование и идентификация дополнительных генов

На основе нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, описанных здесь, например в SEQ ID NO: 1-56 или 59-84, изолирование и идентификация дополнительных генов становятся возможными с использованием стандартных способов. Любой А/Е патоген может служить источником таких генов.

В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот, описанные здесь, могут быть использованы для создания проб и праймеров, включая вырожденные олигонуклеотидные пробы или праймеры, на основе последовательности любой цепи ДНК. Пробы и праймеры могут быть использованы в дальнейшем для поиска в геномных или кДНК библиотеках генов других А/Е патогенов, с применением стандартных способов амплификации и гибридизации.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные последовательности, описанные здесь, могут быть использованы для получения антител или других реагентов, которые применяются для поиска полипептидов А/Е патогенов, которые связываются с этими антителами.

В некоторых вариантах осуществления, связывающиеся партнеры могут быть идентифицированы путем мечения полипептидов по изобретению (например, таких в значительной степени схожих с SEQ ID NO: 22-43, 59 или 73-84) эпитопной последовательностью (например, FLAG или 2НА) и введения их в клетку-хозяина, как путем трансфекции с подходящим вектором, содержащим последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую полипептид по изобретению, так и путем эндогенного введения бактерий типа III с последующей иммунопреципитацией и идентификацией связывающихся партнеров.

Клетки HeLa могут быть инфицированы штаммами, экспрессирующими белки слияния FLAG или 2НА, с последующим лизисом и иммунопреципитацией с анти-FLAG или анти-2НА антителами. Связывающиеся партнеры могут быть идентифицированы с помощью масс-спектрометрии. Если полипептид по изобретению не образуется в достаточных количествах, такой способ может не произвести нужного объема меченого белка для идентификации его партнера. Как часть дополнительного способа, каждый полипептид по изобретению может быть клонирован в вектор трансфицирования млекопитающих, слитый, например, с 2НА, GFP и/или с FLAG. После трансфицирования клетки HeLa могут быть лизированы и меченый полипептид иммунопреципитирован. Связывающийся партнер может быть идентифицирован с помощью SDS PAGE и последующей масс-спектрометрии.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид по изобретению может быть помечен, получен в больших количествах и использован в аффинных колонках и в иммунопреципитации для идентификации и/или подтверждения идентифицированных соединений-мишеней. Белки, меченные FLAG, HA и/или His, могут быть

использованы на таких аффинных колонках для извлечения из клеточных экстрактов факторов клетки-хозяина, и преобладающий фактор может быть подтвержден стандартными анализами связывания, кривыми насыщения и другими методами, описанными здесь или известными специалистам в этой области.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная двухгибридная система может быть использована для изучения белок-белковых взаимодействий. Последовательности нуклеиновых кислот, описанные здесь, или последовательности, в значительной степени схожие с ними, могут быть клонированы в плазмиду приманки рВТ двухгибридной системы, и коммерчески доступная библиотека из 5×10^6 независимых клонов селезенки мыши может быть использована как библиотека-мишень для приманок. Потенциальные преобладающие факторы могут быть в дальнейшем характеризованы путем восстановления плазмид и их возвращения к первоначальному состоянию для уменьшения ложноположительных результатов от вариантов приманки клона и клонов-приманок библиотеки, которые активируют репортерные гены независимо от клонированной приманки. Воспроизводимые преобладающие факторы могут быть изучены, в дальнейшем, как здесь описано.

В некоторых вариантах осуществления, A/E патогенный штамм, экспрессирующий GrlA, например штамм ЕНЕС O157, экспрессирующий клонированный GrlA, может быть использован для протеомного анализа секретируемых A/E протеомов типа III, с применением, например, 2D гелевого анализа супернатантов. Кроме того, полный A/E патоген (например, основанные на ЕНЕС биочипы) может применяться для определения того, какие гены регулируются GrlA. Вирулентность определяют способами, описанными здесь, или известными специалистам в этой области.

После идентификации кодирующих последовательностей, они могут быть изолированы с использованием стандартных способов клонирования и введены в любой подходящий вектор или репликон для, например, получения полипептидов. Такие векторы и репликоны включают, без ограничения, бактериофаг X (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (грамотрицательная бактерия), pGV1 106 (грамотрицательная бактерия), pLAFR1 (грамотрицательная бактерия), pME290 (не-*E. coli* грамотрицательная бактерия), pHv14 (*E. coli* и *Bacillus subtilis*), pBD9 (*Bacillus*), pIJ61 (Стрептомицеты), pUC6 (Стрептомицеты), YIp5 (Сахаромицеты), YCp19 (Сахаромицеты) или вирус коровьей папилломы (клетки млекопитающего).

В целом, полипептиды по изобретению могут быть получены в любой приемлемой клетке-хозяине, измененной или трансфицированной подходящим вектором (69). Способ изменения или трансфицирования и выбор экспрессирующего носителя будут зависеть от выбранной системы хозяина. Могут применяться разнообразные экспрессирующие системы, и выбор строго определенной клетки-хозяина не критичен для изобретения. Например, полипептид, в соответствии с изобретением, может быть получен в прокариотической клетке-хозяине (например, *E. coli*) или в эукариотической клетке-хозяине (например, *Saccharomyces cerevisiae*, клетках насекомых, например, клетках Sf21, или в клетках млекопитающих, например клетках NIH 3T3, HeLa или COS). Эти клетки доступны из различных

источников (например, the American Type Culture Collection, Manassus, VA). Бактериальные экспрессирующие системы для получения полипептидов включают E. coli pET экспрессирующую систему (Novagen, Inc., Madison, Wis.) и pGEX экспрессирующую систему (Pharmacia).

Анализы

Соединения-кандидаты, включая полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот и малые молекулы, могут быть выявлены и оценены с использованием различных способов, описанных здесь или известных научным специалистам. Соединения, уменьшающие уровень экспрессии любых полипептидов или молекул нуклеиновых кислот по изобретению могут быть использованы, например, как лекарства против А/Е патогенной инфекции.

Скрининговые анализы могут сопровождаться, например, измерением экспрессии гена стандартным нозерн-блот-анализом, с использованием любого подходящего фрагмента нуклеиновой кислоты, в соответствии с изобретением, как гибридизационной пробы, где уровень экспрессии гена в присутствии соединения-кандидата сравнивают с уровнем экспрессии гена в отсутствии соединения-кандидата. С другой стороны, или дополнительно, эффект соединения-кандидата может быть определен по уровню экспрессии или секреции полипептида, с использованием, например, иммунопреципитации или приемов вестерн-блота.

Другие анализы могут быть проведены следующим образом.

Подтверждение секреции и транслокации типа III в клетках-хозяевах

Для определения, какое из соединений-кандидатов нуждается в TTSS для секреции, каждый ген или порция генов могут быть присоединены к С-концу FLAG, и супернатанты собирают с WT и TTSS мутантов, например, WT EHEC и изогенного мутанта escN типа III, как описано здесь или известно науке. Другой способ определения секреции включает исследование супернатантов на снижение продуктов секреции в мутантных штаммах, или повышение антител к белку, с использованием вестерн-анализа супернатантов WT и типа III. Для подтверждения того, что ни один из интересующих белков не является компонентом TTSS, супернатанты от каждого из соединений-кандидатов, росших в условиях, индуцирующих тип III, могут быть исследованы на секрецию типа III. LEE TTSS секретирует два класса белков: транслоконы (EspA, B и D), которые связаны с поверхностью бактериальной клетки, и эффекторы, которые перемещаются непосредственно в клетку-хозяина.

Соединения-кандидаты изучают для определения, являются они эффекторами или транслокаторами. Например, FLAG-меченные предполагаемые эффекторы в EHEC или других А/Е патогенах могут быть использованы для инфицирования культивируемых эпителиальных HeLa клеток и исследованы с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии после окрашивания с анти-FLAG антителами. Такая визуализация обычно показывает проникновение бактерий в клетку-хозяина и часто выявляет, какая органелла является мишенью эффектора (например, мембрана - для Tir, комплекс Гольджи - для NleA). Антитела к различным клеточным структурам могут быть использованы таким образом для подтверждения локализации. В дополнение к визуализации, инфицированные HeLa клетки могут быть фракционированы на цитозоль, нерастворимый, и мембранные фракции, с использованием известных способов фракционирования (30), и с помощью вестерн-анализа, производимого с применением анти-FLAG антител, определяют, какая клеточная фракция является мишенью эффектора. В качестве контроля клетки инфицируют меченым эффектором, экспрессируемым в TTSS-дефектном штамме.

Если мишенью является мембранная фракция, обработка высшей солью или щелочной рН может быть использована для определения, является ли это интегральным белком мембраны. Если соединение-кандидат экспрессируется на низком уровне и определение перемещения способом иммуофлюоресценции затруднено, может быть применено генетическое слияние с аденилатциклазой, ферментом, для активности которого необходим цитоплазматический кофактор млекопитающих (кальмодулин) (87).

Эффекты на формирование ложа и усвоение

Учитывая, что накопление актина и образование ложа являются отличительными признаками А/Е патогенов, соединения-кандидаты выявляют по накоплению актина и образованию ложа, например, в культивируемых эпителиальных HeLa клетках.

Инвазия ЕРЕС и ЕНЕС является другим фенотипом клеточной культуры, который легко определяется и свидетельствует о взаимодействии культивируемыми эпителиальными клетками и способности изменять цитоскелет клетки-хозяина (кроме мутантов типа III и штаммов, дефицитных по Tir и интимину). Уровни инвазии различных соединений-кандидатов могут сравниваться в мутантных А/Е патогенах WT и типа III, например, WT и TTSS мутантных ЕНЕС в клетках HeLa, с использованием гентамицинового защитного анализа.

Кроме того, определяют способность соединений-кандидатов блокировать фагоцитоз культивируемых макрофагов, так как ЕРЕС и ЕНЕС подавляют фагоцитоз культивируемых макрофагов через ингибирование активности PI 3-киназы клетки-хозяина тип III-зависимым образом (Celli, J., M. Oliver and B.B. Finlay. 2001. Enteropathogenic Escherichia coli mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. Embo J 20: 1245-58). Если какие-либо соединения-кандидаты не способны подавлять фагоцитоз, может быть проведен дополнительный анализ ингибирования PI 3-киназы.

Эффекты на поляризованные эпителиальные монослои

Состояние межклеточных взаимодействий играет ключевую роль в развитии диареи. Помимо образования ложа, А/Е патогены вызывают и другие LEE типа III-эффекты на поляризованные эпителиальные клетки, включая утрату микроворсинок (сглаживание микроворсинок) и снижение трансмонослойного электрического сопротивления, критерия плотности взаимодействия. Используя поляризованные кишечные монослои клеток Caco-2 человека, может быть применена сканирующая электронная микроскопия высокого разрешения монослоев, инфицированных А/Е патогеном WT (например, WT ЕНЕС), TTSS мутантный А/Е патоген, например, ЕНЕС escN и любое из соединений-кандидатов. Монослои инфицируют различное число раз, отмывают и изучают на SEM, используя стандартные способы (66), и выявляют снижение электрического сопротивления после инфицирования поляризованных клеток Caco-2.

Эффекты на врожденный иммунитет и воспаление

Легко выявляемой чертой патогенов является способность подавлять врожденные иммунные и воспалительные ответы. Подобные эффекты описаны для А/Е патогенов, таких как ЕНЕС и ЕРЕС, и данное исследование может быть использовано для изучения соединений-кандидатов в штаммах WT и TTSS мутантных А/Е патогенов. Например, ЕНЕС вызывает подавление NF- κ B, приводящее к угнетению некоторых цитокинов, таких как IL-8, IL-6 и IL-1 α в клетках HeLa (80), и этот процесс требует LEE TTSS. Соединения-кандидаты исследуют на подавление этих факторов вслед за, например, инфицированием

клеток HeLa, используя стандартные способы, такие как RT-ПЦР (ПЦР в реальном времени) и коммерчески доступные анализы ELISA.

Функциональные исследования на основе информации о локализации

В дополнение к изучению фенотипа, соединения-кандидаты исследуют в зависимости от их локализации в клетке-хозяине. Например, если соединение-кандидат локализуется в комплексе Гольджи, оно может быть изучено для определения наличия отрицательного влияния на функционирование комплекса Гольджи, включая биохимические исследования гликозилирования и функциональные исследования комплекса Гольджи на дрожжевых грибах, экспрессирующих соединение-кандидат. Если соединение-кандидат локализуется в митохондриях, применяют исследования апоптоза и других митохондриальных функций. Если мишенью соединения-кандидата является эндоплазматический ретикулум, изучают синтез и секрецию белков. Если мишенью является ядро, проводят транскрипционные исследования.

Роль вирулентности

Конкурентные индексы (CI) широко используются для определения роли минорных вирулентных факторов, а также принадлежности двух вирулентных факторов к одному вирулентному «пути» (63). Кратко, два штамма с разной устойчивостью к антибиотикам совместно вводят животному и, после достаточного времени инкубации, бактерии выделяют и определяют соотношение двух штаммов. Индекс 1 означает равную вирулентность. Если идентифицированные соединения влияют на вирулентность, их CI, в сравнении с WT, могут быть определены. Также CI используют для определения, к какому вирулентному пути принадлежат соединения-кандидаты. Например, CI могут быть получены при сравнении мутантов двух вирулентных факторов, в дополнение к сравнению каждого из них с WT. При сравнении одиночных мутантов с двойным мутантом, соотношение CI, равное 1 означает, что они принадлежат к одному общему вирулентному пути, тогда как соотношение, отличающееся от 1, означает, что они принадлежат к разным вирулентным «путям».

Микроскопические исследования

Микроскопические способы используют для характеристики заболевания, вызванного A/E патогеном, включая трансмиссионную электронную микроскопию (ТЕМ) и сканирующую электронную микроскопию (SEM) для изучения лимфоидных фолликулов в бляшках Пейера дистальной части подвздошной кишки кроликов, инфицированных REPEC, для подтверждения формирования A/E повреждений (63), конфокальную микроскопию для наблюдения поступления в мышинные ворсинки, и гистологический анализ болезненного процесса в инфицированных мышах.

Эти способы используют для изучения соединений-кандидатов на приемлемых животных моделях, например мышах, инфицированных различными штаммами цитробактера, несущими мутации в последовательностях кандидата. Для каждого соединения-кандидата может быть предпринято комплексное исследование для отслеживания прогрессирования (или его отсутствия) заболевания в этой системе. Кроме того, определяют уровень колонизации этими мутантами поверхности кишечника. Применяют инфицирование животных штаммами, мечеными антибиотиками, после чего изымают ткань кишечника. Ткань гомогенизируют и подсчитывают количество бактерий на селективных счетных пластинках.

Основной особенностью A/E патогена, например цитробактерной инфекции, является выраженное воспаление. Клеточные признаки воспаления исследуют с

помощью конфокальной микроскопии у различных мутантов соединений-кандидатов. Путем мечения тканей антителами или лектинами, с последующей конфокальной микроскопией, выявляют клетки воспаления, мобилизованные к месту инфицирования мутантами, в сравнении с родительским штаммом. Антитела к некоторым факторам врожденного ответа доступны и могут также быть использованы для анализа мутантных фенотипов в ходе инфекции путем изучения факторов врожденного ответа и клеток, таких как макрофаги, нейтрофилы, продукции iNOS, дендритные клетки и др.

Гистологические исследования

Могут проводиться гистологические исследования окрашенных тканей. Например, окрашенные гематоксилином или эозином срезы подвздошной кишки кроликов, инфицированных REPEC, и штаммы с делециями соединений-кандидатов изучают для сравнения воспаления и повреждения тканей и характеристики А/Е патогенных инфекций (58). Подобное же окрашивание проводят на мышцах со штаммами цитробактера, дефицитными по соединениям-кандидатам. Доступны некоторые другие гистологические красители, с помощью которых можно определить воспаление, связанное с цитробактером и изогенными мутантами, включая Гимза и Толуидин синий О (для общей морфологии), Шифф-йодная кислота (окрашивает карбогидраты, позволяя выявить кишечный слизистый слой и бокаловидные клетки), Грам, хлорацетатэстераза (окрашивает клетки воспаления) и Реакция каспаз (для апоптоза). Иммуногистохимия позволяет использовать антитела, направленные против антигенов бактериальных клеток и клеток млекопитающих.

Антитела

Соединения по изобретению могут быть использованы для получения антител к полипептидам по изобретению, с применением стандартных способов получения (45) или способов, известных специалистам в этой области.

Например, кодирующую последовательность для полипептида по изобретению очищают до степени, необходимой для иммунизации кролика. С целью минимизировать возможные проблемы, связанные с низкой аффинностью или специфичностью антисыворотки, создают две или три полипептидные конструкции для каждого протеина, и каждая конструкция вводится, по меньшей мере, двум кроликам. Количество антисыворотки может нарастать в серии инъекций, предпочтительно включающей, по меньшей мере, три ревакцинирующих инъекции. Первичную иммунизацию проводят с полным адъювантом Фрейнда, а последующие иммунизации - с неполным адъювантом Фрейнда. Титры антител отслеживают с помощью вестерн-блота и иммунопреципитационных анализов, используя очищенный белок. Специфичность антисыворотки определяют с использованием панели неродственных белков. Альтернативно или дополнительно, пептиды, связанные с относительно уникальными иммуногенными участками полипептида по изобретению, могут быть получены и сцеплены с гемоцианином лимфы улитки (KLH) через включенный С-терминальный лизин. Антисыворотку к каждому из этих пептидов аффинно очищают на пептидах, конъюгированных с BSA, и проверяют специфичность с помощью ELISA и вестерн-блота, с использованием пептидных конъюгатов, и с помощью вестерн-блота и иммунопреципитации.

Альтернативно, моноклональные антитела, которые специфически связывают любой из полипептидов по изобретению, получают в соответствии со стандартным гибридомным способом (91, 90, 89, 78). Полученные моноклональные антитела

также проверяют на специфичность распознавания с помощью вестерн-блота или иммунопреципитации. Антитела, которые специфически связывают полипептид по изобретению, признаются применимыми; такие антитела могут быть использованы, например, в иммунологическом анализе. Альтернативно, моноклональные антитела получают с использованием полипептида по изобретению, описанному выше, и библиотеки фагового дисплея (112).

В некоторых вариантах осуществления, антитела получают с использованием фрагментов полипептидов, предположительно обладающих иммуногенными свойствами, исходя из таких критериев, как высокая частота заряженных остатков. Антитела специально разрабатывают с расчетом на минимизацию побочного иммунного ответа реципиента с использованием, например, химерных антител, содержащих антиген-связывающий домен от одного вида и Fc-фрагмент от другого вида, или с использованием антител, полученных от гибридомы соответствующего вида.

В некоторых вариантах осуществления, антитела против любого из полипептидов, описанных здесь, используют для лечения или профилактики А/Е патогенной инфекции.

Животные модели

Соединения могут быть быстро изучены на различных животных моделях А/Е патогенной инфекции.

Цитробактерная мышьяная инфекционная модель является моделью заболевания, встречающейся в естественных условиях, а модель ЕНЕС-выделяющей инфекции взрослых коров - моделью естественного носительства, не проявляющегося болезнью (скот не заболевает, хотя ЕНЕС не является частью нормальной флоры). Для цитробактерной модели, вирулентность мутантов изучают на мышах, как описано здесь. Нокаут(КО)/мутантных мышей используют для изучения роли кандидатных последовательностей в инфекции. Получены несколько линий КО мышей, включая определение роли iNOS (20), Т- и В-клеток (106), Tlr-4 и установление степени восприимчивости реципиента (54), так же, как Nck.

Для коровьей модели, ЕНЕС мутанты изучают на годовалых животных (см., например, публикация РСТ № WO 02/053181). Кратко, 10^8 CFU мутанта или WT O157 вводят животному через ротожелудочную интубацию. В течение 14 дней после введения фекальные выделения отслеживают на селективных счетных пластинках, и колонии исследуются с помощью многоканальной ПЦР, уровня выделений, гистологического и микроскопического анализов перианальной области, где концентрируется ЕНЕС (97). Другая модель представляет собой петли кишечника коровы, в которые вводят ЕНЕС и несколько раз изучают гистологически и морфологически, а также подсчитывают количество адгезированных бактерий с помощью счетной пластинки.

Естественную кроличью инфекционную модель инфекции RDEC-1 проводят следующим образом: после культивирования в течение ночи, бактериальную культуру собирают центрифугированием и растворяют в одном мл фосфатного буфера. Новозеландским белым кроликам (весом от 1,0 до 1,6 кг), после голодания в течение ночи, вводят в желудок через орально-гастральный зонд 5 мл 2,5% стерильного натрия бикарбоната и 1 мл RDEC-1 или кандидатной последовательности мутантных штаммов (2×10^{10}). Такую же дозу бактерий вводят каждому кролику на следующий день. Каждого кролика ежедневно взвешивают и собирают выделяемые с фекалиями бактерии с помощью ректальных

тампонов и из каловых катышков. Ректальные тампоны раскатывают по половине поверхности чашек MacConkey, содержащих налидиксовую кислоту. Пять каловых катышков или такое же количество жидких каловых масс собирают от каждого кролика и растворяют в 3 мл фосфатного буфера и 0,1 мл каждой каловой суспензии наносят на чашки MacConkey, содержащие налидиксовую кислоту. Рост колоний, устойчивых к налидиксовой кислоте, подсчитывают следующим образом: 0, нет роста; 1, редко расположенные колонии; 2, плотно расположенные колонии; 3, сплошной рост колоний. Ткани выделяют немедленно после усыпления внутривенной инъекцией кетамина и передозировки фенобарбитала натрия. Степень бактериальной колонизации тканей кишечника измеряли следующим образом: на сегмент кишечника (10 см), кроме слепой кишки, накладывают двойные лигатуры на проксимальном и дистальном концах, перерезают между двойными лигатурами, затем промывают 10 мл ледяного фосфатного буфера. Один грамм вязкого содержимого слепой кишки добавляют к 9 мл фосфатного буфера. Полученную суспензию разводят и наносят на чашки MacConkey, содержащие налидиксовую кислоту. Образцы ткани выделяют с помощью 9 мм зажима, трижды промывают фосфатным буфером, добавляют к 2 мл ледяного фосфатного буфера и гомогенизируют в гомогенизаторе, затем последовательно разведенные образцы наносят на чашки MacConkey. Число бактерий, адгезированных на квадратном сантиметре каждой ткани, подсчитывают следующим образом:

$$\text{CFU/см}^2 = \text{число бактерий/чашка} \times \text{фактор разведения} \times 2 \text{ мл} / 0,452$$

Лечение и диагностика

Полипептиды и молекулы нуклеиновых кислот, описанные здесь, могут быть использованы как лекарства, например, для получения вакцин или лекарственных соединений, или создания А/Е патогенов с ослабленной вирулентностью. Такие А/Е патогены могут быть получены, как описано здесь, например, путем создания праймеров на основе последовательностей нуклеиновых кислот, описанных здесь, и с использованием способа аллельного обмена на основе *sacB* (29). Полипептиды и молекулы нуклеиновых кислот могут быть использованы по отдельности или в комбинации друг с другом или с другими подходящими молекулами, такими как EspA, EspB, EspC, EspD, EspP, Tir, шигатоксин 1, шигатоксин 2 или молекулы интимина.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновых кислот, описанные здесь, могут быть использованы в антисмысловых способах. Под «антисмысловой», как упоминается здесь в отношении нуклеиновых кислот, подразумевается последовательность нуклеиновых кислот, комплементарная к кодирующей цепи молекул нуклеиновых кислот, например гену, такому как *nleA*, *nleB*, *nleC*, *nleD*, *nleE* или *nleF*, или комплементарная к нуклеотидной последовательности, значительно схожей с последовательностью любой из SEQ ID NO: 1-21, или 60-72, или ее фрагменту, или варианту. В некоторых вариантах осуществления, антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты способна снизить уровень полипептида, кодируемого комплементарным геном, когда они оба экспрессируются в клетке. В некоторых вариантах осуществления, уровень полипептида снижается в степени, равной любому целому числу от, по меньшей мере, 10% до, по меньшей мере, 25%, или в степени, равной любому целому числу от, по меньшей мере, 25% до, по меньшей мере, 50%, или в степени, равной любому целому числу от, по меньшей мере, 50% до, по меньшей мере, 75%, или в степени, равной любому целому числу от, по меньшей мере, 75% до 100%, в сравнении с

уровнем полипептида в клетке, экспрессирующей только ген, а не комплементарную антисмысловую молекулу нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, экспрессию гена или интересующего кодирующего или некодирующего участка можно подавить или предотвратить с использованием способа интерференции РНК (РНКi), разновидности пост-транскрипционного генного сайленсинга. РНКi используют для создания функционального «нокаута», то есть системы, в которой экспрессия гена или интересующего кодирующего или некодирующего участка снижена, проявляясь в общем снижении количества кодируемого продукта. Таким образом, РНКi применяют для мечения представляющей интерес нуклеиновой кислоты или ее фрагмента или варианта, чтобы, в свою очередь, снизить ее экспрессию и уровень активности продукта, который ей кодируется. Такая система применяется для функциональных исследований продукта, а также для лечения А/Е патогенных инфекций. РНКi описана, например, в опубликованном патенте США 20020173478 (Gewirtz; опубликован 21 ноября 2002 года) и 20020132788 (Lewis et al., опубликован 7 ноября 2002 года) (79, 67). Реагенты и наборы для работы с РНКi коммерчески доступны, например, в Ambion Inc. (Austin, Техас, США) и New England Biolabs Inc. (Beverly, Массачусетс, США).

Предполагается, что в некоторых системах исходным агентом для РНКi является молекула dsРНК, связанная с нуклеиновой кислотой-мишенью. Затем, предполагается, dsРНК расщепляется на короткие интерферирующие молекулы РНК (siРНК) длиной 21-23 нуклеотида (дуплексы 19-21 н.п., каждый с двумя «липкими» нуклеотидами на 3'-конце). Фермент, предположительно осуществляющий эту первую стадию расщепления, был назван «Dicer» и классифицирован как член РНКаз III семейства dsРНК-специфичных рибонуклеаз. С другой стороны, на РНКi возможно воздействовать через введение непосредственно в клетку, или образование в клетке, при введении в клетку подходящего предшественника (например, вектора и т.д.), таких siРНК или siРНК-подобных молекул. siРНК может затем связываться с другими внутриклеточными компонентами для формирования РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). Образовавшийся RISC затем связывается с представляющим интерес транскриптом через спаривание оснований между компонентом своей siРНК и транскриптом-мишенью, по принципу гомологичности, приводя к расщеплению транскрипта-мишени на расстоянии примерно 12 нуклеотидов от 3'-конца siРНК. Таким образом, мРНК-мишень расщепляется, и уровень кодируемого ей белкового продукта снижается.

Воздействие на РНКi возможно через введение в клетку подходящих siРНК или siРНК-подобных молекул, синтезированных *in vitro*. Воздействовать на РНКi можно, например, с использованием химически синтезированной РНК (64), для чего подходящие молекулы РНК химически синтезируют, применяя известные способы. С другой стороны, используют подходящие векторы экспрессии для транскрибирования такой РНК как *in vitro*, так и *in vivo*. Транскрипцию *in vitro* смысловых и антисмысловых цепей (кодированных последовательностями, представленными на том же векторе или на отдельных векторах) проводят с использованием, например, T7 РНК полимеразы, в таком случае вектор включает подходящую кодирующую последовательность, функционально связанную с T7 промотером. Транскрибированная *in vitro* РНК может, в некоторых вариантах осуществления, быть обработана (например, с использованием РНКазы III *E. coli*)

in vitro до размеров, приемлемых для РНКi. Смысловые и антисмысловые транскрипты объединяют для образования РНК дуплекса, который вводят в представляющую интерес клетку-мишень. Используют и другие векторы, которые экспрессируют РНК малой шпильки (shРНК), которые вводят в siРНК-подобные молекулы. В науке известны различные способы, основанные на применении векторов (65, 93, 95, 98, 99, 105, 109). Также известны различные способы введения таких векторов в клетки как in vitro, так и in vivo (например, генная терапия).

В целом, в осуществлении, экспрессия полипептида, включающего последовательность аминокислот, существенно схожую с последовательностью любой из SEQ ID NO: 22-43, может быть подавлена путем введения в клетку или образования в клетке siРНК или siРНК-подобной молекулы, соответствующей молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или ее фрагменту, или гомологичной нуклеиновой кислоте. В различных вариантах осуществления, такой способ предполагает прямое введение siРНК или siРНК-подобной молекулы в клетку или использование векторных способов, описанных выше. В осуществлении, siРНК или siРНК-подобная молекула имеют длину менее 30 нуклеотидов. В дальнейших вариантах осуществления, siРНК или siРНК-подобная молекула имеют длину около 21-23 нуклеотидов. В осуществлении, siРНК или siРНК-подобная молекула включают в себя дуплексы 19-21 н.п., каждый с двумя «липкими» нуклеотидами на 3'-конце. В осуществлении, siРНК или siРНК-подобная молекула существенно схожа с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, или его фрагмент, или вариант (или фрагмент варианта). Такой вариант способен кодировать белок, имеющий активность полипептида, кодированного SEQ ID NO: 22-43. В осуществлении, смысловая цепь siРНК или siРНК-подобной молекулы существенно схожа с SEQ ID NO: 1-21 или ее фрагментом (РНК, имеющие U вместо T остатка последовательности ДНК).

В некоторых вариантах осуществления, повышенный уровень антител против полипептидов по изобретению используют как лечение А/Е патогенной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или молекулы нуклеиновой кислоты используют для определения присутствия в образце А/Е патогена. Молекулы нуклеиновой кислоты используют для создания проб или праймеров, способных, например, гибридизироваться с ДНК А/Е патогена в образце, или используют для амплификации ДНК А/Е патогена в образце, применяя, например, способ полимеразной цепной реакции. Полипептиды используют, например, для получения антител, специфически связывающихся с полипептидом, экспрессируемом А/Е патогеном. Такие пробы или праймеры могут быть определимо помечены. Под «определимо помечены» имеются в виду любые способы мечения и идентификации присутствия молекулы, например, олигонуклеотидной пробы или праймера, гена или его фрагмента, или молекулы сДНК. Способы определимого мечения молекул хорошо известны в науке и включают, без ограничений, радиоактивное мечение (например, изотопом, таким как ^{32}P или ^{35}S) и нерадиоактивное мечение, такое как ферментативное мечение (например, с использованием пероксидазы хрена или алкалинфосфатазы), хемолюминесцентное мечение, флюоресцентное мечение (например, с использованием, флюоресцеина), биолуминесцентное мечение или определение лиганда, связанного с пробой, с помощью антител. Также этот термин включает молекулы, определимо помеченные непрямым способом, например молекулы, связанные с первым агентом (таким, как биотин), который, в свою очередь, связан со вторым агентом, который может быть обнаружен или

проанализирован (таким, как стрептавидин, меченый флюоресцеином). Метки также включают дигоксигенин, люциферазы и экворин.

Фармацевтические и ветеринарные соединения, дозировки и назначение

Здесь описаны соединения, включающие полипептид и молекулы нуклеиновой кислоты, а также соединения, идентифицируемые с использованием способов по изобретению. В соответствии с изобретением, соединения могут применяться отдельно или в комбинации с другими соединениями (например, молекулами нуклеиновой кислоты, малыми молекулами, полипептидами, пептидами или аналогами пептидов), в присутствии липосом, адъюванта или любого фармацевтически приемлемого носителя, в форме, пригодной для назначения млекопитающим, например человеку, крупному рогатому скоту, овцам и т.д. При необходимости, лечение соединением в соответствии с изобретением можно комбинировать с более традиционными и привычными способами лечения А/Е патогенной инфекции.

Общепринятая фармацевтическая практика может быть применена для разработки приемлемых прописей и составов для назначения соединений больным, инфицированным А/Е патогеном. Любой принятый путь введения может быть использован, например парентеральный, внутривенный, подкожный, внутримышечный, интракраниальный, внутриглазничный, офтальмический, внутрижелудочковый, интракапсулярный, интраспинальный, интрацистернальный, интраперитонеальный, интраназальный, аэрозольный или оральное введение. Прописи могут быть в форме жидких растворов или суспензий; таблеток или капсул; порошков, носовых капель или аэрозолей.

Способы приготовления прописей хорошо известны в науке (57). Прописи для парентерального введения могут содержать, например, инертный наполнитель, стерильную воду или соль, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрогенизированные нафталины. Биосовместимый, биоразлагаемый лактидный полимер, лактид/гликолидный сополимер или полиоксиэтилен-полиоксипропиленовые сополимеры используют для контроля высвобождения соединения. Другие потенциально применимые первичные системы доставки модулирующих соединений включают этилен-винилацетатные сополимерные частицы, осмотические помпы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Прописи для ингаляции могут содержать инертный наполнитель, например лактозу, или могут быть с содержанием водных растворов, например полиоксиэтилен-9-лаурилового эфира, гликохолатов и дезоксигхолатов, или могут быть масляными растворами для назначения в форме носовых капель или геля. Для лечебных или профилактических целей соединения назначаются индивидууму в количествах, достаточных для прекращения или замедления А/Е патогенной инфекции.

«Эффективное количество» соединения, в соответствии с изобретением, включает терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. «Терапевтически эффективным количеством» является количество, эффективное, в дозах и необходимом периоде времени, для достижения требуемого терапевтического результата, такого как уменьшение колонизации А/Е патогеном или выделения А/Е патогена. Терапевтически эффективное количество соединения может различаться в зависимости от ряда факторов, таких как стадия заболевания, возраст, пол, вес субъекта и способности соединения вызывать требуемый ответ у субъекта. Режимы дозирования устанавливают так, чтобы вызвать оптимальный

лечебный ответ. Терапевтически эффективное количество также таково, что любой токсический или побочный эффект соединения перевешивается положительными терапевтическими эффектами. «Профилактически эффективным количеством» является количество, эффективное, в дозах и необходимом периоде времени, для

5 достижения требуемого профилактического результата, такого как предотвращение колонизации А/Е патогеном. Как правило, профилактическая доза применяется у субъектов перед началом или на ранних стадиях заболевания, так что профилактически эффективное количество может быть меньше, чем терапевтически

10 эффективное количество. Предпочтительный уровень для терапевтически и профилактически эффективного количества соединения может быть равен любому целому числу от 0,1 нМ до 0,1 М, от 0,1 нМ до 0,05 М, от 0,05 нМ до 15 мкМ или от 0,01 нМ до 10 мкМ.

Следует заметить, что величина дозировки может меняться при улучшении

15 состояния больного. Для каждого конкретного субъекта устанавливают специальные режимы дозирования на время, в соответствии с его индивидуальной потребностью и профессиональным опытом специалиста, назначающего соединение или контролирующего назначение соединения. Величины дозровок, приведенные

20 здесь, являются примерными и не ограничивают дозровок, которые могут быть выбраны практикующими врачами. Количество активного соединения в препарате может различаться в соответствии с рядом факторов, таких как стадия заболевания, возраст, пол, вес индивидуума. Режимы дозирования устанавливают так, чтобы вызвать оптимальный лечебный ответ. Например, может быть назначено

25 единственное введение, может быть назначено несколько доз, вводимых дробно в течение определенного промежутка времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, исходя из особенностей терапевтической ситуации. Желательным является такое составление единицы дозирования исходного

30 препарата, которое облегчило бы его назначение и унифицировало прием.

В случае прописи вакцины, может быть разработано эффективное количество соединения по изобретению, в отдельности или в комбинации с другими соединениями, и с одним или более иммунологическим адъювантом, для вызова

35 иммунного ответа. Адъюванты, в соответствии с изобретением, могут включать в себя эмульгаторы, мурамил дипептиды, авридин, водные адъюванты, такие как гидроксид алюминия, адъюванты, основанные на хитозане, сапонины, масла, Амфиген®, LPS, экстракты клеточной стенки бактерий, бактериальную ДНК, бактериальные комплексы, синтетические олигонуклеотиды и комбинации

40 этого (100). Адъювант может включать экстракт клеточной стенки *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) (MCWE) (патент США № 4744984), ДНК *M. Phlei* (*M-DNA*), или комплекс микобактериальной клеточной стенки (МСС). Эмульгаторы включают в себя натуральные или синтетические эмульгирующие агенты. Синтетические эмульгирующие агенты включают в себя анионные агенты (например, калий, натрий

45 и аммонийные соли лауриновой и олеиновой кислот, кальциевые, магниевые и алюминийные соли жирных кислот, например металлосодержащие мыла, и органические сульфаты, такие как натрия лаурил сульфат), катионные агенты (например, цетилтриметиламмония бромид), неионные агенты (например,

50 глицериновые сложные эфиры, такие как глицерина моностеарат, полиоксиэтиленгликоля сложные эфиры и простые эфиры, и эфиры сорбитановых жирных кислот, такие как сорбитанмонопальмитат и его полиоксиэтиленовые производные, например, полиоксиэтилена сорбитанмонопальмитат). Натуральные

эмульгирующие агенты включают в себя акацию, желатин, лецитин и холестерин. Другие приемлемые адъюванты включают в себя масло, такое как отдельно взятое масло, смесь масел, эмульсию масло-в-воде (например, EMULSIGENTM, EMULSIGEN PLUSTM, или VSA3), или эмульсию не-масло-в-воде (например, масляную эмульсию, эмульсию вода-в-масле или эмульсию вода-в-масле-в-воде). Масло может быть минеральным маслом, растительным маслом или животным маслом. Приемлемые животные масла включают в себя, например, масло печени трески, масло палтуса, масло американской сельди, масло хоплостета или масло печени акулы, все они коммерчески доступны. Приемлемые растительные масла включают в себя, без ограничений, масло канолы, миндальное масло, хлопковое масло, кукурузное масло, оливковое масло, арахисовое масло, сафлоровое масло, масло кунжута или соевое масло. С другой стороны, различные алифатические азотистые основания могут быть использованы как адъюванты в прописи вакцины. Например, известные иммунологические адъюванты включают в себя амины, четвертичные соединения аммония, гуанидины, бензамидины и соединения тиоурония (75). Специфичные адъювантные соединения включают в себя диметилдиоктадециламмония бромид (DDA) (патент США № 5951988) (88, 59, 85, 68, 84, 82, 83) и N,N-диоктадецил-N,N-бис(2-гидроксиэтил)пропандиамин («авридин») (патент США № 4310550, патент США № 5151267) (62). Адъювант, в соответствии с изобретением, может, например, включать в себя минеральное масло и диметилдиоктадециламмония бромид.

Вакцинные препараты могут быть получены с использованием стандартных способов, включающих в себя, но не ограниченных этим, смешивание, обработку ультразвуком и микрофлюидизацию. Адъювант может составлять примерно от 10 до 50% (об/об) от вакцины, или примерно от 20 до 40% (об/об), или примерно от 20 до 30% или 35% (об/об), или любое значение в этих границах. Соединение также может быть связано с несущей молекулой, такой как бычий сывороточный альбумин или гемоцианин лимфы улитки, для повышения иммуногенности.

В целом, соединения по изобретению должны применяться, не вызывая существенного токсичного эффекта. Токсичность соединения по изобретению определяют с использованием стандартных способов, например путем тестирования на клеточных культурах или экспериментальных животных и определения терапевтического индекса, то есть соотношения между LD50 (летальная доза для 50% популяции) и LD100 (летальная доза для 100% популяции). В некоторых обстоятельствах, однако, таких как некоторые условия заболевания, может быть необходимо назначение существенно более высоких доз соединений.

Следующие примеры предназначены для иллюстрации осуществлений по изобретению и не должны истолковываться как ограничения сферы применения по изобретению.

Пример 1

Создание мутантов

Используют следующие бактериальные штаммы: ЕНЕС O157:H7 штамм 86//24 (32), ЕНЕС EDL933 (изолят дикого типа E. coli O127:H7; 3), ЕНЕС escN-(47), дикий тип ЕРЕС E2348/69 (изолят дикого типа E. coli O127:H6; 50), C. rodentium DBS100 (ATCC 51459; 53), РЕРЕС 0103:K-:H2 85/150 (52), E. coli HB101.

Используют следующие плазмиды:

Плазмида	Описание и соответствующий фенотип	Ссылка
----------	------------------------------------	--------

	pRE118	sacB-основанный вектор-«самоубийца» для аллельного обмена, Kan ^r	4
	pKD46	Плазмидная экспрессия λ red рекомбиназы, AMP ^r	5
	PACYC184	Вектор клонирования, CM ^r Tet ^r	NEB
5	pCR2.1-TOPO	Вектор ПЦР-клонирования, Amp ^r Kan ^r	Invitrogen
	PTOPO-2HA	pCR2.1-TOPO-основанный, Пласт-стимулированный полигенный экспрессирующий кластер для С-терминального 2HA мечения, Amp ^r Kan ^r	
	pCRespG-2HA/BglII	pACYC184-основанный, Citrobacter espG промотер-стимулированный полигенный экспрессирующий кластер для С-терминального 2HA мечения, Cm ^r	
10	pCRler	C. rodentium ler в pCR2.1-TOPO	
	pCRorf11	C. rodentium orf11/grlA в pCR2.1-TOPO	
	pEHorf11	EHec orf11/grlA в pCR2.1-TOPO	
	pEPorf11	EPEC orf11/grlA в pCR2.1-TOPO	
	pKK232-8	pBR322-производное, содержащее лишенный промотора ген cat	Pharmacia
15	pLEE1-CAT	pKK232-8-производное, несущее C. rodentium LEE1 (Ler)-cat транскрипционное слияние от нуклеотидов - 162 до +216.	
	pLEE5-CAT	pKK232-8-производное, несущее C. rodentium LEE5 (Tir)-cat транскрипционное слияние от нуклеотидов - 262 до +201.	

Для ПЦР и обратной ПЦР обычно использовали амплификационную систему проверочного считывания ELONGASE (GIBCO BRL/Life Technologies) для снижения уровня ошибок ПЦР. Продукты ПЦР клонировали с использованием TOPO TA Cloning Kit от Invitrogen, или с pCR2.1-TOPO, или с pCRII-TOPO. Последовательность ДНК определяли с использованием Taq Dye-терминаторного способа и автоматического 373A ДНК секвенатора (Applied Biosystems). Для рутинного клонирования, трансформации и инфекции бактерии выращивали в агаре Luria-Bertani (LB) или в бульоне LB с добавлением соответствующих антибиотиков, при 37°C. Применяли различные антибиотики в следующих концентрациях: ампициллин 100 мкг/мл, карбенициллин 100 мкг/мл, канамицин 50 мкг/мл и хлорамфеникол 30 мкг/мл. Рост на среде Eagle в модификации Dullbecco (DMEM) использовали для вызывания экспрессии гена LEE и секреции белка типа III.

sacB-основанный аллельный обмен (14) и систему лямбда Red рекомбиназы (17) использовали для создания мутантов. В целом, 75% или более внутреннего содержания каждого гена удаляли для уверенности в том, что функция гена нарушена. Ген ler был мутирован с помощью лямбда red рекомбиназного способа, гены ler, orf11/grlA и cesT были мутированы способом sacB-основанного аллельного обмена. Двойной мутант ler/orf11 также был создан с использованием sacB-основанного способа. Создание мутантов tir и escD было описано ранее (20, 56). Мутанты были мутантами с делецией внутри рамки считывания, с введением ферментного сайта рестрикции (или Nhe I, или Bam HI, или Sal I) в место делеции, как описано ниже:

Имя LEE мутанта	Длина белка (aa)	Удаленные кодоны (от # до #)	Элементы, введенные в место делеции	Примененные способы делеции
Δ ler	129	23-97 или 9-122	Nhe I или aphT кластер	SacB или лямбда Red
Δ orf11/grlA	135	23-115	Nhe I	SacB
Δ cesT	156	25-147	Nhe I	SacB

Эти мутанты были верифицированы с помощью реакций ПЦР. Комплементарность тестировали для Δ tir, Δ ler, и Δ orf11 мутантов путем введения соответствующего гена в плазмиду. Все эти гены могут быть комплементарны, подтверждая, что мутации, созданные обоими способами аллельного обмена не оказывают отрицательного влияния на функцию нижележащих генов и являются,

таким образом, неполярными.

Для создания ЕНЕС-рNleA-НА, кодирующий участок nleA амплифицировали с использованием амплификационной системы проверочного считывания ELONGASE (Invitrogen) и следующих праймеров: Z6024F:

5'AGATCTGAAGGAGATATTATGAACATTCAACCGACCATAC (SEQ ID NO: 44);
Z6024R: 5'CTCGAGGACTCTTGTTTCTTCGATTATATCAAAG (SEQ ID NO: 45).

Продукты ПЦР клонировали с использованием TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) и последовательность ДНК верифицировали с использованием Taq Dye-

терминаторного способа и автоматического 373A ДНК секвенатора (Applied Biosystems). Затем продукт субклонировали в pCRespG-2HA/BglII, pACYC-производную плазмиду, сконструированную для управления экспрессией белка от *S. rodentium* EspG промотора и для добавления двух молекул гемагглютинаина (НА) к С-концу экспрессируемого белка. Конструкции плазмиды были затем введены в дикий тип ЕНЕС и ЕНЕС escN- с помощью электропорации.

Мутант с делецией в nleA штамма ЕНЕС, устойчивого к налидиксовой кислоте, создали sacB-основанным аллельным обменом (29). Два фрагмента ДНК, которые фланкируют nleA амплифицировали способом ПЦР с использованием хромосомной ДНК ЕНЕС как матрицы.

Фрагмент А амплифицировали способом ПЦР с использованием праймера NT10 5'CCGGTACCTCTAACCATTGACGCACTCG (SEQ ID NO: 46) и праймера NT11 5'AACCTGCAGAACTAGGTATCTCTAATGCC (SEQ ID NO: 47) для создания продукта с 1,3 т.н.п.

Фрагмент В амплифицировали с использованием праймера NT12 5'AACCTGCAGCTGACTATCCTCGTATATGG (SEQ ID NO: 48) и праймера NT13 5'CCGAGCTCAGGTAATGAGACTGTCAGC (SEQ ID NO: 49) для создания продукта с 1,3 т.н.п.

Фрагменты А и В затем инкубировали в течение 1 часа с PstI и затем фермент инактивировали нагреванием до 65°C в течение 20 минут. Приблизительно 50 нг каждого обработанного фрагмента связывали T4 ДНК лигазой в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакцию связывания разводили 1/10 и 1 мкл добавляли в ПЦР с использованием праймеров NT10 и NT13. Полученный в результате ПЦР продукт с 2,3 т.н.п. затем инкубировали с SacI и KpnI, связывали с соответствующими участками pRE112 (14) и трансформировали в DH5αpir для создания pNT225. pNT225 трансформировали в конъюгативный штамм SM10λpir, который служил в качестве донорского штамма в конъюгации с диким типом ЕНЕС. Устойчивые к налидиксовой кислоте и хлорамфениколу экзоконъюгаты отбирали на LB агаре. Затем экзоконъюгаты помещали на LB агар, содержащий 5% (об/об) сахарозы, без NaCl. Полученные в результате колонии затем исследовали на чувствительность к хлорамфениколу, после чего идентифицировали с помощью ПЦР изоляты с делецией nleA и утраченными последовательностями плазмиды. Мутантов с делецией nleA затем изолировали и использовали в дальнейшей работе. Мутант *S. rodentium* создали с использованием ПЦР и применяли для создания, в pRE118 (14), вектора-«самоубийцы», несущего внутреннюю делецию nleA.

Использовали следующие праймеры: del1F: 5'GGTACCACCACACAGAATAATC (SEQ ID NO: 50); del1R: 5'CGCTAGCCTATATACTGCTGTTGGTT (SEQ ID NO: 51); del2F: 5'GCTAGCTGACAGGCAACTCTTGGACTGG (SEQ ID NO: 52); del2R: 5'GAGCTCAACATAATTTGATGGATTATGAT (SEQ ID NO: 53). Полученную в результате плазмиду вводили в *S. rodentium* с помощью электропорации для

создания антибиотикоустойчивого меродиплоидного штамма. Отсутствие плазмидных последовательностей после второго эпизода рекомбинации отбирали, как описано выше. Антибиотикочувствительные, сахарозоустойчивые колонии верифицировали на наличие соответствующей рекомбинации с помощью ПЦР, применяя праймеры, фланкирующие участки делеции. Отсутствие NleA подтверждали с помощью вестерн-блота полных клеточных лизатов с поликлональной анти-NleA-антисывороткой.

Изучение общих и секретируемых белков/протеомика

Секретируемые белки получали, как описано ранее (51).

Штаммы *S. rodentium* выращивали в течение ночи при постоянном встряхивании в 4 мл бульона Luria (LB) при 37°C. Культуры пересеивали 1 к 50 в 4 мл среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), которую предварительно инкубировали в течение ночи в инкубаторе культуры ткани (при 5% CO₂), и выращивали без встряхивания в течение 6 часов в том же инкубаторе для вызывания экспрессии гена LEE. Культуры центрифугировали дважды при 13000 об/мин в течение 10 мин. Для удаления бактерий и супернатант преципитировали 10% трихлоруксусной кислотой (ТСА) для концентрирования белков, секретируемых в культуральную среду. Бактериальный осадок растворяли в 2X SDS-PAGE буфере и принимали за общий бактериальный белок. Секретируемые белки, преципитированные из супернатанта, также растворяли в 2X SDS-PAGE буфере, а оставшуюся ТСА нейтрализовывали 1 мкл насыщенного Tris. Объемы буфера, использованные для ресуспендирования бактериального осадка и секретируемых белков, нормализовывали до OD600 культур для обеспечения равного содержания в образцах. Секретируемые белки анализировали в 12% или 17% SDS-PAGE и окрашивали 0,1% Coomassie Blue G250. Для вестерн-блота-анализа общие и секретируемые белки разделяли в SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad). Использовали крысиные поликлональные антитела против His-меченного Tir цитробактера и мышиные моноклональные антитела против EPEC EspB. Затем применяли стандартные протоколы вестерн-блота ECL (Amersham Life Science).

Дикие типы EHEC и EHEC CVD451 выращивали в течение ночи на среде LB. Затем культуры разбавляли 1:100 в минимальной среде M-9 с добавлением 44 mM NaHCO₃, 8 mM MgSO₄, 0,4% глюкозы и 0,1% казаминовых кислот и растили без встряхивания при 37°C в 5% CO₂ до OD600 от 0,6 до 0,8.

Секретируемые белки собирали центрифугированием культур при 8000g в течение 30 минут, отделяя супернатанты от осадков. Супернатанты фильтровали через фильтры с размером пор 0,45 микрон и определяли концентрацию белка с помощью анализа BCA (Sigma). Белки готовили для электрофореза путем преципитации с 1/9 объемом 100% ледяной ТСА, на льду, в течение от 45 до 120 мин, после чего центрифугировали при 17600g, в течение 30 мин. Осадки промывали в холодном 100% ацетоне и растворяли в 1X Laemmli буфере (для 1-мерных SDS-PAGE гелей) или в буфере для приготовления образца для 2D гелей (8 М мочевины, 2 М тиомочевины, 4% CHAPS, 20 mM Tris, 0,002% бромифенола синего). Для 2D гелей предварительно добавляли DDT до 6 мг/мл и IPG буфер (pH 3-10: Amersham Biosciences) до 0,5%. 18 см Immobiline Dry Strips (pH3-10: Amersham) регидратировали в образце в течение ночи при 20°C. Затем образцы концентрировали при 15°C до 65000 Vh. После концентрирования стрипы уравнивали в EB+10 мг/мл DTT в течение 15 минут и затем в EB+25 мг/мл иодоацетамида в течение 15 минут (EB - это 50 mM Tris, 6 М мочевины, 30% глицерина, 2% SDS, pH 8,8). Уравновешенные

стрипы наносили на верхнюю часть SDS-PAGE гелей большого формата (12% или 14% акриламида) с использованием 0,5% раствора агарозы в SDS-PAGE буфере+0,002% бромоефенола синего, и гели подвергали электрофорезу, пока краситель не выйдет за пределы геля.

Гели окрашивали Sypro Ruby согласно инструкциям производителей (BioRad) и визуализировали на светостоле UV или с помощью MS/MS на масс-спектрометре LCQ Deca с ионной ловушкой (Thermo Finnigan), оснащенном системой жидкостной хроматографии с нанопотоком (LC Packings-Dionex). Из гелей, визуализированных на светостоле UV, интересующие пятна выделяли вручную. Внутригелевое расщепление белков проводили на Investigator ProGest Robot (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI), как описано (23). Образцы с высоким содержанием белка анализировали с помощью LC-MS системы, состоящей из системы жидкостной хроматографии с нанопотоком, оснащенной FAMOS Autosampler (LC Packings-Dionex, San Francisco, CA), и масс-спектрометра LCQ Deca с ионной ловушкой (Thermo Finnigan, San Jose, CA) (24).

Колонки с обратной фазой PicoFrit Columns PFC7515-PP18-5 (New Objective, Woburn, MA, USA) использовали для разделения пептидов и эфлюент с колонки распыляли непосредственно в масс-спектрометре. Использовали скорость потока 200 нл/мин, и общее время детекции одного образца было равно 45 мин.

Образцы с низким содержанием белка анализировали на масс-спектрометре API QSTAR Pulsar Hybrid MS/MS (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, Canada) (12), оснащенном Nanospray Ion Source (Proxeon, Odense, Denmark). Перед анализом образцы очищали и концентрировали на ZipTips (Millipore, Billerica, MA). API QSTAR Pulsar также использовали для сиквенса пептидов de novo.

Спектры исследовали по базе данных NCBI (Bethesda, MD) с помощью поисковых систем Mascot (Matrixscience) или Sonar (Proteometrics Canada Ltd.).

Конструкция транскрипционных слияний cat и анализ CAT

ПЦР фрагменты, несущие промоторы и все вышележащие регуляторные элементы *ler* (LEE1) и *tir* (LEE5) цитробактера расщепляли с помощью Bam HI Hind III и клонировали в плазмиду pKK232-8, содержащую лишенный промоторов ген *cat*. Здесь показаны позиции, занимаемые клонированными фрагментами. Активность CAT, определяемую этими слияниями в различных штаммах цитробактера, определяли, как описано выше (21, 22). Образцы отбирали в различные промежутки времени из бактериальных культур, росших на DMEM, как описано выше.

Анализ последовательностей и способы биоинформатики

Анализ последовательностей ДНК и белков и поиск гомологии с помощью BLASTN, TBLASTN и BLASTP проводили с использованием программ, доступных на вебсайте NCBI (<http://www.ncbi.nih.org/>). Использовали базы данных с сайтов NCBI, Sanger Genome Centre (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes>) и SwissProt (<http://www.expasy.org/sprot/>). Позиции LEE PAI, так же как и профагов, в геноме EHEC были получены из данных, созданных программой IslandPath (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandpath/>) (13).

Саузерн-блот анализ

Образцы геномной ДНК для саузерн-блот анализа готовили с использованием набора DNeasy Tissue (Qiagen). Пробы готовили путем расщепления pNleA-НА ферментами SalI и BglII для получения фрагментов с 500 н.п., которые метили с использованием набора BrightStar Psoralen-Biotin Nonisotopic Labeling (Ambion).

Пять микрограмм каждого образца геномной ДНК полностью расщепляли в 25 единицах BamHI, EcoRI и PstI в течение ночи. Образцы разводили в 1% агарозном

геле с помощью электрофореза и перемещали на найлоновую мембрану BrightStar-Plus (Ambion) путем пассивной, слабощелочной нисходящей элюции. ДНК перекрестно связывали с мембраной облучением мембраны УФ светом в течение 2 мин, после чего высушивали 30 мин при 80°C.

Мембрану прегибридизировали промыванием в 10 мл ультрочувствительного гибридизационного буфера ULTRAhyb (Ambion) при 42°C в течение 30 мин. Десять микролитров полученной пробы затем добавляли к прегибридизированной мембране в буфере и пробу гибридизировали к мембране при 42°C в течение ночи.

Мембрану промывали 2 раза по 5 мин в моющем буфере пониженной жесткости (Ambion) и 2 раза по 15 мин в моющем буфере повышенной жесткости (Ambion) при комнатной температуре. Гибридизованную пробу изучали с помощью набора BrightStar BioDetect Nonisotopic Detection (Ambion), после чего фотографировали на пленку Kodak.

Создание анти-NleA антисыворотки

Кодирующий участок nleA амплифицировали из геномной ДНК ЕНЕС и клонировали в his-меченный вектор экспрессии (pET28a, Novagen), используя следующие праймеры: 5'TTCCATATGAACATTCAACCGACC (SEQ ID NO: 54) и 5'GGAATTCAATAATAGCTGCCATCC (SEQ ID NO: 55). Эту плазмиду вводили в BL21 (λ DE3), выращивали до оптической плотности 600 (A600) от 0,8 и индуцировали с помощью 0,5 mM IPTG при 20°C в течение 16 часов. Белок, меченный His, очищали на колонке Ni-NTA, согласно инструкциям производителя (Qiagen). Фракции, содержащие NleA, объединяли и добавляли тромбин (500:1), белок диализовали в течение ночи против 20 mM tris pH 8,2, 50 mM NaCl. На следующий день белок помещали на колонку monoQ FPLC с использованием линейного градиента от 50 до 500 mM NaCl. Фракции, содержащие NleA, объединяли. После этой стадии чистота белка была >90%.

Очищенный белок использовали для иммунизации двух крыс Sprague Dawley мужского пола, 300 мкг/крыса, с применением полного адъюванта Фрейнда (Sigma), и полученную антисыворотку аффинно очищали с использованием активированного геля с иммуноаффинной поддержкой Affi-Gel 15, согласно инструкциям производителя (BioRad). Для иммунофлюоресцентных экспериментов антисыворотку затем очищали абсорбцией против ацетонсодержащих порошков, полученных из клеток HeLa и из ЕНЕС NleA, как описано в (45). Специфичность антисыворотки подтверждали анализом вестерн-блота клеточных экстрактов из дикого типа ЕНЕС и ЕНЕС NleA.

Иммуноблот-анализ

Образцы для анализа путем вестерн-блота разделяли путем SDS-PAGE (от 9% до 12% полиакриламид). Белки переносили на нитроцеллюлозу и блокировали иммуноблот в 5% растворе обезжиренного сухого молока (NFDM) в TBS, pH 7,2, содержащем 0,1% Tween 20 (TBST), в течение ночи при 4°C, и затем инкубировали с первичными антителами в 1% NFDM TBST в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). Мембраны промывали 6 раз в TBST и затем инкубировали с 1:5000 раствором конъюгированных с пероксидазой хрена козьих анти-мышинных (H+L) антител (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) в течение 1 ч при RT. Затем мембраны промывали, как описано выше. Комплексы антиген-антитело визуализировали улучшенным набором хемоллюминесцентного определения (Amersham), после чего фотографировали на пленку Kodak (Perkin Elmer).

Использовали следующие первичные антитела: анти-НА.11 (Covance), DnaK

(Stressgen), анти-ЕНЕС Tir, анти-NleA (данное исследование), анти-кальнексин (Stressgen), анти-кальретикулин (Affinity Bioreagents), анти-тубулин (Sigma).

Иммунофлюоресценция

5 Клетки HeLa выращивали на стеклянном покрытии в 24-луночных плашках для клеточных культур и инфицировали в течение 6 часов 1 мкл (ЕНЕС) выдержанной в течение ночи культуры с OD ~0,4. Через 6 часов после инфицирования клетки промывали 3 раза в PBS, содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} , и фиксировали в 2,5% параформальдегиде в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки делали проницаемыми в 0,1% сапонине в PBS, блокировали в 5% козьей сыворотке или 5% BSA в PBS+0,1% сапонина и инкубировали со следующими первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе в течение 1 часа при комнатной температуре: анти-ЕНЕС Tir, 1:1000; анти-E.coli O157 (Difco), 1:200; аффинно-очищенные крысиные поликлональные анти-NleA (данное исследование), 1:100; анти-маннозидаза II (любезно предоставленная Dr. Marilyn Farquhar, UCSD), 1:1000. После 3 промываний в PBS/сапонине, клетки инкубировали во вторичных антителах (Alexa-488 или -568-конъюгированные анти-мышинные, кролика, крысы (Molecular Probes) 1:400), в течение 30 мин при комнатной температуре, промывали 3 раза в PBS/сапонине и один раз в PBS и помещали на стеклянные пластинки с использованием mowiol+DABCO. Для визуализации полимеризованного актина, к вторичным антителам добавляли Alexa-488-конъюгированный фаллоидин (Molecular Probes) в соотношении 1:100. При обнаружении клетки инкубировали с 5 мкг/мл брефелдином А (Boehringer Mannheim) в течение 30 минут перед фиксацией. Изображения получали с использованием микроскопа Zeiss Axioskop, оснащенного цифровой камерой Empix DVC1300, и анализировали с использованием программного обеспечения визуализации Northern Eclipse, или микроскопа BioRad Radiance Plus confocal, с использованием программного обеспечения Lasersharp.

Фракционирование инфицированных реципиентных клеток

Для каждого образца две одинаковые 100 мм чашки с культурой клеток HeLa инфицировали диким типом ЕНЕС-pNleA-НА или ЕНЕСescN-pNleA-НА, с использованием исходной MOI 1:10. Через 6 часов после инфицирования клетки отмывали три раза ледяным PBS и подвергали биохимическому фракционированию, как описано ранее (30, 49). Кратко, клетки ресуспендировали в 300 мкл гомогенизационного буфера (3 мМ имидазола, 250 мМ сахарозы, 0,5 мМ EDTA, рН 7,4) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз COMPLETE (Roche), и механически разрушали пропусканием через иглу 22 размера. Гомогенат центрифугировали на низкой скорости (3000g) в течение 15 минут при 4°C для осаждения неразращенных клеток, бактерий, ядер и компонентов клеточного скелета (низкоскоростной осадок). Супернатант подвергали высокоскоростному ультрацентрифугированию (41000g) в течение 20 минут при 4°C в роторе TLS55 центрифуги TL100 (Beckman) для отделения мембран реципиентных клеток (осадок) от цитоплазмы (супернатант). Осадки ресуспендировали в 300 мкл 1X Laemmli буфере, а супернатант добавляли к 1X Laemmli буферу с использованием 5X маточного раствора. Равные объемы всех фракций разделяли путем SDS-PAGE (9% полиакриламид), переносили на нитроцеллюлозу и анализировали способом вестерн-блота.

Для экстракционных исследований мембран, связанных с NleA, две 100 мм чашки

с культурой инфицированных клеток HeLa фракционировали, как описано выше для каждого условия экстракции. Высокоскоростные осадки (фракция мембран реципиента) ресуспендировали в 300 мкл одного из следующих экстракционных буферов: (i) 10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 7 M NaHCO₃, 5 mM MgCl₂, pH 11,4; (iv) 10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, pH 7,4. Экстракцию проводили на льду путем пипетирования образцов вверх и вниз каждые 5 минут в течение 30 минут, и образцы рецентрифугировали при 100000g в течение 30 минут. Осадок (нерастворимая фракция) ресуспендировали в 300 мкл Laemmli буфера, а супернатант (растворимая фракция) преципитировали в 10% трихлоруксусной кислоте на льду в течение 30 минут, отмывали в 100% ацетоне и ресуспендировали в 300 мкл Laemmli буфера. Равные объемы разделяли путем SDS-PAGE (9% полиакриламид), переносили на нитроцеллюлозу и анализировали способом вестерн-блота.

Анализ инфицирования мышей *C. rodentium*

Пятинедельных мышей C3H/HeJ (Jackson Laboratory) и аутбредных швейцарских мышей NIH (Harlan Sprague-Dawley) выращивали в виварии Университета Британской Колумбии в строгом соответствии с правилами, установленными Комитетом защиты животных Университета Британской Колумбии и Канадским советом по использованию лабораторных животных. Дикий тип *C. rodentium* и мутанты с делецией *pleA* выращивали на LB бульоне в течение ночи при постоянном встряхивании при 200 об/мин и 100 мкл культур использовали для инфицирования мышей через пищеварительный тракт. Инфекционный агент титровали последовательными разведениями и посевами и рассчитывали до количества 4×10^8 КОЕ/мышь для обеих групп. Для инфицирования высокочувствительных C3H/HeJ мышей *C. rodentium*, выживание инфицированных мышей определяли ежедневно в течение курса инфицирования. Для оценки гиперплазии толстого кишечника, первые 4 см дистальной толстой кишки, начиная с анального отверстия, отбирали и взвешивали после удаления всех фекальных масс. Для оценки бактериальной колонизации, ткани толстой кишки и фекальные массы гомогенизировали в PBS, с использованием Polytron Tissue Homogenizer, и последовательно разводили перед посадкой на агар MacConkey (Difco Laboratories). Ткань толстой кишки и фекальные массы объединяли для определения общего бактериального обсеменения толстой кишки мыши к моменту усыпления. Агар MacConkey является селективным для грамотрицательных бактерий, на котором *C. rodentium* образует колонии с высокой степенью отличия и характерными чертами морфологии, нетипичными для *E. coli* (26). Для гистологического анализа последние 0,5 см толстой кишки инфицированной мыши фиксировали в 10% нейтральном буферном формалине, выдерживали, разрезали на фрагменты по 3 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологический анализ проводили в Лаборатории морфологических работ отделения патологии и медицинской лаборатории университета Британской Колумбии.

Пример 2

Анализ регуляции экспрессии гена LEE

Чтобы выяснить, какие гены в LEE регулируют экспрессию гена LEE у *C. rodentium*, анализировали LEE мутантов на экспрессию EspV и Tir, которые кодируются оперонами LEE4 и LEE5 (Tir) соответственно. Общие клеточные лизаты бактерий, выращенных на DMEM, анализировали способом вестерн-блота с анти-Tir и анти-EspV сыворотками. Эти результаты подтвердили важную роль Ler в экспрессии LEE, так как Tir и EspV не вырабатывались в Δler . Как и ожидалось, Δtir и

ΔespB не вырабатывали Tir и EspB соответственно. Tir не визуализировали в ΔcesT, в соответствии с ролью CesT, как шаперона для стабильности и секреции Tir (18, 19). К удивлению, другой LEE-кодируемый белок, Orf11, также был необходим для экспрессии Tir и EspB. Экспрессия Tir и EspB в Δorf11 соответствовала плазмиде, несущей только *Citrobacter orf11* (фиг.8). Ген *orf11* широко представлен в А/Е патогенах, и как ЕНЕС, так и ЕРЕС *orf11* комплементарны *Citrobacter* Δorf11 (фиг.8), показывая, что Orf11 функционально эквивалентен в положительной регуляции экспрессии гена LEE в А/Е патогенах.

Анализ последовательностей показывает, что Orf11/GrlA демонстрирует 23% идентичности CaiF, транскрипционному активатору оперонов *cai* и *fix* *Enterobacteriaceae* (15) и 37% идентичности полученной аминокислотной последовательности нехарактеризованного продукта *Salmonella*, кодируемого геном, находящимся ниже края оперона *std* (16) (фиг.7). На фигуре этот гомолог *Salmonella* показан как SGH (*Salmonella* GrlA гомолог). Все три белка содержат предсказанную helix-turn-helix мотивную характеристику ДНК связывающих белков.

Для определения иерархии Orf11 и Ler в регуляции экспрессии гена LEE, создали двойного мутанта *ler* и *orf11* в *S. rodentium*. Тогда как экспрессия Tir и EspB в Δ*ler* Δorf11 может быть частично восстановлена экспрессией Ler в транс-положении, подобная экспрессия Orf11 не имеет такого эффекта (фиг.8), позволяя предположить, что Orf11 действует выше Ler в каскаде регуляции. Расширенный анализ праймеров подтверждает эту регуляторную иерархию, показывая, что промотор *Citobacter ler* подобен ЕРЕС *ler* и его экспрессия снижена в Δorf11.

Роль Orf11 в регуляции экспрессии *ler* была в дальнейшем продемонстрирована при наблюдении активностей транскрипционных слияний между регуляторными участками оперонов LEE1 (Ler) (pLEE1-CAT) или LEE5 (Tir)(pLEE5-CAT) и репортерным ген *cat* в штаммах *Citrobacter* WT, Δ*ler* и Δorf11, выращенных на модифицированной среде Дульбекко (DMEM) в течение 6 часов. Активность слияния LEE1-cat уменьшалась в Δorf11, а активность слияния LEE5-cat выражено снижалась как в Δ*ler*, так и в Δorf11. Эти результаты показывают, что Orf11 является новым положительным регулятором экспрессии Ler, который существенно способствует экспрессии других оперонов LEE. Так как Orf11 действует выше, чем Ler, в каскаде регуляции, он был назван GrlA (для общего регулятора LEE-активатора).

Пример 3

Идентификация эффекторов, секретируемых LEE-кодируемым TTSS

А/Е патогены секретируют некоторые белки в тканевую культуру или минимальную среду, но секретируемые белки являются в основном транслокаторами EspA, EspB и EspD. Секретируемые белки концентрировали преципитацией с ТСА из супернатанта бактериальных культур, выращенных на DMEM, и анализировали с использованием 12% SDS-PAGE, после чего окрашивали Куммасси Синим. *S. rodentium*, несущий плазмиду, содержащую *orf11/grlA*, секретирует, по меньшей мере, на 300% больше EspA, EspB и EspD, чем штамм WT.

Для выявления эффекторов, кодированных LEE цитробактера, метили различные LEE-кодируемые белки, не вовлеченные в TTS и адгезию клеток-реципиентов, двойным гемагглютининовым (2H) эпитопом на углеродном конце и анализировали их секрецию в WT и мутантных *S. rodentium*. Только Tir, EspG, EspF, EspH и Map секретируются LEE-кодируемым TTSS в *S. rodentium*, позволяя

предположить, что LEE кодирует только 5 эффекторов. Ранее невыявленный белок с молекулярной массой 54 кДа (p54) был легко определен окрашиванием Куммасси в мутанте, который также имел высокий уровень секреции Tir, позволяя предположить, что он представляет собой новый мнимый эффектор, кодируемый вне LEE.

Для идентификации p54 и определения, действительно ли дополнительные эффекторы кодируются вне LEE в *S. rodentium*, воспользовались способностью GrlA увеличивать экспрессию гена LEE и/или секрецию типа III и ввели плазмиду grlA в мутанты, которые секретируют эффекторы, но не транслокаторы. Сверх-экспрессия GrlA значительно увеличивает (более чем на 400%) секрецию Tir в этих мутантах, при отсутствии секреции транслокаторов. Наблюдали, по меньшей мере, 6 дополнительных секретируемых белков, что означает, что LEE-кодированный TTSS секретирует несколько дополнительных белков, не кодируемых LEE.

Для идентификации этих белков секретируемые белки анализировали с использованием 2-D гелей. Так как для некоторых из LEE-кодированных эффекторов (EspF, EspH и Map) были предсказаны щелочные значения pI, с EspF, имеющим максимальный pI 11,00, секретируемые белки были сначала сфокусированы на Immobiline Dry Strips с кислотным (pH 3-10) и щелочным (pH 6-11) градиентами, а затем разделены в 12% и 14% SDS-PAGE соответственно. Гели окрашивали Sypro Ruby, выбранные белковые пятна извлекали вручную и анализировали с использованием масс-спектрометрии и построения белков de novo.

Этот анализ подтвердил, что LEE-кодированные Tir, EspF, EspG, EspH и Map были секретируются типом III (Таблица 2).

Таблица 2

Эффекторы и мнимые эффекторы, секретируемые LEE-кодированным TTSS в *S. rodentium*

Серийный номер	Предлагаемое название	Установленная молекулярная масса	Установленный pI	Генная локализация	Гомологи в ЕНЕС и других патогенах
5	Tir	68	5,0	LEE	Tir, постоянный во всех А/Е патогенах
10	EspG	44	7,3	LEE	EspG, постоянный во всех А/Е патогенах
C1 и C2	Map	23	9,0	LEE	Map, постоянный во всех А/Е патогенах
C3	EspF	31	11,0	LEE	EspF, постоянный во всех А/Е патогенах
C5 и C6	EspH	21	8,7	LEE	EspH, постоянный во всех А/Е патогенах
7	NleA	54	5,8	He-LEE	ЕНЕС Z6024 в О-районе 71 около профага CP-933P
12	NleB	39	5,9	He-LEE	ЕНЕС Z4328 в О-районе 122, REPEC LEE-связанный RorfE, и <i>S.typhimurium</i> STMFI. Также имеет гомологию с Z0985 О-районом 36
13	NleC	40	4,6	He-LEE	ЕНЕС Z0986 в О-районе 36 около профага CP-933 K
14	NleD	28	7,1	He-LEE	ЕНЕС Z0990 в О-районе 36, в том же О-районе, что и Z0985 и Z0986. Также имеет сходство с эффектором HopPtoH томата <i>P.syringae</i> pv
17	NleE	27	6,3	He-LEE	ЕНЕС Z4329 в том же О-районе 122, как и Z4328, REPEC LEE-связанный RorfD и <i>S. flexneri</i> ORF122

19	NleF	24	4,7	He-LEE	ЕНЕС Z6020, в том же О-районе 71, как и Z6024. Некоторые сходства с гипотетическими белками в <i>Yersinia pestis</i> и <i>Helicobacter pylori</i>
20	NleG	26	5,8	He-LEE	Идентифицированная пептидная последовательность: QQENAPSS(I/L)QTR. Гомологов в базе данных не найдено

В дополнение к пяти LEE-кодируемым эффекторам, идентифицировали семь не-LEE-кодируемых секретируемых белка, возможно, являющихся эффекторами. Эти секретируемые белки, кодируемые вне LEE, были соответственно обозначены как NleA (p54), NleB, NleC, NleD, NleE, NleF и NleG (QQENAPSS(I/L)QTR; SEQ ID NO: 59) (для не-LEE-кодируемых эффекторов), чтобы отличить их от LEE-кодируемых секретируемых белков/эффекторов (Esp) (таблица 2). Среди семи идентифицированных белков только NleG был уникален для *S. rodentium*, а остальные 6 белков имели постоянно присутствующие гомологи в ЕНЕС O157 (таблица 2). ЕНЕС гомологи кодируются генами, объединенными в трех отдельных районах генома, при этом каждый район кодирует, по меньшей мере, два белка, демонстрирующих гомологию к секретируемым белкам *S. rodentium* (таблица 2). Гены Z6024 и Z6020, кодирующие гомологи NleA и NleF, расположены в ЕНЕС О-районе 71, связанном с профагом CP-933P. Сходным образом, гены Z4328 и Z4329, кодирующие гомологи NleB и NleE, расположены в ЕНЕС О-районе 122, а гены, кодирующие гомологи NleC и NleD (Z0986 и Z0990), расположены в О-районе 36 (таблица 2, Фиг.9). Кроме того, Z4328 (О-район 122) имеет сильную гомологию с Z0985, геном, расположенным после Z0986 в О-районе 36.

Гомологи всех шести новых ЕНЕС эффекторных генов также представлены и сходно организованы в ЕНЕС, последовательность генома которого определена (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/>). Кроме Z6024, демонстрирующего 89% нуклеотидной идентичности гену ЕНЕС, остальные 5 генов ЕНЕС показывают более чем 95% идентичность их гомологам в ЕНЕС. Более того, некоторые из этих эффекторов также постоянно присутствуют в других патогенных бактериях. NleD/Z0990 имеет сходство с эффектором типа III HopPtoH томата *P. syringae* pv. (41, 42). NleE/Z4329 имеет значительную гомологию с RorfD ЕРЕС кролика (РЕРЕС) и Orf212 *S. flexneri* (8, 33), тогда как NleB/Z4328 имеет значительную гомологию с RorfE РЕРЕС и двумя гипотетическими белками *S. typhimurium*. Гены для Z4328 и Z4329 смежно расположены в ЕНЕС, сходно с расположением генов *rorfD* и *rorfE* в РЕРЕС (8). Однако *rorfD* и *rorfE* расположены после LEE в РЕРЕС, тогда как их аналоги в ЕНЕС находятся в районе (О-район 122), отдаленном от LEE. О-район 122 ЕНЕС, несущий Z4328 и Z4329, также содержит гены, кодирующие два цитотоксина, так же, как и гомолог PagC, важный Pho/PhoQ-регулируемый вирулентный фактор *S. enterica* (3, 43). Три О-района в ЕНЕС, которые кодируют новые эффекторы, имеют динуклеотидное смещение и низкое GC% содержание, отличительные особенности PAI (9). Кроме того, они либо ассоциированы с профагом, либо фланкированы мобильными инсерционными последовательностями, и не представлены в геноме не-патогенной *E. coli* (3), позволяя предположить горизонтальный перенос этих генов. В целом, это позволяет предположить важное

значение этих районов и вновь идентифицированных эффекторов *Citrobacter* и ЕНЕС в вирулентности. Это также показывает, что, хотя они отличаются друг от друга, соответствующие патогены поддерживают удивительно постоянный набор PAI, несмотря на различающиеся локализации PAI в бактериальных хромосомах.

Пример 4

Идентификация NleA

Хотя тип III-секреция считается, как правило, контакт-зависимой (46), определенные условия культуры *in vitro* могут побудить ЕНЕС секретировать эффекторы типа III в экстрацеллюлярную среду в процессе роста в жидкой культуре (28, 51). Супернатанты культуры готовили из дикого типа ЕНЕС (wt) и тип III-секретирующего мутанта (*escN*-), выращенного в условиях, индуцирующих тип III-секрецию. Анализ секретированных белков с использованием SDS-PAGE выявил один избыточный белок с большой молекулярной массой, общий для секретированных белков как образцов дикого типа, так и *escN*-, и несколько других избыточных белков, уникальных для образца дикого типа (Фиг.10А). Секретированные белки разделяли 2-мерным электрофорезом и избыточные выделенные белковые пятна извлекали из геля и анализировали масс-спектрометрически (Фиг.10В, Таблица 1).

Таблица 1							
Номер пятна	ID	Значение e	# пептидов	Предсказанная мол. масса (кДа)	Экспериментальная мол. масса (кДа)	Предсказанный pI	Экспериментальный pI
1	EspP	5,60E-4	4	105	95	5,9	6,5
2a	Tir	2,50E-39	14	58	68	5	5
2b	Tir	2,10E-29	10	58	65	5	4,8
3	NleA	7,70E-11	6	48	50	5	5
4a	EspB	8,60E-53	19	33	38	5,1	5,2
4b	EspB	2,00E-06	2	33	38	5,1	5,1
5	EspA	1,30E-37	16	21	18	4,8	5

Пятно № 1, которое присутствовало в супернатантах культур как дикого типа, так и *escN*- идентифицировали как EspP, плазмид-кодируемый белок ЕНЕС, который секретируется по аутотранспортному механизму, независимому от секреции типа III (25). Четыре основных пятна (№ 2, 3, 4, 5) были уникальны для супернатантов дикого типа. Три из этих пятен идентифицировали как известные секретлируемые белки типа III, кодируемые LEE: Tir (пятно № 2), EspB (пятно № 4) и EspA (пятно № 5) (фиг.10В, таблица 1). Пятно № 3 идентифицировали как белок с предсказанной молекулярной массой 48 кДа, кодируемый открытой рамкой считывания генома ЕНЕС, но вне LEE (фиг.10С). Этот белок назвали NleA, для не-LEE-кодируемого эффектора А.

Пример 5

Характеристика локуса, содержащего *nleA*

Ген *nleA* расположен в О-районе: районе генома ЕНЕС, отсутствующего в геноме непатогенного штамма K-12 *E. coli* (3). Район между последним геном, постоянно присутствующим в остоле K12 *E. coli* (*YscIE*), и генами, кодирующими структурные белки фага, содержит несколько фрагментов мнимой транспозазы и один фрагмент мнимой рекомбиназы (фиг.11А). Анализ этого района с помощью Islandpath, программы, созданной для идентификации PAI (13), показывает, что все ORF этого района имеют динуклеотидные смещения и содержание GC, отличные от показателей

генома ЕНЕС. 10 ORF этого района имеют содержание GC, по меньшей мере, на 1 стандартное отклонение ниже показателей генома ЕНЕС, тогда как 2 из 6 ORF имеют содержание GC, по меньшей мере, на 1 стандартное отклонение выше показателей генома ЕНЕС. Взятые вместе, эти результаты позволяют предположить, что *nleA* расположен в PAI, содержащем горизонтально-перемещенные гены. Несколько других ORF этого района имеют свойства, позволяющие предположить их роль в вирулентности, включая мнимый шаперон (Z2565) и два белка, сходных с тип III-секретируемыми белками других патогенов (Z6021, Z6020).

Для дальнейшего исследования природы и распространенности гена *nleA* получали пробы *nleA* и использовали саузерн-блот на панели геномной ДНК других А/Е патогенов и непатогенного штамма *E. coli*. Как показано на фиг.11В, ген *nleA* был представлен во всех исследованных А/Е патогенах, но отсутствовал в непатогенной *E. coli*. Анализ в процессе геномной последовательности ЕРЕС выявил, что *nleA* находится в непосредственной близости от места инсерции фага в геноме ЕРЕС. *nleA* также присутствует в профаге интимин-позитивного, не-O157 ЕНЕС штамма, O84:H4, но отсутствует в непатогенных штаммах *E. coli*, уропатогенной *E. coli*, которые не содержат LEE. *nleA* также отсутствует в других TTSS-содержащих патогенах, таких как *Salmonella* и *Shigella*. Таким образом, *nleA* представляется специфичным компонентом А/Е патогенов. Многочисленные исследования последовательностей гена *nleA* из *S. rodentium*, ЕРЕС, ЕНЕС и O84:H4 выявили высокую степень устойчивости данной последовательности в этих четырех А/Е патогенах (фиг.11С).

Пример 6

NleA секретируется системой секреции LEE-кодируемого типа III

ЕНЕС и ЕРЕС эффекторы LEE-кодируемого TTSS, описанные в настоящее время, кодируются в LEE, в непосредственной близости к генам, кодирующим секрецию самого аппарата. Для определения, зависима ли секреция *NleA* от LEE-кодируемого TTSS, эпитоп-меченную версию *NleA* экспрессировали из плазмиды в дикий тип ЕНЕС и *escN*-штамм, которые являются дефицитными по секреции типа III (47). Как показано на фиг.12А, хотя НА-меченный *NleA* экспрессировали до одинакового уровня в диком типе ЕНЕС и *escN*-ЕНЕС, белок секретиrowался в экстрацеллюлярную среду только бактериями *NleA*-НА-трансформированного дикого типа. DnaK, несекретируемый бактериальный белок, использовали в качестве контроля отсутствия несекретируемых белков в образцах, секретирующих белок (фиг.12В). Tlg секретиrowался неизмененным и *NleA*-НА-трансформированным штаммами дикого типа, но не секретиrowался *escN*-штаммом (фиг.12С), подтверждая ожидавшиеся TTSS фенотипы. Сходные результаты были получены для экспрессии эпитоп-меченного *NleA* в диком типе ЕРЕС и нескольких тип III-секретирующих мутантах ЕРЕС, что показывает, что *NleA* также может секретиrowаться ЕРЕС TTSS.

Пример 7

NleA транслоцируется в реципиентные клетки

При выращивании ЕНЕС в условиях, индуцирующих секрецию типа III, два типа белков секретируются в экстрацеллюлярную среду. Для определения, является ли *NleA* транслотатором или транслоцированным эффектором, мы исследовали секрецию и транслотацию типа III в отсутствие *NleA* путем создания мутантного штамма с делецией. Анализировали профили секретируемых белков штамма дикого типа и $\Delta nleA$ мутантного ЕНЕС штамма. Образец дикого типа содержал избыточный белок с молекулярной массой примерно 50 кДа, который отсутствовал

среди белков, секретированных $\Delta nleA$ (фиг.13А). Анализ вестерн-блота с антисывороткой против NleA продемонстрировал, что 50 кДа NleA был представлен среди белков, секретированных диким типом и отсутствовал в образце $\Delta nleA$ (фиг.13В). Однако, за исключением присутствия или отсутствия NleA, профили секретируемых белков штаммов дикого типа и $\Delta nleA$ были идентичными (фиг.13А). Таким образом, NleA не требуется для секреции других тип III-секретируемых эффекторов. Для определения, является ли NleA необходимым для транслокации других тип III эффекторов в клетки реципиента, клетки HeLa инфицировали диким типом ЕНЕС и ЕНЕС $\Delta nleA$ и наблюдали транслокацию и функционирование Tlg с использованием иммуофлюоресцентного окрашивания инфицированных клеток. Формирование ложа диким типом ЕНЕС и мутантом $\Delta nleA$ изучали, подвергая инфицированные клетки иммуофлюоресценции с анти-ЕНЕС и анти-Tlg антителами и наблюдая филаменты актина с использованием фаллоидина. Результаты показали, что ЕНЕС $\Delta nleA$ адгезировались к клеткам HeLa на одинаковом уровне с диким типом ЕНЕС. Иммуофлюоресцентное окрашивание показало, что Tlg был транслоцирован в реципиентные клетки и сосредоточен под инфекционными бактериями, как в штамме дикого типа, так и в штамме $\Delta nleA$ ЕНЕС. Для подтверждения функциональной транслокации Tlg инфицированные клетки окрашивали флюоресцентным фаллоидином для визуализации полимеризованного актина, вовлеченного в формирование ложа под адгезированными бактериями. В клетках, инфицированных как диким типом, так и $\Delta nleA$ ЕНЕС, актиновые ложа были свидетельством того, что транслокация и функционирование других эффекторов типа III могут происходить в отсутствие NleA. Эти результаты также показывают, что NleA не требуется для формирования ложа.

Так как NleA не играет роли в секреции или транслокации других эффекторов, исследовали, транслоцируется ли сам NleA. Клетки HeLa инфицировали в течение 6 часов диким типом или *escN*-ЕНЕС, экспрессирующими НА-меченный NleA и подвергали субклеточному фракционированию и анализу вестерн-блота с анти-НА антителами. Как показано на фиг.14А, NleA транслоцируется в реципиентные клетки, где связывается с мембранной фракцией реципиентных клеток. Транслокация NleA не наблюдалась в процессе инфицирования клеток тип III секретирующим мутантом, экспрессирующим НА-меченный NleA, что означает, что транслокация NleA и связывание с мембраной реципиента являются TTSS-зависимыми. Анализ вестерн-блота фракций с антителами к белкам, специфичным для каждой фракции, подтвердил отсутствие перекрестной контаминации фракций. Кальнексин, интегральный мембранный белок реципиентных клеток, отсутствовал в цитоплазматической фракции, а тубулин, цитоплазматический белок реципиентных клеток, отсутствовал в мембранной фракции реципиентных клеток. DnaK, несекретируемый бактериальный белок, присутствовал только в низкоскоростном осадке, демонстрируя отсутствие бактериальной контаминации мембран реципиента и цитозольных фракций. NleA и DnaK отсутствовали в низкоскоростном осадке в тип III мутант-инфицированных клетках, в связи с зависимостью типа III от адгезии ЕНЕС. Для подтверждения неожиданного отсутствия NleA тип III мутант-инфицированных образцах, в связи с зависимостью типа III от адгезии ЕНЕС, проводили сходные эксперименты, экспрессируя и вводя NleA-НА с помощью дикого типа и тип III мутанта ЕРЕС, так как адгезия ЕРЕС к клеткам HeLa не зависит от тип III секреции. NleA присутствовал в мембранной фракции клеток, инфицированных диким типом, но не штаммом тип III мутанта ЕРЕС. И NleA, и DnaK

присутствовали в низкоскоростных осадочных фракциях клеток, инфицированных диким типом и тип III мутантом ЕРЕС.

Для изучения природы связывания NleA с мембранами реципиентных клеток мембранные фракции инфицированных реципиентных клеток, содержащие НА-меченный NleA, экстрагировали на льду, при определенных условиях, и рецентрифугировали для получения растворимых и нерастворимых мембранных фракций (фиг.14В). Эти фракции были подвергнуты анализу вестерн-блота с анти-НА антителами для определения НА-меченного NleA. Обработкой высшей солью (1М NaCl) или щелочным рН (0,2 мМ Na₂CO₃, рН 11,4) удаляли белки, которые периферийно связаны с мембранами электростатическими или гидрофильными взаимодействиями соответственно. Связь NleA с мембранами реципиентных клеток выдерживала разрушение такой обработкой (фиг.14В, верхняя панель), так же, как и кальнексин, интегральный мембранный белок (фиг.14В, средняя панель). Напротив, значительное количество кальретикулина, периферийного мембранного белка, была удалена из мембранной фракции в процессе обработки, как высшей солью, так и щелочным рН (фиг.14В, нижняя панель). Обработка мембранных фракций неионным детергентом Triton X-100, который растворяет интегральные мембранные белки, такие как кальнексин (фиг.14В, средняя панель), почти полностью растворила NleA, в результате чего НА-меченный NleA белок перешел из нерастворимой фракции в растворимую (фиг.14В, верхняя панель). Эти результаты показывают, что NleA транслоцируется в реципиентные клетки, где ведет себя как интегральный мембранный белок. Действительно, анализ последовательности белка NleA несколькими программами предсказания трансмембранных доменов предсказал один или два мнимых трансмембранных домена в этой последовательности (фиг.11С).

Пример 8

NleA локализуется в комплексе Гольджи реципиента

Затем определяли субклеточную локализацию NleA в реципиентных клетках. Клетки HeLa инфицировали диким типом ЕНЕС или ЕНЕС Δ nleA и подвергали иммунофлюоресценции с антителами против NleA и маннозидазы II. Некоторые образцы обрабатывали брэфелдином А в течение 30 минут перед фиксацией.

Проводили двухцветное слоистое окрашивание NleA и маннозидазы II. Клетки HeLa трансфицировали экспрессирующей конструкцией, кодирующей белок слияния GFP-NleA, и подвергали иммунофлюоресценции с антителами против маннозидазы II.

Иммунофлюоресцентное окрашивание клеток HeLa, инфицированных диким типом ЕНЕС, с использованием анти-NleA антител, приводило к образованию перинуклеарных частиц красителя, которые отсутствовали в клетках, инфицированных ЕНЕС Δ nleA или в не инфицированных клетках. Эти частицы не были похожи на окрашивание, получаемое с маркерами для поздних эндосом, лизосом, ER, митохондрий или ядер. Однако очень похожие частицы красителя наблюдались, когда клетки докрашивали с анти-NleA и антителами к маркерам комплекса Гольджи, включая маннозидазу II, где два белка были локализованы рядом. Для подтверждения локализации NleA в комплексе Гольджи инфицированные клетки инкубировали с брэфелдином А, грибковым метаболитом, разрушающим структуру комплекса Гольджи (27), перед фиксацией и иммунофлюоресценцией. Обработка брэфелдином А вызывала диффузию окрашивания маннозидазы II и NleA, как и ожидалось для белков, локализованных в комплексе Гольджи. Солокализацию NleA наблюдали с несколькими другими маркерами для комплекса

Гольджи, а также наблюдали локализацию в комплексе Гольджи в экспериментах, исследовавших эпитоп-меченный NleA, окрашенный антителами к метке, связывавшими как НА, так и FLAG эпитопные метки. Для определения, требует ли локализация NleA в комплексе Гольджи других бактериальных факторов или является собственным свойством NleA, клетки трансфицировали экспрессирующей конструкцией, кодирующей белок слияния GFP-NleA. Трансфицированный NleA GFP также располагается в комплексе Гольджи, где перекрывается с окрашиванием маннозидазы II.

Таким образом, наши результаты показывают, что NleA локализуется в комплексе Гольджи. Наблюдение, что трансфицированный белок слияния GFP-NleA локализуется в комплексе Гольджи, позволяет предположить, что белок NleA содержит информацию, нацеленную на комплекс Гольджи, и не нуждается в других бактериальных факторах для его достижения. NleA, введенный в бактерии, также локализуется в комплексе Гольджи.

Пример 9

NleA необходим для вирулентности

Высокая степень устойчивости последовательности NleA в A/E патогенах (фиг.11С) позволяет предположить, что NleA играет схожую роль в инфекции. *S. rodentium* является естественным патогеном у мышей (53) и используется как модельная система для изучения A/E патогенеза. Для чувствительных линий инфекция *S. rodentium* является фатальной и, как правило, вызывает смерть инфицированных мышей между 6 и 10 днем заражения (54). Более устойчивые линии мышей не умирают от инфекции *S. rodentium*, но подвергаются колонизации с развитием кишечного воспаления и гиперплазии толстого кишечника (54).

Для определения роли NleA в вирулентности создали штамм *S. rodentium* с делецией *nleA* и подтвердили отсутствие NleA с помощью вестерн-блота общих бактериальных экстрактов с NleA антисывороткой (фиг.16А). Мышей инфицировали равными количествами бактерий дикого типа или Δ nleA через желудочный зонд. У мышей СЗН-HeJ, чувствительных к *S. rodentium*, NleA был абсолютно необходим для вирулентности. Все мыши СЗН-HeJ, инфицированные диким типом *S. rodentium*, умерли между 6 и 10 днем заражения (n=9), тогда как все Δ nleA-инфицированные мыши (n=13) показали некоторые легкие симптомы заболевания, такие как жидкий стул, но по-прежнему прибавляли в весе, были активны в продолжение инфекции и все выжили (фиг.16В). Более того, Δ nleA-инфицированные мыши были устойчивы к последующему заражению диким типом *S. rodentium* (n=5, фиг.16В). Таким образом, хотя штамм Δ nleA не является патогенным для чувствительных мышей, он взаимодействует с реципиентом в достаточной мере для стимуляции защитного иммунитета.

В отличие от мышей СЗН-HeJ, инфекция *S. rodentium* не является летальной для аутбредных швейцарских мышей NIH. У этих мышей колонизация *S. rodentium* толстой кишки ведет к воспалению кишечника, гиперплазии толстого кишечника и слабым симптомам диареи. Швейцарских мышей NIH инфицировали диким типом *S. rodentium* или штаммом Δ nleA и усыпляли на 10 день заражения. Мыши, инфицированные штаммом Δ nleA, имели в толстом кишечнике на 10 день, в среднем, титр *S. rodentium* в 20 раз ниже (фиг.16С).

Гистологический анализ толстого кишечника инфицированных швейцарских мышей NIH проводили путем инфицирования мышей диким типом *S. rodentium* или штаммом Δ nleA и усыпления на 10 день заражения. Последние 0,5 см толстой кишки

инфицированных мышей фиксировали в 10% нейтральном буферном формалине, обрабатывали, делали срезы по 3 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Тканевые срезы всех мышей изучали и фотографировали с использованием объективов 5X и 63X. Результаты показывают, что в гистологических анализах биопсий, взятых из анального края инфицированных мышей, обнаружено большое количество бактерий в тканях, инфицированных диким типом, и незначительное число бактерий в образцах, инфицированных $\Delta nleA$. Все животные, инфицированные диким типом *S. rodentium*, демонстрировали патологические знаки гиперплазии толстого кишечника, тогда как мыши, инфицированные $\Delta nleA$, не имели признаков гиперплазии. Образцы, инфицированные диким типом, демонстрировали выраженное воспаление и гиперплазию, до степени, когда исчезал просвет кишечника и внешний мышечный слой был визуально растянут для вмещения увеличенного объема эпителия. Напротив, $\Delta nleA$ -инфицированные образцы демонстрировали относительно нормальную гистологию. Относительная выраженность кишечного воспаления и гиперплазии также проявлялась в различии веса толстого кишечника, ко времени усыпления, в двух группах мышей (фиг.16D). Мыши, инфицированные диким типом, имели также увеличенную селезенку, по сравнению с $\Delta nleA$ -инфицированными мышами, что проявлялось в увеличении веса селезенки.

Таким образом, продемонстрировали выраженное воздействие *NleA* на вирулентность на мышинной модели заболевания. У чувствительных мышей присутствие функционирующего *NleA* в *S. rodentium* ведет к летальной инфекции в течение 10 дней. Мыши, инфицированные штаммом, дефицитным по *NleA*, показывают незначительные симптомы и обязательно выживают после инфекции. У более устойчивых мышинных линий, где инфекция *S. rodentium* не является летальной, *NleA* необходим для развития гиперплазии толстого кишечника, и на 10 день инфекции меньшее количество бактерий с $\Delta nleA$ мутантом присутствует в кишечнике реципиента. Эти исследования показывают явное участие *NleA* в вирулентности *S. rodentium*. Эти результаты ЕНЕС инфицирования клеток HeLa продемонстрировали, что *in vitro* *NleA* не снижает адгезию бактерий на реципиентных клетках или транслокацию других эффекторов, позволяя предположить, что *NleA* может действовать на уровне затруднения процесса выведения у клетки-реципиента, а не увеличения бактериальной адгезии. Более того, устойчивость $\Delta nleA$ -инфицированных мышей к последующему заражению диким типом *S. rodentium* доказывает, что колонизации штаммом *nle* мутанта и его взаимодействия с реципиентом достаточно для стимуляции иммунитета реципиента. Это отличает его от тип III-мутантов *S. rodentium*, которые не колонизируют реципиента и не создают защиты от последующего заражения. Таким образом, *nleA* мутантные штаммы могут использоваться как ослабленные штаммы вакцины.

Следующие публикации включены сюда в качестве ссылки.

5 1. Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic
Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.

10 2. Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan,
G., Kaper, J.B., and Knutton, S. (1998) Enteropathogenic and
enterohaemorrhagic Escherichia coli: more subversive elements.
15 *Mol Microbiol* 30: 911-921.

20 3. Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B.,
Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor,
J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S.,
Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W.,
25 Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K.D., Apodaca, J.,
Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch,
R.A., and Blattner, F.R. (2001) Genome sequence of
30 enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Nature* 409: 529-
533.

35 4. Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K.,
Jarvis, K.G., Deng, Y.K., Lai, L.C., McNamara, B.P.,
Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1998) The complete sequence
40 of the locus of enterocyte effacement (LEE) from
enteropathogenic Escherichia coli E2348/69. *Mol Microbiol* 28:
1-4.

45 5. Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S.,

Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Blattner, F.R. (1998)
Molecular evolution of a pathogenicity island from
5 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 66:
3810-3817.

6. Zhu, C., Agin, T.S., Elliott, S.J., Johnson, L.A.,
10 Thate, T.E., Kaper, J.B., and Boedeker, E.C. (2001) Complete
nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte
Effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1.
15 *Infect Immun* 69: 2107-2115.

7. Deng, W., Li, Y., Vallance, B.A., and Finlay, B.B.
20 (2001) Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter*
rodentium: sequence analysis and evidence for horizontal
transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun*
25 69: 6323-6335.

8. Tauschek, M., Strugnell, R.A., and Robins-Browne, R.M.
30 (2002) Characterization and evidence of mobilization of the
LEE pathogenicity island of rabbit-specific strains of
enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 44: 1533-
35 1550.

9. Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity
40 islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:
641-679.

10. G.R. Cornelis, *J. Cell. Biol.* 158, 401 (2002).

45 11. S. Gruenheid, B. B. Finlay, *Nature* 422, 775 (2003).

12. I. Chernushevich, A. Loboda, B. Thomson, *J. Mass*
Spectrom. 36, 849 (2001).

50 13. Hsiao, W., Wan, I., Jones, S.J., and Brinkman, F.S.

(2003) IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. *Bioinformatics* 19: 418-420.

5 14. Edwards, R.A., Keller, L.H., and Schifferli, D.M. (1998) Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene* 207: 149-157.

10 15. V. Sperandio, J.L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, J.B. Kaper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15196 (1999).

15 16. J.L. Mellies, S.J. Elliott, V. Sperandio, M.S. Donnenberg, J.B. Kaper, *Mol. Microbiol.* 33, 296 (1999).

20 17. K.A. Datsenko, B.L. Wanner, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 6640 (2000).

18. A. Abe et al., *Mol. Microbiol.* 33, 1162 (1999).

25 19. S.J. Elliott et al., *Mol Microbiol.* 33, 1176 (1999).

30 20. Vallance, B.A., Deng, W., De Grado, M., Chan, C., Jacobson, K., and Finlay, B.B. (2002b) Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* in infected mice. *Infect Immun* 70: 6424-6435.

35 21. V.H. Bustamante, F.J. Santana, E. Calva, J.L. Puente, *Mol. Microbiol.* 39, 664 (2001).

40 22. J.L. Puente, D. Bieber, S.W. Ramer, W. Murray, G.K. Schoolnik, *Mol. Microbiol.* 20, 87 (1996).

45 23. T. Houthaeve, H. Gausepohl, M. Mann, K. Ashman, *FEBS Lett.* 376, 91 (1995).

24. Z. Ziegler, *Anal. Chem.* 74, 489A (2002).

50 25. Brunder, W., Schmidt, H., and Karch, H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic

Escherichia coli O157:H7 cleaves human coagulation factor V.
Mol Microbiol 24: 767-778.

5 26. Buchet, A., Nasser, W., Eichler, K., and Mandrand-Berthelot, M.A. (1999) Positive co-regulation of the
Escherichia coli carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP
10 and the CaiF activator. *Mol Microbiol* 34: 562-575.

27. Chardin, P., and McCormick, F. (1999) Brefeldin A:
15 the advantage of being uncompetitive. *Cell* 97: 153-155.

28. DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A.,
Ruschkowski, S., and Finlay, B.B. (1999) Enterohemorrhagic
20 *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated
to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated.
25 *Infect Immun* 67: 2389-2398.

29. Sonnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1991) Construction
of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli*
30 by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 59:
4310-4317.

30. Gauthier, A., de Grado, M., and Finlay, B.B. (2000)
35 Mechanical fractionation reveals structural requirements for
enteropathogenic *Escherichia coli* Tir insertion into host
40 membranes. *Infect Immun* 68: 4344-4348.

31. Goosney, D.L., DeVinney, R., and Finlay, B.B. (2001)
Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to
45 enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*
pedestals. *Infect Immun* 69: 3315-3322.

32. Griffin, P.M., Ostroff, S.M., Tauxe, R.V., Greene,
50 K.D., Wells, J.G., Lewis, J.H., and Blake, P.A. (1988)

Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections.
A broad clinical spectrum. *Ann Intern Med* 109: 705-712.

5 33. C. Buchrieser et al., *Mol. Microbiol.* 38, 760 (2000).

34. Galan, J.E. (2001) Salmonella interactions with host
cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:
10 53-86.

35. Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J.,
Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997) Enteropathogenic *E. coli*
15 (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into
mammalian cells. *Cell* 91: 511-520.

36. Elliott, S.J., Krejany, E.O., Mellies, J.L., Robins-
20 Browne, R.M., Sasakawa, C., and Kaper, J.B. (2001) EspG, a
novel type III system-secreted protein from enteropathogenic
Escherichia coli with similarities to VirA of *Shigella*
25 *flexneri*. *Infect Immun* 69: 4027-4033.

37. Kenny, B., and Jepson, M. (2000) Targeting of an
enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to
30 host mitochondria. *Cell Microbiol* 2: 579-590.

38. McNamara, B.P., Koutsouris, A., O'Connell, C.B.,
Nougayrede, J.P., Sonnenberg, M.S., and Hecht, G. (2001)
35 Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia*
coli disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest*
107: 621-629.
40

39. O. Marches et al., *Infect. Immun.* 68, 2171 (2000).

40. Tu, X., Nisan, I., Yona, C., Hanski, E., and
45 Rosenshine, I. (2003) EspH, a new cytoskeleton-modulating
effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic

50

Escherichia coli. *Mol Microbiol* 47: 595-606.

41. D.S. Guttman et al., *Science* 295, 1722 (2002).

5 42. T. Petnicki-Ocwieja et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7652 (2002).

10 43. S.I. Miller, A.M. Kukral, J.J. Mekalanos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5054 (1989).

15 44. Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G.D., Pawson, T., and Finlay, B.B. (2001) Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nek to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* 3: 856-859.

20 45. Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

25 46. Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433.

30 47. Jarvis, K.G., and Kaper, J.B. (1996) Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* 64: 4826-4829.

40 48. Kenny, B., Ellis, S., Leard, A.D., Warawa, J., Mellor, H., and Jepson, M.A. (2002) Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol* 44: 1095-1107.

50 49. Knodler, L.A., Vallance, B.A., Hensel, M., Jackel, D., Finlay, B.B., and Steele-Mortimer, O. (2003) *Salmonella*

type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Mol Microbiol* 49: 685-704.

50. Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R., and Sotman, S. (1978) *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* 1: 1119-1122.

51. Li, Y., Frey, E., Mackenzie, A.M., and Finlay, B.B. (2000) Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. *Infect Immun* 68: 5090-5095.

52. Peeters, J.E., Geeroms, R., and Orskov, F. (1988) Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infect Immun* 56: 1442-1448.

53. Schauer, D.B., and Falkow, S. (1993) The eae gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun* 61: 4654-4661.

54. Vallance, B.A., Deng, W., Jacobson, K., and Finlay, B.B. (2003) Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 71: 3443-3453.

55. Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A., Mimuro, H., Suzuki, T., and Sasakawa, C. (2002) *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization,

which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *Embo J* 21: 2923-2935.

5 56. Deng, W., Vallance, B.A., Li, Y., Puente, J.L., and Finlay, B.B. (2003) *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for
10 actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol Microbiol* 48: 95-115.

15 57. "Remington's Pharmaceutical Sciences" (19th edition), ed. A. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

58. Abe, A., U. Heczko, R. Hegele, and B. Finlay. 1998.
20 Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. *Journal of Experimental Medicine* 188: 1907-1916.

25 59. *Adv. DrugDeliv. Rev.* 5 (3): 163-187 (1990).

60. Altschul, S.F. 1991. "Amino acid substitution
30 matrices from an information theoretic perspective." *Journal of Molecular Biology*, 219: 555-665.

61. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular*
35 *Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1998.

62. Babiuk et al. (1986) *Virology* 159: 57-66).

40 63. Beuzon, C.R., and D.W. Holden. 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions *in vivo*. *Microbes Infect* 3:1345-52.

45 64. Brown D, et al. (2002) *TechNotes* 9: 3-5.

65. Brummelkamp TR, et al. (2002) *Science* 296: 550-553.

50 66. Canil, C., I. Rosenshine, S. Ruschkowski, M.S. Donnenberg, J.B. Kaper, and B.B. Finlay. 1993.

Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infect Immun* 61: 2755-62.

67. Caplen NJ, et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9746-9747.

68. *Clin. Exp. Immunol.* 78 (2): 256-262 (1989).

69. *Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (P.H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987.

70. Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Orcutt, B.C. 1978. "A model of evolutionary change in proteins." In "Atlas of Protein Sequence and Structure" 5(3) M.O. Dayhoff (ed.), 345-352, National Biomedical Research Foundation, Washington.

71. Eisenberg et al. (*J. Mol. Bio.* 179: 125-142, 184.

72. Elder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97: 2999.

73. *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, NJ.

74. Fey et al., *Emerg. Infect. Dis.* (2000) Volume 6.

75. Gall, D. (1966) *Immunology* 11: 369-386.

76. Geysen et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998-4002.

77. Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23: 709-715.

78. Hammerling et al., In *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., 1981.

79. Hammond SM, et al. (2001) *Nature Rev Gen* 2: 110-119.

80. Hauf, N., and T. Chakraborty. 2003. Suppression of

NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression
by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Immunol* 170:
5 2074-82.

81. Hopp et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1981) 78:
3824-3828.

10 82. *Immunology* 58 (2): 245-250 (1986).

83. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 68 (3): 201-208
15 (1982).

84. *J Immunol. Methods* 97 (2): 159-164 (1987).

85. *J. Controlled Release* 7: 123-132 (1988).

20 86. Karlin, S. and Altschul, S.F. 1990. "Methods for
assessing the statistical significance of molecular sequence
features by using general scoring schemes" *Proc. Natl. Acad.*
25 *Sci. USA.* 87: 2264-2268.

87. Knodler, L.A., J. Celli, W.D. Hardt, B.A. Vallance,
30 C. Yip, and B.B. Finlay. 2002. *Salmonella* effectors within a
single pathogenicity island are differentially expressed and
translocated by separate type III secretion systems. *Mol*
35 *Microbiol* 43: 1089-103.

88. *Kodak Laboratory Chemicals Bulletin* 56 (1): 1-5
40 (1986).

89. Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6: 292, 1976

90. Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6: 511, 1976.

45 91. Kohler et al., *Nature* 256: 495, 1975.

92. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157: 105-132).

93. Lee NS, et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20: 500-505.

50 94. M.S. Johnson and J.P. Overington. 1993. "A Structural

Basis of Sequence Comparisons: An evaluation of scoring methodologies." *Journal of Molecular Biology*. 233: 716-738.

5 95. Miyagishi M, and Taira K. (2002) *Nature Biotechnol*.
20: 497-500.

96. Myers and Miller, *CABIOS*, 1989, 4: 11-17.

10 97. Naylor, S.W., J.C. Low, T.E. Besser, A. Mahajan, G.J.
Gunn, M.C. Pearce, I.J. McKendrick, D.G. Smith, and D.L.
15 Gaily. 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal
rectum is the principal site of colonization of
enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host.
20 *Infect Immun* 71: 1505-12

98. Paddison PJ, et al. (2002). *Genes & Dev*. 16: 948-958.

25 99. Paul CP, et al. (2002) *Nature Biotechnol* 20: 505-508.

100. Schijns et al., *Curr. Opin. Immunol*. (2000) 12: 456.

101. Sharp PA. (2001) *Genes Dev* 15: 485-490.

30 102. States, D.J., Gish, W., Altschul, S.F. 1991.
"Improved Sensitivity of Nucleic Acid Database Search Using
Application-Specific Scoring Matrices" *Methods: A companion to*
35 *Methods in Enzymology* 3(1): 66-77.

103. Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff. 1992 "Amino
40 acid substitution matrices from protein blocks." *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA. 89 (biochemistry): 10915-10919.

104. Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff. 1993.
45 "Performance Evaluation of Amino Acid Substitution Matrices."
Proteins: Structure, Function, and Genetics. 17: 49-61.

105. Sui G, et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:
50 5515-5520.

106. Vallance, B.A., W. Deng, L.A. Knodler, and B.B. Finlay. 2002. Mice lacking T and B lymphocytes develop transient colitis and crypt hyperplasia yet suffer impaired bacterial clearance during *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun* 70: 2070-81

107. Van Donkersgoed et al., *Can. Vet. J.* (1999) 40: 332.

108. Van Donkersgoed et al., *Can. Vet. J.* (2001) 42: 714.

109. Yu J-Y, et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6047-6052.

10. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

111. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1994.

112. Vaughan et al., *Nature Biotech* 14: 309-314, 1996.

113. Larsson A et al Chicken antibodies: taking advantage of evolution—a review. *Poult Sci.* 1993 Oct; 72 (10): 1807-12.

114. Alymova IV, Kodihalli S, Govorkova EA, Fanget B, Gerdil C, Webster RG. Immunogenicity and protective efficacy in mice of influenza B virus vaccines grown in mammalian cells or embryonated chicken eggs. *J Virol.* 1998 May; 72 (5): 4472-7.

115. O'Farrelly C, Branton D, Wanke CA. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. *Infect Immun.* 1992 Jul; 60(7): 2593-7.

116. Romito M, Viljoen GJ, Du Plessis DH. Eliciting antigen-specific egg-yolk IgY with naked DNA. Biotechniques. 2001 Sep; 31 (3): 670, 672, 674-5.

117. Yokoyama H, Umeda K, Peralta RC, Hashi T, Icatlo FC Jr, Kuroki M, Ikemori Y, Kodama Y. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg-yolk antibodies specific for Salmonella enteritidis and S. typhimurium. Vaccine. 1998 Feb; 16 (4): 388-93.

Другие варианты осуществления

Хотя здесь описаны различные варианты осуществления, многие адаптации и модификации могут быть сделаны в пределах объема изобретения в соответствии с общими знаниями специалистов в данной области. Такие модификации включают в себя замены известных эквивалентов любого аспекта изобретения для достижения того же результата, по существу, тем же путем.

Применяемые здесь инвентарные номера относятся к инвентарным номерам многих баз данных, включая GenBank, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), DNA Database of Japan (DDBJ) или Genome Sequence Data Base (GSDB), для нуклеотидных последовательностей, и включая Protein Information Resource (PIR), SWISSPROT, Protein Research Foundation (PRF) и Protein Data Bank (PDB) (последовательности для разрешенных структур), а также к результатам трансляции из аннотированных кодирующих областей в GenBank, EMBL, DDBJ или RefSeq, для полипептидных последовательностей. Численные интервалы включают числа, определяющие интервал. В спецификации слово «включающий» применяется в качестве неограниченного термина, по существу эквивалентного выражению «включающий в качестве неограничивающих примеров», и выражение «включает» имеет соответствующее значение. Цитирование приведенных здесь ссылок не подразумевает допущения, что такие ссылки представляют собой предшествующий по отношению к настоящему изобретению уровень техники.

Все публикации включены в данное описание в качестве ссылки так, как если бы каждая отдельная публикация была конкретно и отдельно указана как включенная в данное описание в качестве ссылки и была бы полностью приведена в данном описании. Изобретение относится ко всем вариантам осуществления и вариациям, по существу описанным здесь и выше, со ссылкой на примеры и чертежи.

Формула изобретения

1. Композиция вакцины для индукции иммунного ответа против А/Е-патогена у животных, содержащая:

а) полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности SEQ ID NO:22-24, или ее иммуногенный фрагмент, и/или

б) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности SEQ ID NO:22-24, или ее иммуногенный фрагмент, и/или

с) молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, по существу идентичную последовательности SEQ ID NO:1-3, или ее иммуногенный фрагмент, и/или

5 д) супернатант клеточной культуры, который содержит рекомбинантный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности SEQ ID NO:22-24, или ее иммуногенный фрагмент, и/или

10 е) бактерию или ее препарат, причем бактерия содержит мутацию в бактериальном геноме в нуклеотидной последовательности, которая по существу идентична SEQ ID NO:1-3, и причем мутация приводит к ослаблению вирулентности; и/или

15 ф) бактерию или ее препарат, причем бактерия содержит делецию в гене, по существу идентичном *pleA*, причем делеция приводит к ослаблению вирулентности, в сочетании с физиологически приемлемым носителем.

2. Композиция по п.1, в которой полипептид составляет 20% клеточного белка, присутствующего в композиции, содержащей супернатант клеточной культуры.

3. Композиция по п.1, дополнительно содержащая *EspA*, *EspB*, *EspD*, *EspP*, *Tir*, шигатоксин 1, шигатоксин 2 или полипептид интимин.

20 4. Композиция по п.1, в которой бактерия представляет собой энтерогеморрагическую *E.coli* (ЕНЕС), энтеропатогенную *E.coli* (ЕРЕС) или *Citrobacter rodentium*.

5. Композиция по п.4, в которой ЕНЕС представляет собой ЕНЕС O157:H7 или ЕНЕС O157:NM; или ЕРЕС представляет собой ЕРЕС O127:H6.

6. Композиция по п.1, в которой бактерия является живой и составлена в рецептуру для перорального введения.

7. Композиция по п.1, в которой бактерия является убитой и составлена в рецептуру для парентерального введения.

8. Композиция по п.1, дополнительно содержащая адъювант.

9. Композиция по п.8, в которой адъювант представляет собой эмульсию «масло-в-воде» или эмульсию, не представляющую собой «масло-в-воде».

35 10. Композиция по п.9, в которой эмульсия «масло-в-воде» представляет собой EMULSIGEN™ или EMULSIGEN PLUS™.

11. Композиция по п.8, в которой адъювант представляет собой минеральное масло или диметилдиоктадециламмония бромид или содержит и минеральное масло, и диметилдиоктадециламмония бромид.

40 12. Композиция по п.8, в которой адъювант включает один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из эмульгирующего средства, мурамилдипептида, средства на водной основе, средства, основанного на хитозане, сапонина, масла, липополисахарида, экстракта бактериальной клеточной стенки, бактериальной ДНК, бактериального комплекса, синтетического олигонуклеотида и алифатического азотистого основания.

13. Композиция по п.12, в которой масло представляет собой Amphigen®.

14. Композиция по п.8, в которой адъювант включает экстракт клеточной стенки микобактерии, ДНК микобактерии или комплекс клеточной стенки микобактерии.

50 15. Композиция по п.8, в которой адъювант присутствует в композиции в концентрации от 20% до 40% (об./об.).

16. Способ ослабления вирулентности А/Е-патогена, включающий делетирование гена *pleA* в А/Е-патогене или делетирование одной или более нуклеотидных

последовательностей в геноме A/E-патогена, в котором нуклеотидная последовательность выбрана из SEQ ID NO:1-3.

17. Рекомбинантный вирулентный полипептид для получения композиции по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательностям SEQ ID NO:22-24.

18. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты для получения композиции по п.1, кодирующая вирулентный полипептид, содержащая нуклеотидную последовательность, по существу идентичную последовательностям SEQ ID NO:1-3.

19. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.18, встроенная в вектор.

20. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.19, где указанный вектор встроен в клетку-хозяина.

21. Композиция по п.1, где животное представляет собой жвачное животное.

22. Композиция по п.21, где жвачное животное представляет собой корову или овцу.

23. Композиция по п.1, где аминокислотная последовательность по меньшей мере на 75% идентична последовательности SEQ ID NO:22-24.

24. Композиция по п.1, где нуклеотидная последовательность гибридизуется в условиях высокой жесткости с последовательностью SEQ ID NO:1-3.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA, et al.
- <120> БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ
- <130> 80021-735
- <140> NOT YET ASSIGNED
- <141> 2004-10-29
- <150> US 60/515,703
- <151> 2003-10-31
- <160> 84
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 1293
- <212> ДНК
- <213> *Citrobacter rodentium*

<400> 1

atgaacattc	aaccgaacat	acattccgga	atcaccacac	agaataatca	acaacatcat	60
cacgcagaac	aagtgcctgt	ctctagctca	ataccgcgat	cagatttacc	tccaaattgc	120
gaagctggat	ttgttggtgca	tattccagag	gatatacagc	aacatgtacc	ggaatgtggt	180
gaaacaacgg	ctctattaag	cttgataaaa	gatgaaggcc	tgctctcagg	actagataaa	240
tatcttgctc	ctcaccttga	agaaggctcc	cttgggaaaa	aagcattgga	tacgtttggt	300
ttattcaatg	ttactcaaat	ggcattagag	ataccagtt	ccgttccagg	catatctggt	360
aaatatggtg	ttcagatgaa	cattgtaaaa	ccagacatac	atccaacaac	cgggaaactat	420
tttttacagc	tatttcctct	gcattgacga	ataggtttta	acttcaaaga	tcttcctggc	480
ccattaaaaa	atgcattaac	caacagcagt	atctcggcta	ctgcacgcac	tgtagccccc	540
acaccaaacg	acccaatgcc	atggtttgga	ttaaactgtc	aagtggttcg	taatcatggt	600
gtagaacttc	ctatagtcaa	aaccgaaaat	ggatggaagc	ttgtagggga	aacacctctt	660
actccagatg	gccccaaaag	caattatacg	gaagaatggg	ttatcaggcc	gggagaagca	720
gattttaaat	atggaacatc	gccattacag	gcaactcttg	gactggagtt	tgggtgcgcat	780
tttaagtggg	atttagataa	tcctaatacc	aaatatgcc	tccttaccaa	tgctgccgca	840
aatgctattg	tgctgctgg	agggtttgcg	gtatccaaag	tccccggcat	agatccaatg	900
ctgtcccttc	atgtcgggtg	aatgcttggg	caagcagcgg	ggcatgccgt	acaatgtaat	960
acccccggat	taaagccaga	cactatttta	tggtgggcag	gcgcgacatt	tggagctgct	1020
gatttaataa	aagccgaatt	tgataaagtg	cggttcactg	actaccctcg	tatatggttc	1080
catgcacggg	aaggagcttt	attcccaa	aagcaagaca	ttgcccgtgt	aacaggcgca	1140
gacataaaag	ctatggaaga	aggcgtaccc	gttgacatc	aacatccaaa	accggaggat	1200
gtggctcatc	atatcgaagg	tggcaattca	ccacatcata	atccatcaaa	ttatgttgac	1260
acctttgaaa	taatccaaga	aacaagggtc	taa			1293

- <210> 2
- <211> 1323
- <212> ДНК
- <213> Энтеропатогенная *E. coli*

<400> 2

atgaacattc	aaccgategt	aacatccgga	atcaccacac	aaaacaatcg	acatcatcac	60
gcagaacaaa	cgccccctac	acaaataccg	caatccgaat	tacctaatgg	atgcgaaacg	120
ggatttggtg	ttcatatccc	agaggatatg	cagcgacatg	caccggaatg	cggtgaaaca	180
acagctctac	tgagcttgat	aaaagatgaa	ggctgctctc	ctgggctgga	taaatatctt	240
gcacctcatc	ttgaagaagg	ctctgcagga	aaaaaagcat	tggatatggt	tggtttatct	300
aatgtctctc	agatggcatt	agaaataccc	agcaccgttc	cggttatctc	tggtaaatat	360
ggtgtccagc	taaacattgt	aaaaccagat	attcatccta	catcaggtaa	ttatttttta	420
cagatattcc	ctttgcatga	tgaaataggt	attaatttta	aagaccttcc	tgggtccatta	480
aaaaatgcat	taagcaacag	caatatacca	accactgtat	cgactgctgc	atccactatt	540
gcatcagcca	ctacttcgac	ggtaaccacc	gcgtcaaaaag	acccaatacc	atgggttggg	600
ttaacagctc	aagtagttcg	taatcatggt	gtggaaacttc	ctatagtcaa	aactgaaaat	660

ggatggaagc	ttgttgga	aactcctctt	actcctgatg	gccccaaagc	aaattatact	720
gaagagtggg	tgatcagacc	gggagaagca	gatttttaa	atgggtgcac	tccactacag	780
gcaactctag	ggctggagtt	tggcgacacat	ttcaagtggg	atttagataa	ccctaatact	840
aaatatgccg	ttcttaccaa	tgctgccgca	aatgcgcttg	gtgctgtagg	gggatttgca	900
gtatccagat	ttactggtac	agatccaatg	ttaagtcctc	atatcgggtg	aatggttggg	960
caagcagcgg	ggcatgccat	acagtataat	acccccggat	taaagccaga	cactatttta	1020
tggtgggcag	gtactactct	tggactggct	gatttaaaca	aggccgagtt	tggagaggcc	1080
agattcactg	actatcctcg	tatatgggtg	catgcaagag	aaggtgccat	tttcccaaat	1140
aaagcagata	ttgaacatgc	cacaggggct	gatatacgcg	caatggaaga	aggtgtatct	1200
gttggacaac	ggcatccaaa	tccagaggat	gtgggtcatc	atatcgaaag	caataactca	1260
ccacatcata	acccatcaaa	ttatgttgat	accgttgata	taatccaaga	aacaagagtc	1320
taa						1323

<210> 3
 <211> 1326
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 3						
atgaacattc	aaccgaccat	acaatctgga	atcacctcac	aaaacaatca	acatcatcaa	60
acagaacaaa	tacctctac	acaaataccg	caatccgaat	tacctctagg	atgccaaagct	120
ggatttggtg	ttaatattcc	agatgatata	cagcaacatg	caccggaatg	cggtgaaaca	180
acagctctac	tgagcttgat	aaaagataaa	ggtctgctct	cagggctaga	cgaatatata	240
gctcctcacc	ttgaagaagg	atccatagga	aaaaaaacat	tggatatggt	tggttttattc	300
aatgttacct	aaatggcatt	agagatacct	agttccgttt	caggcatctc	tggtaaatat	360
ggtgtccagc	taaacattgt	aaaaccagat	attcatccta	catcaggtaa	ttatttttta	420
cagatattcc	ctctgcatga	tgaatatagg	tttaatttta	aagaccttcc	tggcccgtta	480
aaaaatgcat	taagcaacag	taatatatca	accactgcag	tgctcgactat	tgcatcgact	540
ggaacatcag	ccactacttc	gacggtaacc	accgagccaa	aagacccaat	accatggttt	600
ggattaacag	ctcaagtggg	tcgtaatcat	ggtgtagaac	ttcctatagt	caaaactgaa	660
aatggatgga	agcttggttg	agaaacacca	cttactcctg	atgggcccga	agcaaattac	720
acggaggagt	gggttatcag	accgggagaa	gcagatttta	aatatggtgc	atctccatta	780
caggcaactc	tagggctgga	gtttggcgca	catttcaagt	gggatttaga	taaccctaata	840
actaaatatg	ccgttcttac	caatgctgcc	gcaaatgcgc	ttggtgcttt	agggggattt	900
gcagtatcca	gatttgctag	tacagatcca	atgttaagtc	ctcatatcgg	tgcaatgggt	960
gggcaagcag	cagggcatgc	catacagtat	aataccccctg	gattaaagcc	agacactatt	1020
ttatggtggg	ctgggtgcgac	actgggggct	gccgatttta	acaaggccga	gtttgaagta	1080
gctagattca	ctgactatcc	tcgtatatgg	tggcacgcaa	gagaaggagc	tattttcccc	1140
aataaagcag	atattgaaca	tgccacaggt	gctgatatac	gcgcaatgga	agaagggtatc	1200
cctgttggac	agcggcatcc	aaatccagag	gatgtggtta	tcgatatcga	aagcaatggc	1260
ttaccacatc	ataatccatc	aaatcatggt	gatatctttg	atataatcca	agaaacaaga	1320
gtctaa						1326

<210> 4
 <211> 614
 <212> ДНК
 <213> Citrobacter rodentium

<400> 4						
tattcttttt	cagtggtttg	aagcaaggcc	agagcgatac	ggaaaagggtg	aagtaccgat	60
attgaatacc	aaagagcatc	cgtattttgag	caatattata	aatgctgcaa	aaatagaaaa	120
tgagcgcgta	ataggagtac	tggtagacgg	agactttact	tatgagcaaa	gaaaagaatt	180
tctcagctct	gaagatgaac	atcaaaaatat	aaagataata	tatcgggaaa	atgttgattt	240
cagtatgtat	gataaaaaac	tgtctgatat	ttatcttgaa	aatattcatg	aacaagaatc	300
atatccagcg	agtgagagag	ataattatct	gttaggccta	ttaagagaag	agttaaaaaa	360
tattccatac	ggaaaaggact	ctttgattga	atcatatgca	gaaaaaagag	gtcatacttg	420
gtttgatttt	tttagaaact	tggcgggtatt	gaaggggggg	gggttggtta	cagagacggg	480
taaaactgga	tgccataaca	tatctccatg	tgggggatgt	atatactctg	atgcagatat	540
gattattact	gataaattag	gtgtcctgta	tgctcctgat	ggtatcgctg	tgcatgtaga	600
ttgtaatgat	gaga					614

<210> 5
 <211> 555
 <212> ДНК

<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 5

aaggccagag	cgatacggaa	aaggtgaagt	accgatattg	aataccaaaag	agcatccgta	60
tttgagcaat	attataaatg	ctgcaaaaat	agaaaatgag	cgtaatggag	tactggtaga	120
cggagacttt	acttatgagc	aaagaaaaga	atctctcagt	cttgaagatg	aacatcaaaa	180
tataaagata	atatacggg	aaaatgttga	tttcagtatg	tatgataaaa	aactgtctga	240
tatttatctt	gaaaatattc	atgaacaaga	atcatatcca	gcgagtgaga	gagataatta	300
tctgttggtt	ttaagagaag	agttaaaaaa	tattccatac	ggaaaggact	ctttgattga	360
atcatatgca	gaaaaaagag	gtcatacttg	gtttgatttt	tttagaaact	tggcggattt	420
gaaggggggg	gggttggtta	cagagacggg	taaaactgga	tgccataaca	tatctccatg	480
tgggggatgt	atatatcttg	atgcagatat	gattattact	gataaattag	gtgtcctgta	540
tgctcctgat	ggtat					555

<210> 6

<211> 990

<212> ДНК

<213> Энтеропатогенная *E. coli*

<400> 6

atgttatctt	cattaaatgt	ccttcaatcc	agcttcagag	gaaagacagc	tttatcaaat	60
agtacacttc	tccagaaagt	ttcttttgct	ggaaaagaat	attctctgga	acctattgat	120
gaaagaaccc	ctattctttt	tcagtgggtt	gaagcaaggc	cagagcgata	cgaaaaagga	180
gaagtaccaa	tattgaatac	caaagaacat	ccgtatttga	gcaatattat	aaatgctgca	240
aaaatagaaa	atgagcgtat	aatcggtgtg	ctggtagatg	gaaattttac	ttatgaacaa	300
aaaaaggaat	ttctcaatct	tgaaaatgaa	catcaaaata	taaaaataat	ctaccgagca	360
gatgtggatt	tcagcatgta	tgataaaaaa	ctatctgata	tttaccttga	aaatatccat	420
aaacaagaat	cataccctgc	cagtgaagag	gataattatc	tgtaggctt	attaagagaa	480
gagttaaaaa	atatcccaga	aggtaaggac	tctttgattg	agtcatatgc	agaaaaaaga	540
gaacatactt	ggtttgattt	tttcaggaat	ttggccatat	tgaaggctgg	aagtttggtt	600
acagagacgg	gaaaaactgg	atgccataac	atategccct	gtagcggatg	tatatatctt	660
gatgccgaca	tgattattac	cgataaaatta	ggagtcctgt	atgctcctga	tggtatcgct	720
gtgcatgtag	attgtaatga	tgagataaaa	agtcttgaaa	atggtgcatg	agttgtcaat	780
cgtagtaatc	atccagcatt	acttgcaggc	ctcgatatta	tgaagagtaa	agttgacgct	840
catccatatt	atgatggctc	aggaaagggt	atcaagcggc	attttaacta	ttcatcggtt	900
cacaattata	atgctttttg	tgattttatt	gaattttaagc	atgaaaatat	tataccgaat	960
accagtatgt	ataccagcag	ttcatggtaa				990

<210> 7

<211> 990

<212> ДНК

<213> Энтерогеморрагическая *E. coli*

<400> 7

atgttatctt	cattaaatgt	ccttcaatcc	agcttcagag	gaaagacagc	tttatcaaat	60
agtacacttc	tccagaaagt	ttcttttgct	ggaaaagaat	atcctctgga	acctattgat	120
gaaaaaaccc	ctattctttt	tcagtgggtt	gaagcaaggc	cagagcgata	cgaaaaagga	180
gaagtaccaa	tattgaatac	caaagaacat	ccgtatttga	gcaatattat	aaatgctgca	240
aaaatagaaa	atgagcgtat	aatcggtgtg	ctggtagatg	gaaattttac	ttatgaacaa	300
aaaaaggaat	ttctcagtct	tgaaaatgaa	tatcaaaata	taaaaataat	ctaccgagca	360
gatgtggatt	tcagcatgta	tgataaaaaa	ctatctgata	tttaccttga	aaatatccat	420
aaacaagaat	cataccctgc	cagtgaagag	gataattatc	tgtaggctt	attaagagaa	480
gagttaaaaa	atatcccaga	aggtaaggac	tctttgattg	agtcatatgc	agaaaaaaga	540
gaacatactt	ggtttgattt	tttcaggaat	ttggccatgt	tgaaggctgg	aagtttggtt	600
acagagacgg	gaaaaactgg	atgccataac	atategccct	gtagcggatg	tatatatctt	660
gatgccgaca	tgattattac	cgataaaatta	ggagtcctgt	atgctcctga	tggtatcgct	720
gtgcatgtag	attgtaatga	tgagataaaa	agtcttgaaa	atggtgcatg	agttgtcaat	780
cgtagtaatc	atccagcatt	acttgcaggc	ctcgatatta	tgaagagtaa	agttgacgct	840
catccatatt	atgatggctc	aggaaagggt	atcaagcggc	attttaacta	ttcatcggtt	900
caagattata	atgctttttg	tgattttatt	gaattttaagc	atgaaaatat	tataccgaat	960
accagtatgt	ataccagcag	ttcatggtaa				990

<210> 8

<211> 993

<212> ДНК
 <213> *Citrobacter rodentium*

<400> 8
 atgaaaattc cctcactcca gccagcttc aacttttttcg cccagcagg atactctgct 60
 gccgttgctc ccaatcggtc ggacaatgcc tatgctgatt acgtattgga tataggcaag 120
 cgaataccac ttccgcgga agatttaggc aacctatatg aaaatgtcat tcgcgccgtt 180
 cgtgacagcc gtagcaagct catagatcag catacggtcg atatgattgg taacactata 240
 cttgatgctt tgagccgata acaaaccttt cgtgatgccg taagctatgg cattcataat 300
 aaggaggtag acattgggtg cattaaatac agaaacgaat acgagctcaa cggagaatcc 360
 cccgtcaaag ttgatgatat tcaatcacta acctgtaccg aattatatga atacgatgtc 420
 gggcaagaac caattttacc catttgcgag gcaggagaaa acgataacga agagccttat 480
 gtcagtttta gtgttgccgc agatactgac tcttatgaga tgccatcggt gcaggaaggg 540
 ctgattcacg agattattca tcatgtgact ggagctagcg atccgtctgg agatagtaat 600
 atagagctag gacccacgga gattctcgca cgtcgtgtcg ctcaagagct gggatggact 660
 gtccccgact tcataggata tgcagagcca gatcgtgaag ctcatcttag gggacgtaac 720
 ctgaatgccc ttcgacaggc ggccatgcca catgaagata atgagaggac tttcttcgaa 780
 aggtcgggta tgatcagtga tcgatatgag gcgagtcctg atttcacaga gtattccgct 840
 gtgtctaaca tagaatatgg atttatccag caacatgatt ttcccgggtt ggctatcgac 900
 gataattttac aggatgcaaa tcagatccaa ctctatcatg gagcaacctt tatctttaca 960
 ttcgggggatg tggacaaaca caatcagcgc tga 993

<210> 9
 <211> 993
 <212> ДНК
 <213> Энтеропатогенная *E. coli*

<400> 9
 atgaaaattc cctcattaca gtccaacttc aactttttccg ccccggcagg atactctgct 60
 cccattgctc ctaatcggtc tgaaaatgcc tatgcggatt acgtttttgga tataggtaag 120
 cgaataccac ttccgcgagc agatttaagc aacgtatacg aaagtgtaat acgcgccgtc 180
 catgacagcc gtagcaggct tatcgatcag catacagtcg atatgatcgg caacactgta 240
 cttgatgctt tgagccgata acagacattt cgtgatgccg taagctatgg cattcataat 300
 gagaaggtag acattgggtg cattaaatac agaaacgaat acgagcttaa cgaagaatct 360
 tctgtcaaaa ttgatgatat tcaatcacta acctgtaacg aattatatga atatgatgtc 420
 gggcaagagc caattttccc catttgcgaa gcaggagaaa acgataacga agagccttat 480
 gtcagtttta gtgttgccgc agatactgac tcttatgaga tgccatcggt gcaggaaggg 540
 ctgattcacg agattattca tcatgttact ggatctagcg atccatctgg agatagtaat 600
 atagagttag gacccaccga gattctcgca cgtcgtgtcg ctcaagaact gggatggagt 660
 gttccccgact tcaaaggata tgcagagcca gaacgtgaag ctcatcttag gttacgtaac 720
 ctgaatgccc ttcgacaggc tgccatgagg catgaagaga atgagagggc tttcttcgaa 780
 aggtcgggta cgatcagtga ccgatatgag gcgagtcctg atttcacaga gtattccgct 840
 gtgtctaaca taggatacgg atttatccag caacatgatt ttccctggatt ggctatcaac 900
 gataattttac aggatgcaaa tcagatccaa ctgtatcatg gcgcccccta tatttttaca 960
 tttgggggatg tggacaaaca caatcagcga tga 993

<210> 10
 <211> 993
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая *E. coli*

<400> 10
 atgaaaattc cctcattaca gtccaacttc aactttttccg ccccggcagg atactctgct 60
 cccattgctc ctaatcggtc tgaaaatgcc tatgcggatt acgtttttgga tataggtaag 120
 cgaataccac ttccgcgagc agatttaagc aacgtatacg aaagtgtaat acgcgccgtc 180
 catgacagcc gtagcaggct tatcgatcag catacagtcg atatgatcgg caacactgta 240
 cttgatgctt tgagccgata acagacattt cgtgatgccg taagctatgg cattcataat 300
 gagaaggtag acattgggtg cattaaatac agaaacgaat acgagcttaa cgaagaatct 360
 tctgtcaaaa ttgatgatat tcaatcacta acctgtaacg aattatatga atatgatgtc 420
 gggcaagagc caattttccc catttgcgaa gcaggagaaa acgataacga agagccttat 480
 gtcagtttta gtgttgccgc agatactgac tcttatgaga tgccatcggt gcaggaaggg 540
 ctgattcacg agattattca tcatgttact ggatctagcg atccatctgg agatagtaat 600
 atagagttag gacccaccga gattctcgca cgtcgtgtcg ctcaagaact gggatggagt 660
 gttccccgact tcaaaggata tgcagagcca gaacgtgaag ctcatcttag gttacgtaac 720

ctgaatgccc	ttcgacaggc	tgccatgagg	catgaagaga	atgagagggc	tttcttcgaa	780
aggctgggta	cgatcagtga	ccgatatgag	gcgagtcctg	atttcacaga	gtattccgct	840
gtgtctaaca	taggatacgg	atztatccag	caacatgatt	ttcctggatt	ggctatcaac	900
gataatttac	aggatgcaaa	tcagatccaa	ctgtatcatg	gcgcccctta	tattttttaca	960
tttgggggatg	tggacaaaaca	caatcagcaa	tga			993

<210> 11

<211> 708

<212> ДНК

<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 11

atgcgcctta	catcccttaa	cctgacatta	ccttcgttac	ctctaccctc	atcttcaaat	60
tcaatttcag	ccacagacat	tcaatctctt	gtaaaaatgt	cgggtgtgcg	ctgggtgaaa	120
aacaaccaac	aactctgttt	ccacgggact	gaccttaaaa	tctaccagca	tcttgaagct	180
gccctcgata	agatcgaatc	cacagacact	ggacgtactc	ttttgaactg	tattgaatta	240
acatcccagc	tcaaatcaga	aaaactggca	atacatctcg	attctgctga	gttaggggtg	300
atagcacact	gcaatgcgga	tgctgaaaac	tcccaggaa	ctggctccga	ctttcactgt	360
aatctgaatg	cagttgaata	tccctgcggg	caaggaatta	gcctggtaga	ctttcatgca	420
tgcatgtttt	tccatgaact	tctccacggt	ttccacaatt	taaatggaga	gcgcctgaaa	480
gttgagagtt	ctcaaccaga	attacaaaca	cactccccac	ttttactcga	agaagccagg	540
actgttgggt	tgggtgcttt	ttctgaagaa	gttctttcag	aaaataaatt	tcgtgaagag	600
attgggatgc	cccgacagaac	attctaccgg	cacgattcat	ctctcattca	tgatgacaat	660
acagtgactc	agagattcca	gcggaaaaaa	ctgcatccgt	tactttag		708

<210> 12

<211> 699

<212> ДНК

<213> Энтеропатогенная *E. coli*

<400> 12

atgcgcctta	cgtccctcaa	cttggtatta	catcagtcac	caacgtcgag	ctcaatgtca	60
gatacagata	tcgagtctct	tgtaaaagca	tcgagcgctc	aatggataaa	aaataatccg	120
caacttcggt	tccaggggac	tgatcataat	atatatcagc	agattgaagc	agcactcgat	180
aagattggct	ctacagagac	agggcggtga	ctcctgaatg	ctattgaatc	aatatcccgga	240
cttaaatcag	aaacagtggt	aatacacctc	aactcttcca	gactaggagt	tatggcacat	300
agagatatag	atgctgagaa	ccatcggggg	actggttccg	attttcactg	taatctgaat	360
gcagttgaat	atccctgtgg	ggaggggatt	agcgtggtgg	actttcatgc	gactattggt	420
tttcatgagt	tgctccatgt	tttccacaat	ttaaattggg	agcgtttgaa	agttgagagt	480
tcccgaccag	aatcacaaaa	atactctcca	cttttactcg	aagaagccag	gactgttggg	540
ttgggggctt	tttcagagga	ggtgctttca	gaaaataaat	tccgcgaaga	gattgggatg	600
ccccgtagaa	cctcctaccc	gcacgactca	gctcttattc	atgatgacaa	tacagtgagt	660
ctgggattcc	aacaggtaag	actgcatcca	ttgcttttag			699

<210> 13

<211> 699

<212> ДНК

<213> Энтерогеморрагическая *E. coli*

<400> 13

atgcgcctta	cgtccctcaa	cttggtatta	catcagtcac	caaggtcgag	ctcaatgtca	60
gatacagata	tcgagtctct	tgtaaaagca	tcgagcgctc	aatggataaa	aaataatccg	120
caacttcggt	tccaggggac	tgatcataat	atatatcagc	agattgaagc	agcactcgat	180
aagattggct	ctacagagac	agggcggtga	ctcctgaatg	ctattgaatc	aatatcccgga	240
cttaaatcag	aaacagtggt	aatacacctc	aactcttcca	gactaggagt	tatggcacat	300
agagatatag	atgctgagaa	ccatcggggg	actggttccg	attttcactg	taatctgaat	360
gcagttgaat	atccctgtgg	ggaggggatt	agcgtggtgg	actttcatgc	gactattggt	420
tttcatgagt	tgctccatgt	tttccacaat	ttaaattggg	agcgtttgaa	agttgagagt	480
tcccgagcag	aatcacaaaa	atactctcca	cttttactcg	aagaagccag	gactgttggg	540
ttgggggctt	tttcagagga	ggtgctttca	gaaaataaat	tccacgaaga	gattgggatg	600
ccccgtagaa	cctcctaccc	gcacgactca	gctcttattc	atgatgacaa	tacagtgagt	660
ctgggattcc	aacaggtaag	actgcatcca	ttgcttttag			699

<210> 14
 <211> 506
 <212> ДНК
 <213> *Citrobacter rodentium*

<400> 14
 tacttttaagt aatcaccccaa tgtatatgat aagaagtata tatctggcgt aactagagga 60
 gtagctgaac taaaacagga aggatttatt aacgagaaag ccaggcgact tgcttatatg 120
 caagcaatgt attctgtatg tccggaagag tttaaacctt tttccagaaa cgaagctagt 180
 acaccggaag gcagctggct aacagttata tccggaaaac gcccaatggg acagttttct 240
 gtagatagct tataatcatcc tgacttacat gcattgtgtg agcttccgga tatttggtgc 300
 aagatcttcc ctaaagaaaa caatgatttt ttgtatatag tgattgtgta cagaaatgac 360
 agccctctgg gagaacaacg agcaaatcga tttatagaat tatataatat aaaaagagac 420
 atcatgcagg aattaaatta tgaatctcca gagttaaagg ctgtgaaatc tgaaatgatt 480
 attgcacgtg aaatgggaga aatctt 506

<210> 15
 <211> 466
 <212> ДНК
 <213> *Citrobacter rodentium*

<400> 15
 caatgtatat gataagaagt atatatctgg cgtaactaga ggagtagctg aactaaaaca 60
 ggaaggattt attaacgaga aagccaggcg acttgcttat atgcaagcaa tgtattctgt 120
 atgtccgga gagttaaacc ctatttccag aaacgaagct agtacaccgg aaggcagctg 180
 gctaacagtt atatccggaa aacgcccaat gggacagttt tctgtagata gcttatatca 240
 tccctgactta catgcattgt gtgagcttcc ggatatttgt tgcaagatct tccctaaaga 300
 aaacaatgat tttttgtata tagtgattgt gtacagaaat gacagccctc tgggagaaca 360
 acgagcaaat cgatttatag aattatataa tataaaaaga gacatcatgc aggaattaaa 420
 ttatgaatct ccagaggttaa aggcgtgtgaa atctgaaatg attatt 466

<210> 16
 <211> 675
 <212> ДНК
 <213> Энтеропатогенная *E. coli*

<400> 16
 atgattaatc ctgttactaa tactcagggc gtgtccccta taaatactaa atatgctgaa 60
 catgtggtga aaaatattta cccgaaaatt aaacatgatt actttaatga atcacccaat 120
 atatatgata agaagtatat atccggtata accagaggag tagctgaact aaaacaggaa 180
 gaatttggtta acgagaaagc cagacgggtt tcttatatga agactatgta ttctgtatgt 240
 ccagaagcgt ttgaacctat ttccagaaat gaagccagta caccggaagg aagctggcta 300
 acagttatat ccggaaaacg cccaatgggg cagttttctg tagatagttt atacaatcct 360
 gatttacatg cattatgtga gcttccggac atttgttgta agatcttccc taaagaaaaat 420
 aatgattttt tatacatagt tgttggtgac agaaatgaca gccctctagg agaacaacgg 480
 gcaaatagat ttatagaatt atataatata aaaagagata tcatgcagga attaaattat 540
 gagttaccag agttaaaggc agtaaaatct gaaatgatta tcgcacgtga aatgggagaa 600
 atcttttagct acatgcctgg ggaaatagac agttatatga aatacataaa taataaactt 660
 tctaaaattg agtag 675

<210> 17
 <211> 675
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая *E. coli*

<400> 17
 atgattaatc ctgttactaa tactcagggc gtgtccccta taaatactaa atatgctgaa 60
 catgtggtga aaaatattta cccgaaaatt aaacatgatt actttaatga atcacccaat 120
 atatatgata agaagtatat atccggtata accagaggag tagctgaact aaaacaggaa 180
 gaatttggtta acgagaaagc cagacgggtt tcttatatga agactatgta ttctgtatgt 240
 ccagaagcgt ttgaacctat ttccagaaat gaagccagta caccggaagg aagctggcta 300
 acagttatat ccggaaaacg cccaatgggg cagttttctg tagatagttt atacaatcct 360
 gatttacatg cattatgtga gcttccggac atttgttgta agatcttccc taaagaaaaat 420
 aatgattttt tatacatagt tgttggtgac agaaatgaca gccctctagg agaacaacgg 480

gcaaatagat	ttatagaatt	atataatata	aaaagagata	tcatgcagga	attaaattat	540
gagttaccag	agttaaaggc	agtaaaatct	gaaatgatta	tcgcacgtga	aatgggagaa	600
atcttttagct	acatgcctgg	ggaaatagac	agttatatga	aatacataaa	taataaactt	660
tctaaaattg	agtag					675

<210> 18
 <211> 570
 <212> ДНК
 <213> *Citrobacter rodentium*

<400> 18						
atgttaccaa	caagtgggtc	ttcagcaa	ctttactcat	ggatgtatat	ctcaggaaaa	60
gagaatcctt	cgactccgga	atcagtaagt	gaacttaatc	ataatcattt	tctttctcct	120
gaattacagg	agaaaactgga	tgttatgttc	gccatatatt	catgtgccag	aaacaatgat	180
gagcgtgaga	atatttaccc	ggagctaagg	gattttgtaa	gtagccta	ggataagaga	240
aacaatgtgt	ttgaggtgat	aaatgaagat	actgatgagg	tgaccggagc	tctgagagcg	300
ggaatgacga	tagaggacag	ggatagttat	atcagggatc	ttttttttct	gcattcattg	360
aaagtataaa	ttgaggaaa	cagacaagat	aaagaggatt	ggaaatgtaa	agtttatgat	420
ctgctatgtc	cgcatcattc	ttcagagcta	tatggggatc	tacgggcaat	caaatgcctc	480
gttgaaggat	gcagtgatga	ttttagtcct	tttgatacta	ttaaggtgcc	ggatcttact	540
tacaacaaag	gatctttaca	atgtggatga				570

<210> 19
 <211> 519
 <212> ДНК
 <213> *Citrobacter rodentium*

<400> 19						
agcaaatcctt	tactcatgga	tgtatatctc	aggaaaagag	aatccttcga	ctccggaatc	60
agtaagtga	cttaatcata	atcattttct	ttctcctgaa	ttacaggaga	aactggatgt	120
tatgttcgcc	atatattcat	gtgccagaaa	caatgatgag	cgtgagaata	tttaccgga	180
gctaagggat	tttgtaaagta	gcctaattgga	taagagaaac	aatgtgtttg	aggtgataaa	240
tgaagatact	gatgaggtga	ccggagctct	gagagcggga	atgacgatag	aggacaggga	300
tagttatatt	agggatcttt	tttttctgca	ttcattgaaa	gtaaaaattg	aggaaagcag	360
acaagataaa	gaggattgga	aatgtaaagt	ttatgatctg	ctatgtccgc	atcattcttc	420
agagctatat	ggggatctac	gggcaatcaa	atgcctcggt	gaaggatgca	gtgatgattt	480
tagtcctttt	gatactatta	aggtgccgga	tcttactta			519

<210> 20
 <211> 570
 <212> ДНК
 <213> Энтеропатогенная *E. coli*

<400> 20						
atgttaccaa	caagtgggtc	ttcagcaa	ctttattcat	ggatgtatgt	atcaggaaga	60
ggtaaccctt	cgactccgga	atcagtaagt	gagcttaatc	ataatcactt	tctttctcct	120
gaattacaag	ataaacttga	tgttatgttc	tctatatatt	catgtgccag	aaataataat	180
gagcttgagg	aaatttttca	agagctaagt	gcttttgtaa	gtgggctgat	ggataagaga	240
aatagtgtat	ttgaggtgag	aaatgaaaat	actgatgagg	ttgtcggagc	gctgagggcg	300
ggaatgacga	tagaggatag	ggatagttat	atcagggatc	ttttttttct	gcattcattg	360
aaagtaaaaa	ttgaggaaa	tagacaaggc	aaagaagatt	cgaaatgtaa	agtttataat	420
ctgctatgtc	cgcatcactc	ttcagagcta	tatggtgata	tacgagcaat	gaaatgcctc	480
gtggaaggat	gcagtgatga	ttttaatcct	tttgatatta	ttaggtacc	agatcttact	540
tacaacaaag	gatctttaca	atgtggatga				570

<210> 21
 <211> 570
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая *E. coli*

<400> 21						
atgttaccaa	caagtgggtc	ttcagcaa	ctttattcat	ggatgtatgt	atcaggaaga	60
ggtaaccctt	cgactccgga	atcagtaagt	gagcttaatc	ataatcactt	tctttctcct	120
gaattacaag	ataaacttga	tgttatgttc	tctatatatt	catgtgccag	aaataataat	180

gagcttgagg aaatTTTTca agagctaagt gcttttGtaa gtgggctgat ggataagaga 240
aatagtgtat ttgaggTgag aaatGaaaat actgatgagg ttgtcggagc gctgagggcg 300
ggaatgacga tagaggacag ggatagttat atcagggatc ttttttttct gcattcattg 360
aaagtaaaaa ttgaggaaaag tagacaaggc aaagaagatt cgaaatGtaa agtttataat 420
ctgctatgtc cgcatacttc ttCagagcta tatggtgatc tacgagcaat gaaatgcctc 480
gtggaaggat gcagtgatga ttttaatcct tttgatatta ttagggtacc agatcttact 540
tacaacaaaag gatctttaca atgtggatga 570

<210> 22

<211> 430

<212> Белок

<213> Citrobacter rodentium

<400> 22

Met Asn Ile Gln Pro Asn Ile His Ser Gly Ile Thr Thr Gln Asn Asn
1 5 10 15

Gln Gln His His His Ala Glu Gln Val Pro Val Ser Ser Ser Ile Pro
20 25 30

Arg Ser Asp Leu Pro Pro Asn Cys Glu Ala Gly Phe Val Val His Ile
35 40 45

Pro Glu Asp Ile Gln Gln His Val Pro Glu Cys Gly Glu Thr Thr Ala
50 55 60

Leu Leu Ser Leu Ile Lys Asp Glu Gly Leu Leu Ser Gly Leu Asp Lys
65 70 75 80

Tyr Leu Ala Pro His Leu Glu Glu Gly Ser Leu Gly Lys Lys Ala Leu
85 90 95

Asp Thr Phe Gly Leu Phe Asn Val Thr Gln Met Ala Leu Glu Ile Pro
100 105 110

Ser Ser Val Pro Gly Ile Ser Gly Lys Tyr Gly Val Gln Met Asn Ile
115 120 125

Val Lys Pro Asp Ile His Pro Thr Thr Gly Asn Tyr Phe Leu Gln Leu
130 135 140

Phe Pro Leu His Asp Glu Ile Gly Phe Asn Phe Lys Asp Leu Pro Gly
145 150 155 160

Pro Leu Lys Asn Ala Leu Thr Asn Ser Ser Ile Ser Ala Thr Ala Ser
165 170 175

Thr Val Ala Pro Thr Pro Asn Asp Pro Met Pro Trp Phe Gly Leu Thr
180 185 190

Ala Gln Val Val Arg Asn His Gly Val Glu Leu Pro Ile Val Lys Thr
195 200 205

Glu Asn Gly Trp Lys Leu Val Gly Glu Thr Pro Leu Thr Pro Asp Gly
210 215 220

Pro Lys Ala Asn Tyr Thr Glu Glu Trp Val Ile Arg Pro Gly Glu Ala
225 230 235 240

Asp Phe Lys Tyr Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ala Thr Leu Gly Leu Glu
245 250 255

Phe	Gly	Ala	His	Phe	Lys	Trp	Asp	Leu	Asp	Asn	Pro	Asn	Thr	Lys	Tyr	
260								265				270				
Ala	Ile	Leu	Thr	Asn	Ala	Ala	Ala	Asn	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	
275								280				285				
Phe	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Pro	Gly	Ile	Asp	Pro	Met	Leu	Ser	Pro	His	
290								295				300				
Val	Gly	Ala	Met	Leu	Gly	Gln	Ala	Ala	Gly	His	Ala	Val	Gln	Cys	Asn	
305												310				
Thr	Pro	Gly	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Trp	Ala	Gly	Ala	Thr	
				325								330				
Phe	Gly	Ala	Ala	Asp	Leu	Asn	Lys	Ala	Glu	Phe	Asp	Lys	Val	Arg	Phe	
				340								345				
Thr	Asp	Tyr	Pro	Arg	Ile	Trp	Phe	His	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Leu	Phe	
				355								360				
Pro	Asn	Lys	Gln	Asp	Ile	Ala	Arg	Val	Thr	Gly	Ala	Asp	Ile	Lys	Ala	
				370								375				
Met	Glu	Glu	Gly	Val	Pro	Val	Gly	His	Gln	His	Pro	Lys	Pro	Glu	Asp	
385												390				
Val	Val	Ile	Asp	Ile	Glu	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	His	His	Asn	Pro	Ser	
				405								410				
Asn	Tyr	Val	Asp	Thr	Phe	Glu	Ile	Ile	Gln	Glu	Thr	Arg	Val			
				420								425				
												430				
<210> 23																
<211> 440																
<212> Белок																
<213> Энтеропатогенная E. coli																
<400> 23																
Met	Asn	Ile	Gln	Pro	Ile	Val	Thr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Gln	Asn	Asn	
1					5					10					15	
Arg	His	His	His	Ala	Glu	Gln	Thr	Ser	Pro	Thr	Gln	Ile	Pro	Gln	Ser	
				20					25					30		
Glu	Leu	Pro	Asn	Gly	Cys	Glu	Thr	Gly	Phe	Val	Val	His	Ile	Pro	Glu	
				35					40					45		
Asp	Met	Gln	Arg	His	Ala	Pro	Glu	Cys	Gly	Glu	Thr	Thr	Ala	Leu	Leu	
				50					55					60		
Ser	Leu	Ile	Lys	Asp	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Lys	Tyr	Leu	
65				70				75				80				
Ala	Pro	His	Leu	Glu	Glu	Gly	Ser	Ala	Gly	Lys	Lys	Ala	Leu	Asp	Met	
				85				90				95				
Phe	Gly	Leu	Phe	Asn	Val	Ser	Gln	Met	Ala	Leu	Glu	Ile	Pro	Ser	Thr	
				100				105				110				
Val	Pro	Gly	Ile	Ser	Gly	Lys	Tyr	Gly	Val	Gln	Leu	Asn	Ile	Val	Lys	
				115				120				125				

Pro Asp Ile His Pro Thr Ser Gly Asn Tyr Phe Leu Gln Ile Phe Pro
130 135 140

Leu His Asp Glu Ile Gly Ile Asn Phe Lys Asp Leu Pro Gly Pro Leu
145 150 155 160

Lys Asn Ala Leu Ser Asn Ser Asn Ile Pro Thr Thr Val Ser Thr Ala
165 170 175

Ala Ser Thr Ile Ala Ser Ala Thr Thr Ser Thr Val Thr Thr Ala Ser
180 185 190

Lys Asp Pro Ile Pro Trp Phe Gly Leu Thr Ala Gln Val Val Arg Asn
195 200 205

His Gly Val Glu Leu Pro Ile Val Lys Thr Glu Asn Gly Trp Lys Leu
210 215 220

Val Gly Glu Thr Pro Leu Thr Pro Asp Gly Pro Lys Ala Asn Tyr Thr
225 230 235 240

Glu Glu Trp Val Ile Arg Pro Gly Glu Ala Asp Phe Lys Tyr Gly Ala
245 250 255

Ser Pro Leu Gln Ala Thr Leu Gly Leu Glu Phe Gly Ala His Phe Lys
260 265 270

Trp Asp Leu Asp Asn Pro Asn Thr Lys Tyr Ala Val Leu Thr Asn Ala
275 280 285

Ala Ala Asn Ala Leu Gly Ala Val Gly Gly Phe Ala Val Ser Arg Phe
290 295 300

Thr Gly Thr Asp Pro Met Leu Ser Pro His Ile Gly Ala Met Val Gly
305 310 315 320

Gln Ala Ala Gly His Ala Ile Gln Tyr Asn Thr Pro Gly Leu Lys Pro
325 330 335

Asp Thr Ile Leu Trp Trp Ala Gly Thr Thr Leu Gly Leu Ala Asp Leu
340 345 350

Asn Lys Ala Glu Phe Gly Glu Ala Arg Phe Thr Asp Tyr Pro Arg Ile
355 360 365

Trp Trp His Ala Arg Glu Gly Ala Ile Phe Pro Asn Lys Ala Asp Ile
370 375 380

Glu His Ala Thr Gly Ala Asp Ile Arg Ala Met Glu Glu Gly Val Ser
385 390 395 400

Val Gly Gln Arg His Pro Asn Pro Glu Asp Val Val Ile Asn Ile Glu
405 410 415

Ser Asn Asn Ser Pro His His Asn Pro Ser Asn Tyr Val Asp Thr Val
420 425 430

Asp Ile Ile Gln Glu Thr Arg Val
435 440

<210> 24
<211> 441
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 24

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

Gly Gln Ala Ala Gly His Ala Ile Gln Tyr Asn Thr Pro Gly Leu Lys
325 330 335

Pro Asp Thr Ile Leu Trp Trp Ala Gly Ala Thr Leu Gly Ala Ala Asp
340 345 350

Leu Asn Lys Ala Glu Phe Glu Val Ala Arg Phe Thr Asp Tyr Pro Arg
355 360 365

Ile Trp Trp His Ala Arg Glu Gly Ala Ile Phe Pro Asn Lys Ala Asp
370 375 380

Ile Glu His Ala Thr Gly Ala Asp Ile Arg Ala Met Glu Glu Gly Ile
385 390 395 400

Pro Val Gly Gln Arg His Pro Asn Pro Glu Asp Val Val Ile Asp Ile
405 410 415

Glu Ser Asn Gly Leu Pro His His Asn Pro Ser Asn His Val Asp Ile
420 425 430

Phe Asp Ile Ile Gln Glu Thr Arg Val
435 440

<210> 25
<211> 204
<212> Белок
<213> Citrobacter rodentium

<400> 25

Ile Leu Phe Gln Trp Phe Glu Ala Arg Pro Glu Arg Tyr Gly Lys Gly
1 5 10 15

Glu Val Pro Ile Leu Asn Thr Lys Glu His Pro Tyr Leu Ser Asn Ile
20 25 30

Ile Asn Ala Ala Lys Ile Glu Asn Glu Arg Val Ile Gly Val Leu Val
35 40 45

Asp Gly Asp Phe Thr Tyr Glu Gln Arg Lys Glu Phe Leu Ser Leu Glu
50 55 60

Asp Glu His Gln Asn Ile Lys Ile Ile Tyr Arg Glu Asn Val Asp Phe
65 70 75 80

Ser Met Tyr Asp Lys Lys Leu Ser Asp Ile Tyr Leu Glu Asn Ile His
85 90 95

Glu Gln Glu Ser Tyr Pro Ala Ser Glu Arg Asp Asn Tyr Leu Leu Gly
100 105 110

Leu Leu Arg Glu Glu Leu Lys Asn Ile Pro Tyr Gly Lys Asp Ser Leu
115 120 125

Ile Glu Ser Tyr Ala Glu Lys Arg Gly His Thr Trp Phe Asp Phe Phe
130 135 140

Arg Asn Leu Ala Val Leu Lys Gly Gly Gly Leu Phe Thr Glu Thr Gly
145 150 155 160

Lys Thr Gly Cys His Asn Ile Ser Pro Cys Gly Gly Cys Ile Tyr Leu
165 170 175

Asp Ala Asp Met Ile Ile Thr Asp Lys Leu Gly Val Leu Tyr Ala Pro
180 185 190

Asp Gly Ile Ala Val His Val Asp Cys Asn Asp Glu
195 200

<210> 26
<211> 186
<212> Белок
<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 26

Arg Pro Glu Arg Tyr Gly Lys Gly Glu Val Pro Ile Leu Asn Thr Lys
1 5 10 15

Glu His Pro Tyr Leu Ser Asn Ile Ile Asn Ala Ala Lys Ile Glu Asn
20 25 30

Glu Arg Val Ile Gly Val Leu Val Asp Gly Asp Phe Thr Tyr Glu Gln
35 40 45

Arg Lys Glu Phe Leu Ser Leu Glu Asp Glu His Gln Asn Ile Lys Ile
50 55 60

Ile Tyr Arg Glu Asn Val Asp Phe Ser Met Tyr Asp Lys Lys Leu Ser
65 70 75 80

Asp Ile Tyr Leu Glu Asn Ile His Glu Gln Glu Ser Tyr Pro Ala Ser
85 90 95

Glu Arg Asp Asn Tyr Leu Leu Gly Leu Leu Arg Glu Glu Leu Lys Asn
100 105 110

Ile Pro Tyr Gly Lys Asp Ser Leu Ile Glu Ser Tyr Ala Glu Lys Arg
115 120 125

Gly His Thr Trp Phe Asp Phe Phe Arg Asn Leu Ala Val Leu Lys Gly
130 135 140

Gly Gly Leu Phe Thr Glu Thr Gly Lys Thr Gly Cys His Asn Ile Ser
145 150 155 160

Pro Cys Gly Gly Cys Ile Tyr Leu Asp Ala Asp Met Ile Ile Thr Asp
165 170 175

Lys Leu Gly Val Leu Tyr Ala Pro Asp Gly
180 185

<210> 27
<211> 329
<212> Белок
<213> Энтеропатогенная *E. coli*

<400> 27

Met Leu Ser Ser Leu Asn Val Leu Gln Ser Ser Phe Arg Gly Lys Thr
1 5 10 15

Ala Leu Ser Asn Ser Thr Leu Leu Gln Lys Val Ser Phe Ala Gly Lys
20 25 30

Glu Tyr Ser Leu Glu Pro Ile Asp Glu Arg Thr Pro Ile Leu Phe Gln
35 40 45

Trp Phe Glu Ala Arg Pro Glu Arg Tyr Glu Lys Gly Glu Val Pro Ile
50 55 60

Leu Asn Thr Lys Glu His Pro Tyr Leu Ser Asn Ile Ile Asn Ala Ala
65 70 75 80

Lys Ile Glu Asn Glu Arg Ile Ile Gly Val Leu Val Asp Gly Asn Phe
85 90 95

Thr Tyr Glu Gln Lys Lys Glu Phe Leu Asn Leu Glu Asn Glu His Gln
100 105 110

Asn Ile Lys Ile Ile Tyr Arg Ala Asp Val Asp Phe Ser Met Tyr Asp
115 120 125

Lys Lys Leu Ser Asp Ile Tyr Leu Glu Asn Ile His Lys Gln Glu Ser
130 135 140

Tyr Pro Ala Ser Glu Arg Asp Asn Tyr Leu Leu Gly Leu Leu Arg Glu
145 150 155 160

Glu Leu Lys Asn Ile Pro Glu Gly Lys Asp Ser Leu Ile Glu Ser Tyr
165 170 175

Ala Glu Lys Arg Glu His Thr Trp Phe Asp Phe Phe Arg Asn Leu Ala
180 185 190

Ile Leu Lys Ala Gly Ser Leu Phe Thr Glu Thr Gly Lys Thr Gly Cys
195 200 205

His Asn Ile Ser Pro Cys Ser Gly Cys Ile Tyr Leu Asp Ala Asp Met
210 215 220

Ile Ile Thr Asp Lys Leu Gly Val Leu Tyr Ala Pro Asp Gly Ile Ala
225 230 235 240

Val His Val Asp Cys Asn Asp Glu Ile Lys Ser Leu Glu Asn Gly Ala
245 250 255

Ile Val Val Asn Arg Ser Asn His Pro Ala Leu Leu Ala Gly Leu Asp
260 265 270

Ile Met Lys Ser Lys Val Asp Ala His Pro Tyr Tyr Asp Gly Leu Gly
275 280 285

Lys Gly Ile Lys Arg His Phe Asn Tyr Ser Ser Leu His Asn Tyr Asn
290 295 300

Ala Phe Cys Asp Phe Ile Glu Phe Lys His Glu Asn Ile Ile Pro Asn
305 310 315 320

Thr Ser Met Tyr Thr Ser Ser Ser Trp
325

<210> 28
<211> 329
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 28

Met Leu Ser Ser Leu Asn Val Leu Gln Ser Ser Phe Arg Gly Lys Thr
1 5 10 15

Ala Leu Ser Asn Ser Thr Leu Leu Gln Lys Val Ser Phe Ala Gly Lys
20 25 30

Glu Tyr Pro Leu Glu Pro Ile Asp Glu Lys Thr Pro Ile Leu Phe Gln
35 40 45

Trp Phe Glu Ala Arg Pro Glu Arg Tyr Glu Lys Gly Glu Val Pro Ile
50 55 60

Leu Asn Thr Lys Glu His Pro Tyr Leu Ser Asn Ile Ile Asn Ala Ala
65 70 75 80

Lys Ile Glu Asn Glu Arg Ile Ile Gly Val Leu Val Asp Gly Asn Phe
85 90 95

Thr Tyr Glu Gln Lys Lys Glu Phe Leu Ser Leu Glu Asn Glu Tyr Gln
100 105 110

Asn Ile Lys Ile Ile Tyr Arg Ala Asp Val Asp Phe Ser Met Tyr Asp
115 120 125

Lys Lys Leu Ser Asp Ile Tyr Leu Glu Asn Ile His Lys Gln Glu Ser
130 135 140

Tyr Pro Ala Ser Glu Arg Asp Asn Tyr Leu Leu Gly Leu Leu Arg Glu
145 150 155 160

Glu Leu Lys Asn Ile Pro Glu Gly Lys Asp Ser Leu Ile Glu Ser Tyr
165 170 175

Ala Glu Lys Arg Glu His Thr Trp Phe Asp Phe Phe Arg Asn Leu Ala
180 185 190

Met Leu Lys Ala Gly Ser Leu Phe Thr Glu Thr Gly Lys Thr Gly Cys
195 200 205

His Asn Ile Ser Pro Cys Ser Gly Cys Ile Tyr Leu Asp Ala Asp Met
210 215 220

Ile Ile Thr Asp Lys Leu Gly Val Leu Tyr Ala Pro Asp Gly Ile Ala
225 230 235 240

Val His Val Asp Cys Asn Asp Glu Ile Lys Ser Leu Glu Asn Gly Ala
245 250 255

Ile Val Val Asn Arg Ser Asn His Pro Ala Leu Leu Ala Gly Leu Asp
260 265 270

Ile Met Lys Ser Lys Val Asp Ala His Pro Tyr Tyr Asp Gly Leu Gly
275 280 285

Lys Gly Ile Lys Arg His Phe Asn Tyr Ser Ser Leu His Asp Tyr Asn
290 295 300

Ala Phe Cys Asp Phe Ile Glu Phe Lys His Glu Asn Ile Ile Pro Asn
305 310 315 320

Thr Ser Met Tyr Thr Cys Ser Ser Trp
325

<210> 29
<211> 326
<212> Белок

<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 29

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

Tyr Thr Cys Ser Ser Trp
325

<210> 30
<211> 330
<212> Белок
<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 30
Met Lys Ile Pro Ser Leu Gln Pro Ser Phe Asn Phe Phe Ala Pro Ala
1 5 10 15
Gly Tyr Ser Ala Ala Val Ala Pro Asn Arg Ser Asp Asn Ala Tyr Ala
20 25 30
Asp Tyr Val Leu Asp Ile Gly Lys Arg Ile Pro Leu Ser Ala Glu Asp
35 40 45
Leu Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Val Ile Arg Ala Val Arg Asp Ser Arg
50 55 60
Ser Lys Leu Ile Asp Gln His Thr Val Asp Met Ile Gly Asn Thr Ile
65 70 75 80
Leu Asp Ala Leu Ser Arg Ser Gln Thr Phe Arg Asp Ala Val Ser Tyr
85 90 95
Gly Ile His Asn Lys Glu Val His Ile Gly Cys Ile Lys Tyr Arg Asn
100 105 110
Glu Tyr Glu Leu Asn Gly Glu Ser Pro Val Lys Val Asp Asp Ile Gln
115 120 125
Ser Leu Thr Cys Thr Glu Leu Tyr Glu Tyr Asp Val Gly Gln Glu Pro
130 135 140
Ile Leu Pro Ile Cys Glu Ala Gly Glu Asn Asp Asn Glu Glu Pro Tyr
145 150 155 160
Val Ser Phe Ser Val Ala Pro Asp Thr Asp Ser Tyr Glu Met Pro Ser
165 170 175
Trp Gln Glu Gly Leu Ile His Glu Ile Ile His His Val Thr Gly Ala
180 185 190
Ser Asp Pro Ser Gly Asp Ser Asn Ile Glu Leu Gly Pro Thr Glu Ile
195 200 205
Leu Ala Arg Arg Val Ala Gln Glu Leu Gly Trp Thr Val Pro Asp Phe
210 215 220
Ile Gly Tyr Ala Glu Pro Asp Arg Glu Ala His Leu Arg Gly Arg Asn
225 230 235 240
Leu Asn Ala Leu Arg Gln Ala Ala Met Arg His Glu Asp Asn Glu Arg
245 250 255
Thr Phe Phe Glu Arg Leu Gly Met Ile Ser Asp Arg Tyr Glu Ala Ser
260 265 270
Pro Asp Phe Thr Glu Tyr Ser Ala Val Ser Asn Ile Glu Tyr Gly Phe
275 280 285

Ile Gln Gln His Asp Phe Pro Gly Leu Ala Ile Asp Asp Asn Leu Gln
290 295 300

Asp Ala Asn Gln Ile Gln Leu Tyr His Gly Ala Pro Tyr Ile Phe Thr
305 310 315 320

Phe Gly Asp Val Asp Lys His Asn Gln Arg
325 330

<210> 31
<211> 330
<212> Белок
<213> Энтеропатогенная E. coli

<400> 31

Met Lys Ile Pro Ser Leu Gln Ser Asn Phe Asn Phe Ser Ala Pro Ala
1 5 10 15

Gly Tyr Ser Ala Pro Ile Ala Pro Asn Arg Ala Glu Asn Ala Tyr Ala
20 25 30

Asp Tyr Val Leu Asp Ile Gly Lys Arg Ile Pro Leu Ser Ala Ala Asp
35 40 45

Leu Ser Asn Val Tyr Glu Ser Val Ile Arg Ala Val His Asp Ser Arg
50 55 60

Ser Arg Leu Ile Asp Gln His Thr Val Asp Met Ile Gly Asn Thr Val
65 70 75 80

Leu Asp Ala Leu Ser Arg Ser Gln Thr Phe Arg Asp Ala Val Ser Tyr
85 90 95

Gly Ile His Asn Glu Lys Val His Ile Gly Cys Ile Lys Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Tyr Glu Leu Asn Glu Glu Ser Ser Val Lys Ile Asp Asp Ile Gln
115 120 125

Ser Leu Thr Cys Asn Glu Leu Tyr Glu Tyr Asp Val Gly Gln Glu Pro
130 135 140

Ile Phe Pro Ile Cys Glu Ala Gly Glu Asn Asp Asn Glu Glu Pro Tyr
145 150 155 160

Val Ser Phe Ser Val Ala Pro Asp Thr Asp Ser Tyr Glu Met Pro Ser
165 170 175

Trp Gln Glu Gly Leu Ile His Glu Ile Ile His His Val Thr Gly Ser
180 185 190

Ser Asp Pro Ser Gly Asp Ser Asn Ile Glu Leu Gly Pro Thr Glu Ile
195 200 205

Leu Ala Arg Arg Val Ala Gln Glu Leu Gly Trp Ser Val Pro Asp Phe
210 215 220

Lys Gly Tyr Ala Glu Pro Glu Arg Glu Ala His Leu Arg Leu Arg Asn
225 230 235 240

Leu Asn Ala Leu Arg Gln Ala Ala Met Arg His Glu Glu Asn Glu Arg
245 250 255

Ala Phe Phe Glu Arg Leu Gly Thr Ile Ser Asp Arg Tyr Glu Ala Ser
260 265 270

Pro Asp Phe Thr Glu Tyr Ser Ala Val Ser Asn Ile Gly Tyr Gly Phe
275 280 285

Ile Gln Gln His Asp Phe Pro Gly Leu Ala Ile Asn Asp Asn Leu Gln
290 295 300

Asp Ala Asn Gln Ile Gln Leu Tyr His Gly Ala Pro Tyr Ile Phe Thr
305 310 315 320

Phe Gly Asp Val Asp Lys His Asn Gln Arg
325 330

<210> 32
<211> 330
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 32

Met Lys Ile Pro Ser Leu Gln Ser Asn Phe Asn Phe Ser Ala Pro Ala
1 5 10 15

Gly Tyr Ser Ala Pro Ile Ala Pro Asn Arg Ala Glu Asn Ala Tyr Ala
20 25 30

Asp Tyr Val Leu Asp Ile Gly Lys Arg Ile Pro Leu Ser Ala Ala Asp
35 40 45

Leu Ser Asn Val Tyr Glu Ser Val Ile Arg Ala Val His Asp Ser Arg
50 55 60

Ser Arg Leu Ile Asp Gln His Thr Val Asp Met Ile Gly Asn Thr Val
65 70 75 80

Leu Asp Ala Leu Ser Arg Ser Gln Thr Phe Arg Asp Ala Val Ser Tyr
85 90 95

Gly Ile His Asn Glu Lys Val His Ile Gly Cys Ile Lys Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Tyr Glu Leu Asn Glu Glu Ser Ser Val Lys Ile Asp Asp Ile Gln
115 120 125

Ser Leu Thr Cys Asn Glu Leu Tyr Glu Tyr Asp Val Gly Gln Glu Pro
130 135 140

Ile Phe Pro Ile Cys Glu Ala Gly Glu Asn Asp Asn Glu Glu Pro Tyr
145 150 155 160

Val Ser Phe Ser Val Ala Pro Asp Thr Asp Ser Tyr Glu Met Pro Ser
165 170 175

Trp Gln Glu Gly Leu Ile His Glu Ile Ile His His Val Thr Gly Ser
180 185 190

Ser Asp Pro Ser Gly Asp Ser Asn Ile Glu Leu Gly Pro Thr Glu Ile
195 200 205

Leu Ala Arg Arg Val Ala Gln Glu Leu Gly Trp Ser Val Pro Asp Phe
210 215 220

Lys Gly Tyr Ala Glu Pro Glu Arg Glu Ala His Leu Arg Leu Arg Asn
 225 230 235 240
 Leu Asn Ala Leu Arg Gln Ala Ala Met Arg His Glu Glu Asn Glu Arg
 245 250 255
 Ala Phe Phe Glu Arg Leu Gly Thr Ile Ser Asp Arg Tyr Glu Ala Ser
 260 265 270
 Pro Asp Phe Thr Glu Tyr Ser Ala Val Ser Asn Ile Gly Tyr Gly Phe
 275 280 285
 Ile Gln Gln His Asp Phe Pro Gly Leu Ala Ile Asn Asp Asn Leu Gln
 290 295 300
 Asp Ala Asn Gln Ile Gln Leu Tyr His Gly Ala Pro Tyr Ile Phe Thr
 305 310 315 320
 Phe Gly Asp Val Asp Lys His Asn Gln Gln
 325 330
 <210> 33
 <211> 235
 <212> Белок
 <213> Citrobacter rodentium
 <400> 33
 Met Arg Pro Thr Ser Leu Asn Leu Thr Leu Pro Ser Leu Pro Leu Pro
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asn Ser Ile Ser Ala Thr Asp Ile Gln Ser Leu Val Lys
 20 25 30
 Met Ser Gly Val Arg Trp Val Lys Asn Asn Gln Gln Leu Cys Phe His
 35 40 45
 Gly Thr Asp Leu Lys Ile Tyr Gln His Leu Glu Ala Ala Leu Asp Lys
 50 55 60
 Ile Glu Ser Thr Asp Thr Gly Arg Thr Leu Leu Asn Cys Ile Glu Leu
 65 70 75 80
 Thr Ser Arg Leu Lys Ser Glu Lys Leu Ala Ile His Leu Asp Ser Ala
 85 90 95
 Glu Leu Gly Val Ile Ala His Cys Asn Ala Asp Ala Glu Asn Ser Arg
 100 105 110
 Gly Thr Gly Ser Asp Phe His Cys Asn Leu Asn Ala Val Glu Tyr Pro
 115 120 125
 Cys Gly Gln Gly Ile Ser Leu Val Asp Phe His Ala Cys Ile Val Phe
 130 135 140
 His Glu Leu Leu His Val Phe His Asn Leu Asn Gly Glu Arg Leu Lys
 145 150 155 160
 Val Glu Ser Ser Gln Pro Glu Leu Gln Thr His Ser Pro Leu Leu Leu
 165 170 175
 Glu Glu Ala Arg Thr Val Gly Leu Gly Ala Phe Ser Glu Glu Val Leu
 180 185 190

Ser Glu Asn Lys Phe Arg Glu Glu Ile Gly Met Pro Arg Arg Thr Phe
195 200 205

Tyr Pro His Asp Ser Ser Leu Ile His Asp Asp Asn Thr Val Thr Gln
210 215 220

Arg Phe Gln Arg Lys Lys Leu His Pro Leu Leu
225 230 235

<210> 34
<211> 232
<212> Белок
<213> Энтеропатогенная E. coli

<400> 34

Met Arg Pro Thr Ser Leu Asn Leu Val Leu His Gln Ser Ser Thr Ser
1 5 10 15

Ser Ser Met Ser Asp Thr Asp Ile Glu Ser Leu Val Lys Ala Ser Ser
20 25 30

Val Gln Trp Ile Lys Asn Asn Pro Gln Leu Arg Phe Gln Gly Thr Asp
35 40 45

His Asn Ile Tyr Gln Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asp Lys Ile Gly Ser
50 55 60

Thr Glu Thr Gly Arg Val Leu Leu Asn Ala Ile Glu Ser Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Lys Ser Glu Thr Val Val Ile His Leu Asn Ser Ser Arg Leu Gly
85 90 95

Val Met Ala His Arg Asp Ile Asp Ala Glu Asn His Arg Gly Thr Gly
100 105 110

Ser Asp Phe His Cys Asn Leu Asn Ala Val Glu Tyr Pro Cys Gly Glu
115 120 125

Gly Ile Ser Val Val Asp Phe His Ala Thr Ile Val Phe His Glu Leu
130 135 140

Leu His Val Phe His Asn Leu Asn Gly Glu Arg Leu Lys Val Glu Ser
145 150 155 160

Ser Arg Pro Glu Ser Gln Lys Tyr Ser Pro Leu Leu Leu Glu Glu Ala
165 170 175

Arg Thr Val Gly Leu Gly Ala Phe Ser Glu Glu Val Leu Ser Glu Asn
180 185 190

Lys Phe Arg Glu Glu Ile Gly Met Pro Arg Arg Thr Ser Tyr Pro His
195 200 205

Asp Ser Ala Leu Ile His Asp Asp Asn Thr Val Ser Leu Gly Phe Gln
210 215 220

Gln Val Arg Leu His Pro Leu Leu
225 230

<210> 35
<211> 232
<212> Белок

<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (208)..(208)

<223> Xaa = Arg или His

<400> 35

```

Met Arg Pro Thr Ser Leu Asn Leu Val Leu His Gln Ser Ser Arg Ser
1           5           10           15

Ser Ser Met Ser Asp Thr Asp Ile Glu Ser Leu Val Lys Ala Ser Ser
          20           25           30

Val Gln Trp Ile Lys Asn Asn Pro Gln Leu Arg Phe Gln Gly Thr Asp
          35           40           45

His Asn Ile Tyr Gln Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asp Lys Ile Gly Ser
          50           55           60

Thr Glu Thr Gly Arg Val Leu Leu Asn Ala Ile Glu Ser Ile Ser Arg
65           70           75           80

Leu Lys Ser Glu Thr Val Val Ile His Leu Asn Ser Ser Arg Leu Gly
          85           90           95

Val Met Ala His Arg Asp Ile Asp Ala Glu Asn His Arg Gly Thr Gly
          100          105          110

Ser Asp Phe His Cys Asn Leu Asn Ala Val Glu Tyr Pro Cys Gly Glu
          115          120          125

Gly Ile Ser Val Val Asp Phe His Ala Thr Ile Val Phe His Glu Leu
          130          135          140

Leu His Val Phe His Asn Leu Asn Gly Glu Arg Leu Lys Val Glu Ser
          145          150          155          160

Ser Arg Ala Glu Ser Gln Lys Tyr Ser Pro Leu Leu Leu Glu Glu Ala
          165          170          175

Arg Thr Val Gly Leu Gly Ala Phe Ser Glu Glu Val Leu Ser Glu Asn
          180          185          190

Lys Phe His Glu Glu Ile Gly Met Pro Arg Arg Thr Ser Tyr Pro Xaa
          195          200          205

Asp Ser Ala Leu Ile His Asp Asp Asn Thr Val Ser Leu Gly Phe Gln
          210          215          220

Gln Val Arg Leu His Pro Leu Leu
          225          230

```

<210> 36

<211> 168

<212> Белок

<213> Citrobacter rodentium

<400> 36

```

Tyr Phe Asn Glu Ser Pro Asn Val Tyr Asp Lys Lys Tyr Ile Ser Gly
1           5           10           15

```

Val Thr Arg Gly Val Ala Glu Leu Lys Gln Glu Gly Phe Ile Asn Glu
20 25 30

Lys Ala Arg Arg Leu Ala Tyr Met Gln Ala Met Tyr Ser Val Cys Pro
35 40 45

Glu Glu Phe Lys Pro Ile Ser Arg Asn Glu Ala Ser Thr Pro Glu Gly
50 55 60

Ser Trp Leu Thr Val Ile Ser Gly Lys Arg Pro Met Gly Gln Phe Ser
65 70 75 80

Val Asp Ser Leu Tyr His Pro Asp Leu His Ala Leu Cys Glu Leu Pro
85 90 95

Asp Ile Cys Cys Lys Ile Phe Pro Lys Glu Asn Asn Asp Phe Leu Tyr
100 105 110

Ile Val Ile Val Tyr Arg Asn Asp Ser Pro Leu Gly Glu Gln Arg Ala
115 120 125

Asn Arg Phe Ile Glu Leu Tyr Asn Ile Lys Arg Asp Ile Met Gln Glu
130 135 140

Leu Asn Tyr Glu Ser Pro Glu Leu Lys Ala Val Lys Ser Glu Met Ile
145 150 155 160

Ile Ala Arg Glu Met Gly Glu Ile
165

<210> 37
<211> 154
<212> Белок
<213> Citrobacter rodentium

<400> 37

Asn Val Tyr Asp Lys Lys Tyr Ile Ser Gly Val Thr Arg Gly Val Ala
1 5 10 15

Glu Leu Lys Gln Glu Gly Phe Ile Asn Glu Lys Ala Arg Arg Leu Ala
20 25 30

Tyr Met Gln Ala Met Tyr Ser Val Cys Pro Glu Glu Phe Lys Pro Ile
35 40 45

Ser Arg Asn Glu Ala Ser Thr Pro Glu Gly Ser Trp Leu Thr Val Ile
50 55 60

Ser Gly Lys Arg Pro Met Gly Gln Phe Ser Val Asp Ser Leu Tyr His
65 70 75 80

Pro Asp Leu His Ala Leu Cys Glu Leu Pro Asp Ile Cys Cys Lys Ile
85 90 95

Phe Pro Lys Glu Asn Asn Asp Phe Leu Tyr Ile Val Ile Val Tyr Arg
100 105 110

Asn Asp Ser Pro Leu Gly Glu Gln Arg Ala Asn Arg Phe Ile Glu Leu
115 120 125

Tyr Asn Ile Lys Arg Asp Ile Met Gln Glu Leu Asn Tyr Glu Ser Pro
130 135 140

Glu Leu Lys Ala Val Lys Ser Glu Met Ile
145 150

<210> 38
<211> 224
<212> Белок
<213> Энтеропатогенная E. coli

<400> 38

Met Ile Asn Pro Val Thr Asn Thr Gln Gly Val Ser Pro Ile Asn Thr
1 5 10 15

Lys Tyr Ala Glu His Val Val Lys Asn Ile Tyr Pro Lys Ile Lys His
20 25 30

Asp Tyr Phe Asn Glu Ser Pro Asn Ile Tyr Asp Lys Lys Tyr Ile Ser
35 40 45

Gly Ile Thr Arg Gly Val Ala Glu Leu Lys Gln Glu Glu Phe Val Asn
50 55 60

Glu Lys Ala Arg Arg Phe Ser Tyr Met Lys Thr Met Tyr Ser Val Cys
65 70 75 80

Pro Glu Ala Phe Glu Pro Ile Ser Arg Asn Glu Ala Ser Thr Pro Glu
85 90 95

Gly Ser Trp Leu Thr Val Ile Ser Gly Lys Arg Pro Met Gly Gln Phe
100 105 110

Ser Val Asp Ser Leu Tyr Asn Pro Asp Leu His Ala Leu Cys Glu Leu
115 120 125

Pro Asp Ile Cys Cys Lys Ile Phe Pro Lys Glu Asn Asn Asp Phe Leu
130 135 140

Tyr Ile Val Val Val Tyr Arg Asn Asp Ser Pro Leu Gly Glu Gln Arg
145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Ile Glu Leu Tyr Asn Ile Lys Arg Asp Ile Met Gln
165 170 175

Glu Leu Asn Tyr Glu Leu Pro Glu Leu Lys Ala Val Lys Ser Glu Met
180 185 190

Ile Ile Ala Arg Glu Met Gly Glu Ile Phe Ser Tyr Met Pro Gly Glu
195 200 205

Ile Asp Ser Tyr Met Lys Tyr Ile Asn Asn Lys Leu Ser Lys Ile Glu
210 215 220

<210> 39
<211> 224
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 39

Met Ile Asn Pro Val Thr Asn Thr Gln Gly Val Ser Pro Ile Asn Thr
1 5 10 15

Lys Tyr Ala Glu His Val Val Lys Asn Ile Tyr Pro Glu Ile Lys His
20 25 30

Asp Tyr Phe Asn Glu Ser Pro Asn Ile Tyr Asp Lys Lys Tyr Ile Ser
 35 40 45
 Gly Ile Thr Arg Gly Val Ala Glu Leu Lys Gln Glu Glu Phe Val Asn
 50 55 60
 Glu Lys Ala Arg Arg Phe Ser Tyr Met Lys Thr Met Tyr Ser Val Cys
 65 70 75 80
 Pro Glu Ala Phe Glu Pro Ile Ser Arg Asn Glu Ala Ser Thr Pro Glu
 85 90 95
 Gly Ser Trp Leu Thr Val Ile Ser Gly Lys Arg Pro Met Gly Gln Phe
 100 105 110
 Ser Val Asp Ser Leu Tyr Asn Pro Asp Leu His Ala Leu Cys Glu Leu
 115 120 125
 Pro Asp Ile Cys Cys Lys Ile Phe Pro Lys Glu Asn Asn Asp Phe Leu
 130 135 140
 Tyr Ile Val Val Val Tyr Arg Asn Asp Ser Pro Leu Gly Glu Gln Arg
 145 150 155 160
 Ala Asn Arg Phe Ile Glu Leu Tyr Asn Ile Lys Arg Asp Ile Met Gln
 165 170 175
 Glu Leu Asn Tyr Glu Leu Pro Glu Leu Lys Ala Val Lys Ser Glu Met
 180 185 190
 Ile Ile Ala Arg Glu Met Gly Glu Ile Phe Ser Tyr Met Pro Gly Glu
 195 200 205
 Ile Asp Ser Tyr Met Lys Tyr Ile Asn Asn Lys Leu Ser Lys Ile Glu
 210 215 220
 <210> 40
 <211> 188
 <212> Белок
 <213> Citrobacter rodentium
 <400> 40
 Met Leu Pro Thr Ser Gly Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ser Trp Met Tyr
 1 5 10 15
 Ile Ser Gly Lys Glu Asn Pro Ser Thr Pro Glu Ser Val Ser Glu Leu
 20 25 30
 Asn His Asn His Phe Leu Ser Pro Glu Leu Gln Glu Lys Leu Asp Val
 35 40 45
 Met Phe Ala Ile Tyr Ser Cys Ala Arg Asn Asn Asp Glu Arg Glu Asn
 50 55 60
 Ile Tyr Pro Glu Leu Arg Asp Phe Val Ser Ser Leu Met Asp Lys Arg
 65 70 75 80
 Asn Asn Val Phe Glu Val Ile Asn Glu Asp Thr Asp Glu Val Thr Gly
 85 90 95
 Ala Leu Arg Ala Gly Met Thr Ile Glu Asp Arg Asp Ser Tyr Ile Arg
 100 105 110

Asp Leu Phe Phe Leu His Ser Leu Lys Val Lys Ile Glu Glu Ser Arg
115 120 125

Gln Asp Lys Glu Asp Trp Lys Cys Lys Val Tyr Asp Leu Leu Cys Pro
130 135 140

His His Ser Ser Glu Leu Tyr Gly Asp Leu Arg Ala Ile Lys Cys Leu
145 150 155 160

Val Glu Gly Cys Ser Asp Asp Phe Ser Pro Phe Asp Thr Ile Lys Val
165 170 175

Pro Asp Leu Thr Tyr Asn Lys Gly Ser Leu Gln Cys
180 185

<210> 41
<211> 171
<212> Белок
<213> Citrobacter rodentium

<400> 41

Ala Asn Leu Tyr Ser Trp Met Tyr Ile Ser Gly Lys Glu Asn Pro Ser
1 5 10 15

Thr Pro Glu Ser Val Ser Glu Leu Asn His Asn His Phe Leu Ser Pro
20 25 30

Glu Leu Gln Glu Lys Leu Asp Val Met Phe Ala Ile Tyr Ser Cys Ala
35 40 45

Arg Asn Asn Asp Glu Arg Glu Asn Ile Tyr Pro Glu Leu Arg Asp Phe
50 55 60

Val Ser Ser Leu Met Asp Lys Arg Asn Asn Val Phe Glu Val Ile Asn
65 70 75 80

Glu Asp Thr Asp Glu Val Thr Gly Ala Leu Arg Ala Gly Met Thr Ile
85 90 95

Glu Asp Arg Asp Ser Tyr Ile Arg Asp Leu Phe Phe Leu His Ser Leu
100 105 110

Lys Val Lys Ile Glu Glu Ser Arg Gln Asp Lys Glu Asp Trp Lys Cys
115 120 125

Lys Val Tyr Asp Leu Leu Cys Pro His His Ser Ser Glu Leu Tyr Gly
130 135 140

Asp Leu Arg Ala Ile Lys Cys Leu Val Glu Gly Cys Ser Asp Asp Phe
145 150 155 160

Ser Pro Phe Asp Thr Ile Lys Val Pro Asp Leu
165 170

<210> 42
<211> 189
<212> Белок
<213> Энтеропатогенная E. coli

<400> 42

Met Leu Pro Thr Ser Gly Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ser Trp Met Tyr
1 5 10 15

Val Ser Gly Arg Gly Asn Pro Ser Thr Pro Glu Ser Val Ser Glu Leu
20 25 30

Asn His Asn His Phe Leu Ser Pro Glu Leu Gln Asp Lys Leu Asp Val
35 40 45

Met Val Ser Ile Tyr Ser Cys Ala Arg Asn Asn Asn Glu Leu Glu Glu
50 55 60

Ile Phe Gln Glu Leu Ser Ala Phe Val Ser Gly Leu Met Asp Lys Arg
65 70 75 80

Asn Ser Val Phe Glu Val Arg Asn Glu Asn Thr Asp Glu Val Val Gly
85 90 95

Ala Leu Arg Ala Gly Met Thr Ile Glu Asp Arg Asp Ser Tyr Ile Arg
100 105 110

Asp Leu Phe Phe Leu His Ser Leu Lys Val Lys Ile Glu Glu Ser Arg
115 120 125

Gln Gly Lys Glu Asp Ser Lys Cys Lys Val Tyr Asn Leu Leu Cys Pro
130 135 140

His His Ser Ser Glu Leu Tyr Gly Asp Leu Arg Ala Met Lys Cys Leu
145 150 155 160

Val Glu Gly Cys Ser Asp Asp Phe Asn Pro Phe Asp Ile Ile Arg Val
165 170 175

Pro Asp Leu Thr Tyr Asn Lys Gly Ser Leu Gln Cys Gly
180 185

<210> 43
<211> 189
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 43

Met Leu Pro Thr Ser Gly Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ser Trp Met Tyr
1 5 10 15

Val Ser Gly Arg Gly Asn Pro Ser Thr Pro Glu Ser Val Ser Glu Leu
20 25 30

Asn His Asn His Phe Leu Ser Pro Glu Leu Gln Asp Lys Leu Asp Val
35 40 45

Met Val Ser Ile Tyr Ser Cys Ala Arg Asn Asn Asn Glu Leu Glu Glu
50 55 60

Ile Phe Gln Glu Leu Ser Ala Phe Val Ser Gly Leu Met Asp Lys Arg
65 70 75 80

Asn Ser Val Phe Glu Val Arg Asn Glu Asn Thr Asp Glu Val Val Gly
85 90 95

Ala Leu Arg Ala Gly Met Thr Ile Glu Asp Arg Asp Ser Tyr Ile Arg
100 105 110

Asp Leu Phe Phe Leu His Ser Leu Lys Val Lys Ile Glu Glu Ser Arg
115 120 125

Gln Gly Lys Glu Asp Ser Lys Cys Lys Val Tyr Asn Leu Leu Cys Pro
130 135 140

His His Ser Ser Glu Leu Tyr Gly Asp Leu Arg Ala Met Lys Cys Leu
145 150 155 160

Val Glu Gly Cys Ser Asp Asp Phe Asn Pro Phe Asp Ile Ile Arg Val
165 170 175

Pro Asp Leu Thr Tyr Asn Lys Gly Ser Leu Gln Cys Gly
180 185

<210> 44
<211> 40
<212> ДНК
<213> Искусственный

<220>
<223> Праймер Z6024F

<400> 44
agatctgaag gagatattat gaacattcaa ccgaccatac 40

<210> 45
<211> 34
<212> ДНК
<213> Искусственный

<220>
<223> Праймер Z6024R

<400> 45
ctcgaggact cttgtttott cgattatatac aaag 34

<210> 46
<211> 28
<212> ДНК
<213> Искусственный

<220>
<223> Праймер NT10

<400> 46
ccggtacctc taaccattga cgcactcg 28

<210> 47
<211> 29
<212> ДНК
<213> Искусственный

<220>
<223> Праймер NT11

<400> 47
aacctgcaga actaggtatc tctaattgcc 29

<210> 48
<211> 29
<212> ДНК
<213> Искусственный

<220>
<223> Праймер NT12

<400> 48	
aacctgcagc tgactatcct cgtatatgg	29
<210> 49	
<211> 27	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Праймер NT13	
<400> 49	
ccgagctcag gtaatgagac tgtcagc	27
<210> 50	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Праймер del1F	
<400> 50	
ggtaccacca cacagaataa tc	22
<210> 51	
<211> 26	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Праймер del1R	
<400> 51	
cgctagccta tatactgctg ttggtt	26
<210> 52	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Праймер del2F	
<400> 52	
gctagctgac aggcaactct tggactgg	28
<210> 53	
<211> 29	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Праймер del2R	
<400> 53	
gagctcaaca taatttgatg gattatgat	29
<210> 54	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	

<220>

<223> Праймер

<400> 54

ttccatatga acattcaacc gacc

24

<210> 55

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Праймер

<400> 55

ggaattcaat aatagctgcc atcc

24

<210> 56

<211> 135

<212> Белок

<213> Salmonella

<400> 56

Met Glu Ser Lys Asn Ser Asp Tyr Val Ile Pro Asp Ser Val Lys Asn
1 5 10 15

Tyr Asn Gly Glu Pro Leu Tyr Ile Leu Val Ser Leu Trp Cys Lys Leu
20 25 30

Gln Glu Lys Trp Ile Ser Arg Asn Asp Ile Ala Glu Ala Phe Gly Ile
35 40 45

Asn Leu Arg Arg Ala Ser Phe Ile Ile Thr Tyr Ile Ser Arg Arg Lys
50 55 60

Glu Lys Ile Ser Phe Arg Val Arg Tyr Val Ser Tyr Gly Asn Leu His
65 70 75 80

Tyr Lys Arg Leu Glu Ile Phe Ile Tyr Asn Val Asn Leu Glu Ala Ala
85 90 95

Pro Thr Glu Ser His Val Ser Thr Gly Pro Lys Arg Lys Thr Leu Arg
100 105 110

Val Gly Asn Gly Ile Val Gly Gln Ser Ser Ile Trp Asn Glu Met Ile
115 120 125

Met Arg Arg Lys Lys Glu Ser
130 135

<210> 57

<211> 131

<212> Белок

<213> Enterobacteriaceae

<400> 57

Met Cys Glu Gly Tyr Val Glu Lys Pro Leu Tyr Leu Leu Ile Ala Glu
1 5 10 15

Trp Met Met Ala Glu Asn Arg Trp Val Ile Ala Arg Glu Ile Ser Ile
20 25 30

His Phe Asp Ile Glu His Ser Lys Ala Val Asn Thr Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Leu Ser Glu Val Thr Glu Ile Ser Cys Glu Val Lys Met Ile Pro Asn
50 55 60

Lys Leu Glu Gly Arg Gly Cys Gln Cys Gln Arg Leu Val Lys Val Val
65 70 75 80

Asp Ile Asp Glu Gln Ile Tyr Ala Arg Leu Arg Asn Asn Ser Arg Glu
85 90 95

Lys Leu Val Gly Val Arg Lys Thr Pro Arg Ile Pro Ala Val Pro Leu
100 105 110

Thr Glu Leu Asn Arg Glu Gln Lys Trp Gln Met Met Leu Ser Lys Ser
115 120 125

Met Arg Arg
130

<210> 58
<211> 170
<212> Белок
<213> Citrobacter rodentium

<400> 58

Met Cys Pro Asp Asn Thr His Ala Lys Lys Gln Tyr Leu Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asn Asp Ile His Tyr Pro Gly Gln Thr Asn His Asp Ala Cys Phe Ile
20 25 30

Pro Val Ser Val Arg Gln Tyr Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Ile Ile Val
35 40 45

Ala His Trp Cys Leu Leu Gln Gln Asn Trp Val Gln Arg Asn Gln Ile
50 55 60

Ala Glu Ala Phe His Ile Thr Ala Arg Arg Ala Ser Tyr Leu Ile Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Arg Ser Lys Thr Ser Arg Val Val Ser Ile Cys Arg His Gln
85 90 95

Thr Leu Pro Asn Lys Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Tyr Val Ile Arg Val
100 105 110

Leu Asp Ser Pro Thr Pro Ser Thr Arg Arg Glu Lys Ala Gly Pro Pro
115 120 125

Leu Val Ser Lys Arg Arg Val Gly Asn Gly Asp Arg Ser Met Ala Asn
130 135 140

Glu Leu Trp Asn Arg Leu Cys Ser Asn Arg Asn Ala Gly Lys Ile Leu
145 150 155 160

Lys Lys Lys Glu Asp Glu Asp Asp Gly Thr
165 170

<210> 59
<211> 12
<212> Белок

<213> *Citrobacter rodentium*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa = Ile или Leu

<400> 59

Gln Gln Glu Asn Ala Pro Ser Ser Xaa Gln Thr Arg
1 5 10

<210> 60

<211> 981

<212> ДНК

<213> Энтерогеморрагическая *E. coli*

<400> 60

```
atgctttcac cgataaggac aactttccat aactcagtaa atatagtga gagttcaccc 60
tgtcaaacgg tttcttttgc aggaaggaa tatgagttaa aggtcattga tgaaaaaacg 120
cctattcttt ttcagtgggt tgaacctaat cctgaacgat ataagaaaga tgaggttcca 180
atagttaata ctaagcagca tccctattta gataatgtca caaatgcggc aaggatagag 240
agtgatcgta tgataggat ttttgttgat ggcgattttt cagtcaacca aaagactgct 300
ttttcaaaat tggaacgaga ttttgaaaat gtaatgataa tctatcggga agatgttgac 360
ttcagtatgt atgacagaaa actatcagat atttatcatg atattatatg tgaacaaagg 420
ttacgaactg aagacaaaag agatgaatac ttgttgaaatc tgtagagaa agagctgagg 480
gaaatttcaa aggcgcagga ttctttgatt tctatgtatg caaagaaaag aaatcatgca 540
tggtttgatt tcttcagaaa ttttagcctta ttaaaagcag gagagatatt caggtgcaca 600
tataatacaa agaatcacgg tatttcattc ggggaggggt gtatctatct tgatattgat 660
atgatactta caggtaaagt tggtaacaata tatgtcctcg atggaatttc aatgcatgtg 720
gatcgtcgta atgatatgtt aaatattgaa aatagtgcga taattgttaa ccgtagtaat 780
catcctgctc tacttgaggg actttctttt atgcatagta aagtagatgc tcatccatat 840
tatgatgggt tggggaaaag agttaagaaa tattttaatt ttacaccatt acataattat 900
aatcattttt gtgactttat tgagtttaac caccctaata taatcatgaa cacaagtcag 960
tatacatgca gttcatggta a 981
```

<210> 61

<211> 531

<212> ДНК

<213> Энтерогеморрагическая *E. coli*

<400> 61

```
atgaatgtcc ttcgagctca agtagcatct agcggtcgag gggagtttac attaggtaat 60
gagactgtca gcattgtatt taatgaaacc gatgggcgtt ttctatccag cggcagtagt 120
gggggattgc ttactgagtt attcctttat gggtttaata acggccctga agctcttcgc 180
gataggatgc tcagtatgct ttcggactca ggtgaagcac aatcgcaaga gagtattcag 240
gacaaaatat ctcaatgtaa gtttcctggt agttcaggaa atttccagtg cccgccagag 300
tctattcagt gtccaattac actagagaga cccgaagaag gagtgtttgt caaaaattca 360
gatagtccgg cagtatgctg cttatttgat ttgatgcat tttctcgttt agctagtga 420
ggctcatatc atccactgac ccgagaacca ataacggcat caatgattat aagtcctgat 480
aaatgtgttt atgatcctat caagggaacc ttcattataa aagatagtta a 531
```

<210> 62

<211> 912

<212> ДНК

<213> Энтерогеморрагическая *E. coli*

<400> 62

```
atgttatcgc cctcttctat aaatttgagg tgttcatgga attctttaac cagaaacctg 60
acttcgcctg ataatcgtgt tttatcctct gtaagggatg ctgctgttca ctctgatagc 120
gggacgcaag taacggttg caacagaaca tatcgtgttg tggctactga taataagttt 180
tgcgttacaa gagaaagtca tagtggttgt tttactaatc tgttgcacag gttgggatgg 240
cctaagggag agattagcag aaaaattgag gctatgctga atacatcgcc agtgagcagc 300
actatagaaa gaggctctgt tcattcgaac agacctgatt tacctccagt ggattatgcg 360
```

cagccggagt	tacctccagc	ggattatact	caatcagagt	tgccgagggt	tagcaacaat	420
aaatcacccg	tgccaggtaa	tgttattggt	aaagggtgga	atgctgtcgt	gtatgaagat	480
atggaagata	caacaaaagt	gttgaagatg	tttactatat	ctcaaagcca	tgaagagggtg	540
acaagcgaag	ttcgttggtt	caatcagtat	tatgggttccg	ggagtgcaga	gaaaatatat	600
aatgataatg	gaaatgttat	tggattatga	atgaataaaa	taaatgggga	atctcttttg	660
gatattccat	cattaccagc	acaagctgaa	caggctattt	acgatatgtt	tgacagactg	720
gagaaaaaag	gaattctttt	tgttgataca	acagaaacaa	atgttttata	tgatcgtatg	780
agaaatgaat	ttaatccaat	agatatatca	tcttataatg	tttctgatat	ttcatggagt	840
gaacatcaag	tcattgcaatc	ttatcacgga	ggaaagctgg	atcttattag	tgtagtatta	900
agtaagatat	aa					912

<210> 63
 <211> 882
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 63						
atgttatcgc	catattctgt	aaatttgga	tgttcatgga	attctttaac	cagaaacctg	60
acttcgcctg	ataatcgtgt	tttatcctct	gtaagggatg	ctgccgttca	ttctgataat	120
ggggcgcaag	taaagggttg	caacagaaca	tatcgtgttg	ttgccaccga	taataagttt	180
tgcgttacaa	gagaaagtca	tagtggttgt	tttactaatc	tgttgcacag	gctgggatgg	240
cctaaggggg	agattagcag	gaaaattgag	gtcatgctga	atgcatcacc	agtgagcgct	300
gctatggaag	gaggcattgt	tcattcgaac	agacctgatt	tacctcctgt	tgattatgca	360
ccgccagagt	taccgagtgt	ggactataac	aggttgctcag	tacctggtaa	tgttattggc	420
aaagggggga	acgctgtagt	atatgaagat	gctgaggatg	caacaaaagt	cctgaagatg	480
tttactacat	ctcaaagcaa	tgaagagggtg	acaagcgaag	ttcgttgctt	caaccaatat	540
tatggtgccg	ggagtgcaga	aaaaatatat	ggcaataatg	gtgatattat	tggattatga	600
atggataaaa	taaatggaga	atcgctttta	aatatttcgt	ccttgccagc	acaggctgag	660
catgctattt	acgatatgtt	tgatagactg	gagcaaaaag	gaattctttt	tgtcgatata	720
acagagacaa	atgtcttata	tgaccgcgcg	aagaatgagt	ttaatccaat	agatatatca	780
tcttataatg	tttccgaccg	ttcatggagt	gaaagtcaaa	taatgcaatc	ttatcatggc	840
ggaaagcaag	atcttattag	tgtgggtatta	agtaaaattt	ag		882

<210> 64
 <211> 153
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 64						
atggtaatgc	ctggattagt	atcatatata	tcategactt	cattcgcgaa	tgagatggcg	60
gagatgcgtc	agcaggtaat	ggaagggcag	attgggtgat	ttctcctggg	aggggagaga	120
gttagagttt	cttatttatt	tcaattgcat	taa			153

<210> 65
 <211> 576
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 65						
atgccattaa	cctcagatat	tagatcacat	tcattttaatc	ttgggggtgga	ggttggtcgt	60
gcccgaattg	tagccaatgg	gcgcggagat	attacagtcg	gtggtgaaac	tgtcagtatt	120
gtgtatgatt	ctactaatgg	gcgcttttca	tccagtggcg	gtaatggcgg	attgctttct	180
gagttattgc	ttttgggatt	taatagtggg	cctcagacc	ttgggtgagag	aatgctaagt	240
atgctttcgg	actcaggtga	agcacaatcg	caagagagta	ttcagaacaa	aatatctcaa	300
tgtaaagttt	ctgtttgtcc	agagagactt	cagtgcgccg	ttgaggctat	tcagtgtcca	360
attacactgg	agcagcctga	aaaagggtatt	tttgtgaaga	attcagatgg	ttcagatgta	420
tgtactttat	ttgatgccgc	tgcattttct	cgtttggttg	gtgaaggctt	acccacccca	480
ctgaccgggg	aaccaataac	ggcatcaata	attgtaaaac	atgaagaatg	catttatgac	540
gataccagag	gaaacttcat	tataaagggt	aattga			576

<210> 66
 <211> 630
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (439)..(439)
 <223> n = любой нуклеотид

<400> 66
 atgcctgtta ccaccttaag tatcccaagt atatctcaat tatctcctgc aagagtacag 60
 tctttgcagg atgcagccag acttgaaagt ggaataagaa tatccattgg tagtggccaa 120
 tattctgttc actatgtcca actactggat ggattttcag ttgaaccggt gagaggagggc 180
 ttactggata ggctattggg gcgtgagcat cgaatggata gaagggctgt ggctctggaa 240
 aggcaattaa atggaggtgt cgatttttta agtagtggtta ataactattt tcagagtgtc 300
 atggcagaac acagagaaaa taaaacaggt aataaaatat taatggaaaa aataaattct 360
 tgtgtatttg gaacggattc taatcacttt tcttgcccgg agtcattttt gacatgcccg 420
 ataacgctgg acacacctna gactggagtg ttcatgagaa actcacgagg tgctgagata 480
 tgctctctat atgataagga tgcgttagtg caacttggtg aaactgggtg aactcatcct 540
 ctgagtcgag aacctataac agaatcaatg attatgagaa aagacgaatg tcactttgat 600
 gcaaaaagag aagctttttg ttgtaagtga 630

<210> 67
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 67
 atgcctgtag atttaacgcc ttatatattta cctgggggta gttttttgtc tgacattcct 60
 caagaaacct tgtctgagat acgtaatcag actattcgtg gagaagctca agtaagactg 120
 ggtgagttga tgggtgtcaat acgacctatg caggtaaagt gatattttat gggaagtctt 180
 aaccaggatg gtttatcgaa tgataacatc cagattggcc ttcaatatat agaacatatt 240
 gaacgtacac ttaatcatgg tagtttgaca agccgtgaag ttacagtact gcgtgaaatt 300
 gagatgctcg aaaatatgga attgctttct aactaccagt tagaggagtt gttagataaa 360
 attgaagtat gtgcatttaa tgtggagcat gcacaattgc aagtgccaga gagcttacga 420
 acatgccctg ttacattatg tgaaccagaa gatgggggat tcattaatat atcttggtta aacaaggggc 540
 tcaaatgttt gtatgttgta tgataaaatg gcattaatat atcttggtta aacaaggggc 540
 gctcatcctt tgagcaggga atcaatcgca gtttcaatga ttgtaggaag agataattgt 600
 gcttttgact ctgacagagg taacttcgtt ttaaaaaatt aa 642

<210> 68
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 68
 atgcctgtag atttaacgcc ttatatattta cctgggggta gttttttgtc tgacattcct 60
 caagaaacct tgtctgagat acgtaatcag actattcgtg gagaagctca aataagactg 120
 ggtgagttga tgggtgtcaat acgacctatg caggtaaagt gatattttat gggaagtctt 180
 aaccaggatg gtttatcgaa tgataacatc cagattggcc ttcaatatat agaacatatt 240
 gaacgtacac ttaatcatgg tagtttgaca agccgtgaag ttacagtact gcgtgaaatt 300
 gagatgctcg aaaatatgga tttgctttct aactaccagt tagaggagtt gttagataaa 360
 attgaagtat gtgcatttaa tgtggagcat gcacaattgc aagtgccaga gagcttacga 420
 acatgccctg ttacattatg tgaaccagaa gatgggggat ttatgaggaa ttcaatgaat 480
 tcaaatgttt gtatgttgta tgataaaatg gcattaatat atcttggtta aacaaggggc 540
 gctcatcctt tgagcaggga atcaatcgca gtttcaatga ttgtaggaag agataattgt 600
 gcttttgacc ctgacagagg taacttcgtt ttaaaaaatt aa 642

<210> 69
 <211> 630
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 69
 atgcctgtta ccaccttaag tatcccaagt atatctcaat tatctcctgc aggagtacag 60
 tctttgcagg atgctgccag acttgaaagt ggaataagaa tatccattgg tagtggccaa 120
 tattctgttc actatgtcca gctactggat ggattttcag ttgaaccggt gagaggagggc 180

ttactggata	ggctattggg	gcgtgagcat	cgaatggaga	gaagggctgt	ggctctggaa	240
aggcaattaa	atggaggtgt	cgatttttta	agtagtgta	ataactattt	tcagagtgtc	300
atggcagaac	acagagaaaa	taaaacaagt	aataaaatat	taatggaaaa	aataaattct	360
tgtttattta	gacctgatto	taatcacttt	tcttgcccg	agtcattttt	gacatgcccg	420
ataacgctgg	acacacctga	gactgggggtg	ttcatgagaa	actcacgagg	tgctgagata	480
tgctctctat	atgataagga	cgcgttagtg	caacttggtg	aaactgggtg	agctcatcct	540
ctgagtcgag	aacctataac	agaatcaatg	attatgagaa	aagatgaatg	tcactttgat	600
acaaaaagag	aagctttttg	ttgtaagtga				630

<210> 70
 <211> 576
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 70						
atgccattaa	cctcagatat	tagatcacat	tcattttaatc	ttgggggtgga	ggttgttcgt	60
gcccgaattg	tagccaatgg	gcgcggagat	attacagtcg	gtgggtgaaac	tgtcagtatt	120
gtgtatgatt	ctactaatgg	gcgcttttca	tccagtggcg	gtaatggcgg	attgctttct	180
gagttattgc	ttttgggatt	taatagtgg	cctcgagccc	ttggtgagag	aatgctaagt	240
atgctttcgg	actcaggtga	agcacaatcg	caagagagta	ttcagaacaa	aatatctcaa	300
tgtaagtttt	ctgtttgtcc	agagagactt	cagtgcgccg	ttgaggctat	tcartgtcca	360
attacactgg	agcagcctga	aaaagggtatt	tttgtgaaga	attcagatgg	ttcagatgta	420
tgtactttat	ttgatgccgc	tgcattttct	cgtttggttg	gtgaaggctt	acccaccca	480
ctgaccggg	aaccaataac	ggcatcaata	attgtaaaac	atgaagaatg	catttatgac	540
gataccagag	gaaacttcgt	tataaagggt	aattga			576

<210> 71
 <211> 510
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 71						
atggacgctt	ttattgtaga	tcctgttcaa	ggggaactat	attcgggttt	aagccataca	60
gaactagccg	atatcattag	attggctgat	tctgttgaaa	atcaattgaa	tgagggaat	120
tcatttcttg	atgtattcag	tacatatatg	gggcaggtta	tttctgaatt	tatgcatagt	180
aatgataaca	gaattgaatt	gttacagcgg	cgattacatt	catgttcatt	tttagttaat	240
attgaagaaa	tgtcttacat	agatgaagca	ttacagtgcc	cgattacgct	ggcaattcct	300
caacgaggtg	tttttttaag	aaatgctgaa	ggttccagag	tatgtagttt	atatgatgaa	360
atggctcttt	ctcgtataat	taatgatggg	atgcatcacc	caactaagcag	agagccaata	420
acattatcaa	tgcttggtgg	cagagagcag	tgtgagtttg	attgcagtat	cggtcacttt	480
acggtgagga	gtgattgtta	ttcagtgtag				510

<210> 72
 <211> 231
 <212> ДНК
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 72						
atggcagacc	gcaaacagca	ccgcgctatc	gcggagcgtc	gtcacatcca	gactgaaatc	60
aaccgcagac	tttcccgcg	atcacgcgtc	gcgcaaatca	tgacatcaa	tatgctgcat	120
gagcgcagcc	acgcactatc	aaacatttat	tccgcctctg	ttttcagcta	tctggcggat	180
gatctgcacg	agtttcaaca	gctcatccag	cagcaaaaaca	aactccatta	a	231

<210> 73
 <211> 176
 <212> Белок
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 73

Met	Asn	Val	Leu	Arg	Ala	Gln	Val	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Phe
1															
			5						10					15	

Thr Leu Gly Asn Glu Thr Val Ser Ile Val Phe Asn Glu Thr Asp Gly
20 25 30

Arg Phe Leu Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Leu Leu Thr Glu Leu Phe
35 40 45

Leu Tyr Gly Phe Asn Asn Gly Pro Glu Ala Leu Arg Asp Arg Met Leu
50 55 60

Ser Met Leu Ser Asp Ser Gly Glu Ala Gln Ser Gln Glu Ser Ile Gln
65 70 75 80

Asp Lys Ile Ser Gln Cys Lys Phe Pro Val Ser Ser Gly Asn Phe Gln
85 90 95

Cys Pro Pro Glu Ser Ile Gln Cys Pro Ile Thr Leu Glu Arg Pro Glu
100 105 110

Glu Gly Val Phe Val Lys Asn Ser Asp Ser Ser Ala Val Cys Cys Leu
115 120 125

Phe Asp Phe Asp Ala Phe Ser Arg Leu Ala Ser Glu Gly Ser Tyr His
130 135 140

Pro Leu Thr Arg Glu Pro Ile Thr Ala Ser Met Ile Ile Ser Pro Asp
145 150 155 160

Lys Cys Val Tyr Asp Pro Ile Lys Gly Asn Phe Ile Ile Lys Asp Ser
165 170 175

<210> 74
<211> 303
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 74

Met Leu Ser Pro Ser Ser Ile Asn Leu Gly Cys Ser Trp Asn Ser Leu
1 5 10 15

Thr Arg Asn Leu Thr Ser Pro Asp Asn Arg Val Leu Ser Ser Val Arg
20 25 30

Asp Ala Ala Val His Ser Asp Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Gly Asn
35 40 45

Arg Thr Tyr Arg Val Val Val Thr Asp Asn Lys Phe Cys Val Thr Arg
50 55 60

Glu Ser His Ser Gly Cys Phe Thr Asn Leu Leu His Arg Leu Gly Trp
65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Ile Ser Arg Lys Ile Glu Ala Met Leu Asn Thr Ser
85 90 95

Pro Val Ser Thr Thr Ile Glu Arg Gly Ser Val His Ser Asn Arg Pro
100 105 110

Asp Leu Pro Pro Val Asp Tyr Ala Gln Pro Glu Leu Pro Pro Ala Asp
115 120 125

Tyr Thr Gln Ser Glu Leu Pro Arg Val Ser Asn Asn Lys Ser Pro Val
130 135 140

Pro Gly Asn Val Ile Gly Lys Gly Gly Asn Ala Val Val Tyr Glu Asp
145 150 155 160

Met Glu Asp Thr Thr Lys Val Leu Lys Met Phe Thr Ile Ser Gln Ser
165 170 175

His Glu Glu Val Thr Ser Glu Val Arg Cys Phe Asn Gln Tyr Tyr Gly
180 185 190

Ser Gly Ser Ala Glu Lys Ile Tyr Asn Asp Asn Gly Asn Val Ile Gly
195 200 205

Ile Arg Met Asn Lys Ile Asn Gly Glu Ser Leu Leu Asp Ile Pro Ser
210 215 220

Leu Pro Ala Gln Ala Glu Gln Ala Ile Tyr Asp Met Phe Asp Arg Leu
225 230 235 240

Glu Lys Lys Gly Ile Leu Phe Val Asp Thr Thr Glu Thr Asn Val Leu
245 250 255

Tyr Asp Arg Met Arg Asn Glu Phe Asn Pro Ile Asp Ile Ser Ser Tyr
260 265 270

Asn Val Ser Asp Ile Ser Trp Ser Glu His Gln Val Met Gln Ser Tyr
275 280 285

His Gly Gly Lys Leu Asp Leu Ile Ser Val Val Leu Ser Lys Ile
290 295 300

<210> 75
<211> 293
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 75

Met Leu Ser Pro Tyr Ser Val Asn Leu Gly Cys Ser Trp Asn Ser Leu
1 5 10 15

Thr Arg Asn Leu Thr Ser Pro Asp Asn Arg Val Leu Ser Ser Val Arg
20 25 30

Asp Ala Ala Val His Ser Asp Asn Gly Ala Gln Val Lys Val Gly Asn
35 40 45

Arg Thr Tyr Arg Val Val Ala Thr Asp Asn Lys Phe Cys Val Thr Arg
50 55 60

Glu Ser His Ser Gly Cys Phe Thr Asn Leu Leu His Arg Leu Gly Trp
65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Ile Ser Arg Lys Ile Glu Val Met Leu Asn Ala Ser
85 90 95

Pro Val Ser Ala Ala Met Glu Arg Gly Ile Val His Ser Asn Arg Pro
100 105 110

Asp Leu Pro Pro Val Asp Tyr Ala Pro Pro Glu Leu Pro Ser Val Asp
115 120 125

Tyr Asn Arg Leu Ser Val Pro Gly Asn Val Ile Gly Lys Gly Gly Asn
130 135 140

Ala Val Val Tyr Glu Asp Ala Glu Asp Ala Thr Lys Val Leu Lys Met
145 150 155 160

Phe Thr Thr Ser Gln Ser Asn Glu Glu Val Thr Ser Glu Val Arg Cys
165 170 175

Phe Asn Gln Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Ala Glu Lys Ile Tyr Gly Asn
180 185 190

Asn Gly Asp Ile Ile Gly Ile Arg Met Asp Lys Ile Asn Gly Glu Ser
195 200 205

Leu Leu Asn Ile Ser Ser Leu Pro Ala Gln Ala Glu His Ala Ile Tyr
210 215 220

Asp Met Phe Asp Arg Leu Glu Gln Lys Gly Ile Leu Phe Val Asp Thr
225 230 235 240

Thr Glu Thr Asn Val Leu Tyr Asp Arg Ala Lys Asn Glu Phe Asn Pro
245 250 255

Ile Asp Ile Ser Ser Tyr Asn Val Ser Asp Arg Ser Trp Ser Glu Ser
260 265 270

Gln Ile Met Gln Ser Tyr His Gly Gly Lys Gln Asp Leu Ile Ser Val
275 280 285

Val Leu Ser Lys Ile
290

<210> 76
<211> 50
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 76

Met Val Met Pro Gly Leu Val Ser Tyr Ile Ser Ser Thr Ser Phe Ala
1 5 10 15

Asn Glu Met Ala Glu Met Arg Gln Gln Val Met Glu Gly Gln Ile Gly
20 25 30

Gly Phe Leu Leu Gly Gly Glu Arg Val Arg Val Ser Tyr Leu Phe Gln
35 40 45

Leu His
50

<210> 77
<211> 191
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 77

Met Pro Leu Thr Ser Asp Ile Arg Ser His Ser Phe Asn Leu Gly Val
1 5 10 15

Glu Val Val Arg Ala Arg Ile Val Ala Asn Gly Arg Gly Asp Ile Thr
20 25 30

Val Gly Gly Glu Thr Val Ser Ile Val Tyr Asp Ser Thr Asn Gly Arg
35 40 45

Phe Ser Ser Ser Gly Gly Asn Gly Gly Leu Leu Ser Glu Leu Leu Leu
 50 55 60
 Leu Gly Phe Asn Ser Gly Pro Arg Ala Leu Gly Glu Arg Met Leu Ser
 65 70 75 80
 Met Leu Ser Asp Ser Gly Glu Ala Gln Ser Gln Glu Ser Ile Gln Asn
 85 90 95
 Lys Ile Ser Gln Cys Lys Phe Ser Val Cys Pro Glu Arg Leu Gln Cys
 100 105 110
 Pro Leu Glu Ala Ile Gln Cys Pro Ile Thr Leu Glu Gln Pro Glu Lys
 115 120 125
 Gly Ile Phe Val Lys Asn Ser Asp Gly Ser Asp Val Cys Thr Leu Phe
 130 135 140
 Asp Ala Ala Ala Phe Ser Arg Leu Val Gly Glu Gly Leu Pro His Pro
 145 150 155 160
 Leu Thr Arg Glu Pro Ile Thr Ala Ser Ile Ile Val Lys His Glu Glu
 165 170 175
 Cys Ile Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Asn Phe Ile Ile Lys Gly Asn
 180 185 190

<210> 78
 <211> 209
 <212> Белок
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (147)..(147)
 <223> Хаа = любая аминокислота

<400> 78

Met Pro Val Thr Thr Leu Ser Ile Pro Ser Ile Ser Gln Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Arg Val Gln Ser Leu Gln Asp Ala Ala Arg Leu Glu Ser Gly Ile
 20 25 30
 Arg Ile Ser Ile Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Val His Tyr Val Gln Leu
 35 40 45
 Leu Asp Gly Phe Ser Val Glu Pro Val Arg Gly Gly Leu Leu Asp Arg
 50 55 60
 Leu Leu Gly Arg Glu His Arg Met Asp Arg Arg Ala Val Ala Leu Glu
 65 70 75 80
 Arg Gln Leu Asn Gly Gly Val Asp Phe Leu Ser Ser Val Asn Asn Tyr
 85 90 95
 Phe Gln Ser Val Met Ala Glu His Arg Glu Asn Lys Thr Gly Asn Lys
 100 105 110
 Ile Leu Met Glu Lys Ile Asn Ser Cys Val Phe Gly Thr Asp Ser Asn
 115 120 125

His Phe Ser Cys Pro Glu Ser Phe Leu Thr Cys Pro Ile Thr Leu Asp
 130 135 140

Thr Pro Xaa Thr Gly Val Phe Met Arg Asn Ser Arg Gly Ala Glu Ile
 145 150 155 160

Cys Ser Leu Tyr Asp Lys Asp Ala Leu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly
 165 170 175

Gly Thr His Pro Leu Ser Arg Glu Pro Ile Thr Glu Ser Met Ile Met
 180 185 190

Arg Lys Asp Glu Cys His Phe Asp Ala Lys Arg Glu Ala Phe Cys Cys
 195 200 205

Lys

<210> 79
 <211> 213
 <212> Белок
 <213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 79

Met Pro Val Asp Leu Thr Pro Tyr Ile Leu Pro Gly Val Ser Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Asp Ile Pro Gln Glu Thr Leu Ser Glu Ile Arg Asn Gln Thr Ile
 20 25 30

Arg Gly Glu Ala Gln Val Arg Leu Gly Glu Leu Met Val Ser Ile Arg
 35 40 45

Pro Met Gln Val Asn Gly Tyr Phe Met Gly Ser Leu Asn Gln Asp Gly
 50 55 60

Leu Ser Asn Asp Asn Ile Gln Ile Gly Leu Gln Tyr Ile Glu His Ile
 65 70 75 80

Glu Arg Thr Leu Asn His Gly Ser Leu Thr Ser Arg Glu Val Thr Val
 85 90 95

Leu Arg Glu Ile Glu Met Leu Glu Asn Met Glu Leu Leu Ser Asn Tyr
 100 105 110

Gln Leu Glu Glu Leu Leu Asp Lys Ile Glu Val Cys Ala Phe Asn Val
 115 120 125

Glu His Ala Gln Leu Gln Val Pro Glu Ser Leu Arg Thr Cys Pro Val
 130 135 140

Thr Leu Cys Glu Pro Glu Asp Gly Val Phe Met Arg Asn Ser Met Asn
 145 150 155 160

Ser Asn Val Cys Met Leu Tyr Asp Lys Met Ser Leu Ile Tyr Leu Val
 165 170 175

Lys Thr Arg Ala Ala His Pro Leu Ser Arg Glu Ser Ile Ala Val Ser
 180 185 190

Met Ile Val Gly Arg Asp Asn Cys Ala Phe Asp Ser Asp Arg Gly Asn
 195 200 205

Phe Val Leu Lys Asn
210

<210> 80
<211> 213
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 80
Met Pro Val Asp Leu Thr Pro Tyr Ile Leu Pro Gly Val Ser Phe Leu
1 5 10 15
Ser Asp Ile Pro Gln Glu Thr Leu Ser Glu Ile Arg Asn Gln Thr Ile
20 25 30
Arg Gly Glu Ala Gln Ile Arg Leu Gly Glu Leu Met Val Ser Ile Arg
35 40 45
Pro Met Gln Val Asn Gly Tyr Phe Met Gly Ser Leu Asn Gln Asp Gly
50 55 60
Leu Ser Asn Asp Asn Ile Gln Ile Gly Leu Gln Tyr Ile Glu His Ile
65 70 75 80
Glu Arg Thr Leu Asn His Gly Ser Leu Thr Ser Arg Glu Val Thr Val
85 90 95
Leu Arg Glu Ile Glu Met Leu Glu Asn Met Asp Leu Leu Ser Asn Tyr
100 105 110
Gln Leu Glu Glu Leu Leu Asp Lys Ile Glu Val Cys Ala Phe Asn Val
115 120 125
Glu His Ala Gln Leu Gln Val Pro Glu Ser Leu Arg Thr Cys Pro Val
130 135 140
Thr Leu Cys Glu Pro Glu Asp Gly Val Phe Met Arg Asn Ser Met Asn
145 150 155 160
Ser Asn Val Cys Met Leu Tyr Asp Lys Met Ala Leu Ile His Leu Val
165 170 175
Lys Thr Arg Ala Ala His Pro Leu Ser Arg Glu Ser Ile Ala Val Ser
180 185 190
Met Ile Val Gly Arg Asp Asn Cys Ala Phe Asp Pro Asp Arg Gly Asn
195 200 205

Phe Val Leu Lys Asn
210

<210> 81
<211> 209
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 81
Met Pro Val Thr Thr Leu Ser Ile Pro Ser Ile Ser Gln Leu Ser Pro
1 5 10 15
Ala Gly Val Gln Ser Leu Gln Asp Ala Ala Arg Leu Glu Ser Gly Ile
20 25 30

Arg Ile Ser Ile Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Val His Tyr Val Gln Leu
35 40 45

Leu Asp Gly Phe Ser Val Glu Pro Val Arg Gly Gly Leu Leu Asp Arg
50 55 60

Leu Leu Gly Arg Glu His Arg Met Glu Arg Arg Ala Val Ala Leu Glu
65 70 75 80

Arg Gln Leu Asn Gly Gly Val Asp Phe Leu Ser Ser Val Asn Asn Tyr
85 90 95

Phe Gln Ser Val Met Ala Glu His Arg Glu Asn Lys Thr Ser Asn Lys
100 105 110

Ile Leu Met Glu Lys Ile Asn Ser Cys Leu Phe Arg Pro Asp Ser Asn
115 120 125

His Phe Ser Cys Pro Glu Ser Phe Leu Thr Cys Pro Ile Thr Leu Asp
130 135 140

Thr Pro Glu Thr Gly Val Phe Met Arg Asn Ser Arg Gly Ala Glu Ile
145 150 155 160

Cys Ser Leu Tyr Asp Lys Asp Ala Leu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly
165 170 175

Gly Ala His Pro Leu Ser Arg Glu Pro Ile Thr Glu Ser Met Ile Met
180 185 190

Arg Lys Asp Glu Cys His Phe Asp Thr Lys Arg Glu Ala Phe Cys Cys
195 200 205

Lys

<210> 82
<211> 191
<212> Белок
<213> Энтерогеморрагическая E. coli

<400> 82

Met Pro Leu Thr Ser Asp Ile Arg Ser His Ser Phe Asn Leu Gly Val
1 5 10 15

Glu Val Val Arg Ala Arg Ile Val Ala Asn Gly Arg Gly Asp Ile Thr
20 25 30

Val Gly Gly Glu Thr Val Ser Ile Val Tyr Asp Ser Thr Asn Gly Arg
35 40 45

Phe Ser Ser Ser Gly Gly Asn Gly Gly Leu Leu Ser Glu Leu Leu Leu
50 55 60

Leu Gly Phe Asn Ser Gly Pro Arg Ala Leu Gly Glu Arg Met Leu Ser
65 70 75 80

Met Leu Ser Asp Ser Gly Glu Ala Gln Ser Gln Glu Ser Ile Gln Asn
85 90 95

Lys Ile Ser Gln Cys Lys Phe Ser Val Cys Pro Glu Arg Leu Gln Cys
100 105 110

Pro Leu Glu Ala Ile Gln Cys Pro Ile Thr Leu Glu Gln Pro Glu Lys
115 120 125

Gly Ile Phe Val Lys Asn Ser Asp Gly Ser Asp Val Cys Thr Leu Phe
130 135 140

Asp Ala Ala Ala Phe Ser Arg Leu Val Gly Glu Gly Leu Pro His Pro
145 150 155 160

Leu Thr Arg Glu Pro Ile Thr Ala Ser Ile Ile Val Lys His Glu Glu
165 170 175

Cys Ile Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Asn Phe Val Ile Lys Gly Asn
180 185 190

<210> 83
<211> 169
<212> Бeлoк
<213> Энтeрoгeмoррaгичeскaя E. coli

<400> 83

Met Asp Ala Phe Ile Val Asp Pro Val Gln Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
1 5 10 15

Leu Ser His Thr Glu Leu Ala Asp Ile Ile Arg Leu Ala Asp Ser Val
20 25 30

Glu Asn Gln Leu Asn Gly Gly Asn Ser Phe Leu Asp Val Phe Ser Thr
35 40 45

Tyr Met Gly Gln Val Ile Ser Glu Phe Met His Ser Asn Asp Asn Arg
50 55 60

Ile Glu Leu Leu Gln Arg Arg Leu His Ser Cys Ser Phe Leu Val Asn
65 70 75 80

Ile Glu Glu Met Ser Tyr Ile Asp Glu Ala Leu Gln Cys Pro Ile Thr
85 90 95

Leu Ala Ile Pro Gln Arg Gly Val Phe Leu Arg Asn Ala Glu Gly Ser
100 105 110

Arg Val Cys Ser Leu Tyr Asp Glu Met Ala Leu Ser Arg Ile Ile Asn
115 120 125

Asp Gly Met His His Pro Leu Ser Arg Glu Pro Ile Thr Leu Ser Met
130 135 140

Leu Val Ala Arg Glu Gln Cys Glu Phe Asp Cys Ser Ile Gly His Phe
145 150 155 160

Thr Val Arg Ser Asp Cys Tyr Ser Val
165

<210> 84
<211> 76
<212> Бeлoк
<213> Энтeрoгeмoррaгичeскaя E. coli

<400> 84

Met Ala Asp Arg Lys Gln His Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg His Ile
1 5 10 15

Gln Thr Glu Ile Asn Arg Arg Leu Ser Arg Ala Ser Arg Val Ala Gln
 20 25 30

Ile Met His Ile Asn Met Leu His Glu Arg Ser His Ala Leu Ser Asn
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Val Phe Ser Tyr Leu Ala Asp Asp Leu His Glu
 50 55 60

Phe Gln Gln Leu Ile Gln Gln Gln Asn Lys Leu His
 65 70 75

Последовательность ДНК NleA *Citrobacter rodentium*

ATGAACATTCAACCGAACATACATTCCGGAATCACCACACAGAATAATCAACAACATCATCACGCAGAA
 CAAGTGCCTGTCTCTAGCTCAATACCGCGATCAGATTTACCTCCAAATTGCGAAGCTGGATTTGTTGTG
 CATATTCAGAGGATATACAGCAACATGTACCGGAATGTGGTGAAACAACGGCTCTATTAAGCTTGATA
 AAAGATGAAGGCCTGCTCTCAGGACTAGATAAATATCTTGCTCCTCACCTTGAAGAAGGCTCCCTTGGG
 AAAAAAGCATTGGATACGTTTGGTTTATTCAATGTTACTCAAATGGCATTAGAGATACCCAGTTCCGTT
 CCAGGCATATCTGGTAAATATGGTGTTCAGATGAACATTGTAAAACAGACATACATCCAACAACCGGG
 AACTATTTTTTACAGCTATTTCCCTCTGCATGACGAAATAGGTTTTAACTTCAAAGATCTTCTGGCCCA
 TTAAAAAATGCATTAACCAACAGCAGTATATCGGCTACTGCATCGACTGTAGCCCCACACCAAACGAC
 CCAATGCCATGGTTTGGATTAAGTCTCAAGTGGTTTCGTAATCATGGTGTAGAACTTCTATAGTCAAA
 ACCGAAAATGGATGGAAGCTTGTAGGGGAAACACCTCTTACTCCAGATGGCCCCAAAGCCAATTATACG
 GAAGAATGGGTTATCAGGCCGGGAGAAGCAGATTTTAAATATGGAACATCGCCATTACAGGCAACTCTT
 GGACTGGAGTTTGGTGCATTTTTAAGTGGGATTTAGATAATCCTAATACCAAATATGCCATCCTTACC
 AATGCTGCCGCAAATGCTATTGGTGTCTGCTGGAGGGTTTGCAGTATCCAAAGTCCCCGGCATAGATCCA
 ATGCTGTCCCCTCATGTGGTGCATGCTTGGGCAAGCAGCGGGGCATGCCGTACAATGTAATACCCCC
 GGATTAAAGCCAGACACTATTTTATGGTGGGCAGGCGCGACATTTGGAGCTGCTGATTTAAATAAAGCC
 GAATTTGATAAAGTGGGTTCACTGACTACCTCGTATATGGTTCCATGCACGGGAAGGAGCTTTATTC
 CCAAAATAGCAAGACATTGCCCGTGTAAACAGGCCGAGACATAAAAGCTATGGAAGAAGGCGTACCCGTT
 GGACATCAACATCCAAAACCGGAGGATGTGGTCATCGATATCGAAGGTGGCAATTCACCACATCATAAT
 CCATCAAATTATGTTGACACCTTTGAAATAATCCAAGAAACAAGGGTCTAA (SEQ ID NO:1)

ФИГ. 1А

Последовательность белка NleA *Citrobacter rodentium*

MNIQPNIHSGITTONNQHHHAEEQVPVSSSI PRSDLPNCEAGFVVHIPEDIQHVPECGETTALLSLI
 KDEGLLSGLDKYLAPHLEEGSLGKKALDTFGLFNVTQMALEIPSSVPGISGKYGVQMNI VKPDIHPTTG
 NYFLQLFPLHDEIGFNFKDLPGPLKNALTNSSISATASTVAPTNDPMPWFGLTAQVVRNHGVELPIVK
 TENGWKLVGETPLTPDGPKANYTEEWVIRPGEADFKYGTSPLOATLGLEFGAHFKWDLDNPNTRYAILT
 NAAANAIGAAGGFVAVSKVPGIDPMLSPHVGAMLGQAAGHAVQCNTPGLKPDITLWWAGATFGAADLNKA
 EFDKVRFTDYPRIWFHAREGALFPNKQDIARVTGADIKAMEEGVPVGHQHPKPEDVVIDIEGGNSPHHN
 PSNYVDTFEIIQETRV (SEQ ID NO:22)

ФИГ. 1В

Последовательность ДНК NleA энтеропатогенной E. coli

atgaacattcaaccgatcgtaacatccggaatcaccacacaaaacaatcgacatcatcacgcagaacaa
acgtcccctacacaaataccgcaatccgaattacctaattggaatgcgaacgggatttgtgttcatatc
ccagaggatatgcagcgacatgcaccggaatgcggtgaaacaacagctctactgagcttgataaaagat
gaaggtctgctctctgggctggataaatatcttgacctcatcttgaagaaggctctgcaggaaaaaa
gcattggatatgtttggtttattcaatgtctctcagatggcattagaaataccagcaccgttccgggt
atctctggtaaatatggtgtccagctaaacattgtaaaaccagatattcatcctacatcaggtaattat
tttttacagatattccctttgcatgatgaaataggtattaatttttaagaccttccgtggtccattaaa
aatgcattaagcaacagcaatataccaaccactgtatcgactgctgcatccactattgcatcagccact
acttcgacggtaaccaccgctcaaaagacccaataaccatggtttggttaacagctcaagtagttcgt
aatcatggtgtggaacttccatagtcaaaactgaaatggatggaagcttgttgagaaactcctctt
actcctgatggcccaagcaaatatactgaagagtgggtgatcagaccgggagaagcagatttttaa
tatggtgcatctccactacaggcaactctagggttgagtttggcgacatttcaagtgggatttagat
aaccctaataactaaatagccgttcttaccaatgtgcgcaaatgcgcttgggtgctgtagggggattt
gcagtatccagattttactggtacagatccaatgttaagtccctcatatcggtgcaatggttgggcaagca
gcggggcatgccatacagtataatacccccgattaaagccagacactattttatggtgggcagggtact
actcttgactggctgatttaaacaaaggccgagtttggagaggccagattcactgactatcctcgtata
tggtggcatgcaagagaaggtgccattttcccaataaagcagatattgaacatgccacaggggctgat
atacgcgcaatggaagaaggtgtatctgttgacaacggcatccaaatccagaggatgtggtcatcaat
atcgaaagcaataactcaccacatcataaccatcaaattatgttgataccgttgatataatccaagaa
acaagagtctaa (SEQ ID NO:2)

ФИГ. 1С**Последовательность белка NleA энтеропатогенной E. coli**

MNIQPIVTSGITTONNRHHAEQTSPTQIPQSELPNGCETGFVVHIPEDMQRHAPECGETTALLSLIKD
EGLLSGLDKYLAPHLEEGSAGKKALDMFGLFNVSQMALEIPSTVPGISGKYGVQLNIVKPDHPTSGNY
FLQIFPLHDEIGINFKDLPGPLKNALSNSNIPTTVSTAASIASTSTVTASKDPIFWGLTAQVVR
NHGVELPIVKTENGWKLVGETPLTPDGPKANYTEEWVIRPGEADFKYGASPLQATLGLFEGAHFWDLD
NPNTKYAVLTNAANALGAVGGFAVSRTGTDPMLSPHIGAMVGOAGHAIQYNTPLKPDITLWWAGT
TLGLADLNKAEFGEARFTDYPRIWWHAREGAIFFPKADIEHATGADIRAMEEGVSVGQRHPNPEDVVIN
IESNNSPHHNPSNYVDTVDIQETRV (SEQ ID NO:23)

ФИГ.1D**Последовательность ДНК NleA энтерогеморрагической E. coli**

ATGAACATTCAACCGACCATACAACTCTGGAATCACCTCACAAAACAATCAACATCATCAACAGAACAA
ATACCCCTCTACACAAATACCGCAATCCGAATTACCTCTAGGATGCCAAGCTGGATTGTGTTAATATT
CCAGATGATATACAGCAACATGCACCGGAATGCGGTGAAACAACAGCTCTACTGAGCTTGATAAAAGAT
AAGGTCTGCTCTCAGGGCTAGACGAATATATAGCTCCTCACCCTTGAAGAAGGATCCATAGGAAAAAA
ACATTGGATATGTTTGGTTTATTCAATGTTACCCAAATGGCATTAGAGATACCTAGTTCGGTTTCAGGC
ATCTCTGGTAAATATGGTGTCCAGCTAAACATTGTAAACCAGATATTATCCTACATCAGGTAATTAT
TTTTTACAGATATTCCCTCTGCATGATGAAATAGGTTTAAATTTTAAAGACCTTCCCTGGCCGTTAAAA
AATGCATTAAGCAACAGTAATATATCAACCACTGCAGTGTGCACTATTGCATCGACTGGAACATCAGCC
ACTACTTCGACGGTAACCACCGAGCCAAAAGACCCAATACCATGGTTTGGATTAAACAGCTCAAGTGGTT
CGTAATCATGGTGTAGAACTTCTATAGTCAAACTGAAATGGATGGAAGCTTGTGGAGAAACACCA
CTTACTCCTGATGGGCCGAAAGCAAATTACACGGAGGAGTGGGTATCAGACCGGGAGAAGCAGATTTT
AAATATGGTGCATCTCCATTACAGGCAACTCTAGGGCTGGAGTTTGGCGCACATTTCAAGTGGGATTTA
GATAACCCATAATAAATATGCCGTTCTTACCAATGCTGCCGCAAATGCGCTTGGTGCCTTAGGGGGA
TTTGCAGTATCCAGATTTGCTAGTACAGATCCAATGTTAAGTCCTCATATCGGTGCAATGGTTGGGCAA
GCAGCAGGGCATGCCATACAGTATAATACCCCTGGATTAAAGCCAGACACTATTTTATGGTGGGCTGGT
CGCACACTGGGGCTGCCGATTTAAACAAGGCCGAGTTTGAAGTAGCTAGATTCACTGACTATCCTCGT
ATATGGTGGCACGCAAGAGAAGGAGCTATTTCCCAATAAAGCAGATATTGAACATGCCACAGGTGCT
GATATACGCGCAATGGAAGAAGGTATCCCTGTTGGACAGCGGCATCCAAATCCAGAGGATGTGTAATC
GATATCGAAAGCAATGGCTTACCACATCATAATCCATCAAATCATGTTGATATCTTTGATATAATCCAA
GAAACAAGAGTCTAA (SEQ ID NO:3)

ФИГ. 1Е

Последовательность белка NleA энтерогеморрагической E. coli

mnigptiqsgitsqnnqhhteqipstqipqselpigcagfvvnipddiqqhapecgettallslid
kgllsgldeyiaephleegsigkktldmfglfnvtqmaleipssvsgisgkygvqlnivkpdihptsgny
flqifplhdeigfnfkdlpgplknalsnsnisttavstiasgttsattstvttepkdpipwfgltaqvv
rnhgvelpivktengwklvgetpltpdgpkanyteewvirpgeadfkygasplqatlglefgahfkwdl
dnpntkyavltnaaanalgaggfavrsfastdpmlsphigamvggaaghaiqyntpglkdtilwwag
atlgadlnkaefevarfthdypriwwharegaifpnkadiehatgadrameegipvgqrhnpdpdvvi
diesnglphhnpshvdfidiiqetr (SEQ ID NO:24)

ФИГ. 1F**Последовательность ДНК NleB Citrobacter rodentium**

tattctttttcagtggtttgaagcAAGGCCAGAGCGATACGGAAAAGGTGAAGTACCGATATTGAATAC
CAAAGAGCATCCGTATTTGAGCAATATTATAAATGCTGCAAAAATAGAAAATGAGCGCGTAATaGGAGT
ACTGGTAGACGGAGACTTTACTTATGAGCAAAGAAAAGAATTTCTCAGTCTTGAAGATGAACATCAAAA
TATAAAGATAATATATCGGGAAAATGTTGATTTTCAGTATGTATGATAAAAAACTGTCTGATATTTATCT
TGAAAATATTCATGAACAAGAATCATATCCAGCGAGTGAGAGAGATAATTATCTGTTaGGCTTaTTAAG
AGAAGAGTTAAAAAATATTCCATACGGAAAGGACTCTTTGATTGAATCATATGCAGAAAAAAGAGGTCA
TACTTGGTTTGTATTTTTTAGAACTTGGCGGTATTGAAGGGGGGGGGTGTGTTACAGAGACGGGTAA
AACTGGATGCCATAACATATCTCCATGTGGGGGATGTATATATCTTGATGCAGATATGATTATTACTGA
TAAATTAGGTGTCTGTATGCTCCTGATGGTATcgctgtgcatgtagattgtaatatgaga (SEQ
ID NO:4)

ФИГ. 2A

AAGGCCAGAGCGATACGGAAAAGGTGAAGTACCGATATTGAATACCAAAGAGCATCCGTATTTGAGCAA
TATTATAAATGCTGCAAAAATAGAAAATGAGCGTAATGGAGTACTGGTAGACGGAGACTTTACTTATGA
GCAAAGAAAAGAATTTCTCAGTCTTGAAGATGAACATCAAAAATATAAAGATAATATATCGGGAAAATGT
TGATTTTCAGTATGTATGATAAAAAACTGTCTGATATTTATCTTGAAAATATTTCATGAACAAGAATCATA
TCCAGCGAGTGAGAGAGATAATTATCTGTTGGTTTTAAGAGAAGAGTTAAAAAATATTCCATACGGAAA
GGACTCTTTGATTGAATCATATGCAGAAAAAAGAGGTCATACTTGGTTTGTATTTTTTAGAACTTGGC
GGTATTGAAGGGGGGGGGTGTGTTACAGAGACGGGTAAACTGGATGCCATAACATATCTCCATGTGG
GGGATGTATATATCTTGATGCAGATATGATTATTACTGATAAATTAGGTGTCTGTATGCTCCTGATGG
TAT (SEQ ID NO:5)

ФИГ. 2B**Последовательность белка NleB Citrobacter rodentium**

ILFQWFEARPERYKGGEVPIlNTKEHPYLSNIINAAKIENERVIGVLVDGDFTYEQRKEFLSLEDEHQN
IKIIYRENVDFSMYDKKLSDIYLENIHEQESYPASERDNYLLGLLREELKNIPYKDSLIESYAEKRGH
TWFDFFRNLAVLKGGGLFTETGKTGCHNISPCGGCIYLDADMIITDKLGVLYAPDGIAPHVDCNDE
(SEQ ID NO:25)

ФИГ. 2C

RPERYKGGEVPIlNTKEHPYLSNIINAAKIENERVIGVLVDGDFTYEQRKEFLSLEDEHQNIKIYREN
VDFSMYDKKLSDIYLENIHEQESYPASERDNYLLGLLREELKNIPYKDSLIESYAEKRGH
LAFLKGGGLFTETGKTGCHNISPCGGCIYLDADMIITDKLGVLYAPDG (SEQ ID NO:26)

ФИГ. 2D

Последовательность ДНК NleB энтеропатогенной E. coli

atgttatcttcattaaatgtccttcaatccagcttcagaggaaagacagctttatcaaatagtacactt
ctccagaaagtttcttttctgctggaaaagaatattctctggaacctattgatgaaagaaccttattctt
tttcagtgggttgagcaatattataaatgctgcaaaaatagaaaatgagcgtataatcggtgtgctggta
catccgtatgttgagcaatattataaatgctgcaaaaatagaaaatgagcgtataatcggtgtgctggta
gatggaaattttacttatgaacaaaaaaggaaatcttcaatcttgaaaatgaacatcaaaatataaaa
ataatctaccgagcagatgtggatttcagcatgtatgataaaaaactatctgatatttaccttgaaaat
atccataaacaagaatcataccctgccagtggaggggataaattatctgttaggcttattaagagaagag
ttaaaaaatatacccagaaggtaaggactctttgattgagtcatatgcagaaaaagagaacatacttgg
tttgattttttcaggaatttgccatattgaaggctggaagtttgtttacagagacgggaaaaactgga
tgccataacatatcgccctgtagcggatgtatatatcttgatgccgacatgattattaccgataaatta
ggagtcctgtatgctcctgatggatcgctgtgcatgtagattgtaatgatgagataaaaagtcttgaa
aatggtgcatagattgtcaatcgtagtaatcatccagcattacttgcaggcctcgatattatgaagagt
aaagttgacgctcatccatattatgatggtctaggaagggtatcaagcggcattttaactatcatcg
ttacacaattataatgctttttgtgattttattgaatttaagcatgaaaatattataaccgaataccagt
atgtataaccagcagttcatggttaa (SEQ ID NO:6)

ФИГ. 2Е**Последовательность белка NleB энтеропатогенной E. coli**

MLSSLNLVQLSSFRGKTALSNSTLLQKVSFAGKEYSLEPIDERTPILFQWFPEARPERYKGEVPILNTKE
HPYLSNIINAAKIENERIIGVLVDGNFTYEQKKEFLNLENEHQNIKIIRADVDFSMYDKKLSDIYLEN
IHQESYPASERDNYLLGLLREELKNIPEGKDSLIESYAEKREHTWFDFFRNLAALKAGSLFTETGKTG
CHNISPCSGCIYLDADMIITDKLGVLYAPDGIHVHDCNDEIKSLENGAIVNRSNHPALLAGLDIMKS
KVDAHPPYDGLGKGIKRHFNYSSLHNYNAFCDFIEFKHENIIPNTSMYTSSSW (SEQ ID NO:27)

ФИГ. 2F**Последовательность ДНК NleB энтерогеморрагической E. coli**

ATGTTATCTTCATTAAATGTCCTTCAATCCAGCTTCAGAGGAAAGACAGCTTTATCAAATAGTACACTT
CTCCAGAAAGTTTCTTTTCTGCTGGAAAAGAATATCTCTGGAACCTATTGATGAAAAAACCCCTATTCTT
TTTCAGTGGTTTGAAGCAAGGCCAGAGCGATACGAAAAAGGAGAAGTACCAATATTGAATACCAAGAA
CATCCGTATTTGAGCAATATTATAAATGCTGCAAAAATAGAAAATGAGCGTATAATCGGTGTGCTGGTA
GATGGAAATTTTACTTATGAACAAAAAAGGAATTTCTCAGTCTTGAAAATGAATATCAAAATATAAAA
ATAATCTACCGAGCAGATGTGGATTTTCAGCATGTATGATAAAAACTATCTGATATTTACCTTGAAAAT
ATCCATAAACAAGAATCATACCCTGCCAGTGAGAGGGATAATTATCTGTTAGGCTTATTAAGAGAAGAG
TTAAAAAATATCCCAGAAGGTAAGGACTCTTTGATTGAGTCATATGCAGAAAAAGAGAACATACTTGG
TTTGATTTTTTTCAGGAATTTGGCCATGTTGAAGGCTGGAAGTTTGTTTACAGAGACGGGAAAAAAGTGA
TGCCATAACATATCGCCCTGTAGCGGATGTATATATCTTGATGCCGACATGATTATTACCGATAAATTA
GGAGTCCTGTATGCTCCTGATGGTATCGCTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
AATGGTGCGATAGTTGTCAATCGTAGTAATCATCCAGCATTACTTGAGGCTCGATATTATGAAGAGT
AAAGTTGACGCTCATCCATATTATGATGGTCTAGGAAAGGGTATCAAGCGGCATTTTAACTATTTCATCG
TTACACGATTATAATGCTTTTTGTGATTTTATTGAATTTAAGCATGAAAATATTATACCGAATACCACT
ATGTATACCTGCAGTTCATGGTAA (SEQ ID NO:7)

ФИГ. 2G**Последовательность белка NleB энтерогеморрагической E. coli**

mlsslnlvqlssfrgktalsnstllqkvsfagkeyplepidektplilfqwfearperyerkygevpilntke
hpylsniinaakieneriigvlvdgnftyeqkksleneyqnikiiyradvdfsmysdkklsdiylen
ihkgesypaserdnyllgllreelknipegkdsliesyakrehtwfdffrnlaamlkagslftetgktg
chnispcsgciyldadmiitdklgvlyapdgiavhdcndeiikslengaivnrsnhpallagldimks
kvdahppyydglgkgikrhfnysllhdyndfcdfiefkheniipntsmyscssw (SEQ ID NO:28)

ФИГ. 2H

MLSPIRTTFHNSVNIVQSSPCQTVSFAGKEYELKVIDEKTPIILFQWFEPNPERYKKDEVPIVNTKQHPY
LDNVTAARIESDRMIGIFVDGDFSVNQKTAFSKLERDFENVMIYREDVDVDFSMYDRKLSDIYHDIICE
QRLRTEDKRDEYLLNLLLEKELREISKAQDSLISMYAKKRNHAWFDFFRNLAALKAGEIFRCTYNTKNHG
ISFGEIGCIYLDMDMILTGLGTIYAPDGISMHVDRNDSVNIENSAIVNRSNHPALLEGLSFMHSHKVD
AHPYYDGLGKGKVKYFNFTPLHNYNHFCDFIEFNHPNIIMNTSQYTCSSW (SEQ ID NO:29)

ФИГ. 2I

Последовательность ДНК NleB энтерогеморрагической E. coli

atgctttcac cgataaggac aactttccat aactcagtaa atatagtgca gagttcacc
 tgtcaaacgg tttcttttgc aggaaggaa tatgagttaa aggtcattga tgaaaaaacg
 cctattcttt ttcagtgggt tgaacctaat cctgaacgat ataagaaaaga tgagggtcca
 atagttaata ctaagcagca tccctattta gataatgtca caaatgcggc aaggatagag
 agtgatcgta tgataggtat tttgttgat ggcgattttt cagtcaacca aaagactgct
 ttttcaaat tggacgaga ttttgaaaat gtaatgataa tctatcgga agatgttgac
 ttcagtatgt atgacagaaa actatcagat atttatcatg atattatatg tgaacaaagg
 ttacgaactg aagacaaaag agatgaatac ttgttgaatc tgtagagaa agagctgagg
 gaaatttcaa aggcgcagga ttctttgatt tctatgtatg caaagaaaag aaatcatgca
 tggtttgatt tcttcagaaa tttagcctta ttaaaagcag gagagatatt cagggtgcaca
 tataatacaa agaatacagg tatctcatc ggggaggggt gtatctatct tgatatggat
 atgatactta caggtaagct tggtaacaata tatgctcctg atggaatttc aatgcatgtg
 gatcgtcgta atgatatgtt aaatattgaa aatagtcaa taattgttaa ccgtagtaat
 catcctgctc tacttgaggg actttctttt atgcatagta aagtagatgc tcatccatat
 tatgatgggt tggggaagg agttaagaaa ttttttaatt ttacaccatt acataattat
 aatcattttt gtgactttat tgagttaaac caccctaata taatcatgaa cacaagtcag
 tatacatgca gttcatggta a (SEQ ID NO:60)

ФИГ. 2J**Последовательность ДНК NleC Citrobacter rodentium**

ATGAAAATTCCTCACTCCAGCCCAGCTTCAACTTTTTTCGCCCCAGCAGGATACTCTGCTGCCGTTGCT
 CCCAATCGTTCCGACAATGCCTATGCTGATTACGTATTGGATATAGGCAAGCGAATAACCACTTCCGCG
 GAAGATTTAGGCAACCTATATGAAAATGTCATTTCGCGCCGTTTCGTGACAGCCGTAGCAAGCTCATAGAT
 CAGCATACGGTCGATATGATTGGTAACACTATACTTGATGCTTTGAGCCGATCACAAACCTTTCGTGAT
 GCCGTAAGCTATGGCATTATAATAAGGAGGTACACATTGGTTCATTAAATACAGAAACGAATACGAG
 CTCACCGGAGAATCCCCCGTCAAAGTTGATGATATTCAATCACTAACCTGTACCGAATTATATGAATAC
 GATGTCGGGCAAGAACCAATTTTACCCATTTGCGAGGCAGCAGAAAACGATAACGAAGAGCCTTATGTC
 AGTTTTAGTGTTCGCCAGATACTGACTCTTATGAGATGCCATCGTGGCAGGAAGGGCTGATTACAGAG
 ATTATTCATCATGTGACTGGAGCTAGCGATCCGTCTGGAGATAGTAATATAGAGCTAGGACCCACGGAG
 ATTCTCGCACGTCGTGTGCTCAAGAGCTGGGATGGACTGTCCCCGACTTCATAGGATATGCAGAGCCA
 GATCGTGAAGCTCATCTTAGGGGACGTAACCTGAATGCCCTTCGACAGGCGCCATGCGACATGAAGAT
 AATGAGAGGACTTTCTTCGAAAGGCTGGGTATGATCAGTGATCGATATGAGGCGAGTCCCTGATTTTACA
 GAGTATTCGCTGTGTCTAACATAGAATATGGATTATCCAGCAACATGATTTTCCCGGGTTGGCTATC
 GACGATAATTTACAGGATGCAAATCAGATCCAACCTCTATCATGGAGCACCTTATATCTTTACATTCCGG
 GATGTGGACAAACACAATCAGCGCTGA (SEQ ID NO:8)

ФИГ. 3A**Последовательность белка NleC Citrobacter rodentium**

MKIPSLQPSFNFFAPAGYSAAVAPNRSNAYADYVLDIGKRIPLSAEDLGNLYENVIRAVRDSRSKLID
 QHTVDMIGNTILDALSRSTFRDAVSYGIHNKEVHIGCIKYRNEYELNGESPVKVDDIQSLTCTELYEY
 DVGQEPILPICEAGENDNEEPYVSFSVAPDTSYEMPSWQEGLIHEIIHHVTGASDPSGDSNIELGPTE
 ILARRVAQELGWTVPDFIGYAEPDREAHLRGRNLNALRQAAMRHEDNERTFFERLGMISDRYEASPDFT
 EYSAVSNIEYGFIOQHDFPGLAIDDLQDANQIQLYHGAPYIFTFGDVKHNQR (SEQ ID NO:30)

ФИГ. 3B

Последовательность ДНК NleC энтеропатогенной E. coli

atgaaaattccctcattacagtcctcaacttcaacttttccgccccggcaggatactctgctccattgct
cctaactcgtgctgaaaatgcctatgcggattacggttttgatataaggaagcgaataccactttccgca
gcagatttaagcaacgtatacgaagtgtaatacgcgcgcgtccatgacagccgtagcaggcttatcgat
cagcatacagtcgatatgatcggcaacactgtacttgatgctttgagccgatcacagacatttcgtgat
gccgtaagctatggcattcataatgagaaggtacacattgggtgcattaaatacagaaacgaatacgag
cttaacgaagaatcttctgtcaaaattgatgatattcaatcactaacctgtaacgaattatatgaatat
gatgtcgggcaagagccaattttcccatttgcgaagcaggagaaaaacgataacgaagagccttatgtc
agttttagtggttgccagatactgactcttatgagatgccatcgtggcagggaaggaactgattcacgag
attattcatcatgttactggatctagcgtccatctggagatagtaatatagagttaggaccaccgag
attctcgcacgtcgtgtcgtcaagaactgggatggagtgttccgacttcaaaggatatgcagagcca
gaacgtgaagctcatcttaggttacgtaacctgaatgcccttcgacaggctgccatgaggcatgaagag
aatgagaggggctttctcgaaaggctgggtacgatcagtgaccgatatgaggcgagtcctgatttcaca
gagtattccgctgtgtctaacataggatcgggatttatccagcaacatgattttcctggattggctatc
aacgataatttacaggatgcaaatcagatccaactgtatcatggcgcccccttatatttttacatttggg
gatgtggacaaaacacaatcagcgatga (SEQ ID NO:9)

ФИГ. 3С

Последовательность белка NleC энтеропатогенной E. coli

MKIPSLQSNFNSAPAGYSAPIAPNRAENAYADYVLDIGKRIPLSAADLSNVYESVIRAVHDSRSLID
QHTVDMIGNTVLDALSRSTFRDAVSYGIHNEKVHIGCIKYRNEYELNEESSVKIDDIQSLTCNELY
DVGQEPFIPICEAGENDNEEPYVSFSVAPDTSYEMPSWQEGLIHEIIHHVTGSSDPSGDSNIELGPTE
ILARRVAQELGWSVPDFKGYAEPEREHLRLRLNLALRQAAMRHEENERAFFERLGTISDRYEASPDFT
EYSAVSNIGYGFIIQHDFFGLAINDNLQDANQIQLYHGAPYIFTFGDVKHNQR (SEQ ID NO:31)

ФИГ. 3D

Последовательность ДНК NleC энтерогеморрагической E. coli

ATGAAAATTCCCTCATTACAGTCCAACTTCAACTTTTCCGCCCCGGCAGGATACTCTGCTCCCATTTGCT
CCTAATCGTGCTGAAAATGCCATATGCGGATTACGTTTTGGATATAGGTAAGCGAATACCACTTTCCGCA
GCAGATTAAAGCAACGTATACGAAAGTGTAATACGCGCCGTCATGACAGCCGTAGCAGGCTTATCGAT
CAGCATACAGTCGATATGATCGGCAACACTGTACTTGATGCTTTGAGCCGATCACAGACATTTCTGTGAT
GCCGTAAGCTATGGCATTCTATAATGAGAAGGTACACATTGGTTGCATTAAATACAGAAACGAATACGAG
CTTAACGAAGAATCTTCTGTCAAATTGATGATATTCAATCACTAACCTGTAACGAATTATATGAATAT
GATGTGCGGGCAAGAGCCAATTTTCCCCATTTGCGAAGCAGGAGAAAACGATAACGAAGAGCCTTATGTC
AGTTTTAGTGTTGCCCGAGATACTGACTCTTATGAGATGCCATCGTGGCAGGAAGGACTGATTACAGAG
ATTATTCATCATGTTACTGGATCTAGCGATCCATCTGGAGATAGTAATATAGAGTTAGGACCCACCGAG
ATTCTCGCACGTCGTGTGCTCAAGAACTGGGATGGAGTGTTCCCGACTTCAAAGGATATGCAGAGCCA
GAACGTGAAGCTCATCTTAGGCTACGTAACCTGAATGCCCTTCGACAGGCTGCCATGAGGCATGAAGAG
AATGAGAGGGCTTTCTTGGAAAGGCTGGGTACGATCAGTGACCGATATGAGGCGACTCTGATTTACACA
GAGTATTCGCTGTGTCTAACATAGGATACGGATTTATCCAGCAACATGATTTCTTGGATTGGCTATC
AACGATAATTTACAGGATGCAAATCAGATCCAACCTGTATCATGGCGCCCCCTATATTTTACATTTGGG
GATGTGGACAAACACAATCAGCAATGA (SEQ ID NO:10)

ФИГ. 3Е

Последовательность белка NleC энтерогеморрагической E. coli

mkipsqlqsnfnfsapagysapiapnraenayadyvldigkriplsaadlsnvyesviravhdsrslid
qhtvdmigntvldalrsqtfrdavsylhnekvhigci kyrneyelneessvkiddiqsltcnelzey
dvqgepifpiceagendneepvvsfsvapdtdsyempswqegliheiihhvtgssdpsgdsnielgpte
ilarrvaqelgwsvpdfkgyaepereahlrlrlnlalrqaamrheenerafferlgtisdryeaspdf
eysavsnigygfiiqqhdfpqlaaindnlqdanqilqlyhgapyiftfgdvdkhnqq (SEQ ID NO:32)

ФИГ. 3F

Последовательность ДНК NleD *Citrobacter rodentium*

ATGCGCCCTACATCCCTTAACCTGACATTACCTTCGTTACCTCTACCCTCATCTTCAAATTCATTTCA
GCCACAGACATTCAATCTCTTGTAAAAATGTCGGGTGTGCGCTGGGTGAAAAACAACCAACTCTGT
TTCCACGGGACTGACCTTAAATCTACCAGCATCTTGAAGCTGCCCTCGATAAGATCGAATCCACAGAC
ACTGGACGTACTCTTTTGAAGTGTATTGAATTAACATCCCGACTCAAATCAGAAAAACTGGCAATACAT
CTCGATTCTGCTGAGTTAGGGGTGATAGCACACTGCAATGCGGATGCTGAAAACTCCCGAGGAACTGGC
TCCGACTTTCATCTGTAATCTGAATGCAGTTGAATATCCCTGCGGGCAAGGAATTAGCCTGGTAGACTTT
CATGCATGCATTGTTTTCCATGAACCTCTCCACGTTTTCCACAATTTAAATGGAGAGCGCCTGAAAGTT
GAGAGTTCTCAACCAGAATTACAAACACACTCCCCACTTTTACTCGAAGAAGCCAGGACTGTTGGGTG
GGTGTCTTTTCTGAAGAAGTTCTTTCAGAAAAATAAATTCGTGAAGAGATTGGGATGCCCCGCAGAAC
TTCTACCCGCACGATTCTCTCTATTTCATGATGACAATACAGTGACTCAGAGATTCCAGCGGAAAAAA
CTGCATCCGTTACTTTAG (SEQ ID NO:11)

ФИГ. 4А

Последовательность белка NleD *Citrobacter rodentium*

MRPTSLNLTPLSLPLPSSSNSISATDIQSLVKMSGVRWVKNNQQLCFHGTDLKIYQHLEAALDKIESTD
TGRLLNCIELTSRLKSEKLAIHLDSAEELGVIAHCNADAENSRGTGSDFHCLNNAVEYPCGGQGISLVDF
HACIVFHELLHVFNHNLNGERLKVESQPELQTHSPLLEEARTVGLGAFSEEVLSENKFREEIGMPRRT
FYPHDSSLIHDDNTVTQRFQKKLHPLL (SEQ ID NO:33)

ФИГ. 4В

Последовательность ДНК NleD энтеропатогенной *E. coli*

atgcgccctacgtccctcaacttggtattacatcagtcacacgtcgagctcaatgtcagatacagat
atcgagtcctcttgtaaaagcatcgagcggtcaatggataaaaaataatccgcaactcgtttccagggg
actgatcataatatatcagcagattgaagcagcactcgataagattggtctctacagagacagggcgt
gtactcctgaatgctattgaatcaatatcccgacttaaatcagaaacagtggttaatacacctcaactct
tccagactaggagttatggcacatagagatatagatgctgagaaccatcggggactggttccgatttt
caactgaatctgaatgcagttgaatatccctgtggggagggattagcgtggtggactttcatgcgact
attgtttttcatgagttgctccatgttttccacaatttaaattggggagcgtttgaaagttgagagttcc
cgaccagaatcacaaaaatactctccacttttactcgaagaagccaggactgttggttggtggggtttt
tcagaggaggtgctttcagaaaaataattccgcgaagagattgggatgccccgtagaacctcctaccg
cacgactcagctcttattcatgatgacaatacagtgagctctgggattccaacaggttaagactgcatcca
ttgcttttag (SEQ ID NO:12)

ФИГ. 4С

Последовательность белка NleD энтеропатогенной *E. coli*

MRPTSLNLVLHQSSTSSMSDTEISLVKASSVQWIKNNPQLRFQGTDHNIYQQIEAALDKIGSTETGR
VLLNAIESISRLKSETVVIHLNSSLRGVMAHRDIDAENHRGTGSDFHCLNNAVEYPCGEGISVVDHAT
IVFHELLHVFNHNLNGERLKVESRPESQKYSPLLEEARTVGLGAFSEEVLSENKFREEIGMPRRTSYP
HDSALIHDDNTVSLGFQVRLHPLL (SEQ ID NO:34)

ФИГ. 4D

Последовательность ДНК NleD энтерогеморрагической *E. coli*

ATGCGCCCTACGTCCCTCAACTTGGTATTACATCAGTCATCAAGGTCGAGCTCAATGTCAGATACAGAT
ATCGAGTCTCTTGTAAAGCATCGAGCGTTCAATGGATAAAAAATAATCCGCAACTTCGTTTCCAGGGG
ACTGATCATAATATATATCAGCAGATTGAAGCAGCACTCGATAAGATTGGCTCTACAGAGACAGGGCGT
GTACTCCTGAATGCTATTGAATCAATATCCCGACTTAAATCAGAAACAGTGGTAATACACCTCAACTCT
TCCAGACTAGGAGTTATGGCACATAGAGATATAGATGCTGAGAACCATCGGGGACTGGTTCGGATTTT
CACTGTAATCTGAATGCAGTTGAATATCCCTGTGGGGAGGGGATTAGCGTGGTGGACTTTCATGCGACT
ATTGTTTTTTCATGAGTTGCTCCATGTTTTCCACAATTTAAATGGGGAGCGTTTGAAAGTTGAGAGTTCC
CGAGCAGAATCACAAAAATACTCTCCACTTTTACTCGAAGAAGCCAGGACTGTTGGGTGGGGGCTTTT
TCAGAGGAGGTGCTTTTCAGAAAAATAATTCACGAAGAGATTGGGATGCCCCGTAGAACCTCTACCCG
CRCGACTCAGCTCTTATTCATGATGACAATACAGTGAGTCTGGGATTCCAACAGGTAAGACTGCATCCA
TTGCTTTAG (SEQ ID NO:13)

ФИГ. 4Е

Последовательность белка NleD энтерогеморрагической E. coli

mrptslnlvihqssrrssmsdtdieslvkassvqwiknpqlrfqgtdhniyqqieaaldkigstetgr
vllnaiesisrlksetvvihlnssrlgvmahrdidaenhrgtgsdfhcnlnaveypcgegisvvdhfat
ivfhellhvfhnlnngerlrvessraesqkyspllleartvlgafseevlsenkfheeigmprrtsyp
xdsalihddntvslgfqqvrlhpl1 (SEQ ID NO:35)

ФИГ. 4F**Последовательность ДНК NleE Citrobacter rodentium**

tactttaatgaatcaccCAATGTATATGATAAGAAGTATATATCTGGCGTAAGTAGAGGAGTAGCTGAA
CTAAAACAGGAAGGATTTATTAACGAGAAAGCCAGGCGACTTGCTTATATGCAAGCAATGTATTCTGTA
TGTCGGGAAGAGTTTAAACCTATTTCCAGAAACGAAGCTAGTACACCGGAAGGCAGCTGGCTAACAGTT
ATATCCGGAAAACGCCCAATGGGACAGTTTTCTGTAGATAGCTTATATCATCCTGACTTACATGCATTG
TGTGAGCTTCCGATATTTGTTGCAAGATCTTCCCTAAAGAAAAACAATGATTTTTTGTATATAGTGATT
GTGTACAGAAATGACAGCCCTCTGGGAGAACACGAGCAAATCGATTTATAGAATTATATAATAAAAA
AGAGACATCATGCAGGAATTAAATTATGAATCTCCAGAGTTAAAGGCTGTGAAATCTGAAATGATTATT
gcacgtgaaatgggagaaatctt (SEQ ID NO:14)

ФИГ. 5A

CAATGTATATGATAAGAAGTATATATCTGGCGTAAGTAGAGGAGTAGCTGAACTAAAACAGGAAGGATT
TATTAACGAGAAAGCCAGGCGACTTGCTTATATGCAAGCAATGTATTCTGTATGTCCGAAGAGTTTAA
ACCTATTTCCAGAAACGAAGCTAGTACACCGGAAGGCAGCTGGCTAACAGTTATATCCGGAAAACGCC
AATGGGACAGTTTTCTGTAGATAGCTTATATCATCCTGACTTACATGCATTGTTGTGAGCTTCCGATAT
TTGTTGCAAGATCTTCCCTAAAGAAAAACAATGATTTTTTGTATATAGTGATTGTGTACAGAAATGACAG
CCCTCTGGGAGAACACGAGCAAATCGATTTATAGAATTATATAATAAAAAAGAGACATCATGCAGGA
ATTAAATTATGAATCTCCAGAGTTAAAGGCTGTGAAATCTGAAATGATTATT (SEQ ID NO:15)

ФИГ. 5B**Последовательность белка NleE Citrobacter rodentium**

YFNESPNVYDKKYISGVTRGVAELKQEGFINEKARRLAYMQAMYSVCPEEFKPIRNEASTPEGSWLTV
ISGKRPMGQFSVDSLYHPDLHALCELPDICCKIFPKENNDFLYIVIVYRNDSPLEQRANRFIELYNIK
RDMQELNYESPELKAVKSEMI IAREMGEI (SEQ ID NO:36)

ФИГ. 5C

NVYDKKYISGVTRGVAELKQEGFINEKARRLAYMQAMYSVCPEEFKPIRNEASTPEGSWLTVISGKR
PMGQFSVDSLYHPDLHALCELPDICCKIFPKENNDFLYIVIVYRNDSPLEQRANRFIELYNIKRDIMQ
ELNYESPELKAVKSEMI (SEQ ID NO:37)

ФИГ. 5D**Последовательность ДНК NleE энтеропатогенной E. coli**

atgattaatcctgttactaataactcagggcgtgtcccctataaataactaaatgctgaacatgtgggtg
aaaaataatttaccggaaaattaaacatgattactttaatgaatcaccgaatatatgataagaagtat
atatccggtataaccagaggagtagctgaactaaaacaggaagaatttgtaacgagaaagccagacgg
ttttcttatatgaagactatgtattctgtatgtccagaagcgtttgaacctatttccagaaatgaagcc
agtacaccggaaggaagctggctaacagttatatccggaaaacgccaatggggcagttttctgtagat
agtttatacaatcctgatttacatgcattatgtgagcttccggacatttggtgtaagatcttccctaaa
gaaaataatgattttttatacatagttgtgtgtacagaaatgacagccctctaggagaacaacgggca
aatagatttatagaattatataatataaaaaagagatatcatgcaggaattaaattatgagttaccagag
ttaaaggcagtaaaatctgaaatgattatcgacgtgaaatgggagaaatcttttagctacatgcctggg
gaaatagacagtttatatgaaatacataaataaaactttctaaaattgagtag (SEQ ID NO:16)

ФИГ. 5E

Последовательность белка NleE энтеропатогенной E. coli

MINPVTNTQGVSPINTKYAEHVVKNIYPKIKHDYFNESPNYDKKYISGITRGVAELKQEEFVNEKARR
FSYMKTMYSVCPEAFEPISRNEASTPEGSWLTVISGKRPMQFQSVDSLNPDLHALCELPDICCKIFPK
ENNDFLYIVVVYRNDSPLEGEQRANRFIELYNIKRDIMQELNYELPELKAVKSEMIAREMGEIFSYPG
EIDSYMKYINNKLKSKIE (SEQ ID NO:38)

ФИГ. 5F**Последовательность ДНК NleE энтерогеморрагической E. coli**

ATGATTAATCCTGTTACTAATACTCAGGGCGTGTCCCTATAAATACTAAATATGCTGAACATGTGGTG
AAAAATATTTACCCGGAATTAACATGATTACTTTAATGAATCACCCAATATATATGATAAGAAGTAT
ATATCCGGTATAACCAGAGGAGTAGCTGAACAAAACAGGAAGAATTTGTAAACGAGAAAGCCAGACGG
TTTTCTTATATGAAGACTATGTATTCTGTATGTCCAGAAGCGTTTGAACCTATTTCCAGAAATGAAGCC
AGTACACCCGAAGGAAGCTGGCTAACAGTTATATCCGGAAAACGCCCAATGGGGCAGTTTCTGTAGAT
AGTTTATACAATCCTGATTTACATGCATTATGTGAGCTTCCGGACATTTGTTGTAAGATCTTCCCTAAA
GAAAATAATGATTTTTTATACATAGTTGTTGTGTACAGAAATGACAGCCCTCTAGGAGAACAAACGGGCA
AATAGATTTATAGAATTATATAATATAAAAAGAGATATCATGCAGGAATTAAATTATGAGTTACCAGAG
TTAAAGGCAGTAAATCTGAAATGATTATCGCACGTGAAATGGGAGAAATCTTTAGCTACATGCCTGGG
GAAATAGACAGTTATATGAAATACATAAATAAATAACTTTCTAAAATTGAGTAG (SEQ ID NO:17)

ФИГ. 5G**Последовательность белка NleE энтерогеморрагической E. coli**

minpvtntqgvspintkyaehvvkniypeikhdyfnespnnydkkyisgitrgvaelkqeevnekar
fsymktrmysvcpeafepisrneastpegswlvisgkrpmqfsvdslpdlhalcelpdicckifpk
enndflyivvvyrndsplgeqrnrfielynikrdimqelnyelpelkavksemliaremgeifsympg
eidsymkyinnklskie (SEQ ID NO:39)

ФИГ. 5H**Последовательность ДНК NleF Citrobacter rodentium**

atgttaccacaagtgggtcttcAGCAAATCTTTACTCATGGATGTATATCTCAGGAAAAGAGAATCCT
TCGACTCCGGAATCAGTAAGTGAACCTAATCATAATCATTTTCTTTCTCCTGAATTACAGGAGAACTG
GATGTTATGTTTCGCCATATATTCATGTGCCAGAAACAATGATGAGCGTGAGAATATTTACCCGGAGCTA
AGGGATTTTGTAAGTAGCCTAATGGATAAGAGAAACAATGTGTTTGAGGTGATAAATGAAGATACTGAT
GAGGTGACCGGAGCTCTGAGAGCGGGAATGACGATAGAGGACAGGGATAGTTATATCAGGGATCTTTTT
TTTCTGCATTCATTGAAAGTAAAAATTGAGGAAAGCAGACAAGATAAAGAGGATTGGAATGTAAAGTT
TATGATCTGCTATGTCCGCATCATTTCTCAGAGCTATATGGGGATCTACGGGCAATCAAATGCCTCGTT
GAAGGATGCAGTGATGATTTTAGTCCTTTGATACTATTAAGGTGCCGGATCTTACTTAcaacaaagga
tcctttacaatgtggatga (SEQ ID NO:18)

ФИГ. 6A

AGCAAATCTTTACTCATGGATGTATATCTCAGGAAAAGAGAATCCTTCGACTCCGGAATCAGTAAGTGA
ACTTAATCATAATCATTTTCTTTCTCCTGAATTACAGGAGAACTGGATGTTATGTTTCGCCATATATTC
ATGTGCCAGAAACAATGATGAGCGTGAGAATATTTACCCGGAGCTAAGGGATTTTGTAAGTAGCCTAAT
GGATAAGAGAAACAATGTGTTTGAGGTGATAAATGAAGATACTGATGAGGTGACCGGAGCTCTGAGAGC
GGGAATGACGATAGAGGACAGGGATAGTTATATCAGGGATCTTTTTTTCTGCATTCATTGAAAGTAAA
AATTGAGGAAAGCAGACAAGATAAAGAGGATTGGAATGTAAAGTTTATGATCTGCTATGTCCGCATCA
TTCTTCAGAGCTATATGGGGATCTACGGGCAATCAAATGCCTCGTTGAAGGATGCAGTGATGATTTTAG
TCCTTTTGATACTATTAAGGTGCCGGATCTTACTTA (SEQ ID NO:19)

ФИГ. 6B**Последовательность белка NleF Citrobacter rodentium**

MLPTSGSSANLYSWMYISGKENPSTPESVSELNHNHFLSPELQEKLDVMFAIYSCARNNDERENIYPEL
RDFVSSLMDKRNNVFEVINEDTDEVGTGALRAGMTIEDRDSYIRDLFFLHSLKVKIEESRQDKEDWKCKV
YDLLCPHHSSELYGDLRAIKCLVEGCSDDFSPFDTIKVPDLTYNKGSLLQC (SEQ ID NO:40)

ФИГ. 6C

ANLYSWMYISGKENPSTPESVSELNHNHFLSPELQEKLDVMFAIYSCARNNDERENIYPELRDFVSSLM
DKRNNVFEVINEDTDEVTLGALRAGMTIEDRDSYIRDLFFLHSLKVKIEESRQDKEDWKCKVYDLLCPHH
SSELYGDLRAIKCLVEGCSDDFSPFDTIKVPDL (SEQ ID NO:41)

ФИГ. 6D

Последовательность ДНК NleF энтеропатогенной E. coli

atgttaccacaagaagtggttcttcagcaaattctttattcatggatgtatgtatcaggaagaggttaaccct
tcgactccggaatcagtaagttagcttaatacataataactttcttctcctgaattacaagataaactt
gatgttatggtctctatatattcatgtgccagaaataataatgagcttgaggaaatttttcaagagcta
agtgcctttgtaagtgggctgatggataagagaaatagtgattttgaggtgagaaatgaaaatactgat
gaggttgcggagcgctgagggcggaatgacgatagaggatagggatagttatatcagggatcttttt
tttctgcattcattgaaagtaaaaaattgaggaaagtagacaaggcaagaagattcgaaatgtaaagtt
tataatctgctatgtccgcatactcttcagagctatatgggtgatctacgagcaatgaaatgcctcgtg
gaaggatgcagtgatgattttaatccttttgatattattagggtaccagatcttacttacaacaagga
tctttacaatgtggatga (SEQ ID NO:20)

ФИГ. 6E

Последовательность белка NleF энтеропатогенной E. coli

MLPTSGSSANLYSWMYVSGRGNPSTPESVSELNHNHFLSPELQDKLDVMVSIYSCARNNNELEEIFQEL
SAFVSGGLMDKRNSVFEVRNENTDEVVGLRAGMTIEDRDSYIRDLFFLHSLKVKIEESRQDKEDSKCKV
YNLLCPHHSSELYGDLRAMKCLVEGCSDDFNPFDIIRVPDLTYNKGSLQCG (SEQ ID NO:42)

ФИГ.6F

Последовательность ДНК NleF энтерогеморрагической E. coli

ATGTTACCAACAAGTGGTTCTTCAGCAAATCTTTATTTCATGGATGTATGTATCAGGAAGAGGTAACCCCT
TCGACTCCGGAATCAGTAAGTGAGCTTAATCATAATCACTTTCTTCTCCTGAATTACAAGATAAACTT
GATGTTATGGTCTCTATATATTTCATGTGCCAGAAATAATAATGAGCTTGAGGAAATTTTCAAGAGCTA
AGTGCTTTTGTAAGTGGGCTGATGGATAAGAGAAATAGTGATTTTGAGGTGAGAAATGAAAATACTGAT
GAGGTTGTCGGAGCGCTGAGGGCGGGAATGACGATAGAGGACAGGGATAGTTATATCAGGGGATCTTTT
TTTCTGCATTTCATTGAAAGTAAAAATTGAGGAAAGTAGACAAGGCAAAGAAGATTTCGAAATGTAAAGTT
TATAATCTGCTATGTCCGCATCACTCTTCAGAGCTATATGGTGATCTACGAGCAATGAAATGCCTCGTG
GAAGGATGCAGTGATGATTTTAATCCTTTTGATATTATTAGGGTACCAGATCTTACTTACAACAAGGA
TCTTTACAATGTGGATGA (SEQ ID NO:21)

ФИГ. 6G

Последовательность белка NleF энтерогеморрагической E. coli

mlptsgssanlyswmyvsgrgnpstpesvselnhnflspelqdkldvmvsiyscarnnneleEIFQEL
safvsglmdkrnsVFEVRNENTDEVVGLRAGMTIEDRDSYIRDLFFLHSLKVKIEESRQDKEDSKCKV
ynllcphhsseLYGDLRAMKCLVEGCSDDFNPFDIIRVPDLTYNKGSLQCG (SEQ ID NO:43)

ФИГ.6H

*

SGH MCPDNTHAKKQYLTPGNDIHYPGQTNHDACFIPVSVRQYA
Caif MCEG-----YV
GrlA M-----ESKNSDYVIPDSVKNYN

***** * ****+ +++ *** ++ ++

SGH GEPLYIIVAHWCLLOQNWVORNOIAEAFHITARRASYLIA

CaIF EKPLYLLIAEWMAENRWVIAREISIHFDIEHSAVNTLT

GrlA GEPLYILVSLWCKLQEXWISRNDIAEAFGINLRASFIIT

Мотив спираль-поворот-спираль

```

      *+      +      +      +      +      +      +      +*
SGN      YLRSKTSRVVVSICRHQTLPN-KARRYEIIY-VIRVLDSPPTP
Caif     YILSEVTEISCEVKMIP-NKLEGRGCQCQRLVKVVDIDEQ
GrlA     YISRRKEKISFRVRYVSYGNLHYKRLEIF-IYNVNLEAAP

```

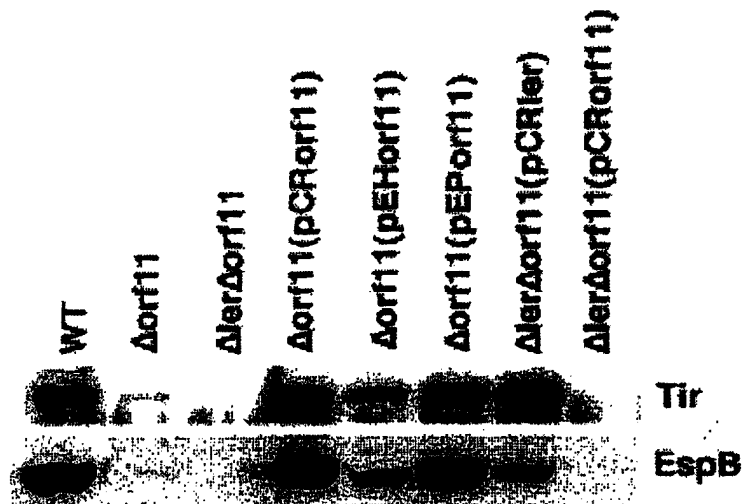
		+	+		*÷		*+ +
SGN	STRREKAGPF-----				LVSKRRVGNNGDRSM--		ANELWNRLC
Caif	IYARLRNNSREKL				VGVRKTPRIPAVPLTE		LNREQKWQMM-
GrlA	TESHVSTGPK-----				RKTLRVNGGIVG---		QSSIWNEM-

```

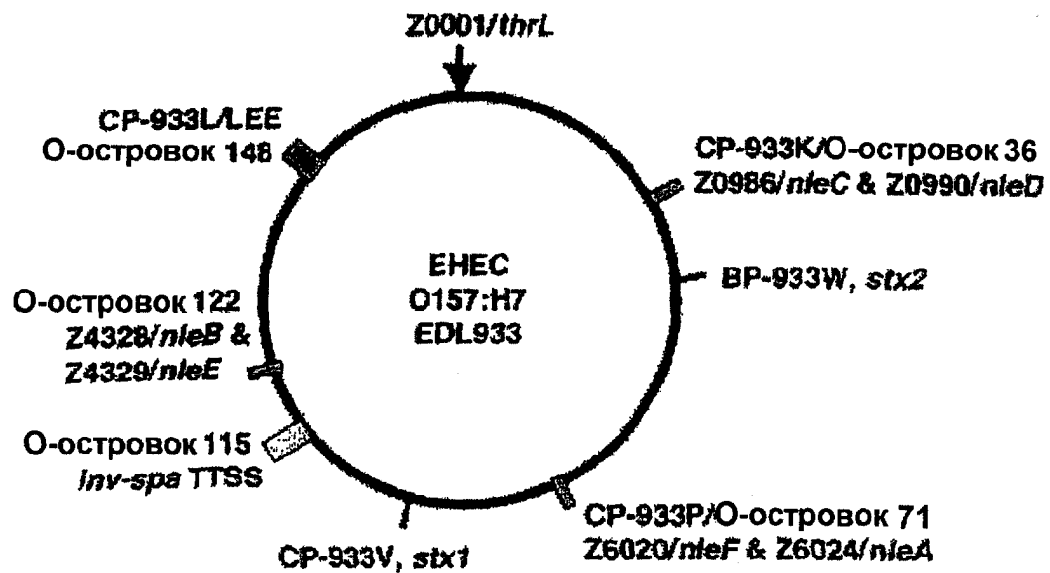
          + + + + + +
SGN      SNRNAGKILKKKEDEDDGT (170 aa)
CaIF     ----LSKSMRR          (131 aa)
Gr1A     -----IMRRKKE-----S (135 aa)

```

ФИГ. 7



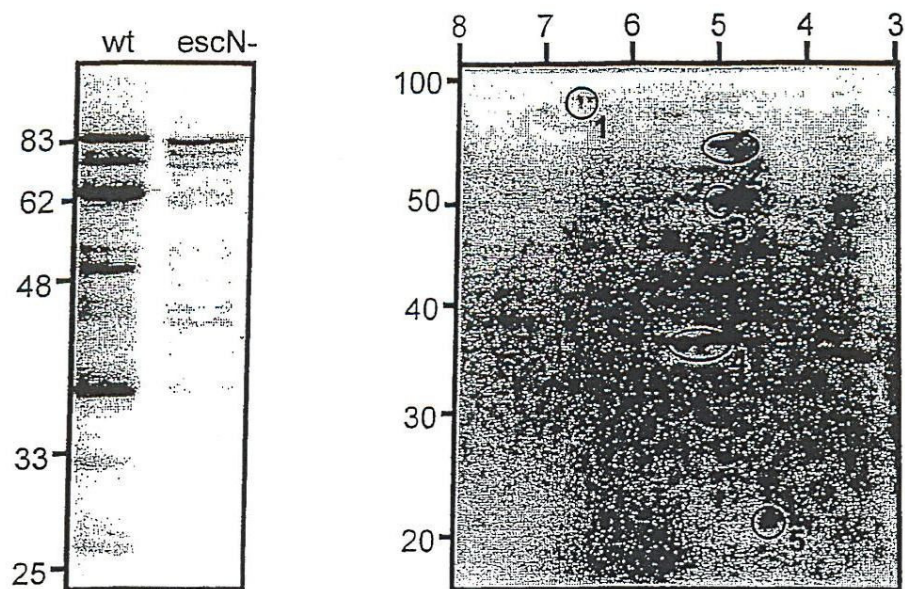
ФИГ. 8



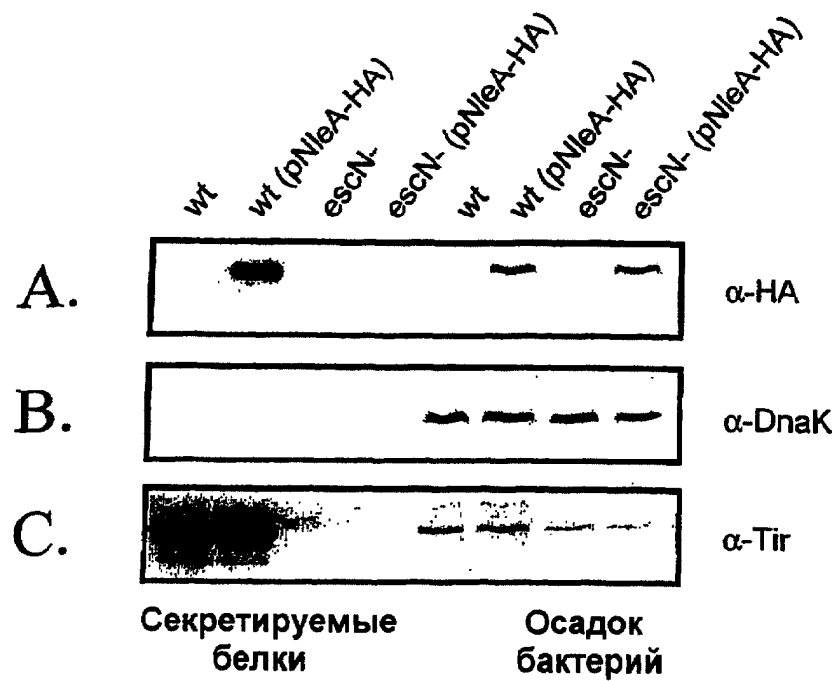
ФИГ. 9

A.

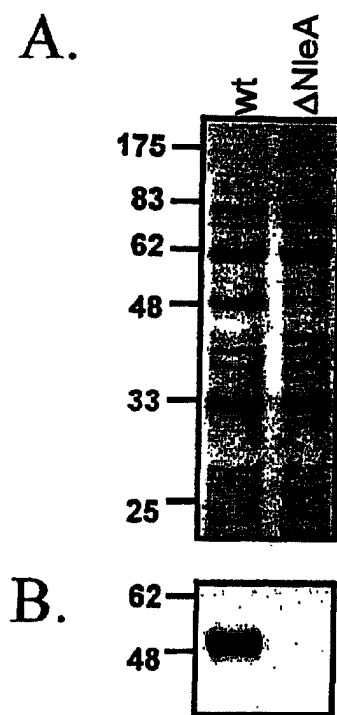
B.



Фиг.10

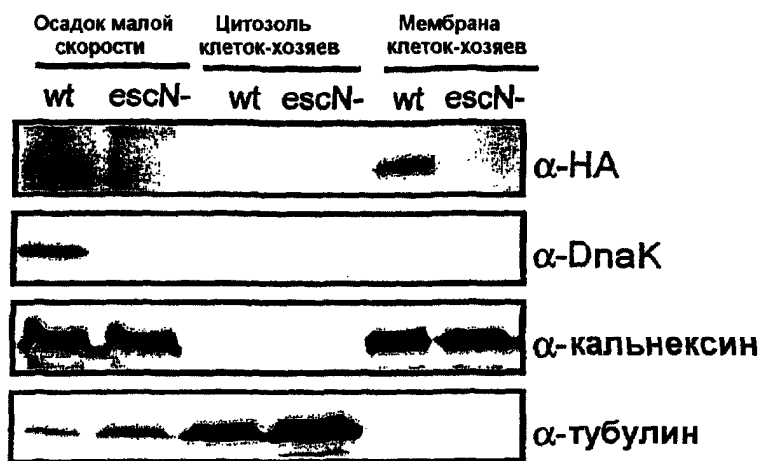


ФИГ. 12

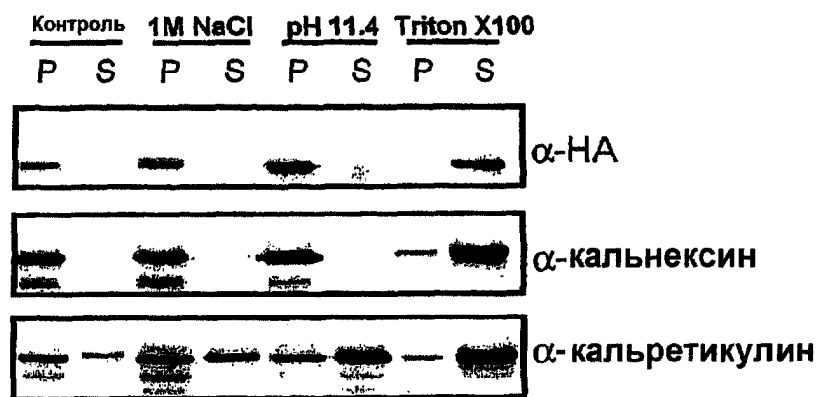


ФИГ. 13

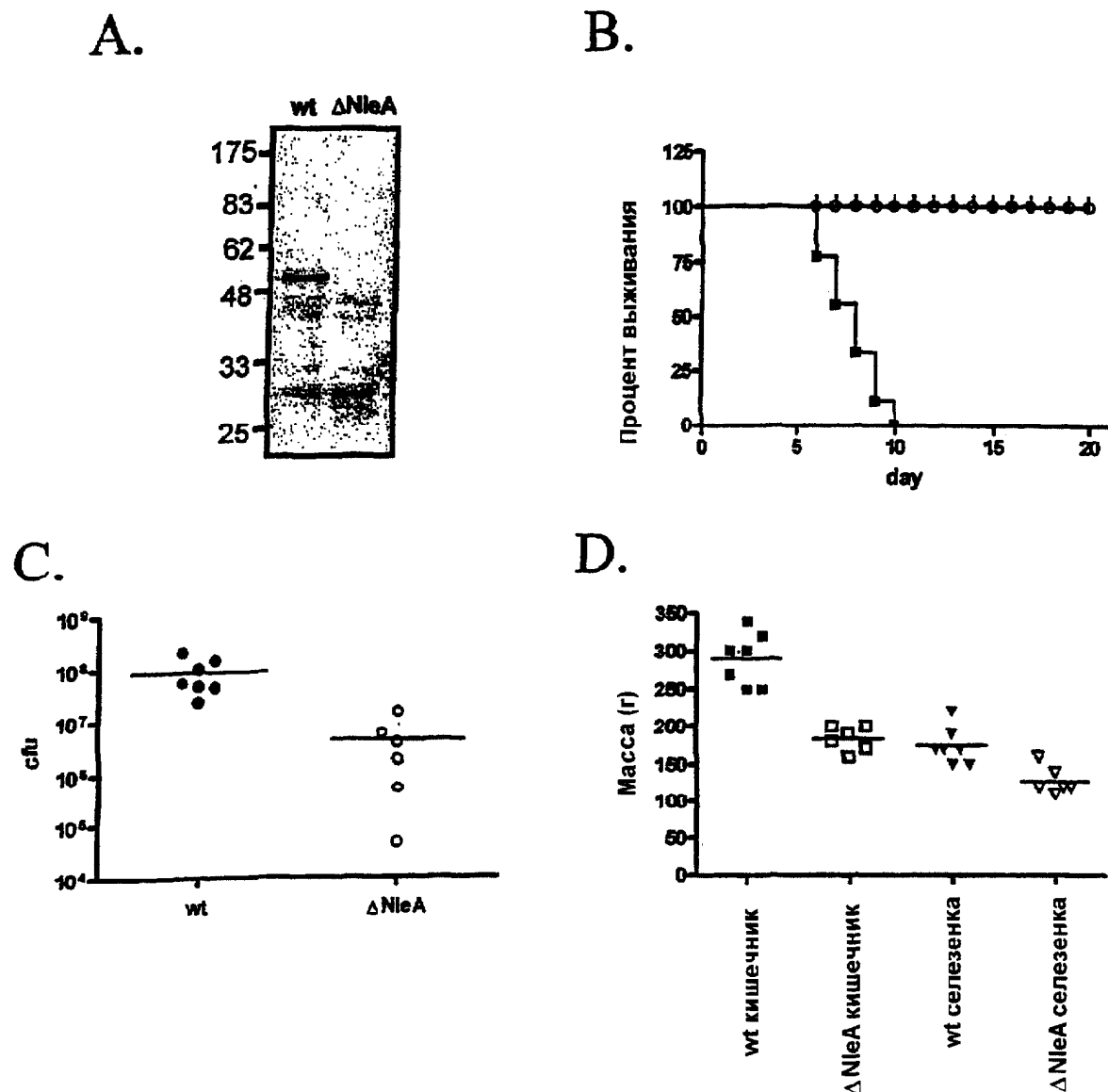
A.



B.



ФИГ. 14



ФИГ. 15

Нуклеотидная последовательность NleG энтерогеморрагической *E. coli*

```

ATGAATGTCCTTCGAGCTCAAGTAGCATCTAGCGGTCGAGGGGAGTTTACATTAGGTAAT
GAGACTGTCAGCATTGTATTTAATGAAACCGATGGGCGTTTTCTATCCAGCGGCAGTAGT
GGGGGATTGCTTACTGAGTTATTCCTTTATGGGTTTAATAACGGCCCTGAAGCTCTTCGC
GATAGGATGCTCAGTATGCTTTCGGACTCAGGTGAAGCACAATCGCAAGAGAGTATTCAG
GACAAAAATATCTCAATGTAAGTTTCCTGTTAGTTTCAGGAAATTTCCAGTGCCCGCCAGAG
TCTATTCAGTGTCCAATTACACTAGAGAGACCCGAAGAAGGAGTGTTTGTCAAAAATTCA
GATAGTTCGGCAGTATGCTGCTTATTTGATTTTGATGCATTTTCTCGTTTAGCTAGTGAA
GGCTCATATCATCCACTGACCCGAGAACCAATAACGGCATCAATGATTATAAGTCCTGAT
AAATGTGTTTATGATCCTATCAAGGGAAACTTCATTATAAAAGATAGTTAA
(SEQ ID NO: 61)

```

ФИГ. 16А

Последовательность белка NleG энтерогеморрагической E. coli

MNVLRAQVASSGRGEFTLGNETVSIVFNETDGRFLSSGSSGGLLTELFLYGFNNGPEALRDRMLSMLSD
SGEASQSESIQDKISQCKFPVSSGNFQCPPEISIQCPITLERPEEGVFVKNSDSSAVCCCLFDFDAFSRLA
SEGSYHPLTREPIITASMIISPDKCVYDPIKGNFIKDS (SEQ ID NO: 73)

ФИГ. 16В**Нуклеотидная последовательность NleH1 энтерогеморрагической E.coli**

ATGTTATCGCCCTCTTCTATAAAATTTGGGATGTTTCATGGAATTCTTTAACCAGAAACCTG
ACTTCGCCTGATAATCGTGTCTTTATCCTCTGTAAGGGATGCTGCTGTTCACTCTGATAGC
GGGACGCAAGTAACGGTTGGCAACAGAACATATCGTGTGTGGTCACTGATAATAAGTTT
TGCGTTACAAGAGAAAGTCATAGTGGTTGTTTTACTAATCTGTTGCACAGGTTGGGATGG
CCTAAGGGGAGAGATTAGCAGAAAAATGAGGCTATGCTGAATACATCGCCAGTGAGCACG
ACTATAGAAAAGAGGCTCTGTTTCATTTCGAACAGACCTGATTTACCTCCAGTGGATTATGCG
CAGCCGGAGTTACCTCCAGCGGATTATACTCAATCAGAGTTGCCGAGGGTTAGCAACAAT
AAATCACCCGTGCCAGGTAATGTTATTGGTAAAGGTGGTAATGCTGTCGTGATGAAGAT
ATGGAAGATACAACAAAAGTGTGAAGATGTTTACTATATCTCAAAGCCATGAAGAGGTG
ACAAGCGAAGTTTCGTTGTTTCAATCAGTATTATGGTTCCGGGAGTGCCAGAGAAAAATATAT
AATGATAATGGAATGTTATTGGTATTAGAATGAATAAAATAAATGGGGAATCTCTTTTG
GATATTCATCATTAACAGCACAAAGCTGAACAGGCTATTTACGATATGTTTGACAGACTG
GAGAAAAAAGGAATCTTTTTGTTGATACAACAGAAACAAATGTTTTATATGATCGTATG
AGAAATGAATTTAATCCAATAGATATATCATCTTATAATGTTTCTGATATTTTCATGGAGT
GAACATCAAGTCATGCAATCTTATCACGGAGGAAAGCTGGATCTTATTAGTGTAGTATTA
AGTAAGATATAA

(SEQ ID NO: 62)

ФИГ. 17А**Последовательность белка NleH1 энтерогеморрагической E. coli**

MLSPSSINLGCSWNSLTRNLTSFNDNRVLSSVRDAAVHSDSGTQVTVGNRTYRVVVTDNKF
CVTRESHSGCFTNLLHRLGWPKGEISRKIEAMLNTSPVSTTIERGSVHSNRDLPFPVDYA
QPELPPADYTQSELPRVSNKSPVPGNVIGKGGNAVVEDMEDTTKVLKMTTISQSHEEV
TSEVRFCFNQYYSGSAEKIYNDNGNVIGIRMNKINGESLLDI PSLPAQAEQAIYDMFDR
EKKGILFVDTTETNVLYDRMRNEFNPIDISSYNVSDISWSEHQVMQSYHGGKLDLISVVL
SKI (SEQ ID NO: 74)

ФИГ. 17В**Нуклеотидная последовательность NleH2 энтерогеморрагической E.coli**

ATGTTATCGCCATATTCTGTAAATTTGGGATGTTTCATGGAATTCTTTAACCAGAAACCTG
ACTTCGCCTGATAATCGTGTCTTTATCCTCTGTAAGGGATGCTGCCGTTCACTCTGATAAT
GGGGCGCAAGTAAAGGTTGGCAACAGAACATATCGTGTGTGGTCCACCGATAATAAGTTT
TGCGTTACAAGAGAAAGTCATAGTGGTTGTTTTACTAATCTGTTGCACAGGCTGGGATGG
CCTAAGGGGGAGATTAGCAGGAAATGAGGTCATGCTGAATGCATCACCAGTGAGCGCT
GCTATGGAAAGAGGCATTGTTTCATTTCGAACAGACCTGATTTACCTCCTGTTGATTATGCA
CCGCCAGAGTTACCGAGTGTGGACTATAACAGGTTGTCAGTACCTGGTAATGTTATTGGC
AAAGGGGGGAACGCTGTAGTATATGAAGATGCTGAGGATGCAACAAAAGTCCTGAAGATG
TTTACTACATCTCAAAGCAATGAAGAGGTGACAAGCGAAGTTCGTTGCTTCAACCAATAT
TATGGTGCCGGGAGTGCAGAAAAATATATGGCAATAATGGTGATATTATTGGTATTAGA
ATGGATAAAATAAATGGAGAATCGCTTTTAAATATTTTCGTCCTTGCCAGCACAGGCTGAG
CATGCTATTTACGATATGTTTGATAGACTGGAGCAAAAAGGAATTCTTTTTGTGCGATACA
ACAGAGACAAATGTCTTATATGACCGCGCGAAGAATGAGTTTAAATCCAATAGATATATCA
TCTTATAATGTTTCCGACCGTTTCATGGAGTGAAAGTCAAATAATGCAATCTTATCATGGC
GGAAAGCAAGATCTTATTAGTGTGGTATTAAAGTAAATTTAG (SEQ ID NO: 63)

ФИГ. 18А

Последовательность белка NleH2 энтерогеморрагической E. coli

MLSPYSVNLGCSWNSLTRNLTS PDNRVLSSVRDAAVHSDNGAQVKVGNRTYRVVATDNKF
 CVTRESHSGCFTNLLHRLGWPKGEISRKIEVMLNASPVSAAMERGI VHSNRPDLPFVDYA
 PPFLPSVDYNRLSVPGNVIGKGGNAVVEYEDAEATKVLKMFTTSSQSNEEVTSEVRCFNQY
 YGAGSAEKIYGNNGDIIGIRMDKINGESLLNLISSLPQAQAEHAIYDMFDRLEQKILFYDT
 TETNVLYDRAKNEFPIDISSYNVSDRSWSESQIMQSYHGGKQDLISVVLSKI (SEQ ID NO: 75)

ФИГ. 18В**Нуклеотидная последовательность Z2076 энтерогеморрагической E.coli**

ATGGTAATGCCTGGATTAGTATCATATATATCATCGACTTCATTTCGGAATGAGATGGCG
 GAGATGCGTCAGCAGGTAATGGAAGGGCAGATTGGTGGATTTCTCCTGGGAGGGGAGAGA
 GTTAGAGTTTCTTATTTATTTCAATTGCATTAA (SEQ ID NO: 64)

ФИГ. 19А**Последовательность белка Z2076 энтерогеморрагической E. coli**

MVMPGLVSYISSTSFANEMAEMRQQVMEGQIGGFLGGERVRSYLFQLH
 (SEQ ID NO: 76)

ФИГ. 19В**Нуклеотидная последовательность Z2149 энтерогеморрагической E.coli**

ATGCCATTAACCTCAGATATTAGATCACATTCATTTAATCTTGGGGTGGAGGTTGTTTCGT
 GCCCGAATTGTAGCCAATGGGCGCGGAGATATTACAGTCGGTGGTGAACCTGTCAGTATT
 GTGTATGATTCTACTAATGGGCGCTTTTCATCCAGTGGCGGTAATGGCGGATTGCTTTCT
 GAGTTATTGCTTTTGGGATTTAATAGTGGTCCGAGCCCTTGGTGAGAGAATGCTAAGT
 ATGCTTTCGGACTCAGGTGAAGCACAATCGCAAGAGAGTATTCAGAACAAAATATCTCAA
 TGTAAGTTTTCTGTTTGTCCAGAGAGACTTCAGTGCCCGCTTGAGGCTATTTCAGTGTCCA
 ATTACACTGGAGCAGCCTGAAAAAGGTATTTTTTGTGAAGAATTCAGATGGTTTCAGATGTA
 TGTACTTTATTTGATGCCGCTGCATTTTCTCGTTTGGTTGGTGAAGGCTTACCCACCCA
 CTGACCCGGGAACCAATAACGGCATCAATAATTGTAAACATGAAGAATGCATTTATGAC
 GATACCAGAGGAACTTCATTATAAAGGGTAATTGA (SEQ ID NO: 65)

ФИГ. 20А**Последовательность белка Z2149 энтерогеморрагической E. coli**

MPLTSDIRSHSFNLGVEVVRARIVANGRGDITVGGETVSIVYDSTNGRFSSSGNGGLLS
 ELLLLGFNSGPRALGERMLSMLSDSGEAQSQESI QNKISQCKFSVCPERLQCPLEAIQCP
 ITLEQPEKGI FVKNSDGS DVCTLFDAAAF SRLVGEGLPHPLTREPITASIIVKHRECIYD
 DTRGNFLIKGN (SEQ ID NO: 77)

ФИГ. 20В**Нуклеотидная последовательность Z2150 энтерогеморрагической E.coli**

atgcctgtta ccaccttaag tatcccaagt atatctcaat tatctcctgc aagagtacag
 tctttgcagg atgcagccag acttgaaagt ggaataagaa tatccattgg tagtggccaa
 tattctgttc actatgtcca actactggat ggattttcag ttgaaccggt gagaggaggc
 ttactggata ggctattggg gcgtgagcat cgaatggata gaagggctgt ggctctggaa
 aggcaattaa atggaggtgt cgatttttta agtagtgta ataactattt tcagagtgtc
 atggcagaac acagagaaaa taaaacaggt aataaaatat taatggaaaa aataaattct
 tgtgtatttg gaacggattc taatcacttt tcttgcccg agtcattttt gacatgcccg
 ataacgctgg acacacctna gactggagtg ttcattgagaa actcacgagg tgctgagata
 tgctctctat atgataagga tgcgttagtg caacttggtg aaactgggtg aactcatcct
 ctgagtcgag aacctataac agaatcaatg attatgagaa aagacgaatg tcactttgat
 gcaaaaagag aagctttttg ttgtaagtga
 (SEQ ID NO: 66)

ФИГ. 21А

Последовательность белка Z2150 энтерогеморрагической E. coli

MPVTTLSPISISQLSPARVQSLQDAARLESIGIRISIGSGQYSVHYVQLLDGFSVEPVRGGLLDRLIGRE
 HRMDRRAVALERQLNGGVDFLSSVNNYFQSVMAEHRENKTGNKILMEKINSCVFGTDSNHFSCPEFLT
 CPITLDTPTXGTFMRNSRGAEICSLYDKDALVQLVETGGTHPLSREPITESMIMRKDECHFDAKREAFCK
 (SEQ ID NO: 78)

ФИГ. 21В**Нуклеотидная последовательность Z2151 энтерогеморрагической E.coli**

ATGCCTGTAGATTTAAGCCTTATATTTTACCTGGGGTTAGTTTTTGTCTGACATTCCT
 CAAGAAACCTTGTCTGAGATACGTAATCAGACTATTCGTGGAGAAGCTCAAGTAAGACTG
 GGTGAGTTGATGGTGTCAATACGACCTATGCAGGTAATGGATATTTTATGGGAAGTCTT
 AACCAGGATGGTTTATCGAATGATAACATCCAGATTGGCCTTCAATATATAGAACATATT
 GAACGTACACTTAATCATGGTAGTTTGACAAGCCGTGAAGTTACAGTACTGCGTGAAATT
 GAGATGCTCGAAAATATGGAATTGCTTTCTAACTACCAGTTAGAGGAGTTGTTAGATAAA
 ATTGAAGTATGTGCATTTAATGTGGAGCATGCACAATTGCAAGTGCCAGAGAGCTTACGA
 ACATGCCCTGTTACATTATGTGAACCAGAAGATGGGGTATTTATGAGGAATCAATGAAT
 TCAAATGTTTGTATGTTGTATGATAAAATGTCATTAATATATCTTGTAAAACAAGGGCG
 GCTCATCCTTTGAGCAGGGAATCAATCGCAGTTTCAATGATTGTAGGAAGAGATAATTGT
 GCTTTTGACTCTGACAGAGGTAACCTTCGTTTTAAAAAATTAA (SEQ ID NO: 67)

ФИГ. 22А**Последовательность белка Z2151 энтерогеморрагической E. coli**

MPVDLTPIYILPGVSFLSDIPQETLSEIRNQTIRGEAQVRLGELMVSIRPMQVNGYFMGSL
 NQDGLSNDNIQIGLQYIEHIERTLNHGSLTSREVTVLREIEMLENMELLSNYQLEELLDK
 IEVCAFNVENHAQLQVPESLRTCPTLCEPEDGVFMRNSMNSNVCMLYDKMSLIYLVKTRA
 AHPLSRESIAVSMIVGRDNCADFSDRGNFVLKN (SEQ ID NO: 79)

ФИГ. 22В**Нуклеотидная последовательность Z2337 энтерогеморрагической E.coli**

ATGCCTGTAGATTTAAGCCTTATATTTTACCTGGGGTTAGTTTTTGTCTGACATTCCT
 CAAGAAACCTTGTCTGAGATACGTAATCAGACTATTCGTGGAGAAGCTCAAATAAGACTG
 GGTGAGTTGATGGTGTCAATACGACCTATGCAGGTAATGGATATTTTATGGGAAGTCTT
 AACCAGGATGGTTTATCGAATGATAATATCCAGATTGGCCTTCAATATATAGAACATATT
 GAACGTACACTTAATCATGGTAGTTTGACAAGCCGTGAAGTTACAGTACTGCGTGAAATT
 GAGATGCTCGAAAATATGGAATTGCTTTCTAACTACCAGTTAGAGGAGTTGTTAGATAAA
 ATTGAAGTATGTGCATTTAATGTGGAGCATGCACAATTGCAAGTGCCAGAGAGCTTACGA
 ACATGCCCTGTTACATTATGTGAACCAGAAGATGGGGTATTTATGAGGAATCAATGAAT
 TCAAATGTTTGTATGTTGTATGATAAAATGGCATTAAATACATCTTGTAAAACAAGGGCG
 GCTCATCCTTTGAGCAGGGAATCAATCGCAGTTTCAATGATTGTAGGAAGAGATAATTGT
 GCTTTTGACCCTGACAGAGGTAACCTTCGTTTTAAAAAATTAA (SEQ ID NO: 68)

ФИГ. 23А**Последовательность белка Z2337 энтерогеморрагической E. coli**

MPVDLTPIYILPGVSFLSDIPQETLSEIRNQTIRGEAQIRLGELMVSIRPMQVNGYFMGSL
 NQDGLSNDNIQIGLQYIEHIERTLNHGSLTSREVTVLREIEMLENMDLLSNYQLEELLDK
 IEVCAFNVENHAQLQVPESLRTCPTLCEPEDGVFMRNSMNSNVCMLYDKMALIHVLKTRA
 AHPLSRESIAVSMIVGRDNCADFDPDRGNFVLKN (SEQ ID NO: 80)

ФИГ. 23В

Нуклеотидная последовательность Z2338 энтерогеморрагической E.coli

ATGCCTGTTACCACCTTAAGTATCCCAAGTATATCTCAATTATCTCCTGCAGGAGTACAG
 TCTTTGCAGGATGCTGCCAGACTTGAAAGTGAATAAGAATATCCATTGGTAGTGGCCAA
 TATTCTGTTCACTATGTCCAGCTACTGGATGGATTTTCAGTTGAACCGGTGAGAGGAGGC
 TTAAGGATAGGCTATTGGGGCGTGAGCATCGAATGGAGAGAAGGGCTGTGGCTCTGGAA
 AGGCAATTAAATGGAGGTGTCGATTTTTTAAGTAGTGTAAATAACTATTTTCAGAGTGTC
 ATGGCAGAACACAGAGAAAATAAAACAAGTAATAAATATTAATGGAAAAATAAATTCT
 TGTATTATTAGACCTGATTCTAATCACTTTTCTTGCCCGGAGTCATTTTTCAGATGCCG
 ATAACGCTGGACACACCTGAGACTGGGGTGTTCATGAGAACTCACGAGGTGCTGAGATA
 TGCTCTCTATATGATAAGGACGCGTTAGTGCAACTTGTGAACTGGTGGAGCTCATCT
 CTGAGTCGAGAACCTATAACAGAATCAATGATTATGAGAAAAGATGAATGTCACCTTGAT
 AAAAAAGAGAAGCTTTTGTGTAGTGA (SEQ ID NO: 69)

ФИГ. 24А**Последовательность белка Z2338 энтерогеморрагической E. coli**

MPVTTLSIPSISQLSPAGVQSLQDAARLESIGIRISIGSGQYSVHYVQLLDGFSVEPVRRG
 LLDRLLGREHRMERRAVALERQLNGGVDFLSSVNNYFQSVMAEHRENKTSNKILMEKINS
 CLFRPDSNNHFCPEFLTCPITLDTPETGVFMRNSRGAEICSLYDKDALVQLVETGGANP
 LSREPITESMIMRKDECHFDTKREAFCK (SEQ ID NO: 81)

ФИГ. 24В**Нуклеотидная последовательность Z2339 энтерогеморрагической E.coli**

ATGCCATTAACTCAGATATTAGATCACATTCATTTAATCTTGGGGTGGAGGTTGTTGCT
 GCCGAATTGTAGCCAATGGGCGCGGAGATATTACAGTCGGTGGTGAACTGTCAGTATT
 GTGTATGATTCTACTAATGGGCGCTTTTCATCCAGTGGCGGTAATGGCGGATTGCTTTCT
 GAGTTATTGCTTTTGGGATTTAATAGTGGTCCTCGAGCCCTTGGTGAGAGAATGCTAAGT
 ATGCTTTTCGAGCTCAGGTGAAGCACAAATCGCAAGAGAGTATTGAGAACAAAATATCTCAA
 TGTAAAGTTTCTGTTTGTCCAGAGAGACTTCAGTGCCCGCTTGAGGCTATTCARTGTCCA
 ATTACACTGGAGCAGCCTGAAAAAGGTATTTTGTGAAGAATTGAGATGGTTCAGATGTA
 TGACTTTATTGATGCCGCTGCATTTCTCGTTTGGTGGTGAAGGCTTACCCACCCCA
 CTGACCCGGGAACCAATAACGGCATCAATAATTGTAACATGAAGAATGCATTTATGAC
 GATACCAGAGGAACTTCGTTATAAAGGGTAATTGA (SEQ ID NO: 70)

ФИГ. 25А**Последовательность белка Z2339 энтерогеморрагической E. coli**

MPLTSDIRSHSFNLGVEVVRARIVANGRGDITVGGETVSVIVYSTNGRFSSSGGNGLLS
 ELLLLGFNSGPRALGERMLSMMLSDSGEASQESIQNKISQCKFSVCPERLQCPLEAIQCP
 ITLEQPEKGIFVKNSDGSVCTLFDAAAF SRLVGEGLPHPLTREPTASIIIVKHEECIYD
 DTRGNFVIKGN (SEQ ID NO: 82)

ФИГ. 25В**Нуклеотидная последовательность Z2560 энтерогеморрагической E.coli**

atggacgctt ttattgtaga tcctgttcaa ggggaactat attcgggttt aagccataca
 gaactagccg atatcattag attggctgat tctgttgaaa atcaattgaa tggaggcaat
 tcatttcttg atgtattcag tacatatatg gggcagggtta tttctgaatt tatgcatagt
 aatgataaca gaattgaatt gttacagcgg cgattacatt catgttcatt tttagttaat
 attgaagaaa tgtcttacat agatgaagca ttacagtgcc cgattacgct ggcaattcct
 caacgaggtg tttttttaag aaatgctgaa ggtccagag tatgtagttt atatgatgaa
 atggctcttt ctctgtataat taatgatggg atgcatcacc cactaagcag agagccaata
 acattatcaa tgcttggtgc cagagagcag tgtgagtttg attgcagtat cggtcacttt
 acggtgagga gtgattgtta ttcagtgtag (SEQ ID NO: 71)

ФИГ. 26А

Последовательность белка Z2560 энтерогеморрагической E. coli

MDAFIVDPVQGELYSGLSHTELADIIRLADSVENQLNGGNSFLDVFSTYMGQVISEFMHSNDNRIELLO
RRLHSCSFLVNIEMSYIDEALQCPITLAI PQRGVFLRNAEGSRVCSLYDEMALSRIINDGMHHPLSRE
PITLSMLVAREQCEFDCSIGHFTVRSDCYSV (SEQ ID NO: 83)

ФИГ. 26В

Нуклеотидная последовательность Z2976 энтерогеморрагической E. coli

ATGGCAGACCGCAAACAGCACCGCGCTATCGCGGAGCGTCGTCACATCCAGACTGAAATC
AACCGCAGACTTTCCCGCGCATCACGCGTCGCGCAAATCATGCACATCAATATGCTGCAT
GAGCGCAGCCACGCACTATCAAACATTTATTCCGCCTCTGTTTTTCAGCTATCTGGCGGAT
GATCTGCACGAGTTTCAACAGCTCATCCAGCAGCAAAACAACTCCATTAA (SEQ ID NO:72)

ФИГ. 27А

Последовательность белка Z2976 энтерогеморрагической E. coli

MADRKQHRATAERRHIQTEINRRLSRASRVAQIMHINMLHERSHALSNIYSASVFSYLAD
DLHEFQQLIQQNKLN (SEQ ID NO:84)

ФИГ. 27В