



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94206** (13) **C2**

(51) **МПК** (2011.01)
C12N 15/31 (2011.01)
A61K 38/16 (2011.01)
A61K 39/108 (2011.01)
A61K 35/74 (2011.01)
C12N 1/20 (2011.01)
C12Q 1/68 (2011.01)
G01N 33/569 (2011.01)
C07K 14/24 (2011.01)
A61K 39/02 (2011.01)
A61P 31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) БАКТЕРІАЛЬНІ ФАКТОРИ ВІРУЛЕНТНОСТІ І ВАРІАНТИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) a200605985
(22) 29.10.2004
(24) 26.04.2011
(86) PCT/CA2004/001891, 29.10.2004
(31) 60/515,703
(32) 31.10.2003
(33) US
(46) 26.04.2011, Бюл.№ 8, 2011 р.
(72) ФІНЛЕЙ БРЕТТ, СА, ГРЮНХЕЙД САМАНТА, СА, ДЕН ВАНЫНЬ, СА, ВАЛЛАНС БРЮС, СА, ПУЕНТЕ ХОСЕ Л., МХ
(73) ДЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ БРІТІШ КОЛАМБІА, СА, УНІВЕРСІДАД НАСЪОНАЛЬ АУТОНОМА ДЕ МЕКСІКО, МХ
(56) DENG WANYIN ET AL: "Citrobacter rodentium translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice." MOLECULAR MICROBIOLOGY APR 2003, vol. 48, no. 1, April 2003 (2003-04), pages 95-115.
ABE A ET AL: "Two enteropathogenic Escherichia coli type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 16 NOV 1998, vol. 188, no. 10, 16 November 1998 (1998-11-16), pages 1907-1916.
US6365723 B; 02.04.02.
JP2002355074 A2, 24.01.02.
WO02053181 A1, 11.07.02.
DENG W. ET AL: 'Dissecting virulence; Systematic and functional analyses of a pathogenicity island' PNAS vol. 101, no. 10, March 2004, pages 3597 - 3602.
GRUENHEID S. ET AL: 'Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic

Escherichia coli O157:H7' MOL MICROBIOL vol. 51, no. 5, March 2004, pages 1233 - 1249.
MUNDY R. ET AL: 'Identification of a Novel Citrobacter rodentium Type III Secreted Protein, EspI, and Roles of This and Other Secreted Proteins in Infection' INFECT IMMUN vol. 72, no. 4, April 2004, pages 2288 - 2302.
MARCHES O. ET AL: 'Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition' MOL MICROBIOL vol. 50, no. 5, December 2003, pages 1553 - 1567.
DATABASE UNIPROT [Online] 01 March 2002 'hypothetical protein Z6024', XP003010368 Database accession no. Q8XAJ5.
KRESSE A.U. ET AL: 'Characterization of SepL of Enterohemorrhagic Escherichia coli' J OF BACTERIOLOGY vol. 182, no. 22, November 2000, pages 6490 - 6498.
LI Y. ET AL: 'Human response to Escherichia coli O157:H7 Infection: Antibodies to Secreted Virulence Factors' INFECTION AND IMMUNITY vol. 68, no. 9, September 2000, pages 5090 - 5095.
(57) 1. Композиція, яка містить:
а) поліпептид, який включає амінокислотну послідовність, по суті ідентичну послідовності SEQ ID NO: 22-24 або її фрагменту, або варіанту,
б) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність, по суті ідентичну послідовності SEQ ID NO: 22-24 або її фрагменту, або варіанту,
с) молекулу нуклеїнової кислоти, яка включає нуклеотидну послідовність, по суті ідентичну послідовності SEQ ID NO: 1-3 або її фрагменту, або варіанту,

(13) **C2**

(11) **94206**

(19) **UA**

- d) надосадову рідину клітинної культури, яка включає поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, по суті ідентичну послідовності SEQ ID NO: 22-24 або її фрагменту, або варіанту,
- е) бактерію або її препарат, де бактерія включає в себе мутацію в бактерійному геномі в нуклеотидній послідовності, яка, по суті, ідентична SEQ ID NO: 1-3, або
- f) бактерію або її препарат, де бактерія включає в себе мутацію в гені, по суті, ідентичному *NleA* або її гомологам, у сполученні з фізіологічно прийнятним носієм, де *NleA* являє собою фактор вірулентності або кодує фактор вірулентності.
2. Композиція за п. 1, в якій поліпептид становить 20 % клітинного білка, присутнього в композиції, що містить надосадову рідину клітинної культури.
3. Композиція за п. 1, яка додатково містить *EspA*, *EspB*, *EspD*, *EspP*, *Tir*, шигатоксин 1, шигатоксин 2 або поліпептид інтимін.
4. Композиція за п. 1, в якій бактерія являє собою ентерогеморагічну *E. coli* (EHEC), ентеропатогенну *E. coli* (EPEC) або *Citrobacter rodentium*.
5. Композиція за п. 4, де EHEC являє собою EHEC 0157:H7 або EHEC 0157:NM; або де EPEC являє собою EPEC 0127:H6.
6. Композиція за п. 1, в якій бактерія є живою і призначена для перорального введення.
7. Композиція за п. 1, в якій бактерія є убитою і призначена для парентерального введення.
8. Композиція за п.1, яка додатково містить ад'ювант.
9. Композиція за п. 8, в якій ад'ювант являє собою емульсію "масло у воді" або емульсію, що не являє собою "масло у воді".
10. Композиція за п. 9, в якій емульсія "масло у воді" являє собою EMULSIGEN™ або EMULSIGENPLUS™.
11. Композиція за п. 8, в якій ад'ювант являє собою мінеральне масло або диметилдіоктадециламонію бромід або містить і мінеральне масло, і диметилдіоктадециламонію бромід.
12. Композиція за п. 8, в якій ад'ювант включає один або декілька агентів, вибраних з групи, яка складається з емульгуючого засобу, мурамідпептиду, засобу на водній основі, засобу, оснований на хітозані, сапоніну, масла, ліпополісахариду, екстракту бактерійної клітинної стінки, бактерійної ДНК, бактерійного комплексу, синтетичного олігонуклеотиду і аліфатичної азотистої основи.

13. Композиція за п. 12, в якій масло являє собою Amphigen®.
14. Композиція за п. 8, в якій ад'ювант включає екстракт клітинної стінки мікобактерії, ДНК мікобактерії або комплекс клітинної стінки мікобактерії.
15. Композиція за п. 8, де ад'ювант присутній в композиції в концентрації від 20 % до 40 % (об./об.).
16. Застосування композиції за будь-яким з пп. 1-15 для отримання лікарського засобу для:
- (i) індукції імунної відповіді у тварини проти A/E-патогену або його компонента,
- (ii) зниження виділення або колонізації A/E-патогену у тварини, або
- (iii) лікування або профілактики інфекції, що викликається A/E-патогеном, у тварини.
17. Застосування за п. 16, в якому тварина є жуйною або являє собою людину.
18. Застосування за п. 17, в якому жуйна тварина являє собою особину великої рогатої худоби або особину вівці.
19. Застосування за п. 16, в якому A/E-патоген являє собою ентерогеморагічну *E. coli* (EHEC), ентеропатогенну *E. coli* (EPEC) або *Citrobacter rodentium*.
20. Застосування за п. 19, в якому EHEC являє собою EHEC 0157:H7 або EHEC 0157: NM; або в якому EPEC являє собою EPEC 0127:H6.
21. Спосіб ослаблення вірулентності A/E-патогену, що включає мутування одного або декількох генів, вибраних з групи, яка складається з *nleA* або її гомологів в A/E-патогені, або мутування однієї або декількох нуклеотидних послідовностей в геномі A/E-патогену, в якому нуклеотидна послідовність вибрана з SEQ ID NO: 1-3.
22. Рекombінантний поліпептид, що включає амінокислотну послідовність, по суті ідентичну послідовності SEQ ID NO: 22-24.
23. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність, по суті ідентичну послідовності SEQ ID NO: 1-3.
24. Виділена молекула нуклеїнової кислоти за п. 23, де вказана виділена молекула нуклеїнової кислоти включена у вектор.
25. Виділена молекула нуклеїнової кислоти за п. 23, де вказаний вектор включений в клітину-хазяїна.

Винахід відноситься до бактеріальних патогенів. Більш конкретно, винахід частково відноситься до білків, що секретуються, бактеріальних патогенів і способів їх застосування.

Escherichia coli являє собою виключно мінливий організм. На додаток до того, що вона є представником нормальної кишкової флори, штами *E. coli* можуть також викликати інфекції сечового міхура, менінгіт і діарею. *E. coli*, що викликають діарею, включають, щонайменше, п'ять типів *E. coli*, які викликають різні симптоми, що варіюють від

холероподібної діареї до гострого коліту. Кожний тип *E. coli*, що викликають діарею, володіє конкретним набором факторів вірулентності, включаючи адгезини, інвазини і/або токсини, які відповідають за індукцію конкретного типу діареї.

Ентеропатогенна *E. coli* (EPEC) являє собою переважну причину дитячої діареї у всьому світі. Захворювання EPEC характеризується водянистою діареєю різної тяжкості, з блювотою і пропасницею, що часто супроводжуються втратою рідини. На додаток до окремих спалахів у денних

медичних і дитячих установах у країнах, що розвиваються, ЕРЕС представляє серйозну загрозу здоров'ю немовлят (<6 місяців). У всьому світі ЕРЕС являє собою основну причину опосередкованої бактеріями діареї у немовлят, і, за оцінками, ЕРЕС є причиною загибелі декількох сотень тисяч дітей на рік.

Ентерогеморагічна *E. coli*, яка також називається продукуючою шигатоксин *E. coli* (STEC) або продукуючою веротоксин *E. coli* (VTEC), викликає більш тяжку діарею, ніж ЕРЕС (ентероколіт) і приблизно у 10% випадків дане захворювання прогресує у захворювання нирок - гемолітико-уремічний синдром (HUS), який часто є фатальним. ЕНЕС O157:H7 являє собою найбільш поширений серотип у Канаді і Сполучених Штатах, і асоційований із забрудненням їжі і води (3). Інші серотипи ЕНЕС також викликають значні проблеми в Азії, Європі і Південній Америці, і, у меншій мірі, у Північній Америці. ЕНЕС колонізує велика рогата худоба і викликає пошкодження А/Е, але не викликає захворювання у дорослих тварин, і замість цього мікроорганізми викидаються у навколишнє середовище. Однак, це викликає серйозні проблеми охорони здоров'я, оскільки для інфікування людей досить відносно невеликої кількості ЕНЕС.

На відміну від діареї іншого походження, що викликається *E. coli*, наприклад, що викликаються *E. coli*, які утворюють ентеротоксини, діарея, викликана ЕНЕС і ЕРЕС, не опосередкована токсином. Замість цього, ЕРЕС і ЕНЕС зв'язуються з поверхнею кишечника (ЕРЕС з тонким кишечником, ЕНЕС з товстим кишечником) і викликають характерний гістологічний осередок пошкодження, який називається осередком прикріплення і згладжування (А/Е) (8).

Осередки А/Е відмічаються розчиненням поверхні війчастого епітелію кишечника і втратою епітеліальних мікроворсинок (згладжування) у ділянках прикріплення бактерій. Зв'язавшись, бактерії залишаються на чашоподібних виступах або ложах. В основі даного ложа в епітеліальній клітині лежать деякі компоненти цитоскелету, включаючи актин і асоційовані з актином цитоскелетні білки. Утворення осередків А/Е і багатих актином лож під прикріпленими бактеріями є гістопатологічною ознакою А/Е патогенів (1,2).

Дана патологія може імітуватися на клітинах, що культивуються, *in vitro*, і утворення лож може спостерігатися шляхом флуоресцентного забарвлення актину (2, 11). Утворення А/Е-осередку може бути відповідальним за руйнування війчастого шару і мікроворсинок, секрецію рідини і діарею.

ЕРЕС і ЕНЕС належать до сімейства А/Е-патогенів, включаючи декілька ЕРЕС-подібних тваринних патогенів, які викликають захворювання у кроликів (РЕРЕС), свиней (РЕРЕС) і мишей (*Citrobacter rodentium*). Дані патогени містять острівці патогенності (РАІ), які кодуєть спеціалізовані системи секреції і фактори вірулентності, що секретуються, критичні у плані розвитку захворювання. Гени, необхідні для утворення А/Е-осередків, як вважають, кластеризовані разом в один хромосомний острівцеві патогенності, відомий як локус згладжування ентероцитів (LEE), які включають

регуляторні елементи, систему секреції III типу (TTSS), ефекторні білки, що секретуються, і зв'язані з ними шаперони (4-8).

LEE містить 41 ген, що робить його одним з найбільш складних РАІ. Основна функція LEE TTSS являє собою доставку ефекторів у клітину-хазяїна, де вони порушують функції клітин-хазяїнів і опосередковують захворювання (9, 10, 34). Ідентифіковано п'ять ефекторів, що кодуєть LEE (Tir, EspG, EspF, Map і EspH) (35-40). Tir (перемішуваний рецептор інтиміну) переміщується у клітину-хазяїна, де він зв'язується з цитоскелетними і сигнальними білками хазяїна та ініціює полімеризацію актину у ділянці прикріплення бактерії (31, 44), що приводить до утворення ложеподібних актинових структур, що лежать під прикріпленими бактеріями, які безпосередньо взаємодіють з поза-клітинною петлею Tir за допомогою білка зовнішньої мембрани бактерії інтиміну. CstT грає роль шаперону для стабільності і секреції Tir (18, 19).

В А/Е-патогенах охарактеризовано чотири інших TTSS-перемішуваних ефектори, що кодуєть в LEE: EspH посилює подовження актинових лож (40); EspF грає роль у роз'єднанні щільних контактів між кишковими епітеліальними клітинами (38); EspG споріднений зі зв'язаним з мікротрубочками *Shigella* ефектором VirA (36, 55); і Map локалізований у мітохондріях (37), але також відіграє роль у динаміці актину (48). Ler (регулятор, що кодуєть в LEE) є єдиним ідентифікованим регулятором, що кодуєть в LEE.

Винахід, зокрема, базується на ідентифікації декількох нових загальних білків, що секретуються, А/Е-патогенів.

В одному аспекті винахід відноситься до композицій, що включають поліпептид або його фрагмент, або його варіант, або надосадову рідину культури клітин, що включає такий поліпептид, де по суті чистий поліпептид включає амінокислотну послідовність по суті ідентичну послідовності будь-якої однієї або декількох з SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагментам, або варіантам. Винахід також відноситься до композицій, що включають молекулу нуклеїнової кислоти, де молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій одній або декільком послідовностям з SEQ ID NO: 1-21 або 60-72; і до композицій, що включають нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, по суті ідентичний будь-якій одній або декільком послідовностям з SEQ ID NO: 22-43, або їх фрагментам. Композиції можуть додатково включати фізіологічно прийнятний носій, або додатково включати ад'ювант. Композиції можуть також включати поліпептид або молекулу нуклеїнової кислоти, таку як EspA, EspB, EspD, EspP, Tir, шигатоксин 1, шигатоксин 2, або інтимін. Поліпептиди або молекули нуклеїнової кислоти можуть бути по суті чистими.

В альтернативних аспектах винахід також відноситься до бактерій або до їх препаратів, де бактерія включає мутацію у гені, такому як *pleA*, *pleB*, *pleC*, *pleD*, *pleE*, *pleF*, *pleG*, *pleH*, або в їх гомологу, або включає мутацію у бактеріальному геномі у нуклеотидній послідовності, яка є по суті ідентичною у відношенні SEQ ID NO: 1-21 або 60-72. У

деяких варіантах здійснення бактерія може являти собою А/Е-патоген, наприклад, ентерогеморагічну *E. coli* (EHEC; наприклад, EHEC O157:H7 або EHEC O157:NM), ентеропатогенну *E. coli* (EPEC; наприклад, EPEC O127:H6) або *Citrobacter rodentium*. У деяких варіантах здійснення мутація може ослаблювати вірулентність або може відбуватися у нуклеотидній послідовності у геномі А/Е-патогену, яка по суті ідентична послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-21 або 60-72. Бактерія може надаватися у вигляді композиції, у комбінації з ад'ювантом. У деяких варіантах здійснення бактерія може бути живою. У деяких варіантах здійснення бактерія може бути вбитою. Спосіб введення може бути пероральним або парентеральним.

В альтернативних варіантах винахід також відноситься до способу виявлення А/Е-патогену у зразку шляхом надання зразка; і виявлення нуклеотидної послідовності, по суті, ідентичної послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 1-21 або 60-72, або її фрагменту або варіанту; нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептидну послідовність, по суті, ідентичну послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або поліпептиду, що включає амінокислотну послідовність, по суті ідентичну послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 22-43, 59 або 73-84, або її фрагменту, або варіанту, де присутність нуклеотидної послідовності або амінокислотної послідовності вказує на присутність А/Е-патогену у зразку (наприклад, в яйці, фекаліях, крові або кишечнику). Виявлення може включати в себе контакт нуклеотидної послідовності із зондом або праймером, по суті ідентичним послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-21 або 60-72, або нуклеотидній послідовності, що кодує поліпептидну послідовність, по суті, ідентичну послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх частини, або може включати в себе контакт амінокислотної послідовності з антитілом, яке специфічно зв'язується з послідовністю, вибраною з групи, яка складається з SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або його фрагментом або варіантом.

В альтернативних варіантах винахід також відноситься до способів індукції імунної відповіді проти А/Е-патогену або його компонента, або для зниження колонізації А/Е-патогеном або виділення А/Е-патогену з тварини (наприклад, людини; жуйної, такої як вівці, кози, велика рогата худоба, і т.д.; або будь-якої іншої тварини, наприклад, свині, кролики, домашня птиця (наприклад, качки, кури, індички) і т.д.), шляхом ідентифікації тварини, яка інфікована А/Е-патогеном або має ризик інфікування ним; і введення тварині ефективної кількості композиції, що включає поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну послідовності будь-якої однієї або декількох SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84; нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептидну послідовність, по суті, ідентичну послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84; молекулу нуклеїнової кислоти, яка включає нуклеотидну послідовність, по суті ідентичну послідовності будь-якої однієї або декількох з SEQ ID NO: 1-21 або 60-72; або

надосадову рідину клітинної культури, яка містить такі поліпептиди, що, таким чином, викликає імунну відповідь або знижує колонізацію А/Е-патогеном або виділення А/Е-патогену з тварини.

В альтернативних аспектах винахід також відноситься до способу ослаблення вірулентності А/Е-патогену, шляхом надання А/Е-патогену; і мутації гена, такого як *hleS*, *hleB*, *hleC*, *hleD*, *hleE*, *hleF*, *hleG*, або *hleH*, або їх гомолога в А/Е-патогені, або мутації однієї або декількох нуклеотидних послідовностей у геномі А/Е-патогену, де нуклеотидна послідовність вибрана з SEQ ID NO: 1-21 або 60-72, з ослабленням за рахунок цього вірулентності.

В альтернативних аспектах винахід також відноситься до способу скринінгу сполуки, що ослаблює вірулентність А/Е-патогену, шляхом надання системи (наприклад, клітини, наприклад, клітини EHEC, EPEC, або *C. rodentium*, експериментальної тварини або системи *in vitro*), яка включає: поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, по суті ідентичну послідовності будь-якої однієї або декількох з SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84 або їх фрагменту, або варіанту; нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептидну послідовність, по суті, ідентичну послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 22-43, 59 або 73-84, або їх фрагменту, або варіанту; або молекулу нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність, по суті ідентичну будь-якій одній або декільком послідовностям з SEQ ID NO: 1-21 або 60-72, або їх варіанту, або фрагменту; надання сполуки, що тестується; і визначення того, чи модулює сполука, що тестується, експресію, секрецію або біологічну активність поліпептиду або молекули нуклеїнової кислоти, де зміна, наприклад, зниження експресії, секреції, або біологічної активності поліпептиду або молекули нуклеїнової кислоти, вказує на сполуку, яка ослаблює вірулентність А/Е-патогену.

В альтернативних варіантах винахід також відноситься до способу продукції фактора вірулентності А/Е-патогену шляхом надання рекомбінантної клітини, що включає поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, по суті ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагменту або варіанту; нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептидну послідовність, по суті, ідентичну послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагменту або варіанту; або молекулу нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 1-21 або 60-72, або їх фрагменту або варіанту; вирощування рекомбінантної клітини в умовах, які забезпечують експресію і/або секрецію поліпептиду, і, необов'язково, виділення поліпептиду. У деяких варіантах здійснення поліпептид може секретуватися з клітини.

В альтернативних варіантах винахід також відноситься до способу лікування або профілактики інфекції, що викликається А/Е-патогеном, шляхом ідентифікації ссавця, який має інфекцію, викликану А/Е-патогеном, або має ризик такої інфекції; і введення ссавцеві ефективної кількості сполуки, яка ослаблює вірулентність А/Е-патогену, де сполука

інгібує експресію або секрецію поліпептиду, що включає амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагменту, або варіанту. У деяких варіантах здійснення сполука може являти собою антисмислову молекулу нуклеїнової кислоти, комплементарну відносно нуклеотидної послідовності, по суті, ідентичної будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 1-21, або 60-72, або їх фрагменту, або варіанту, або може являти собою siRNA.

В альтернативних варіантах винахід також відноситься до рекомбінантного поліпептиду, що включає амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну послідовності SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або до виділеної молекули нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність, по суті, ідентичну послідовності SEQ ID NO: 1-21 або 60-72; і/або до вектора, що включає такі нуклеотидні послідовності; і/або до клітини-хазяїна (наприклад, до A/E-патогену, такого як ентерогеморагічна *E. coli* (EHEC), ентеропатогенна *E. coli* (EPEC), або *Citrobacter rodentium*), що включає такі вектори. Вектор може мати здатність інтегруватися у геном A/E-патогену або може не володіти такою здатністю.

В альтернативних аспектах винахід також відноситься до застосування композицій, бактерій, поліпептидів, або молекул нуклеїнової кислоти за винаходом, для одержання лікарського засобу для індукції імунної відповіді проти A/E-патогену, або його компонента, або для зниження виділення або колонізації A/E-патогену у тварини.

В альтернативних аспектах винахід також відноситься до наборів, що включають реагент для виявлення у зразку A/E-патогену і вкладиш в упаковку з інструкціями для виявлення у зразку A/E-патогену. Реагент може включати в себе зонд, або праймер-зонд, або праймер, по суті ідентичний у відношенні: нуклеотидної послідовності, вибраної з групи, яка складається з однієї або декількох з послідовностей SEQ ID NO: 1-21 або 60-72 або їх фрагменту, або варіанту, або нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, по суті ідентичний одній або декільком послідовностям SEQ ID NO: 22-43, 59, 73-84, або їх фрагменту або варіанту, або антитіло, яке специфічно зв'язується з послідовністю, вибраною з групи, яка складається з однієї або декількох послідовностей з SEQ ID NO: 22-43, 59, 73-84, або їх фрагменту або варіанту.

«A/E-патоген» являє собою патоген, наприклад, патогенну бактерію *E. coli*, який може зв'язуватися з поверхнями кишечника тварини, наприклад, ссавця, наприклад, великої рогатої худоби, овець, кіз, свиней, кроликів, собак, котів, і т.д., або видів птахів, наприклад, курей, качок, індичок, і т.д., і викликати появу характерного гістологічного осередку пошкодження, що називається осередком прикріплення і згладжування (A/E) (8). Загалом, інфекція, викликана A/E-патогеном, може приводити до діареї, ентероколіту, захворювання нирок (наприклад, до гемолітико-уремічного синдрому).

Однак інфекція, що викликається A/E-патогеном, не обов'язково виявляється у симпто-

мах захворювання; ссавець-хазяїн, інфікований A/E-патогеном, може бути носієм патогену і залишатися здоровим і не хворим. Таким чином, ссавці, які інфіковані A/E-патогеном або мають ризик такого інфікування, включають тварин, наприклад, сільськогосподарських тварин, таких як домашня птиця, наприклад, курей, індичок, качок, або жуйних, наприклад, велика рогата худоба, вівці, кози, і т.д., або інших сільськогосподарських тварин, наприклад, свиней, у яких не виявляються симптоми захворювання, а також включають людей, чутливих до важкого кишкового захворювання внаслідок інфекції, що викликається A/E-патогеном.

Необмежувальні приклади A/E-патогенів включають ентерогеморагічну *E. coli* (EHEC) (також відому як продукуюча шигатоксин *E. coli* (STEC) або продукуюча веротоксин *E. coli* (VTEC)), наприклад, серотипи EHEC O157 (наприклад, EHEC O157:H7, геномна послідовність якої описана в інвентарних номерах AE005594, AE005595, AP002566, AE005174, NC_002695, або NC_002655), або O158, O5, O8, O18, O26, O45, O48, O52, O55, O75, O76, O78, O84, O91, O103, O104, O111, O113, O114, O116, O118, O119, O121, O125, O28, O145, O146, O163, O165; ентеропатогенну *E. coli* (EPEC); а також патогенну *E. coli*, що інфікує мишей (наприклад, *Citrobacter rodentium*); свиней; овець; собак; та інших ссавців.

Багато штамів A/E-патогенів комерційно доступні, наприклад, за допомогою American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Віргінія, США. A/E-патогени можуть також виділятися з інфікованих суб'єктів, наприклад, безпосереднім висіванням на сорбітний агар MacConkey, доповнений цефіксимом і телуритом, або шляхом імуномагнітного збагачення з подальшим висіванням на те ж середовище (72, 107, 108).

«Білок», «пептид» або «поліпептид» являє собою будь-який ланцюг з двох або декількох амінокислот, що включають ті, що зустрічаються у природі, або неприродні амінокислоти або аналоги амінокислот, незалежно від посттрансляційних модифікацій (наприклад, глікозилювання або фосфорилування). «Амінокислотна послідовність», «поліпептид», «пептид» або «білок» за винаходом можуть включати пептиди або білки, які мають аномальні зв'язки, перекресні зв'язки або кінцеве кепування, непептидні зв'язки або альтернативні модифікуючі групи. Такі модифіковані пептиди також входять в об'єм винаходу. Термін «модифікуючі агенти», як маєтись на увазі, включає структури, безпосередньо приєднані до пептидної структури (наприклад, ковалентним приєднанням), а також ті, які опосередковано приєднані до пептидної структури (наприклад, шляхом стабільної нековалентної асоціації або шляхом ковалентного приєднання до додаткових амінокислотних залишків, або їх міметики, аналоги або похідні, які можуть фланкувати центральну пептидну структуру). Наприклад, модифікуюча група може приєднуватися до N-кінця або до C-кінця пептидної структури, або до області пептиду або пептидоміметики, що фланкує центральний домен.

Альтернативно, модифікуюча група може приєднуватися до бічного ланцюга, щонайменше, од-

ного амінокислотного залишку пептидної структури, або до області пептиду або пептидоміметики, що фланкує центральний домен (наприклад, через епсилон-аміногрупу залишку(-ів) лізину, через карбоксигрупу залишку(-ів) аспарагінової кислоти або залишку(-ів) глутамінової кислоти, через гідроксигрупу залишку(-ів) тирозину, залишку(-ів) серину або залишку(-ів) треоніну або іншої відповідної реакційноздатної групи бічного ланцюга амінокислоти). Модифікуючі групи, ковалентно зв'язані з пептидною структурою, можуть приєднуватися за допомогою і з використанням способів, добре відомих у даній галузі, для зв'язування хімічних структур, що включають, наприклад, зв'язки амідів, алкіламіно, карбамату або сечовини.

Терміни «нуклеїнова кислота» або «молекула нуклеїнової кислоти» охоплюють РНК (плюс і мінус-ланцюги) і ДНК, що включає кДНК, геномну ДНК, і синтетичну (наприклад, хімічно синтезовану) ДНК. Нуклеїнова кислота може бути двохланцюжковою або одноланцюжковою. Коли нуклеїнова кислота одноланцюжкова, вона може бути смисловим ланцюгом або антисмисловим ланцюгом. Молекула нуклеїнової кислоти може являти собою будь-який ланцюг з двох або більшого числа ковалентно зв'язаних нуклеотидів, включаючи ті, що зустрічаються у природі, або неприродні нуклеотиди, або аналоги або похідні нуклеотидів. «РНК» означає послідовність двох або більшого числа ковалентно зв'язаних, таких, що зустрічаються у природі, або модифікованих рибонуклеотидів. Одним з прикладів модифікованої РНК, включеної у даний термін, є фосфотіоатна РНК. Під «ДНК» мається на увазі послідовність двох або більшого числа ковалентно зв'язаних, таких, що зустрічаються у природі, або модифікованих рибонуклеотидів. Під «кДНК» мається на увазі комплементарна або копійна ДНК, продукувана з РНК-матриці під дією РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази). «Клон кДНК» означає дуплексну послідовність ДНК, комплементарну цікавлячій молекулі РНК, яка включена у клонуючий вектор. Під «комплементарністю» мається на увазі, що дві нуклеїнові кислоти, наприклад, ДНК або РНК, містять достатнє число нуклеотидів, які здатні утворювати пари основ Уотсона-Крика, утворюють область двохланцюжковості двох нуклеїнових кислот. Таким чином, аденін в одному ланцюгу ДНК або РНК утворює пару з тиміном у протилежному комплементарному ланцюгу ДНК або з урацилом у протилежному комплементарному ланцюгу РНК. Потрібно розуміти, що кожний нуклеотид у молекулі нуклеїнової кислоти не обов'язково повинен утворювати точну пару основ Уотсона-Крика з нуклеотидом у протилежному комплементарному ланцюгу з утворенням дуплекса. Молекула нуклеїнової кислоти «комплементарна» відносно іншої молекули нуклеїнової кислоти, якщо вона гібридується, в умовах високої жорсткості, з другою молекулою нуклеїнової кислоти.

Використовуваний тут термін «надосадова рідина клітинної культури» в основному відноситься до надосадової рідини, одержаної внаслідок культивування бактерії або іншого організму (наприклад, дріжджів) або клітини (наприклад, клітини

комах), яка здатна секретувати один або декілька поліпептидів, що включають амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, 59, 73-84, або їх фрагменту або варіанту, або їх імуногенній частині, у клітинне культуральне середовище. У деяких варіантах здійснення надосадова рідина клітинної культури також може містити один або декілька з поліпептидів EspA, EspB, EspD, Tir, інтиміну, шигатоксину 1 або 2, або EspP, або їх фрагментів або агрегатів.

Бактерія може являти собою A/E-патоген, наприклад, EHEC, EPEC, або *Citrobacter rodentium*, що, у деяких варіантах здійснення може модифікуватися або мутуватися, або переважно експресувати або секретувати описані тут білки, або може являти собою деяку іншу бактерію, наприклад, непатогенну бактерію, наприклад, непатогенну *E. coli*, таку як HB101, або не-A/E-патоген, який був модифікований або мутований, наприклад, рекомбінантним або іншим способом, так що він став секретувати один або декілька описаних тут білків, наприклад, поліпептид, що включає амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, 59, 73-84, або їх фрагменту або варіанту, або його імуногенну частину, у клітинне культуральне середовище. У деяких варіантах здійснення бактерія не є EHEC або EPEC.

У деяких варіантах здійснення, в яких бактерія є A/E-патогеном, вона також може нести подальшу модифікацію, яка ослаблює її здатність експресувати або секретувати поліпептид (наприклад, EspA, EspB, EspD, Tir, інтимін, шигатоксин 1 або 2, або EspP), який у нормі буде секретувати його за відсутності модифікації. У деяких варіантах здійснення інший організм (наприклад, дріжджі) або клітина (наприклад, клітина комахи) модифіковані або мутовані, наприклад, рекомбінантним або іншим способом, так що вони секретують один або декілька описаних тут білків, наприклад, поліпептид, що включає амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, або її імуногенній частині, у клітинне культуральне середовище.

Сполука є «по суті чистою» або «виділеною», коли вона відділена від компонентів, які супроводжують її у природі. Звичайно сполука є по суті чистою, коли вона становить, щонайменше, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, або 60%, або більш звичайно, щонайменше, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, або 99% за масою від всього матеріалу зразка.

Таким чином, поліпептид, який хімічно синтезований або продукований рекомбінантною технологією, в основному, по суті, позбавлений асоційованих з ним у природі компонентів. Поліпептид також в основному є, по суті, чистим, якщо він відділений від асоційованих з ним у природі компонентів фізичними методами, такими як центрифугування, преципітація, колонкова хроматографія, гель-електрофорез, ВЕРХ, і т.д.

Молекула нуклеїнової кислоти, в основному, є по суті чистою або «виділеною», коли вона не є безпосередньо злиною (тобто ковалентно зв'язаною) з кодувальною послідовністю, до якої вона звичайно прилягає у наявному у природі геномі організму, з яких походить ДНК за винаходом. Тому «виділений» ген або молекула нуклеїнової кислоти, як мається на увазі, означає ген або молекулу нуклеїнової кислоти, що не фланкована молекулами нуклеїнової кислоти, які звичайно (у природі) фланкують ген або молекулу нуклеїнової кислоти (як у геномних послідовностях), і/або повністю або частково очищена від інших послідовностей, що транскрибуються (наприклад, у бібліотеці кДНК або РНК). Наприклад, виділена нуклеїнова кислота за винаходом може бути по суті виділена з комплексного клітинного середовища, в якому вона присутня у природі. У деяких випадках виділений матеріал утворює частину композиції (наприклад, неочищений екстракт містить інші речовини), буферної системи або суміші реагентів.

В інших обставинах матеріал може очищатися до достатньої гомогенності, що, наприклад, визнається шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі (PAGE) або колонкової хроматографії, такої як ВЕРХ. Тому даний термін включає в себе, наприклад, рекомбінантну нуклеїнову кислоту, введену у вектор, такий як плазміда, що автономно реплікується, або вірус; або у геномну ДНК прокаріота або еукаріота, або ту, яка існує в окремій молекулі (наприклад, фрагменті кДНК або геномної ДНК, продукуюваної шляхом ПЛР або обробки рестрикційною ендонуклеазою), незалежно від інших послідовностей. Вона також включає рекомбінантну нуклеїнову кислоту, яка є частиною гібридного гена, що кодує додаткові поліпептидні послідовності. Переважно, виділена нуклеїнова кислота включає в себе, щонайменше, приблизно 50, 80 або 90 процентів (на основі молярного співвідношення) всіх присутніх видів макромолекул. Таким чином, виділений ген або молекула нуклеїнової кислоти може включати ген або молекулу нуклеїнової кислоти, яка синтезована хімічно або рекомбінантними способами. Рекомбінантні ДНК, що містяться у векторі, включені у використовуване тут визначення «виділений». Також виділені молекули нуклеїнової кислоти включають молекули рекомбінантної ДНК у гетерологічних клітинах-хазяїнах, а також частково або по суті очищені молекули ДНК у розчині. Одержані *in vivo* та *in vitro* РНК-транскрипти молекул ДНК за даним винаходом також відносяться до «виділених» молекул нуклеїнової кислоти. Такі виділені молекули нуклеїнової кислоти можуть використовуватися у виробництві поліпептиду, що кодується, як зонд для виділення гомологічних послідовностей (наприклад, з інших видів ссавців), для картування гена (наприклад, шляхом гібридизації *in situ* з хромосомами), або для виявлення експресії гена у тканині (наприклад, у людській тканині, такий як периферична кров), наприклад, шляхом аналізу нозерн-блотингом.

По суті чиста сполука може бути одержана, наприклад, екстракцією з природного джерела; експресією рекомбінантної молекули нуклеїнової

кислоти, що кодує поліпептидну сполуку; або шляхом хімічного синтезу. Чистота може вимірюватися з використанням будь-якого придатного способу, такого як колонкова хроматографія, гель-електрофорез, ВЕРХ, і т.д.

По суті чистий препарат клітини, наприклад, бактеріальної клітини, являє собою препарат клітини, в якій контамінуючі клітини, які не мають необхідного мутантного генотипу, або не експресують або не секретують необхідний поліпептид у відповідних кількостях, складають менше 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, або 90% загальної кількості клітин у препараті.

Різні гени і послідовності нуклеїнової кислоти за винаходом можуть являти собою рекомбінантні послідовності. Термін «рекомбінантний» означає, що щось підлягало рекомбінації, так що при посиленні на конструкцію нуклеїнової кислоти термін відноситься до молекули, яка складена послідовностями нуклеїнової кислоти, які об'єднані разом або продукуювані за допомогою способів молекулярної біології. При посиленні терміну «рекомбінантний» на білок або поліпептидну молекулу даний термін означає, що білкова або поліпептидна молекула експресована з використанням рекомбінантної конструкції нуклеїнової кислоти, створеної за допомогою способів молекулярної біології. При посиленні терміну «рекомбінантний» на генетичну композицію, даний термін відноситься до гамети або до потомства з новими комбінаціями алелей, які не були присутніми у вихідних геномах. Конструкції рекомбінантної нуклеїнової кислоти можуть включати нуклеотидну послідовність, яка лігвана з послідовністю нуклеїнової кислоти, з якою вона не лігвана у природі або з якою вона лігвана у природі в іншому положенні, або дана нуклеїнова кислота піддається маніпуляціям, що приводять до такого лігування. Тому посилення на конструкцію нуклеїнової кислоти як на «рекомбінантну» вказує на те, що молекула нуклеїнової кислоти піддавалася маніпуляціям з використанням генної інженерії, тобто за рахунок людського втручання.

Рекомбінантні конструкції нуклеїнової кислоти можуть, наприклад, вводитися у клітину-хазяїна шляхом трансформації. Такі рекомбінантні конструкції нуклеїнової кислоти можуть включати послідовності, що походять з одного виду клітин-хазяїнів або з різних видів клітин-хазяїнів, які можуть виділятися і повторно вводитися у клітини виду хазяїна. Послідовності рекомбінантних конструкцій нуклеїнової кислоти можуть ставати інтегрованими у геном клітини-хазяїна, внаслідок початкової трансформації клітин-хазяїнів, або внаслідок подальших подій рекомбінації і/або репарації.

Використовуваний тут термін «гетерологічний» відносно нуклеїнової кислоти або білка являє собою молекулу, з якою маніпулювали за рахунок людського втручання, так що вона локалізується у місці, відмінному від місця, в якому вона знаходиться у природі. Наприклад, послідовність нуклеїнової кислоти з одного виду може вводитися у геном іншого виду, або послідовність нуклеїнової кислоти з одного геномного локусу може переміщатися в інший геномний або позахромосомний

локус того ж виду. Гетерологічний білок включає, наприклад, білок, експресований з гетерологічної кодувчої послідовності, або білок, експресований з рекомбінантного гена у клітині, яка у природі не експресує даний білок.

«По суті ідентична» послідовність являє собою амінокислотну або нуклеотидну послідовність, яка відрізняється від послідовності порівняння тільки однією або декількома консервативними замінами, описаними вище, або однією або декількома неконсервативними замінами, делеціями, або вставками, розташованими у тих положеннях послідовності, які не відмінюють біологічної функції амінокислотної молекули або молекули нуклеїнової кислоти. Така послідовність може характеризуватися ідентичністю, що складає будь-яке ціле число від 10% до 99%, або, більш конкретно, щонайменше, від 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55% або 60%, або, щонайменше, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, або 95%, або, як мінімум 96%, 97%, 98%, або 99%, відносно амінокислотної послідовності або послідовності нуклеотидів, використаної для порівняння, із застосуванням, наприклад, програми Align (96) або FASTA. Для поліпептидів довжина послідовностей порівняння може становити, щонайменше 2, 5, 10, або 15 амінокислот, або, щонайменше, 20, 25, або 30 амінокислот. В альтернативних варіантах здійснення довжина послідовностей порівняння може становити, щонайменше, 35, 40, або 50 амінокислот, або понад 60, 80, або 100 амінокислот. Для молекул нуклеїнової кислоти довжина послідовностей порівняння може становити, щонайменше, 5, 10, 15, 20, або 25 нуклеотидів, або, щонайменше, 30, 40, або 50 нуклеотидів. В альтернативних варіантах здійснення довжина послідовностей порівняння може становити, щонайменше, 60, 70, 80, або 90 нуклеотидів, або понад 100, 200, або 500 нуклеотидів. Ідентичність по послідовності може легко вимірюватися з використанням програмного забезпечення для аналізу послідовності (наприклад, пакету програмного забезпечення Sequence Analysis Software Package від Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, або програмного забезпечення BLAST, доступного від National Library of Medicine, або як описано тут).

Приклади придатного програмного забезпечення включають в себе програми Pile-up і PrettyBox. Таке програмне забезпечення шукає подібні послідовності шляхом оцінки гомології різних замін, делецій та інших модифікацій.

Альтернативно або додатково, дві послідовності нуклеїнової кислоти можуть бути «по суті ідентичними», якщо вони гібридизуються в умовах високої жорсткості. У деяких варіантах здійснення умови високої жорсткості являють собою, наприклад, умови, які забезпечують гібридизацію, порівнянню з гібридизацією, яка відбувається з використанням ДНК-зонду, щонайменше, 500 нуклеотидів у довжину, у буфері, який містить 0,5M NaHPO₄, pH7,2, 7% SDS, 1mM EDTA, і 1% BSA (фракція V), при температурі 65°C, або у буфері, що містить 48% формаміду, 4,8×SSC, 0,2M Tris-Cl, pH7,6, 1×розчин Denhardt, 10% декстран-сульфат, і 0,1%

SDS, при температурі 42°C. (Це звичайні жорсткі умови для нозерн- або саузерн-гібридизації.) Гібридизації можна проводити протягом періоду приблизно від 20 до 30 хвилин, або приблизно від 2 до 6 годин, або приблизно від 10 до 15 годин, або понад 24 години або більше. Умови гібридизації високої жорсткості забезпечують успіх багатьох способів, що рутинно виконуються молекулярними біологами, наприклад, ПЛР високої жорсткості, секвенування ДНК, аналізу одноланцюжкового конформаційного поліморфізму, і гібридизації *in situ*. На відміну від нозерн- і саузерн-гібридизації, дані способи рутинно виконуються з відносно короткими зондами (наприклад, звичайно 16 нуклеотидів або довше для ПЛР або секвенування і приблизно 40 нуклеотидів або більше для гібридизації *in situ*). Умови високої жорсткості, що використовуються у даних способах, добре відомі фахівцям у галузі молекулярної біології (61).

По суті ідентична послідовність може, наприклад, являти собою амінокислотну послідовність, яка є по суті ідентичною будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагменту або варіанту, або нуклеотидну послідовність, по суті ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 1-21 або 60-72, або їх фрагменту або варіанту. У деяких варіантах здійснення по суті ідентична послідовність може, наприклад, являти собою нуклеотидну послідовність, комплементарну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 1-21 або 60-72, або їх фрагменту або варіанту, або послідовність, що гібридизується з ними. У деяких варіантах здійснення по суті ідентична послідовність може бути одержана з А/Е-патогену.

«Зонд» або «праймер» являє собою одноланцюжкову молекулу ДНК або РНК з визначеною послідовністю, яка може утворювати пару з другою молекулою ДНК або РНК, яка містить комплементарну послідовність (мішень). Стабільність одержаної у результаті гібридної молекули залежить від ступеня утворення пар основ, яке відбувається, і підлягає впливу параметрів, таких як ступінь комплементарності між зондом і цільовою молекулою, і ступеня жорсткості умов гібридизації. Ступінь жорсткості гібридизації підлягає впливу параметрів, таких як температура, концентрація солі і концентрація органічних молекул, таких як формамід, і визначається способами, відомими фахівцям у даній галузі. Зонди або праймери, специфічні відносно описаних тут послідовностей нуклеїнової кислоти, або їх частин, можуть варіювати за довжиною на число нуклеотидів, яке дорівнює будь-якому цілому числу, щонайменше, від 8 нуклеотидів до числа понад 500 нуклеотидів, включаючи будь-яке значення між ними, в залежності від мети і умов застосування зонда або праймера. Наприклад, зонд або праймер може становити, щонайменше, 8, 10, 15, 20, або 25 нуклеотидів у довжину, або може становити, щонайменше, 30, 40, 50, або 60 нуклеотидів у довжину, або може складати понад 100, 200, 500, або 1000 нуклеотидів у довжину. Зонди або праймери, специфічні відносно описаних тут молекул нуклеїнової кислоти, можуть характеризуватися ідентичністю, що дорівнює будь-якому цілому числу приблизно від 10% до

99%, або, у більш загальному плані, щонайменше, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55% або 60%, або, щонайменше, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, або 95%, або як мінімум 96%, 97%, 98%, або 99% відносно описаних тут послідовностей нуклеїнової кислоти, яка визначена з використанням, наприклад, програми Align (96).

Зонди або праймери можуть бути радіоактивно або нерадіоактивно міченими, з можливістю детектування за допомогою способів, які відомі фахівцям у даній галузі. Зонди або праймери можуть використовуватися у способах, що задіюють гібридизацію нуклеїнової кислоти, наприклад, при секвенуванні нуклеїнової кислоти, ампліфікації нуклеїнової кислоти шляхом полімеразної ланцюгової реакції, аналізі одноланцюжкового конформаційного поліморфізму (SSCP), аналізі поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів, саузерн-гібридизації, нозерн-гібридизації, гібридизації *in situ*, аналізі зсуву електрофоретичної рухливості (EMSA), та інших способах, які відомі фахівцям у даній галузі. Зонди або праймери можуть походити з геномної ДНК або кДНК, наприклад, шляхом ампліфікації, або з клонованих сегментів ДІЖ, або можуть бути хімічно синтезовані.

«Мутація» включає яку-небудь зміну послідовності ДНК, тобто генома організму, у порівнянні з батьківським штамом. Зміна може виникати спонтанно або за рахунок впливу на організм мутагенного стимулу, наприклад, мутагенного хімікату, енергії, випромінювання, рекомбінантних способів, кон'югації або будь-яких інших способів, що застосовуються для зміни ДНК. Мутація може включати зміну у будь-якій з описаних тут нуклеотидних послідовностей або може включати зміну у нуклеотидній послідовності, що кодує будь-який з описаних тут поліпептидів.

Мутація може «ослаблювати вірулентність», якщо внаслідок мутації рівень вірулентності мутантної клітини знижується, щонайменше, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, або 100%, при порівнянні з батьківськими штамми. Зниження вірулентності також може вимірюватися зниженням, щонайменше, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, або 100%, експресії поліпептиду, наприклад, поліпептиду, що включає амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагменту або варіанту, у мутантному штамі у порівнянні з батьківським штамом. Вірулентність А/Е-патогену може вимірюватися, як описано тут, або, як відомо у даній галузі. Зниження вірулентності може також вимірюватися зміною, щонайменше, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, або 100%, біологічної активності поліпептиду, наприклад, поліпептиду, що включає амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагменту або варіанту.

«Модулювання» або «модулює» означає зміну, за рахунок підвищення або зниження. Підвищення або зниження може бути зміною на будь-яке ціле число від 10% до 90%, або на будь-яке ціле число від 30% до 60%, або може являти со-

бою понад 100%, у порівнянні з контролем або зразками, або сполукою порівняння.

«Сполука, що тестується» являє собою будь-яку хімічну сполуку, що зустрічається у природі, або сполуку штучного походження. Необмежувальні приклади сполук, що тестуються, можуть включати пептиди, поліпептиди, синтетичні органічні молекули, органічні молекули, що зустрічаються у природі, і молекули нуклеїнової кислоти. Сполука, що тестується, може «конкурувати» з відомою сполукою, такою як будь-який з поліпептидів або молекул нуклеїнової кислоти, описаних тут, наприклад, перешкоджаючи вірулентності або перешкоджаючи будь-якій біологічній реакції, що індукується відомою сполукою.

Загалом, сполука, що тестується, може характеризуватися будь-яким значенням ступеня модулювання від 10% до 200%, або понад 500%, у порівнянні з контрольною сполукою. Наприклад, сполука, що тестується, може характеризуватися, щонайменше, будь-яким додатним або від'ємним цілим числом від 10% до 200% модулювання, або, щонайменше, будь-яким додатним або від'ємним цілим числом від 30% до 150% модулювання, або, щонайменше, будь-яким додатним або від'ємним цілим числом від 60% до 100% модулювання, або щонайменше, будь-яким додатним або від'ємним цілим числом понад 100% модулювання. Сполука, яка являє собою негативний модулятор загалом знижує модулювання відносно відомої сполуки, у той час як сполука, яка являє собою позитивний модулятор, загалом, підвищує модулювання відносно відомої сполуки.

«Вектор» являє собою молекулу ДНК, що проходить, наприклад, з плазміди, бактеріофагу, або вірусу ссавця або комах, або штучної хромосоми, в яку може вбудовуватися молекула нуклеїнової кислоти, наприклад, нуклеотидна послідовність, по суті ідентична будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 1-21 або 60-72 або їх фрагменту або варіанту. Вектор може містити один або декілька унікальних сайтів рестрикції і може бути здатний до автономної реплікації у визначеному хазяїні, таким чином, що клонована послідовність відтворюється. Вектор може являти собою експресуючий ДНК-вектор, тобто, будь-який автономний елемент, здатний направляти синтез рекомбінантного поліпептиду, і таким чином може використовуватися для експресії поліпептиду, наприклад, поліпептиду, що включає амінокислотну послідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагменту або варіанту, у клітині-хазяїні. Експресуючі ДНК-вектори включають бактеріальні плазміди і фаги, і плазміди і віруси ссавців та комах. Вектор може бути здатним інтегруватися у геном клітини-хазяїна, так що будь-яка модифікація, яка вводиться у геном клітини-хазяїна за допомогою вектора стає частиною генома клітини-хазяїна. Вектор може бути нездатним інтегруватися у геном клітини-хазяїна, і тому залишатися у вигляді одиниці, що автономно реплікується, такої як плазміда.

Антитіло «специфічно зв'язується» з антигеном, коли воно розпізнає і зв'язує антиген, наприклад, поліпептид, що включає амінокислотну пос-

лідовність, по суті, ідентичну будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 22-43, 59, або 73-84, або їх фрагменту або варіанту, але, по суті, не розпізнає і не зв'язує інші молекули у зразку. Таке антитіло характеризується, наприклад, спорідненістю у відношенні антигену, яка, щонайменше, у 10, 100, 1000 або 10000 разів вища за спорідненість антитіла відносно іншої молекули порівняння у зразку.

«Зразок» може являти собою будь-який орган, тканину, клітину, або клітинний екстракт, виділений з суб'єкта, наприклад, зразок, виділений з тварини, інфікованої A/E-патогеном, або з тварини, якій ввели один або декілька поліпептидів або нуклеїнових кислот за винаходом, або їх імуногенних фрагментів. Наприклад, необмежувальні приклади зразка можуть включати тканину (наприклад, з біопсії або аутопсії), клітини, кров, сироватку, молоко, сечу, кал, слину, екскременти, яйця, культуру клітин ссавців або культуральне середовище, або будь-який інший зразок, або будь-який екстракт даних матеріалів, одержаний від пацієнта (людини або тварини), суб'єкта, що тестується, або експериментальної тварини. Необмежувальні приклади зразка можуть також включати продукти, які продукуються у клітинній культурі нормальними або трансформованими клітинами (наприклад, шляхом технології рекомбінантної ДНК або моноклональних антитіл). «Зразок» може також являти собою клітину або клітинну лінію, створену в експериментальних умовах, які не виділені безпосередньо з суб'єкта. Зразок також може бути позбавленим клітин, штучно одержаним або синтезованим.

Зразок може аналізуватися для виявлення гена, генома, поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, що походить з A/E-патогену, або для виявлення мутації у гені, що походить з A/E-патогену, або для виявлення рівнів експресії гена або поліпептиду, що походить з A/E-патогену, або для визначення біологічної функції гена або поліпептиду, що походить з A/E-патогену, з використанням способів, відомих у даній галузі і/або описаних тут. Наприклад, такі способи, як секвенування, аналіз однотанцюжкового конформаційного поліморфізму (SSCP) або аналіз довжин рестрикційних фрагментів (RFLP) продуктів ПЛР, що походять зі зразка, може використовуватися для виявлення мутації у гені; ELISA або вестерн-блотинг може використовуватися для вимірювання рівнів поліпептиду або спорідненості антитіл; нозерн-блотинг може використовуватися для вимірювання рівнів мРНК, або ПЛР може використовуватися для вимірювання рівня молекули нуклеїнової кислоти.

«Імунна відповідь» включає як необмежувальні приклади одну або декілька наступних реакцій ссавця: індукцію антитіл, В-клітин, Т-клітин (включаючи хелперні Т-клітини, супресорні Т-клітини, цитотоксичні Т-клітини, $\gamma\delta$ -Т-клітини), специфічно направлених на антиген(и) у композиції або вакцині, після введення композиції або вакцини. Таким чином, імунна відповідь на композицію або вакцину включає розвиток у ссавці-хазяїні клітинної або опосередкованої антитілами відповіді на цікавлячу композицію або вакцину. Загалом, дана імунна

відповідь буде приводити до запобігання або зниження інфекції, що викликається A/E-патогеном; до стійкості кишечнику до колонізації A/E-патогеном; або до зниження виділення A/E-патогену.

«Імуногенний фрагмент» поліпептиду або нуклеїнової кислоти відноситься до амінокислотної послідовності або до послідовності нуклеїнової кислоти, яка викликає імунну відповідь. Таким чином, імуногенний фрагмент може включати в себе без обмежень, будь-яку частину будь-якої з описаних тут послідовностей, або послідовність, по суті, ідентичну їй, яка включає один або декілька епітопів (ділянка, розпізнавана специфічною клітиною імунної системи, такою як Т-клітина або В-клітина). Наприклад, імуногенний фрагмент може включати в себе без обмежень пептиди будь-якої довжини від 6 до 60, або понад 60 амінокислот, наприклад, пептиди будь-якої довжини від 10 до 20 амінокислот, або від 20 до 40 амінокислот, що походять з будь-якої з описаних тут послідовностей. Такі фрагменти можуть ідентифікуватися з використанням стандартних способів, відомих фахівцям у даній галузі, наприклад, способів картування епітопів, або графіків антигенності або гідрофобності, з використанням, наприклад, програми Omega version 1.0 від Oxford Molecular Group (див., наприклад, патент США №4708871) (76, 77, 81,92,73).

На Фіг.1A-F показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності NleA з *C. rodentium*, EPEC і EHEC (SEQ ID NO: 1-3 і 22-24).

На Фіг.2A-J показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності NleB і NleB2 з *C. rodentium*, EPEC і EHEC (SEQ ID NO: 4-7 і 25-29 & 60).

На Фіг.3A-F показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності NleC з *C. rodentium*, EPEC і EHEC (SEQ ID NO: 8-10 і 30-32).

На Фіг.4A-F показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності NleD з *C. rodentium*, EPEC і EHEC (SEQ ID NO: 11-13 і 33-35).

На Фіг.5A-H показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності NleE з *C. rodentium*, EPEC і EHEC (SEQ ID NO: 14-17 і 36-39).

На Фіг.6A-H показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності NleF з *C. rodentium*, EPEC і EHEC (SEQ ID NO: 18-21 і 40-43).

На Фіг.7 показано вирівнювання амінокислотної послідовності 7 *C. rodentium* OrfII/GrIA (SEQ ID NO: 56) з позитивним регулятором трансляції CaiF (SEQ ID NO: 57) і з передбаченою амінокислотою послідовністю неохарактеризованого білка *Salmonella* (SEQ ID NO: 58). Підкреслений передбачений мотив спіраль-поворот-спіраль, характерний для ДНК-зв'язувальних білків. Ідентичні амінокислотні послідовності показані *, у той час як консервативні зміни показані +.

На Фіг.8 показана комплементация *C. rodentium* Aorf11 за допомогою orf11 з *C. rodentium* (pCRorf11), EHEC (pEHorf11), або EPEC (pEPorf11), і комплементация подвійного мутанта *C. rodentium* Δ ler-Dorf11 за допомогою *C. rodentium* ler або orf11.

Фіг.9 являє собою схематичну діаграму, на якій показане відносне розташування О-острівців, що містять 6 вперше ідентифікованих ефекторних

генів генома EHEC O157:H7. Також показане розташування генів шигагтоксину (stx), LEE, і inv-spa TTSS. Відмічається асоціація багатьох з даних генів з профагами (CP-933 і BP-933).

На Фіг.10А-В показаний протеомний аналіз білків EHEC, що секретуються. А. Одновимірний гель SDS-PAGE загальних білків, що секретуються, з EHEC дикого типу (wt) і мутанта секреції III типу (escN-). Міграція маркерів молекулярної маси (в кДа) показана зліва від гелю. В. Двовимірний гель загальних білків, що секретуються, з EHEC дикого типу. Міграція маркерів молекулярної маси (в кДа) показана зліва, і зразкові значення рі показані вгорі гелю. Білкові плями, аналізовані шляхом мас-спектроскопії (див. таблицю I), обведені кружком і пронумеровані.

На Фіг.11А-С показана геномна організація, розподіл і консервативність NleA. А. Графічне представлення області, що оточує nleA у геномі EHEC. Напрямок транскрипції кожної ORF відмічений стрілкою. Анотація ORF модифікована з (3). NleA виділений жирним шрифтом. В. Аналіз шляхом саузерн-блоту геномної ДНК з EPEC, EHEC, REPEC, *Citrobacter rodentium* (Citro.), і непатогенного штаму *E. coli* HB101. Кожний зразок геномної ДНК розщеплювали BamHI (доріжки 1, 4, 7, 10, 13), EcoRI (доріжки 2, 5, 8, 11, 14), і PstI (доріжки 3, 6, 9, 12, 15). С. Множинне вирівнювання білкової послідовності NleA з EHEC, профагу інтимінопозитивного, що не відноситься до O157 штаму EHEC (O84:H4), EPEC, і *Citrobacter rodentium*. Ідентичні залишки представлені точками (.), амінокислоти, відсутні у конкретній послідовності, представлені тире (-). Дві гідрофобних ділянки, які можуть являти собою передбачувані трансмембранні домени, виділені жирним шрифтом у послідовності EHEC.

На Фіг.12 показаний вестерн-блот-аналіз білків, що секретуються, (ліві доріжки) і бактеріальних згустків (праві доріжки) дикого типу (wt) EHEC і мутанта секреції III типу (escN-), що експресує pNleA-NA і нетрансформованих контролів. Блоти зондували за допомогою NA(A.), анти-DnaK (B.), анти-Tir (C).

На Фіг.13А-В показана секреція III типу і транслокація в ΔnleA EHEC. А. Гель SDS-PAGE загальних білків, що секретуються, з EHEC дикого типу (wt) і мутанта ΔnleA. Міграція маркерів молекулярної маси (в кДа) показана зліва від гелю. В. Вестерн-блот-аналіз білків, що секретуються, з EHEC дикого типу (wt) і мутанта ΔnleA з антисироваткою ΔnleA. Міграція маркерів молекулярної маси (в кДа) показана зліва від гелю.

На Фіг.14А-В показаний вестерн-блот-аналіз фракцій інфікованих клітин-хазяїнів. А. Клітини HeLa інфікували EHEC дикого типу (wt) або escN-EHEC, що експресує мічену NA NleA і піддавали субклітинному фракціонуванню шляхом диференціального центрифугування. Аналізовані фракції являлися собою: бактерії, незруйновані клітини і цитоскелет (осад, одержаний з низькою швидкістю), цитозоль клітини-хазяїна (цитозоль хазяїна), і мембрани клітин-хазяїнів (мембрани хазяїна). Фракції аналізували шляхом вестерн-блоту з використанням анти-NA, анти-DnaK, антитіл проти ка-

льнексину, і антитіл проти тубуліну. В. Виділяли фракції мембран з клітин, інфікованих EHEC дикого типу, що експресує мічений NA NleA. Потім мембранні фракції екстрагували на льоді при високій концентрації солі (1M NaCl), високому pH (pH11,4), нейтральному pH та ізотонічній солі (контроль) або нейтральному pH та ізотонічній солі, що містить 1% triton×100 (Triton X 100), і повторно центрифугували з одержанням розчинних (S) і нерозчинних фракцій мембран (P). Дані фракції піддавали вестерн-блот-аналізу за допомогою антитіл проти NA (верхня панель), антитіл проти кальнексину (середня панель), і антитіл проти кальретикуліну (нижня панель).

На Фіг.15А-Д показані дослідження вірулентності *Citrobacter rodentium* на мишах. А. Вестерн-блот загальних бактеріальних екстрактів з *C. rodentium* дикого типу (wt) і мутанта ΔnleA, що тестуються антисироваткою проти NleA. Міграція маркерів молекулярної маси (в кДа) показана зліва від гелю. В. Графіки виживання для мишей C3H/HeJ, інфікованих *C. rodentium* дикого типу (чорні квадрати), ΔnleA *C. rodentium* (незафарбовані кружки), і мишей, раніше інфікованих мутантом ΔnleA і згодом стимульованих *C. rodentium* дикого типу (вертикальні смуги). Мишей піддавали моніторингу щодобово протягом курсу інфекції, і коли миша починала гинути, її негайно фіксували. Показана процентна частка мишей від початкового числа мишей у кожній групі, які були життєздатні на кожну добу. С. Титри *C. rodentium* з кишечника інфікованих швейцарських мишей NIH. Мишей інфікували *C. rodentium* дикого типу (чорні кружки) або штамом ΔnleA (незафарбовані кружки) і фіксували на 10 добу після інфікування. Тканину кишечника і згустки фекалій гомогенізували і висівали на агар МасСопкеу для визначення загального навантаження *C. rodentium* у кишечнику миші на час фіксації. Кожна миша в експерименті представляє одиничну точку. Середнє у кожній групі вказане на графіку горизонтальними смужками. Д. Маса кишечника і селезінки інфікованих швейцарських мишей NIH. Мишей інфікували *C. rodentium* дикого типу (чорні кружки і трикутники) або штамом ΔnleA (незафарбовані квадрати і трикутники) і фіксували на 10 добу після інфікування. Кишки (квадрати) і селезінки (трикутники) розтинали і зважували. Кожна миша в експерименті була представлена однією точкою. Середнє у кожній групі вказано на графіку горизонтальними смугами.

На Фіг.16А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності гомолога NleG з EHEC (SEQ ID NO: 61 і 73).

На Фіг.17А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності NleH1 з EHEC (SEQ ID NO: 62 і 74).

На Фіг.18А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності NleH2 з EHEC (SEQ ID NO: 63 і 75).

На Фіг.19А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2076 з EHEC (SEQ ID NO: 64 і 76).

На Фіг.20А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2149 з EHEC (SEQ ID NO: 65 і 77).

На Фіг.21А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2150 з EHEC (SEQ ID NO: 66 і 78).

На Фіг.22А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2151 з EHEC (SEQ ID NO: 67 і 79).

На Фіг.23А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2337 з EHEC (SEQ ID NO: 68 і 80).

На Фіг.24А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2338 з EHEC (SEQ ID NO: 69 і 81).

На Фіг.25А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2339 з EHEC (SEQ ID NO: 70 і 82).

На Фіг.26А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2560 з EHEC (SEQ ID NO: 71 і 83).

На Фіг.27А-В показані нуклеотидні і амінокислотні послідовності Z2976 з EHEC (SEQ ID NO: 72 і 84).

Автори винаходу ідентифікували декілька нових білків, що секретуються, А/Е патогенів (таблиця 2) з використанням позитивного регулятора LEE (глобальний регулятор активатора LEE, або GrIA), який може застосовуватися для значного підвищення секреції, і дозволив авторам провести функціональний скринінг на предмет білків, які секретуються за допомогою LEE TTSS, що кодується з використанням підходу, який базується на протеоміці. Дані нові білки, названі Nle (LEE ефектор, що не кодується) від А до Н, присутні у патогенах, що містять LEE, і відсутні у непатогенних штаммах *E. coli*, і у патогенах, що не мають LEE, кодується зовні від LEE за допомогою 3 PAI, які присутні в А/Е-патогенах, і еволюціонують спільно з LEE (3,8). Ідентифікація даних білків у деяких випадках забезпечувала додання функції ORF з раніше невідомою функцією. Типовий білок NleA (p54) являє собою ефектор III типу в А/Е-патогенах, включаючи *C. rodentium*, EPEC, і EHEC, і грає критичну роль у вірулентності. NleA кодується в асоційованому з фагом острові патогенності у геномі EHEC, окремому від LEE. Кодований в LEE-TTSS направляє транслокацію NleA у клітину-хазяїна, де він локалізується в апараті Гольджі. NleA присутній у патогенах, що містять LEE, і відсутній у непатогенних штаммах *E. coli* та у патогенах, які не містять LEE.

У деяких варіантах здійснення винаходу дані поліпептиди і нуклеїнові кислоти, що кодують дані поліпептиди або їх частини, можуть використовуватися як вакцини, терапевтичні засоби, діагностичні засоби, або інструменти для скринінгу лікарських засобів проти інфекцій, що викликаються А/Е-патогенами, або як реагенти.

Поліпептиди і сполуки, що тестуються

Сполуки за винаходом включають, без обмежень, поліпептиди і молекули нуклеїнової кислоти, описані, наприклад, в SEQ ID NO: 1-56, 59-84, і їх фрагменти, аналоги і варіанти. Сполуки за винаходом також включають продукти генів *orf11/grlA*, *nleA*, *nleB*, *nleB2*, *nleC*, *nleD*, *nleE*, *nleF*, *nleG*, *nleH* (*nleH1* і/або *nleH2*), або їх гомологи.

Сполуки за винаходом також включають поліпептиди і молекули нуклеїнової кислоти, описані, наприклад, у геномній послідовності EHEC (наприклад, AE005174) під 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, або L0043 (*Orf11/GrIA*) (інвентарний №AF071034), і їх фрагменти, аналоги і варіанти.

Сполуки можуть бути одержані, наприклад, заміною, делецією або вставкою амінокислотного залишку у будь-яке положення описаного тут поліпептиду, іншими консервативними амінокислотними залишками, тобто, залишками, що мають подібні фізичні, біологічні або хімічні властивості, і шляхом скринінгу, наприклад, на здатність сполуки посилювати вірулентність. У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки за винаходом включають антитіла, які специфічно зв'язуються з описаними тут поліпептидами, наприклад, з SEQ ID NO: 22-43, 59 або 73-84.

У даній галузі добре відомо, що деякі модифікації і зміни можуть бути зроблені у структурі поліпептиду без істотної зміни біологічної функції такого пептиду з одержанням біологічно еквівалентного поліпептиду. В одному з аспектів винаходу поліпептиди за даним винаходом також розширені до біологічно еквівалентних пептидів або «варіантів», які відрізняються від частини послідовності поліпептидів за даним винаходом консервативними амінокислотними замінами, або відрізняються неконсервативними замінами, які не змінюють біологічної функції, наприклад, вірулентності. Застосовуваний тут термін «консервативна амінокислотна заміна» відноситься до заміни однієї амінокислоти на іншу у даному положенні пептиду, причому заміна може бути проведена без істотної втрати відповідної функції. При проведенні таких заміни подібні амінокислоти можуть замінюватися на основі відносної подібності замісників бічних ланцюгів, наприклад, їх розміру, заряду, гідрофобності, гідрофільності, і тому подібного, і такі заміни можуть аналізуватися на предмет їх впливу на функцію пептиду шляхом рутинного тестування.

Застосовуваний тут термін «амінокислоти» означає ті L-амінокислоти, які звичайно знаходяться у білках, що зустрічаються у природі, D-амінокислоти і такі амінокислоти при їх модифікації. Відповідно до цього, амінокислоти за винаходом можуть включати, наприклад: 2-аміноадипінову кислоту; 3-аміноадипінову кислоту; бета-аланін; бета-амінопропіонову кислоту; 2-аміномасляну кислоту; 4-аміномасляну кислоту; піперидинову кислоту; 6-амінокапронову кислоту; 2-аміногептанову кислоту; 2-аміноізомасляну кислоту; 3-аміноізомасляну кислоту; 2-амінопімелінову кислоту; 2,4-діаміномасляну кислоту; десмозин; 2,2'-діамінопімелінову кислоту; 2,3-діамінопропіонову кислоту; N-етилгліцин; N-етиласпарагін; гідроксилізин; ало-гідроксилізин; 3-гідроксипролін; 4-гідроксипролін; ізодесмозин; ало-ізолейцин; N-метилгліцин; саркозин; N-

метилізолейцин; 6-N-метиллізин; N-метилвалін; норвалін; норлейцин; і орнітин.

У деяких варіантах здійснення можуть проводитися консервативні амінокислотні заміни, в яких амінокислотний залишок заміщений на інший, який має подібний рівень гідрофобності (наприклад, у межах значення плюс або мінус 2,0, або плюс або мінус 1,5, або плюс або мінус 1,0, або плюс або мінус 0,5), де наступною може бути амінокислота, що має індекс гідропатичності приблизно -1,6, наприклад, Tyr (-1,3) або Pro (-1,6), а амінокислотним залишкам призначені наступні індекси (як детально описано у патенті США №4554101, включеному у даний опис як посилання): 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); і Trp (-3,4).

В альтернативних варіантах здійснення можуть проводитися консервативні амінокислотні заміни, в яких амінокислотний залишок заміщений на інший, що має подібний гідропатичний індекс (наприклад, у межах значення плюс або мінус 2,0, або плюс або мінус 1,5, або плюс або мінус 1,0, або плюс або мінус 0,5). У таких варіантах здійснення кожному амінокислотному залишку може призначатися гідропатичний індекс на основі характеристик гідрофобності і заряду, таким чином: 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); і Arg (-4,5).

В альтернативних варіантах можуть проводитися консервативні амінокислотні заміни з використанням загальнодоступних сімейств матриць подібності (60, 70, 102, 103, 94, 104, 86). Матриця PAM базується на коефіцієнтах, одержаних з еволюційної моделі, у той час як матриця Blosum використовує коефіцієнти, що походять з висококонсервативних блоків при вирівнюванні. Коефіцієнт подібності вищий нуля у матрицях PAM або Blosum може використовуватися для одержання консервативних амінокислотних замін.

В альтернативних варіантах здійснення можуть бути зроблені консервативні амінокислотні заміни, в яких амінокислотний залишок замінюється іншим того ж класу, де амінокислоти поділяються на класи неполярних, кислих, основних і нейтральних, таким чином: неполярні Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Met; кислі Asp, Glu; основні Lys, Arg, His; нейтральні Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr.

Консервативні амінокислотні заміни можуть включати в себе заміну L-амінокислоти відповідною D-амінокислотою, консервативною D-амінокислотою, або такою, що зустрічається у природі формою амінокислоти, яка не кодується генетично, а також консервативною заміною L-амінокислоти. Такі, що зустрічаються у природі амінокислоти, які не кодуються у геномі, включають бета-аланін, 3-амінопропіонову кислоту, 2,3-діамінопропіонову кислоту, альфа-аміноізомасляну кислоту, 4-аміномасляну кислоту, N-метилглутамін (саркозин), гідроксипролін, орнітин, цитрулін, трет-бутилаланін, трет-бутилглутамін, N-

метилізолейцин, фенілглутамін, циклогексилаланін, норлейцин, норвалін, 2-нафтилаланін, піридилаланін, 3-бензотієнілаланін, 4-хлорфенілаланін, 2-фторфенілаланін, 3-фторфенілаланін, 4-фторфенілаланін, пеніциламін, 1,2,3,4-тетрагідроізохінолін-3-карбонову кислоту, бета-2-тієнілаланін, метіонінсульфоксид, гомоаргінін, N-ацетиллізин, 2-аміномасляну кислоту, 2-аміномасляну кислоту, 2,4-діаміномасляну кислоту, п-амінофенілаланін, N-метилвалін, гомоцистеїн, гомосерин, цистеїнову кислоту, еписилон-аміногексанову кислоту, дельта-аміновалеріанову кислоту, або 2,3-діаміномасляну кислоту.

В альтернативних варіантах здійснення консервативні амінокислотні заміни включають заміни, що базуються на міркуваннях гідрофільності або гідрофобності, розміру або об'єму, або заряду. Амінокислоти можуть загалом характеризуватися гідрофобністю або гідрофільністю, насамперед, в залежності від бічного ланцюга амінокислоти. Гідрофобна амінокислота характеризується гідрофобністю вище нуля, а гідрофільна амінокислота характеризується гідрофільністю нижче нуля, базуючись на нормалізованій консенсусній шкалі гідрофобності Eisenberg et al. (71). Гідрофобні амінокислоти, що кодуються генами, включають в себе Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Pro, Met і Trp, і гідрофільні амінокислоти, що кодуються генами, включають в себе Thr, His, Glu, Gln, Asp, Arg, Ser і Lys. Гідрофобні амінокислоти, що не кодуються генами, включають трет-бутилаланін, тоді як гідрофільні амінокислоти, що не кодуються генами, включають цитрулін і гомоцистеїн.

Гідрофобні і гідрофільні амінокислоти можуть далі поділятися на основі характеристик їх бічних ланцюгів. Наприклад, ароматична амінокислота являє собою гідрофобну амінокислоту з бічним ланцюгом, що містить, щонайменше, одне ароматичне або гетероароматичне кільце, яке може містити один або декілька замісників, таких як -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, і т.д., де R незалежно являє собою (C₁-C₆)-алкіл, заміщений (C₁-C₆)-алкіл, (C₁-C₆)-алкеніл, заміщений (C₁-C₆)-алкеніл, (C₁-C₆)-алкініл, заміщений (C₁-C₆)-алкініл, (C₅-C₂₀)-арил, заміщений (C₅-C₂₀)-арил, (C₆-C₂₆)-алкіларил, заміщений (C₆-C₂₆)-алкіларил, 5-20-членний гетероарил, заміщений 5-20-членний гетероарил, 6-26-членний алкілгетероарил, або заміщений 6-26-членний алкіл гетероарил. Ароматичні амінокислоти, що кодуються генами, включають Phe, Tyr, і Trp, у той час як амінокислоти, що не кодуються генами включають фенілглутамін, 2-нафтилаланін, бета-2-тієнілаланін, 1,2,3,4-тетрагідроізохінолін-3-карбонову кислоту, 4-хлорфенілаланін, 2-фторфенілаланін, 3-фторфенілаланін, і 4-фторфенілаланін.

Неполярна амінокислота являє собою гідрофобну амінокислоту з бічним ланцюгом, який не змінений при фізіологічному pH і який має зв'язки, в яких пари електронів, спільні для двох атомів, у рівній мірі утримуються кожним з двох атомів (тобто, бічні ланцюги неполярні). Неполарні амінокислоти, що кодуються генами, включають Gly, Leu,

Val, Ile, Ala і Met, у той час як неполярні амінокислоти, що не кодуються генами, включають циклогексилаланін. Неполярні амінокислоти можуть далі поділятися таким чином, що будуть включати аліфатичні амінокислоти, які являють собою гідрофобні амінокислоти, що мають аліфатичний вуглеводневий бічний ланцюг. Аліфатичні амінокислоти, що кодуються генами, включають в себе Ala, Leu, Val, і Ile, тоді як аліфатичні амінокислоти, що не кодуються генами, включають норлейцин.

Полярна амінокислота являє собою гідрофільну амінокислоту з бічним ланцюгом, який не заряджений при фізіологічному рН, але який має один зв'язок, в якому пара електронів, спільна для двох атомів, утримується ближче до одного з атомів. Полярні амінокислоти, що кодуються генами, включають Ser, Thr, Asn, і Gln, тоді як полярні амінокислоти, що не кодуються генами, включають цитрулін, N-ацетиллізин і метіонінсульфоксид.

Кисла амінокислота являє собою гідрофільну амінокислоту зі значенням pK_a бічного ланцюга менше 7. Кислі амінокислоти звичайно мають негативно заряджені бічні ланцюги при фізіологічному рН внаслідок втрати іона водню. Кислі амінокислоти, що кодуються генами, включають Asp і Glu. Основна амінокислота являє собою гідрофільну амінокислоту зі значенням pK_a бічного ланцюга вище 7. Основні амінокислоти звичайно мають позитивно заряджені бічні ланцюги при фізіологічному рН внаслідок асоціації з іоном гідронію. Основні амінокислоти, що кодуються генами, включають Arg, Lys, і His, тоді як основні амінокислоти, що не кодуються генами, включають нециклічну амінокислоту орнітин, 2,3-діамінопропіонову кислоту, 2,4-діаміномасляну кислоту, і гомоаргінін.

Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що вказані вище класифікації не абсолютні і що амінокислота може класифікуватися більш ніж в одну категорію. Крім того, амінокислоти можуть класифікуватися на основі їх відомої поведінки і/або характерних хімічних, фізичних або біологічних властивостей, на основі конкретних тестів або у порівнянні з раніше ідентифікованими амінокислотами. Амінокислоти можуть включати біфункціональні радикали, що мають подібні до амінокислот бічні ланцюги.

Консервативні заміни також можуть включати заміну хімічно дериватизованого радикала на не-дериватизований залишок, наприклад, шляхом реакції функціональної бічної групи амінокислоти. Таким чином, дані заміни можуть включати сполуки, вільні аміногрупи яких дериватизовані з утворенням гідрохлоридів аміну, п-толуолсульфонільних груп, карбобензоксигруп, трет-бутилоксикарбонільних груп, хлорацетильних груп або формільних груп. Подібним чином, вільні карбоксильні групи можуть дериватизуватися з утворенням солей, складних ефірів метилу і етилу або інших типів складних ефірів або гідразидів, і бічні ланцюги можуть дериватизуватися з утворенням О-ацил- або О-алкілпохідних вільних гідроксильних груп або N-імі-бензилгістидину для азоту імідазолу гістидину. Пептидні аналоги також включають амінокислоти, які були хімічно змінені, наприклад, шляхом метилування, амідування С-кінцевої амінокислоти алкіламіном, таким як ета-

ноламін або етилендіамін, або ацилювання або метилування бічного ланцюга амінокислоти (наприклад, ацилювання епсилон-аміногрупи лізину). Пептидні аналоги також можуть включати заміну амідного зв'язку пептиду заміщенням амідом (наприклад, групами формули $-C(O)-NR$, де R являє собою (C_1-C_6) -алкіл, (C_1-C_6) -алкеніл, (C_1-C_6) -алкініл, заміщений (C_1-C_6) -алкіл, заміщений (C_1-C_6) -алкеніл, або заміщений (C_1-C_6) -алкініл) або ізостер амідного зв'язку (наприклад, $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$ (цис і транс), $-C(O)CH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, або $-CH_2SO-$).

Сполуки можуть бути ковалентно зв'язані, наприклад, полімеризацією або кон'югацією, з утворенням гомополімерів або гетерополімерів. Можуть використовуватися спейсери і лінкери, що звичайно складаються з малих нейтральних молекул, таких як амінокислоти, які незаряджені у фізіологічних умовах. Зв'язки можуть досягатися декількома шляхами. Наприклад, залишки цистеїну можуть додаватися до кінців пептидів, і множинні пептиди можуть ковалентно зв'язуватися шляхом контрольованого окиснення. Альтернативно, можуть використовуватися гетеробіфункціональні засоби, такі як агенти, що утворюють дисульфід/амід, або тіоефір/амід агенти. Сполука також може зв'язуватися з іншою сполукою, яка, наприклад, може модулювати імунну відповідь. Сполука також може бути напруженою, наприклад, за рахунок наявності циклічних частин.

Пептиди або пептидні аналоги можуть синтезуватися стандартними хімічними способами, наприклад, шляхом автоматичного синтезу з використанням розчину або методології твердофазового синтезу. Автоматичні пептидні синтезатори є комерційно доступними, і в них використовуються способи, добре відомі у даній галузі. Пептиди або пептидні аналоги можуть також бути одержані з використанням рекомбінантної ДНК-технології з використанням стандартних способів, таких як описані, наприклад, в Sambrook, et al. (110) або Ausubel et al. (111). Загалом, сполуки-кандидати ідентифіковані у великих бібліотеках природних продуктів або синтетичних (або напівсинтетичних) екстрактах або хімічних бібліотеках способами, відомими у даній галузі. Фахівці у галузі виявлення і розробки лікарських засобів розуміють, що конкретне джерело таких, що тестуються, екстрактів або сполуки не є критичним відносно способу(ів) за винаходом. Відповідно до цього, по суті, будь-яка кількість хімічних екстрактів або сполук можуть піддаватися скринінгу з використанням описаних тут типових способів. Приклади таких екстрактів або сполук включають в себе, як необмежувальні приклади, такі, які базуються на рослинах, грибах, прокаріотах або тваринах екстракти, бульйони ферментації і синтетичні сполуки, а також модифікацію існуючих сполук. Багато способів також доступні для випадкового або направленного синтезу (наприклад, напівсинтезу або повного синтезу) будь-якого числа хімічних сполук, включаючи як необмежувальні приклади сполуки на основі цукрів, ліпідів, пептидів і нуклеїнових кислот. Комерційно доступні синтетичні бібліотеки сполук. Альтернативно, комерційно доступні бібліотеки

природних сполук у вигляді бактеріальних, грибних, рослинних або тваринних екстрактів з ряду джерел, включаючи Biotics (Sussex, Великобританія), Xenova (Slough, Великобританія), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, Флорида, США), і PharmaMar, Масачусетс, США. Крім того, натуральні і синтетично продукovanі бібліотеки, наприклад, поліпептиди патогену A/E продукуються, якщо потрібно, способом, відомим у даній галузі, наприклад, стандартними способами екстракції і фракціонування. Більш того, якщо потрібно, будь-яка бібліотека або сполука легко модифікується з використанням стандартних хімічних, фізичних або біохімічних способів.

Коли виявляють, що грубий екстракт модулює вірулентність, необхідне подальше фракціонування позитивного екстракту-кандидата для виділення хімічних складових, відповідальних за ефект, що спостерігається. Так, метою процесу екстракції, фракціонування і очищення є ретельна характеристика і ідентифікація хімічної суті у неочищеному екстракті, що володіє властивостями з модулювання вірулентності. Ті ж аналізи, що описані тут для детектування видів активності у сумішах сполук, можуть використовуватися для очищення активного компонента і для тестування його похідних. Способи фракціонування і очищення таких гетерогенних екстрактів відомі у даній галузі. Якщо потрібно, сполуки, які, як показано, можуть використовуватися як лікарські засоби, хімічно модифікують способами, відомими у даній галузі. Сполуки, ідентифіковані як такі, що володіють терапевтичною, профілактичною, діагностичною або іншою цінністю, можуть згодом аналізуватися з використанням *Citrobacter* або моделі інфекції, що викликається A/E-патогеном на великій рогатій худобі, або будь-якій іншій моделі інфекції, що викликається A/E-патогеном на тваринах.

Вакцини

«Вакцини» є сполуками, що включають в себе матеріали, які викликають необхідну імунну відповідь. Вакцина може виділяти, активувати або використовувати пам'ять В- і Т-клітин імунної системи для, наприклад, включення механізмів видалення з організму інфекційних агентів, таких як A/E патогени або їх компоненти. У деяких варіантах здійснення вакцина включає відповідний носій, такий як ад'ювант, який є агентом, що діє неспецифічним способом для підвищення імунної відповіді на специфічний антиген або на групу антигенів, викликаючи зменшення кількості антигену при призначенні будь-якої дози вакцини або зменшення частоти введення вакцини, потрібної для одержання необхідної імунної відповіді. Необхідна імунна відповідь може включати повний або частковий захист від зараження (присутня в екскрементах інфікованої тварини, наприклад, свавця) або утворення колоній (присутня у кишечнику інфікованої тварини, наприклад, свавця) A/E патогеном. Наприклад, необхідна імунна відповідь може включати будь-який ступінь, від 10% до 100%, наприклад, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% захисту від зараження або утворення колоній A/E патогеном вакцинованої тварини у порівнянні з невакцинованою твариною.

Вакцини, що відносяться до винаходу, можуть включати в себе поліпептиди і нуклеїнові кислоти, описані тут, або їх імуногенні фрагменти, і можуть призначатися з використанням будь-якої відомої або описаної тут форми введення. У деяких варіантах здійснення винаходу вакцина може включати в себе живий A/E патоген, мертвий A/E патоген або їх компоненти. Живий A/E патоген, який може бути призначений у формі пероральної вакцини, може містити невідоме генетичне пошкодження, що знижує вірулентність A/E патогену, але не його здатність викликати імунну відповідь. Жива вакцина може бути здатна заселяти кишечник вакцинованої тварини, наприклад, свавця.

У деяких варіантах здійснення, поліпептиди і молекули нуклеїнових кислот, описані тут, або їх імуногенні фрагменти, або бактерії, що мутували (наприклад, ослаблені бактерії), описані тут, можуть вводитися птахам, наприклад, курчатам, качкам, індичкам та ін., щоб викликати імунну відповідь, наприклад, підвищення рівня антитіл, у птахів. Яйця або їх продукти, одержані від таких птахів, що виявляють імунну відповідь проти поліпептидів і молекул нуклеїнових кислот, описаних тут, або проти їх імуногенних фрагментів, можуть бути призначені тваринам, наприклад, людині, великій і дрібній рогатій худобі, вівцям та ін., щоб викликати імунну відповідь на поліпептиди і молекули нуклеїнових кислот, описані тут, або їх імуногенні фрагменти, у тварин. Способи підвищення рівня антитіл у птахів і застосування таких антитіл описані, наприклад, у патенті США 5750113, виданому Cook 12 травня 1998 року; у патенті США 6730822, виданому Ivarie, et al. 4 травня 2004 року; і публікаціях 113-117, що наводяться тут.

Вакцини, що відносяться до винаходу, можуть бути надалі доповнені доданням рекомбінантних або очищених антигенів, таких як EspA, EspB, EspD, EspP, Tir, шигатоксин 1 або 2 і/або інтимін, з використанням відомих стандартних способів. Наприклад, одержання і використання рекомбінантних білків EHEC O157:H7, таких як EspA, Tir, EspB та інтимін, було описане (публікація PCT №WO 99/24576; 51).

Клітинна культура

A/E патогени можуть вирощуватися відповідно до будь-яких відомих або описаних тут способів. Наприклад, A/E патогени можуть спочатку вирощуватися на середовищі Luria-Bertani (LB) протягом приблизно від 8 до 48 годин, або приблизно від 12 до 24 годин, і потім розводитися приблизно від 1:5 до 1:100, наприклад, 1:67, або приблизно від 1:5 до 1:25, або приблизно 1:10, у мінімальному середовищі M-9, доповненому 20-100mM NaHCO₂ або NaHCO₃, або приблизно 30-50mM, або приблизно 44mM NaHCO₂ або NaHCO₃; 4-20mM MgSO₄, або приблизно 5-10mM; або приблизно від 0,8mM до 8mM MgSO₄, від 0,1 до 1,5% глюкози, або приблизно від 0,2% до 1%, або приблизно 0,4% глюкози і від 0,05 до 0,5% казамінових кислот, або приблизно від 0,07 до 0,2%, або приблизно 0,1% казамінових кислот. Культури в основному підтримуються при приблизно 37°C, можливо в 2-10% CO₂ або приблизно в 5% CO₂, і вирощуються до оптичної щільності приблизно 600nm від

0,7 до 0,8. Цілі клітини потім видаляються будь-яким придатним способом, наприклад, мікрофільтрацією або центрифугуванням, і супернатант може бути концентрований, наприклад, в 10-1000 разів або більше, наприклад, у 100 разів, з використанням діалізу, ультрафільтрації або подібних способів. Спільний білок легко визначається з використанням добре відомих у науці способів.

Супернатанти клітинних культур можуть бути одержані з використанням культур будь-яких A/E патогенів, включаючи дикий тип або мутантні A/E патогени, наприклад, ЕНЕС, як описано тут або відомо науковим фахівцям. Загалом, A/E патоген культивується у придатному середовищі, в умовах, що сприяють секреції антигену типу III (патенти США №№6136554 і 6165743) (51, 74).

Ізолювання та ідентифікація додаткових генів

На основі нуклеотидних або амінокислотних послідовностей, описаних тут, наприклад, в SEQ ID NO:1-56 або 59-84, ізолювання та ідентифікація додаткових генів стають можливими, з використанням стандартних способів. Будь-який A/E патоген може служити джерелом таких генів.

У деяких варіантах здійснення, послідовності нуклеїнових кислот, описані тут, можуть бути використані для створення проб і праймерів, включаючи вироджені олігонуклеотидні проби або праймери, на основі послідовності будь-якого ланцюга ДНК. Проби і праймери можуть бути використані надалі для пошуку у геномних або кДНК бібліотеках генів інших A/E патогенів, із застосуванням стандартних способів ампліфікації і гібридизації.

У деяких варіантах здійснення, амінокислотні послідовності, описані тут, можуть бути використані для одержання антитіл або інших реагентів, які застосовуються для пошуку поліпептидів A/E патогенів, які зв'язуються з цими антитілами.

У деяких варіантах здійснення, партнери, що зв'язуються можуть бути ідентифіковані шляхом мічення поліпептидів за винаходом (наприклад, таких значною мірою подібних до SEQ ID NO: 22-43, 59 або 73-84) епітопною послідовністю (наприклад, FLAG або 2HA), і введення їх у клітину-хазяїна, як шляхом трансфекції з відповідним вектором, що містить послідовність нуклеїнових кислот, що кодує поліпептид за винаходом, так і шляхом ендогенного введення бактерій типу III з подальшою імунопреципітацією та ідентифікацією партнерів, що зв'язуються.

Клітини HeLa можуть бути інфіковані штамми, які експресують білки злиття FLAG або 2HA, з подальшим лізисом та імунопреципітацією з анти-FLAG або анти-2HA антитілами. Партнери, що зв'язуються, можуть бути ідентифіковані за допомогою мас-спектрометрії. Якщо поліпептид за винаходом не утворюється у достатніх кількостях, такий спосіб може не виробити потрібного об'єму міченого білка для ідентифікації його партнера. Як частина додаткового способу, кожний поліпептид за винаходом може бути клонований у вектор трансфікування ссавців, злитий, наприклад, з 2HA, GFP і/або з FLAG. Після трансфікування клітини HeLa можуть бути лізовані і мічений поліпептид імунопреципітований. Партнер, що зв'язується,

може бути ідентифікований за допомогою SDS PAGE і подальшої мас-спектрометрії.

У деяких варіантах здійснення, поліпептид за винаходом може бути помічений, одержаний у великих кількостях і використаний в афінних колонках і в імунопреципітації для ідентифікації і/або підтвердження ідентифікованих сполук-мішеней. Білки, мічені FLAG, HA і/або His, можуть бути використані на таких афінних колонках для діставання з клітинних екстрактів факторів клітини-хазяїна, і переважний фактор може бути підтверджений стандартними аналізами зв'язування, кривими насичення та іншими методами, описаними тут або відомими фахівцям у даній галузі.

У деяких варіантах здійснення бактеріальна двохгібридна система може бути використана для вивчення білок-білкових взаємодій. Послідовності нуклеїнових кислот, описані тут, або послідовності, значною мірою подібні до них, можуть бути клоновані у плазмиду приманки рВТ двохгібридної системи, і комерційно доступна бібліотека з 5×10^6 незалежних клонів селезінки миші може бути використана як бібліотека-мішень для приманок. Потенційні переважні фактори можуть бути надалі характеризовані шляхом відновлення плазмід і їх повернення до вихідного стану для зменшення псевдопозитивних результатів від варіантів приманки клону і клонів-приманок бібліотеки, які активують репортерні гени незалежно від клонованої приманки. Відтворювані переважні фактори можуть бути вивчені, надалі, як тут описано.

У деяких варіантах здійснення, A/E патогенний штам, що експресує GrIA, наприклад, штам ЕНЕС 0157, що експресує клонований GrIA, може бути використаний для протеомного аналізу таких, що секретуються, A/E протеомів типу III, із застосуванням, наприклад, 2D гелевого аналізу супернатантів. Крім того, повний A/E патоген (наприклад, біоципи, що базуються на ЕНЕС) може застосовуватися для визначення того, які гени регулюються GrIA. Вірулентність визначають способами, описаними тут, або відомими фахівцям у даній галузі.

Після ідентифікації кодуючих послідовностей, вони можуть бути ізольовані з використанням стандартних способів клонування і введені у будь-який відповідний вектор або реплікон для, наприклад, одержання поліпептидів. Такі вектори і реплікони включають, без обмеження, бактеріофаг X (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (грам-негативна бактерія), pGVI 106 (грам-негативна бактерія), pLAFRI (грам-негативна бактерія), pME290 (не-*E. coli* грам-негативна бактерія), pHv14 (*E. coli* і *Bacillus subtilis*), pBD9 (*Bacillus*), pIJ61 (Стрептоміцети), pUC6 (Стрептоміцети), YIp5 (Сахароміцети), YCrp19 (Сахароміцети) або вірус коров'ячої папіломи (клітини ссавця).

Загалом, поліпептиди за винаходом можуть бути одержані у будь-якій прийнятній клітині-хазяїні, змінений або трансфікований відповідним вектором (69). Спосіб зміни або трансфікування і вибір експресуючого носія будуть залежати від вибраної системи хазяїна. Можуть застосовуватися різноманітні експресуючі системи, і вибір строго визначеної клітини-хазяїна не критичний для винаходу. Наприклад, поліпептид, відповідно до вина-

ходу, може бути одержаний у прокаріотичній клітині-хазяїні (наприклад, *E. coli*) або в еукаріотичній клітині-хазяїні (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*, клітинах комах, наприклад, клітинах Sf21, або у клітинах ссавців, наприклад, клітинах NIH 3T3, HeLa або COS). Ці клітини доступні з різних джерел (наприклад, the American Type Culture Collection, Manassus, VA). Бактеріальні експресуючі системи для одержання поліпептидів включають *E. coli* pET експресуючу систему (Novagen, Inc., Madison, Wis.), і pGEX експресуючу систему (Pharmacia).

Аналізи

Сполуки-кандидати, включаючи поліпептиди, молекули нуклеїнових кислот і малі молекули, можуть бути виявлені та оцінені з використанням різних способів, описаних тут або відомих науковим фахівцям. Сполуки, що зменшують рівень експресії будь-яких поліпептидів або молекул нуклеїнових кислот за винаходом можуть бути використані, наприклад, як ліки проти A/E патогенної інфекції.

Скринінгові аналізи можуть супроводжуватися, наприклад, вимірюванням експресії гена стандартним нозерн-блот аналізом, з використанням будь-якого придатного фрагмента нуклеїнової кислоти, відповідно до винаходу, як гібридизаційної проби, де рівень експресії гена у присутності сполуки-кандидата порівнюють з рівнем експресії гена за відсутності сполуки-кандидата. З іншого боку, або додатково, ефект сполуки-кандидата може бути визначений за рівнем експресії або секреції поліпептиду, з використанням, наприклад, імунопреципітації або прийомів вестерн-блоту.

Інші аналізи можуть бути проведені наступним чином:

Підтвердження секреції і транслокації типу III у клітинах-хазяїнах

Для визначення, яка зі сполук-кандидатів має потребу у TTSS для секреції, кожний ген або порція генів можуть бути приєднані до С-кінця FLAG, і супернатанти збирають з WT і TTSS мутантів, наприклад, WT HHEC та ізогенного мутанта *escN* типу III, як описано тут або відомо науці. Інший спосіб визначення секреції включає дослідження супернатантів на зниження продуктів секреції у мутантних штамх, або підвищення антитіл до білка, з використанням вестерн-аналізу супернатантів WT і типу III. Для підтвердження того, що жодний з цікавлячих білків не є компонентом TTSS, супернатанти від кожної зі сполук-кандидатів, які росли в умовах, що індують тип III, можуть бути досліджені на секрецію типу III. LEE TTSS секретує два класи білків: транслокони (*EspA*, *B* і *D*), які зв'язані з поверхнею бактеріальної клітини, і ефектори, які переміщуються безпосередньо у клітину-хазяїна. Сполуки-кандидати вивчають для визначення, є вони ефекторами або транслокаторами. Наприклад, FLAG-мічені передбачувані ефектори в ЕНЕС або інших A/E патогенах можуть бути використані для інфікування епітеліальних HeLa клітин, що культивуються, і досліджені за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії після забарвлювання з анти-FLAG антитілами. Така візуалізація звичайно показує про-

никнення бактерій у клітину-хазяїна і часто виявляє, яка органела є мішенню ефектора (наприклад, мембрана - для Tіg, комплекс Гольджі для NleA). Антитіла до різних клітинних структур можуть бути використані таким чином для підтвердження локалізації. На додаток до візуалізації, інфіковані HeLa клітини можуть бути фракціоновані на цитозоль, нерозчинний, і мембранні фракції, з використанням відомих способів фракціонування (30), і за допомогою вестерн-аналізу, що проводиться із застосуванням анти-FLAG антитіл, визначають, яка клітинна фракція є мішенню ефектора. Як контроль клітини інфікують міченим ефектором, що експресується в TTSS-дефектному штамі. Якщо мішенню є мембранна фракція, обробка вищою сіллю або лужною рН може бути використана для визначення, чи є це інтегральним білком мембрани. Якщо сполука-кандидат експресується на низькому рівні і визначення переміщення способом імунофлуоресценції ускладнене, може бути застосоване генетичне злиття з аденілатциклазою, ферментом, для активності якого необхідний цитоплазматичний кофактор ссавців (кальмодулін) (87).

Ефекти на формування ложа і засвоєння

Враховуючи, що накопичення актину і утворення ложа є відмінними ознаками A/E патогенів, сполуки-кандидати виявляють за накопиченням актину і утворенням ложа, наприклад, в епітеліальних HeLa клітинах, що культивуються.

Інвазія ЕРЕС і ЕНЕС є іншим фенотипом клітинної культури, який легко визначається і свідчить про взаємодію з епітеліальними клітинами, що культивуються, і здатність змінювати цитоскелет клітини-хазяїна (крім мутантів типу III і штамів, дефіцитних за Tіg та інтиміном). Рівні інвазії різних сполук-кандидатів можуть порівнюватися у мутантних A/E патогенах WT і типу III, наприклад, WT і TTSS мутантних ЕНЕС у клітинах HeLa, з використанням гентаміцинового захисного аналізу.

Крім того, визначають здатність сполук-кандидатів блокувати фагоцитоз макрофагів, що культивуються, оскільки ЕРЕС і ЕНЕС придушують фагоцитоз макрофагів, що культивуються, через інгібування активності PI 3-кінази клітини-хазяїна тип PII-залежним чином (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). Якщо які-небудь сполуки-кандидати не здатні придушувати фагоцитоз, може бути проведений додатковий аналіз інгібування PI 3-кінази.

Ефекти на поляризовані епітеліальні моношари

Стан міжклітинних взаємодій грає ключову роль у розвитку діареї. Крім утворення ложа, A/E патогени викликають й інші LEE типу III-ефекти на поляризовані епітеліальні клітини, включаючи втрату мікроворсинок (згладжування мікроворсинок) і зниження трансмоншарового електричного опору, критерію щільності взаємодії. Використовуючи поляризовані кишкові моношари клітин Caco-2 людини, може бути застосована скануюча електронна мікроскопія високого розрізнення моношарів, інфікованих A/E патогеном WT (наприклад, WT

EHEC), TTSS мутантний A/E патоген, наприклад, EHEC escN і будь-яка зі сполук-кандидатів. Моношари інфікують різне число разів, відмивають і вивчають на SEM, використовуючи стандартні способи (66), і виявляють зниження електричного опору після інфікування поляризованих клітин Ca-co-2.

Ефекти на природжений імунітет і запалення

Рисою патогенів, що легко виявляється, є здатність придушувати природжені імунні та запальні відповіді. Подібні ефекти описані для A/E патогенів, таких як EHEC і EPEC, і дане дослідження може бути використане для вивчення сполук-кандидатів у штамх WT і TTSS мутантних A/E патогенів. Наприклад, EHEC викликає придушення NF- κ B, що приводить до пригнічення деяких цитокінів, таких як IL-8, IL-6 і IL-1 α у клітинах HeLa (80), і цей процес вимагає LEE TTSS. Сполуки-кандидати досліджують на придушення цих факторів услід за, наприклад, інфікуванням клітин HeLa, використовуючи стандартні способи, такі як RT-PCR (ПЛР у реальному часі) і комерційно доступні аналізи ELISA.

Функціональні дослідження на основі інформації про локалізацію

На додаток до вивчення фенотипу, сполуки-кандидати досліджують в залежності від їх локалізації у клітині-хазяїні. Наприклад, якщо сполука-кандидат локалізується у комплексі Гольджі, вона може бути вивчена для визначення наявності негативного впливу на функціонування комплексу Гольджі, включаючи біохімічні дослідження глікозилювання і функціональні дослідження комплексу Гольджі на дріжджових грибах, що експресують сполуку-кандидат. Якщо сполука-кандидат локалізується у мітохондріях, застосовують дослідження апоптозу та інших мітохондріальних функцій. Якщо мішенню сполуки-кандидату є ендоплазматичний ретикулум, вивчають синтез і секрецію білків. Якщо мішенню є ядро, проводять транскрипційні дослідження.

Роль вірулентності

Конкурентні індекси (CI) широко використовуються для визначення ролі міnorних вірулентних факторів, а також приналежності двох вірулентних факторів до одного вірулентного «шляху» (63). Коротко, два штами з різною стійкістю до антибіотиків спільно вводять тварині і, після достатнього часу інкубації, бактерії виділяють і визначають співвідношення двох штамів. Індекс 1 означає рівну вірулентність. Якщо ідентифіковані сполуки впливають на вірулентність, їх CI, у порівнянні з WT, можуть бути визначені. Також CI використовують для визначення, до якого вірулентного шляху належать сполуки-кандидати. Наприклад, CI можуть бути одержані при порівнянні мутантів двох вірулентних факторів, на додаток до порівняння кожного з них з WT. При порівнянні одиночних мутантів з подвійним мутантом, співвідношення CI, яке дорівнює 1, означає, що вони належать до одного спільного вірулентного шляху, тоді як співвідношення, відмінне від 1, означає, що вони належать до різних вірулентних «шляхів».

Мікроскопічні дослідження

Мікроскопічні способи використовують для характеристики захворювання, викликаного A/E патогеном, включаючи трансмісійну електронну мікроскопію (TEM) і скануючу електронну мікроскопію (SEM) для вивчення лімфоїдних фолікулів у бляшках Пейєра дистальної частини клубової кишки кроликів, інфікованих REPEC, для підтвердження формування A/E пошкоджень (63), конфокальну мікроскопію для спостереження надходження у мишачі ворсинки, і гістологічний аналіз хворобливого процесу в інфікованих мишах.

Ці способи використовують для вивчення сполук-кандидатів на прийнятних тваринних моделях, наприклад, мишах, інфікованих різними штамми цитробактеру, що несуть мутації у послідовностях кандидата. Для кожної сполуки-кандидату може бути зроблене комплексне дослідження для відстеження прогресування (або його відсутності) захворювання у цій системі. Крім того, визначають рівень колонізації цими мутантами поверхні кишечника. Застосовують інфікування тварин штамми, міченими антибіотиками, після чого вилучають тканину кишечника. Тканину гомогенізують і підраховують кількість бактерій на селективних лічильних пластинках.

Основною особливістю A/E патогену, наприклад, цитробактерної інфекції, є виражене запалення. Клітинні ознаки запалення досліджують за допомогою конфокальної мікроскопії у різних мутантів сполук-кандидатів. Шляхом мічення тканин антитілами або лектинами, з подальшою конфокальною мікроскопією, виявляють клітини запалення, мобілізовані до місця інфікування мутантами, у порівнянні з батьківським штамом. Антитіла до деяких факторів природженої відповіді доступні і можуть також бути використані для аналізу мутантних фенотипів у ході інфекції шляхом вивчення факторів природженої відповіді і клітин, таких як макрофаги, нейтрофіли, продукції iNOS, дендритні клітини та ін.

Гістологічні дослідження

Можуть проводитися гістологічні дослідження забарвлених тканин. Наприклад, забарвлені гематоксиліном або еозином зрізи клубової кишки кроликів, інфікованих REPEC, і штами з делеціями сполук-кандидатів вивчають для порівняння запалення і пошкодження тканин і характеристики A/E патогенних інфекцій (58). Подібне ж забарвлювання проводять на мишах з штамми цитробактеру, дефіцитними за сполуками-кандидатами. Доступні деякі інші гістологічні барвники, за допомогою яких можна визначити запалення, пов'язане з цитробактером та ізогенними мутантами, включаючи Гімза і Толуїдин синій О (для загальної морфології), Шифф-йодну кислоту (забарвлює карбогідрати, дозволяючи виявити кишковий слизовий шар і келихоподібні клітини), Грам, хлорацетатестеразу (забарвлює клітини запалення) і Реакцію каспаз (для апоптозу). Імуногістохімія дозволяє використовувати антитіла, направлені проти антигенів бактеріальних клітин і клітин ссавців.

Антитіла

Сполуки за винаходом можуть бути використані для одержання антитіл до поліпептидів за

винаходом, із застосуванням стандартних способів одержання (45) або способів, відомих фахівцям у даній галузі.

Наприклад, кодууючу послідовність для поліпептиду за винаходом очищують до ступеня, необхідного для імунізації кролика. З метою мінімізувати можливі проблеми, пов'язані з низької афінністю або специфічністю антисироватки, створюють дві або три поліпептидні конструкції для кожного протеїну, і кожна конструкція вводиться, щонайменше, двом кроликам. Кількість антисироватки може наростати у серії ін'єкцій, яка переважно включає, щонайменше, три ревакцинуючих ін'єкцій. Первинну імунізацію проводять з повним ад'ювантом Фрейнда, а наступні імунізації - з неповним ад'ювантом Фрейнда. Титри антитіл відстежують за допомогою вестерн-блоту і імунопреципітаційних аналізів, використовуючи очищений білок. Специфічність антисироватки визначають з використанням панелі неспоріднених білків. Альтернативно або додатково, пептиди, зв'язані з відносно унікальними імуногенними ділянками поліпептиду за винаходом, можуть бути одержані і зчеплені з гемоціаніном лімфи равлика (KLH) через включений С-термінальний лізін. Антисироватку до кожного з цих пептидів афінно очищують на пептидах, кон'югованих з BSA, і перевіряють специфічність за допомогою ELISA і вестерн-блоту, з використанням пептидних кон'югатів, і за допомогою вестерн-блоту та імунопреципітації.

Альтернативно, моноклональні антитіла, які специфічно зв'язують будь-який з поліпептидів за винаходом, одержують відповідно до стандартного гібридомного способу (91, 90, 89, 78). Одержані моноклональні антитіла також перевіряють на специфічність розпізнавання за допомогою вестерн-блоту або імунопреципітації. Антитіла, які специфічно зв'язують поліпептид за винаходом, визнаються застосовними; такі антитіла можуть бути використані, наприклад, в імунологічному аналізі. Альтернативно, моноклональні антитіла одержують з використанням поліпептиду за винаходом, що описаний вище, і бібліотеки фагового дисплею (112).

У деяких варіантах здійснення, антитіла одержують з використанням фрагментів поліпептидів, що приблизно володіють імуногенними властивостями, виходячи з таких критеріїв, як висока частота заряджених залишків. Антитіла спеціально розробляють з розрахунком на мінімізацію побічної імунної відповіді реципієнта з використанням, наприклад, химерних антитіл, що містять антиген-зв'язувальний домен від одного виду і Fc-фрагмент від іншого виду, або з використанням антитіл, одержаних від гібридоми відповідного виду.

У деяких варіантах здійснення, антитіла проти будь-якого з поліпептидів, описаних тут, використовують для лікування або профілактики А/Е патогенної інфекції.

Тваринні моделі

Сполуки можуть бути швидко вивчені на різних тваринних моделях А/Е патогенної інфекції.

Цитробактерна мишача інфекційна модель є моделлю захворювання, що зустрічається у при-

родних умовах, а модель ЕНЕС-виділяючої інфекції дорослих корів - моделлю природного носійства, що не виявляється хворобою (худоба не захворює, хоча ЕНЕС не є частиною нормальної флори). Для цитробактерної моделі, вірулентність мутантів вивчають на мишах, як описано тут. Нокаут(КО)/мутантних мишей використовують для вивчення ролі кандидатних послідовностей в інфекції. Одержано декілька ліній КО мишей, включаючи визначення ролі iNOS (20), T- і B-клітин (106), Tlr-4 і встановлення ступеню сприйнятливості реципієнта (54), так само, як Nek.

Для коров'ячої моделі, ЕНЕС мутанти вивчають на однорічних тваринах (див., наприклад, публікацію PCT №WO 02/053181). Коротко, 10^8 CFU мутанта або WT 0157 вводять тварині через ротово-шлункову інтубацію. Протягом 14 днів після введення фекальні виділення відстежують на селективних лічильних пластинках, і колонії досліджуються за допомогою багатоканальної ПЛР, рівня виділень, гістологічного і мікроскопічного аналізів періанальної області, де концентрується ЕНЕС (97). Інша модель являє собою петлі кишечника корови, в які вводять ЕНЕС і декілька разів вивчають гістологічно і морфологічно, а також підраховують кількість адгезованих бактерій за допомогою лічильної пластинки. Природну кролячу інфекційну модель інфекції RDEC-1 проводять наступним чином: після культивування протягом ночі, бактеріальну культуру збирають центрифугуванням і розчиняють в одному мл фосфатного буфера. Новозеландським білим кроликам (вагою від 1,0 до 1,6 кг), після голодування протягом ночі, вводять у шлунок через орально-гастральний зонд 5 мл 2,5% стерильного натрію бікарбонату і 1 мл RDEC-1 або кандидатної послідовності мутантних штамів ($2 \cdot 5 \times 10^{10}$). Таку ж дозу бактерій вводять кожному кролику на наступний день. Кожного кролика щодня зважують і збирають бактерії, що виділяються з фекаліями за допомогою ректальних тампонів і з калових шматків. Ректальні тампони розкатують по половині поверхні чашок MacConkey, що містять налідиксову кислоту. П'ять калових шматків або таку ж кількість рідкої калової маси збирають від кожного кролика і розчиняють в 3 мл фосфатного буфера і 0,1 мл кожної калової суспензії наносять на чашки MacConkey, що містять налідиксову кислоту. Ріст колоній, стійких до налідиксової кислоти, підраховують наступним чином: 0, немає росту; 1, рідко розташовані колонії; 2, щільно розташовані колонії; 3, суцільний ріст колоній. Тканини виділяють зразу ж після усиплення внутрішньовенною ін'єкцією кетаміну і передозування фенобарбіталу натрію. Ступінь бактеріальної колонізації тканин кишечника вимірювали наступним чином: на сегмент кишечника (10 см), крім сліпої кишки, накладають подвійні лігатури на проксимальному і дистальному кінцях, перерізають між подвійними лігатурами, потім промивають 10 мл льодяного фосфатного буфера. Один грам в'язкого вмісту сліпої кишки додають до 9 мл фосфатного буфера. Одержану суспензію розводять і наносять на чашки MacConkey, що містять налідиксову кислоту. Зразки тканини виділяють за допомогою 9 мм затискача, тричі промивають фосфат-

ним буфером, додають до 2мл льодяного фосфатного буфера і гомогенізують у гомогенізаторі, потім послідовно розведені зразки наносять на чашки MacConkey. Число бактерій, адгезованих на квадратному сантиметрі кожної тканини підраховують наступним чином:

$CFU/cm^2 = \text{число бактерій/чашка} \times$

$\text{фактор розведення} \times 2 \text{ мл} / 0,452$

Лікування і діагностика

Поліпептиди і молекули нуклеїнових кислот, описані тут, можуть бути використані як ліки, наприклад, для одержання вакцин або лікарських сполук, або створення А/Е патогенів з ослабленою вірулентністю. Такі А/Е патогени можуть бути одержані, як описано тут, наприклад, шляхом створення праймерів на основі послідовностей нуклеїнових кислот, описаних тут, і з використанням способу алельного обміну на основі *sacB* (29). Поліпептиди і молекули нуклеїнових кислот можуть бути використані окремо або у комбінації один з одним або з іншими придатними молекулами, такими як *EspA*, *EspB*, *EspC*, *EspD*, *EspP*, *Tir*, шига-токсин I, шига-токсин 2 або молекули інтиміну.

У деяких варіантах здійснення, молекули нуклеїнових кислот, описані тут, можуть бути використані в антисмислових способах. Під «антисмисловою», як згадується тут відносно нуклеїнових кислот, мається на увазі послідовність нуклеїнових кислот, комплементарна до кодуєчого ланцюга молекул нуклеїнових кислот, наприклад, гена, такого як *pleA*, *pleB*, *pleC*, *pleD*, *pleE* або *pleF*, або комплементарна до нуклеотидної послідовності, значно подібної до послідовності будь-якої з SEQ ID NO: 1-21 або 60-72, або її фрагменту, або варіанту. У деяких варіантах здійснення, антисмислова молекула нуклеїнової кислоти здатна знизити рівень поліпептиду, що кодується комплементарним геном, коли вони обидва експресуються у клітині. У деяких варіантах здійснення, рівень поліпептиду знижується у мірі, що дорівнює будь-якому цілому числу від, щонайменше, 10% до, щонайменше, 25%, або у мірі, що дорівнює будь-якому цілому числу від, щонайменше, 25% до, щонайменше, 50%, або у мірі, що дорівнює будь-якому цілому числу від, щонайменше, 50% до, щонайменше, 75%, або у мірі, що дорівнює будь-якому цілому числу від, щонайменше, 75% до 100%, у порівнянні з рівнем поліпептиду у клітині, яка експресує тільки ген, а не комплементарну антисмислову молекулу нуклеїнової кислоти.

У деяких варіантах здійснення, експресію гена або цікавлячої кодуєчої або некодуєчої ділянки можна придушити або запобігти їй з використанням способу інтерференції РНК (РНКі), різновиду пост-транскрипційного генного сайленсингу. РНКі використовують для створення функціонального «нокауту», тобто системи, в якій експресія гена або цікавлячої кодуєчої або некодуєчої ділянки знижена, виявляючись у загальному зниженні кількості продукту, що кодується. Таким чином, РНКі застосовують для мічення такої, що представляє інтерес, нуклеїнової кислоти або її фрагмента або варіанту, щоб, у свою чергу, знизити її експресію і рівень активності продукту, який нею кодується. Така система застосовується для функціональних

досліджень продукту, а також для лікування А/Е патогенних інфекцій. РНКі описана, наприклад, в опублікованому патенті США 20020173478 (Gewirtz; опублікований 21 листопада 2002 року) і 20020132788 (Lewis et al., опублікований 7 листопада 2002 року) (79, 67). Реагенти і набори для роботи з РНКі комерційно доступні, наприклад, в Ambion Inc. (Austin, Texas, США) і New England Biolabs Inc. (Beverly, Масачусетс, США).

Припускається, що у деяких системах вихідним агентом для РНКі є молекула dsРНК, зв'язана з нуклеїновою кислотою-мішенню. Потім, припускається, що dsРНК розщеплюється на короткі інтерферуючі молекули РНК (siРНК) довжиною 21-23 нуклеотиди (дуплекси 19-21 н.п., кожний з двома «липкими» нуклеотидами на 3'-кінці). Фермент, що приблизно здійснює цю першу стадію розщеплення, був названий «Dicer» і класифікований як член РНКаз III сімейства dsРНК-специфічних рибонуклеаз. З іншого боку, на РНКі можливо впливати через введення безпосередньо у клітину, або утворення у клітині, при введенні у клітину відповідного попередника (наприклад, вектора і т.д.), таких siРНК або siРНК-подібних молекул. siРНК може потім зв'язуватися з іншими внутрішньоклітинними компонентами для формування РНК-індукованого комплексу сайленсингу (RISC). Утворений RISC потім зв'язується з транскриптом, що представляє інтерес, через спарювання основ між компонентом своєї siРНК і транскриптом-мішенню, за принципом гомологічності, приводячи до розщеплення транскрипту-мішені на відстані приблизно 12 нуклеотидів від 3'-кінця siРНК. Таким чином, mРНК-мішень розщеплюється, і рівень білкового продукту, що кодується нею, знижується.

Вплив на РНКі можливий через введення у клітину відповідних siРНК або siРНК-подібних молекул, синтезованих *in vitro*. Впливати на РНКі можна, наприклад, з використанням хімічно синтезованої РЕК (64), для чого відповідні молекули РНК хімічно синтезують, застосовуючи відомі способи. З іншого боку, використовують відповідні вектори експресії для транскрибування такої РНК як *in vitro*, так і *in vivo*. Транскрипцію *in vitro* смислових і антисмислових ланцюгів (кодованих послідовностями, представленими на тому ж векторі або на окремих векторах) проводять з використанням, наприклад, T7 РНК полімерази, у такому випадку вектор включає відповідну кодуєчу послідовність, функціонально зв'язану з T7 промотором. Транскрибована *in vitro* РНК може, у деяких варіантах здійснення, бути оброблена (наприклад, з використанням РНКазі III *E. coli*) *in vitro* до розмірів, прийнятних для РНКі. Смыслові і антисмыслові транскрипти об'єднують для утворення РНК дуплекса, який вводять у клітину-мішень, що представляє інтерес. Використовують й інші вектори, які експресують РНК малої шпильки (shРНК), які вводять в siРНК-подібні молекули. У науці відомі різні способи, що базуються на застосуванні векторів (65, 93, 95, 98, 99, 105, 109). Також відомі різні способи введення таких векторів у клітини, як *in vitro*, так і *in vivo* (наприклад, генна терапія).

Загалом, у здійсненні, експресія поліпептиду, що включає послідовність амінокислот, істотно подібну до послідовності будь-якої з SEQ ID NO: 22-43, може бути придушена шляхом введення у клітину або утворення у клітині siPHK або siPHK-подібної молекули, що відповідає молекулі нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид або її фрагменту, або гомологічній нуклеїновій кислоті. У різних варіантах здійснення, такий спосіб передбачає пряме введення siPHK або siPHK-подібної молекули у клітину або використання векторних способів, описаних вище. У здійсненні, siPHK або siPHK-подібна молекула мають довжину менше 30 нуклеотидів. У наступних варіантах здійснення, siPHK або siPHK-подібна молекула мають довжину близько 21-23 нуклеотидів. У здійсненні, siPHK або siPHK-подібна молекула включають в себе дуплекси 19-21 н.п., кожний з двох «липкими» нуклеотидами на 3'-кінці. У здійсненні, siPHK або siPHK-подібна молекула істотно подібні до нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид або його фрагмент, або варіант (або фрагмент варіанту). Такий варіант здатний кодувати білок, що має активність поліпептиду, кодованого SEQ ID NO: 22-43. У здійсненні, смисловий ланцюг siPHK або siPHK-подібної молекули істотно подібні до SEQ ID NO: 1-21 або її фрагменту (PHK, що мають U замість T залишку послідовності ДНК).

У деяких варіантах здійснення, підвищений рівень антитіл проти поліпептидів за винаходом використовують як лікування A/E патогенної інфекції.

У деяких варіантах здійснення, поліпептид або молекули нуклеїнової кислоти використовують для визначення присутності у зразку A/E патогену. Молекули нуклеїнової кислоти використовують для створення проб або праймерів, здатних, наприклад, гібридизуватися з ДНК A/E патогену у зразку, або використовують для ампліфікації ДНК A/E патогену у зразку, застосовуючи, наприклад, спосіб полімеразної ланцюгової реакції. Поліпептиди використовують, наприклад, для одержання антитіл, що специфічно зв'язуються з поліпептидом, який експресується A/E патогеном. Такі проби або праймери можуть бути визначально помічені. Під «визначно помічені» маються на увазі будь-які способи мічення та ідентифікації присутності молекули, наприклад, олігонуклеотидної проби або праймера, гена або його фрагмента, або молекули cДНК. Способи визначного мічення молекул добре відомі у науці і включають, без обмежень, радіоактивне мічення (наприклад, ізотопом, таким як ^{32}P або ^{35}S) і нерadioактивне мічення, таке як ферментативне мічення (наприклад, з використанням пероксидази хрому або алкалінофосфатази), хемілюмінесцентне мічення, флуоресцентне мічення (наприклад, з використанням, флуоресцеїну), біоломінесцентне мічення або визначення ліганду, зв'язаного з пробою, за допомогою антитіл. Також цей термін включає молекули, визначно помічені опосередкованим способом, наприклад, молекули, зв'язані з першим агентом (таким, як біотин), який, у свою чергу, зв'язаний з другим агентом, який може бути виявлений або проаналізований (таким, як стрептавідин, мічений флуоресцеїном). Мітки

також включають дигоксигенін, люциферази і екворин.

Фармацевтичні і ветеринарні сполуки, дозування і призначення Тут описані сполуки, що включають поліпептид і молекули нуклеїнової кислоти, а також сполуки, що ідентифікуються з використанням способів за винаходом. Відповідно до винаходу, сполуки можуть застосовуватися окремо або у комбінації з іншими сполуками (наприклад, молекулами нуклеїнової кислоти, малими молекулами, поліпептидами, пептидами або аналогами пептидів), у присутності ліпосом, ад'юванту або будь-якого фармацевтично прийнятного носія, у формі, придатній для призначення савцям, наприклад, людині, великій рогатій худобі, віцям і т.д. За необхідності, лікування сполукою відповідно до винаходу можна комбінувати з більш традиційними і звичними способами лікування A/E патогенної інфекції.

Загальноприйнята фармацевтична практика може бути застосована для розробки прийнятних приписів і складів для призначення сполук хворим, інфікованим A/E патогеном. Будь-який прийнятий шлях введення може бути використаний, наприклад, парентеральний, внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньом'язовий, інтракраніальний, внутрішньоочний, офтальмічний, внутрішньошлунковий, внутрішньокапсулярний, інтраспінальний, інтрацистернальний, інтраперитонеальний, інтраназальний, аерозольний або оральне введення. Приписи можуть бути у формі рідких розчинів або суспензій; таблеток або капсул; порошків, носових крапель або аерозолів.

Способи приготування приписів добре відомі у науці (57). Приписи для парентерального введення можуть містити, наприклад, інертний наповнювач, стерильну воду або сіль, поліалкіленгліколи, такі як поліетиленгліколь, олії рослинного походження або гідрогенізовані нафталіни. Біосумісний, біорозкладаний лактидний полімер, лактид/гліколідний співполімер або поліоксіетилен-поліоксипропіленові співполімери використовують для контролю вивільнення сполуки. Інші потенційно застосовні первинні системи доставки модулюючих сполук включають етилен-вінілацетатні співполімерні частинки, осмотичні помпи, імплантовані інфузійні системи і ліпосоми. Приписи для інгалації можуть містити інертний наповнювач, наприклад, лактозу, або можуть бути з вмістом водних розчинів, наприклад, поліоксіетилен-9-лаурилу ефіру, глікохолату і дезоксихолату, або можуть бути масляними розчинами для призначення у формі носових крапель або гелю. Для лікувальних або профілактичних цілей сполуки призначаються індивідууму у кількостях, достатніх для припинення або уповільнення A/E патогенної інфекції.

«Ефективна кількість» сполуки, відповідно до винаходу, включає терапевтично ефективну кількість або профілактично ефективну кількість. «Терапевтично ефективною кількістю» є кількість, ефективна, у дозах і необхідному періоді часу, для досягнення необхідного терапевтичного результату, такого як зменшення колонізації A/E патогеном або виділення A/E патогену. Терапевтично ефективна кількість сполуки може відрізнятися в зале-

жності від ряду факторів, таких як стадія захворювання, вік, стать, вага суб'єкта і здатності сполуки викликати необхідну відповідь у суб'єкта. Режими дозування встановлюють так, щоб викликати оптимальну лікувальну відповідь. Терапевтично ефективна кількість також така, що будь-який токсичний або побічний ефект сполуки перевищується позитивними терапевтичними ефектами. «Профілактично ефективною кількістю» є кількість, ефективна, у дозах і необхідному періоді часу, для досягнення необхідного профілактичного результату, такого як запобігання колонізації A/E патогеном. Як правило, профілактична доза застосовується у суб'єктів перед початком або на ранніх стадіях захворювання, так що профілактично ефективна кількість може бути меншою, ніж терапевтично ефективна кількість. Переважний рівень для терапевтично і профілактично ефективної кількості сполуки може дорівнювати будь-якому цілому числу від 0,1нМ до 0,1М, від 0,1нМ до 0,05М, від 0,05нМ до 15мкМ або від 0,01нМ до 10мкМ.

Потрібно зазначити, що величина дозування може змінюватися при поліпшенні стану хворого. Для кожного конкретного суб'єкта встановлюють спеціальні режими дозування на час, відповідно до його індивідуальної потреби і професійного досвіду фахівця, який призначає сполуку або контролює призначення сполуки. Величини дозування, наведені тут, є зразковими і не обмежують дозування, які можуть бути вибрані практикуючими лікарями. Кількість активної сполуки у препараті може відрізнятися відповідно до ряду факторів, таких як стадія захворювання, вік, стать, вага індивідуума. Режими дозування встановлюють так, щоб викликати оптимальну лікувальну відповідь. Наприклад, може бути призначено єдине введення, може бути призначено декілька доз, що вводяться окремо протягом визначеного проміжку часу або доза може бути пропорційно зменшена або збільшена, виходячи з особливостей терапевтичної ситуації. Бажаним є таке складання одиниці дозування вихідного препарату, яке полегшило б його призначення та уніфікувало прийом.

У випадку припису вакцини, може бути розроблена ефективна кількість сполуки за винаходом, окремо або у комбінації з іншими сполуками, і з одним або більше імунологічними ад'ювантом, для виклику імунної відповіді. Ад'юванти, відповідно до винаходу, можуть включати в себе емульгатори, мураміл дипептиди, авридин, водні ад'юванти, такі як гідроксид алюмінію, ад'юванти, що базуються на хітозані, сапоніни, масла, Амфіген®, LPS, екстракти клітинної стінки бактерій, бактеріальну ДНК, бактеріальні комплекси, синтетичні олігонуклеотиди і комбінації цього (100). Ад'ювант може включати екстракт клітинної стінки *Mycobacterium phlei* (M. phlei) (MCWE) (патент США №4744984), ДНК M. Phlei (M-DNA), або комплекс мікобактеріальної клітинної стінки (MCC). Емульгатори включують в себе натуральні або синтетичні емульгуючі агенти. Синтетичні емульгуючі агенти включують в себе аніонні агенти (наприклад, калій, натрій і амонійні солі лауринової і олеїнової кислот, кальцієві, магнієві і алюмінієві солі жирних кислот, наприклад, металовмісні мила, і органічних сульфонати, такі

як натрію лаурил сульфат), катіонні агенти (наприклад, цетилтриметиламонію бромід), неіонні агенти (наприклад, гліцеринові складні ефіри, такі як гліцерину моностеарат, поліоксіетиленгліколю складні ефіри і прості ефіри, і ефіри сорбітанових жирних кислот, такі як сорбітанмонопальмітат і його поліоксіетиленові похідні, наприклад, поліоксіетилену сорбітанмонопальмітат). Натуральні емульгуючі агенти включають в себе акацію, желатин, лецитин і холестерин. Інші прийнятні ад'юванти включають в себе масло, таке як окремо взяте масло, суміш масел, емульсію масло-у-воді (наприклад, EMULSIGEN™, EMULSIGEN PLUS™, або VSA3), або емульсію не-масло-у-воді (наприклад, масляну емульсію, емульсію вода-у-маслі або емульсію вода-у-маслі-у-воді). Масло може бути мінеральним маслом, рослинною олією або тваринним маслом. Прийнятні тваринні масла включають в себе, наприклад, масло печінки тріски, масло палтуса, масло американського оселедця, масло великоголова або масло печінки акули, всі вони комерційно доступні. Прийнятні рослинні олії включають в себе, без обмежень, олію канолі, мигдальну олію, бавовняну олію, кукурудзяну олію, оливкову олію, арахісову олію, сафлорову олію, олію кунжуту або соєву олію. З іншого боку, різні аліфатичні азотисті основи можуть бути використані як ад'юванти у приписі вакцини. Наприклад, відомі імунологічні ад'юванти включають в себе аміни, четвертинні сполуки амонію, гуанідини, бензамідини і сполуки тіоуронію (75). Специфічні ад'ювантні сполуки включають в себе диметилдіоктадециламонію бромід (DDA) (патент США №5951988) (88, 59, 85, 68, 84, 82, 83) і N,N-діоктадецил-N,N-біс(2-гідроксіетил)пропандіамін («авридин») (патент США №4310550, патент США №5151267) (62). Ад'ювант, відповідно до винаходу, може, наприклад, включати в себе мінеральне масло і диметилдіоктадециламонію бромід.

Вакцинні препарати можуть бути одержані з використанням стандартних способів, що включають в себе, але не обмежуються цим, змішування, обробку ультразвуком і мікрофлюїдизацію. Ад'ювант може складати приблизно від 10 до 50% (об./об.) від вакцини, або приблизно від 20 до 40% (об./об.), або приблизно від 20 до 30% або 35% (об./об.), або будь-яке значення у цих межах. Сполука також може бути зв'язана з несучою молекулою, такою як бичачий сироватковий альбумін або гемоціанін лімфи равлика, для підвищення імуногенності.

Загалом, сполуки за винаходом повинні застосовуватися, не викликаючи істотного токсичного ефекту. Токсичність сполуки за винаходом визначають з використанням стандартних способів, наприклад, шляхом тестування на клітинних культурах або експериментальних тваринах і визначення терапевтичного індексу, тобто співвідношення між LD50 (летальна доза для 50% популяції) і LD100 (летальна доза для 100% популяції). У деяких обставинах, однак, таких як деякі умови захворювання, може бути необхідне призначення істотно більш високих доз сполук.

Наступні приклади призначені для ілюстрації здійснень за винаходом і не повинні тлумачитися як обмеження сфери застосування за винаходом.

Приклад 1

Створення мутантів

Використовують наступні бактеріальні штами: EHEC O157:H7 штам 86//24 (32), EHEC EDL933

(ізолят дикого типу E. coli O127:H7; 3); EHEC escN- (47), дикий тип EPEC E2348/69 (ізолят дикого типу E. coli O127:H6; 50), C. rodentium DBS100 (ATCC 51459; 53), REPEC 0103:K-H2 85/150 (52), E. coli HB101. Використовують наступні плазмідні:

Плазміда	Опис і відповідний фенотип	Посилання
pRE118	Вектор-«самогубець», що базується на sacB, для алельного обміну, Kan ^r	4
pKD46	Плазмідна експресія λ red рекомбінази, AMP ^r	5
PACYC184	Вектор клонування, CM ^r Tet ^r	NEB
pCR2.1-TOPO	Вектор ПЛР-клонування, Amp ^r Kan ^r	Invitrogen
PTOPO-2HA	такий, що базується на pCR2.1-TOPO, Пласт-стимульований полігенний експресуючий кластер для C-термінального 2HA мічення, Amp ^r Kan ^r	
pCRespG-2HA/BgIII	такий, що базується на pACYC184, Citrobacter espG промотер-стимульований полігенний експресуючий кластер для C-термінального 2HA мічення, Cm ^r	
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-похідне, що містить позбавлений промотору ген cat	Pharmacia
pLEE1-CAT	pKK232-8-похідне, що несе C. rodentium LEE1 (Ler)-cat транскрипцій-не злиття від нуклеотидів -162 до +216	
pLEE5-CAT	pKK232-8-похідне, що несе C. rodentium LEE5 (Tir)-cat транскрипцій-не злиття від нуклеотидів -262 до +201.	

Для ПЛР і зворотної ПЛР звичайно використовували ампліфікаційну систему перевірного зчитування ELONGASE (GIBCO BRL/Life Technologies) для зниження рівня помилок ПЛР. Продукти ПЛР клонували з використанням TOPO TA Cloning Kit від Invitrogen, або з pCR2.1-TOPO, або з pCR11-TOPO. Послідовність ДНК визначали з використанням Taq Dye-термінаторного способу і автоматичного 373A ДНК секвенатора (Applied Biosystems). Для рутинного клонування, трансформації та інфекції бактерії вирощували в агарі Luria-Bertani (LB) або у бульйоні LB з доданням відповідних антибіотиків, при 37°C. Застосовували різні антибіотики у наступних концентраціях: ампіцилін 100мкг/мл, карбеніцилін 100мкг/мл, канаміцин 50мкг/мл і хлорамфенікол 30мкг/мл. Ріст на середовищі Eagle у модифікації Dullbecco (DMEM)

використовували для викликання експресії гена LEE і секреції білка типу III.

Алельний обмін, що базується на sacB, (14) і систему лямбда Red рекомбінази (17) використовували для створення мутантів. Загалом, 75% або більше внутрішнього вмісту кожного гена видаляли для впевненості у тому, що функція гена порушена. Ген ler був мutowаний за допомогою лямбда red рекомбіназного способу, гени ler, orf11/grlA і cesT були мutowані способом алельного обміну, що базується на sacB. Подвійний мутант ler/orf11 також був створений з використанням способу, що базується на sacB. Створення мутантів tir і escD було описане раніше (20, 56). Мутанти були мutowані з делецією всередині рамки зчитування, з введенням ферментного сайту рестрикції (або Nhe I, або Bam HI, або Sal I) у місце делеції, як описано нижче:

Ім'я LEE мутанта	Довжина білка (aa)	Видалені кодони (від # до #)	Елементи, введені у місце делеції	Застосовані способи делеції
Δler	129	23-97 або 9-122	Nhe I або aphT кластер	SacB або лямбда Red
Δorf11/grlA	135	23-115	Nhe I	SacB
ΔcesT	156	25-147	Nhe I	SacB

Ці мутанти були верифіковані за допомогою реакцій ПЛР. Комплементарність тестували для Δtir, Δler, і Δorf11 мутантів шляхом введення відповідного гена у плазміді. Всі ці гени можуть бути комплементарні, підтверджуючи, що мутації, створені обома способами алельного обміну не здійснюють негативного впливу на функцію розташованих нижче генів і є, таким чином, неполярними.

Для створення EHEC-pNleA-HA, кодуючу ділянку nleA ампліфікували з використанням ампліфікаційної системи перевірного зчитування ELONGASE (Invitrogen) і наступних праймерів: Z6024F:

5'AGATCTGAAGGAGATATTATGAACATTCAACCG ACCATAC (SEQ ID NO: 44); Z6024R: 5'CTCGAGGACTCTTGTTCCTTCGATTATATCAAAG (SEQ ID NO: 45). Продукти ПЛР клонували з вико-

ристанням TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) і послідовність ДНК верифікували з використанням Taq Due-термінаторного способу і автоматичного 373A ДНК секвенатора (Applied Biosystems). Потім продукт субклонували в pCRespG-2HA/BglIII, pACYC-похідну плазмиду, сконструйовану для керування експресією білка від *C. rodentium* EspG промотору і для додання двох молекул гемаглютиніну (HA) до С-кінця білка, що експресується. Конструкції плазмиди були потім введені у дикий тип EHEC і EHEC escN- за допомогою електропорації.

Мутант з делецією в *pleA* штаму EHEC, стійкого до налідиксової кислоти, створили альельним обміном, що базується на *sacB* (29). Два фрагменти ДНК, які фланкують *pleA*, ампліфікували способом ПЛР з використанням хромосомної ДНК EHEC як матриці.

Фрагмент А ампліфікували способом ПЛР з використанням праймера NT10 5'CCGGTACCTCTAACCATTGACGCACTCG (SEQ ID NO: 46) і праймера NT11 5'AACCTGCAGAACTAGGTATCTCTAATGCC (SEQ ID NO: 47) для створення продукту з 1,3т.н.п.

Фрагмент В ампліфікували з використанням праймера NT12 5'AACCTGCAGCTGACTATCCTCGTATATGG (SEQ ID NO: 48) і праймера NT13 5'CCGAGCTCAGGTAATGAGACTGTGACG (SEQ ID NO: 49) для створення продукту з 1,3т.н.п.

Фрагменти А і В потім інкубували протягом 1 години з PstI і потім фермент інактивували нагріванням до 65°C протягом 20 хвилин. Приблизно 50нг кожного обробленого фрагменту зв'язували T4 ДНК лігазою протягом 1 години при кімнатній температурі. Реакцію зв'язування розводили 1/10 і 1мкл додавали у ПЛР з використанням праймерів NT10 і NT13. Одержаний у результаті ПЛР продукт з 2,3т.н.п., потім інкубували з Sad і KpnI, зв'язували з відповідними ділянками pRE112 (14) і трансформували в DH5α.pir для створення pNT225. pNT225 трансформували у кон'югативний штам SM10λ.pir, який служив як донорський штам у кон'югації з диким типом EHEC. Стійкі до налідиксової кислоти і хлорамфеніколу екзокон'югати відбирали на LB agarі. Потім екзокон'югати вміщували на LB agar, що містить 5% (об./об.) сахарози, без NaCl. Одержані у результаті колонії потім досліджували на чутливість до хлорамфеніколу, після чого ідентифікували за допомогою ПЛР ізоляти з делецією *pleA* і втраченими послідовностями плазмиди. Мутантів з делецією *pleA* потім ізолювали і використовували у подальшій роботі. Мутант *C. rodentium* створили з використанням ПЛР і застосовували для створення, в pRE118 (14), вектора «самогубця», що несе внутрішню делецію *pleA*.

Використовували наступні праймери: de11F: 5'GGTACCACCACACAGAATAATC (SEQ ID NO: 50); de11R: 5'CGCTAGCCTATATACTGCTGTTGGTT (SEQ ID NO: 51); de12F: 5'GCTAGCTGACAGGCAACTCTTGGACTGG (SEQ ID NO: 52); de12R: 5'GAGCTCAACATAATTTGATGGATTATGAT (SEQ ID NO: 53). Одержану у результаті плазмиду вводили в *C. rodentium* за допомогою електропорації

для створення антибіотикостійкого міродиплоїдного штаму. Відсутність плазмідних послідовностей після другого епізоду рекомбінації відбирали, як описано вище. Антибіотикочутливі, сахарозостійкі колонії верифікували на наявність відповідної рекомбінації за допомогою ПЛР, застосовуючи праймери, що фланкують ділянки делеції. Відсутність *NleA* підтверджували за допомогою вестерн-блоту повних клітинних лізатів з поліклональною анти-*NleA*-антисироваткою.

Вивчення загальних і секретованих білків/протеоміку

Секретовані білки одержували, як описано раніше (51).

Штами *C. rodentium* вирощували протягом ночі при постійному струшуванні в 4мл бульйону Luria (LB) при 37°C. Культури пересівали 1 до 50 в 4мл середовища Ігла у модифікації Дульбеко (DMEM), яку заздалегідь інкубували протягом ночі в інкубаторі культури тканини (при 5% CO₂), і вирощували без струшування протягом 6 годин у тому ж інкубаторі для викликання експресії гена LEE. Культури центрифугували двічі при 13000об./хв. протягом 10хв. для видалення бактерій і супернатант преципітували 10% трихлороцтовою кислотою (TCA) для концентрування білків, секретованих у культуральне середовище. Бактеріальний осад розчиняли в 2X SDS-PAGE буфері і приймали за загальний бактеріальний білок. Секретовані білки, преципітовані з супернатанту, також розчиняли в 2X SDS-PAGE буфері, а TCA, що залишилася, нейтралізували 1 мкл трисеного Tris. Об'єми буфера, використані для ресуспендування бактеріального осаду і секретованих білків, нормалізували до OD600 культур для забезпечення рівного вмісту у зразках. Секретовані білки аналізували в 12% або 17% SDS-PAGE і забарвлювали 0,1% Coomassie Blue G250. Для вестерн-блот аналізу загальні і секретовані білки розділяли в SDS-PAGE і переносили на нітроцелюлозну мембрану (Bio-Rad). Використовували щурячі поліклональні антитіла проти His-міченого Tіг цитробактеру і мишачі моноклональні антитіла проти EPEC EspB. Потім застосовували стандартні протоколи вестерн-блоту ECL (Amersham Life Science).

Дикі типи EHEC і EHEC CVD451 вирощували протягом ночі на середовищі LB. Потім культури розбавляли 1:100 у мінімальному середовищі M-9 з доданням 44мМ NaHCO₃, 8мМ MgSO₄, 0,4% глюкози і 0,1% казамінових кислот і вирощували без струшування при 37°C в 5% CO₂ до OD600 від 0,6 до 0,8.

Секретовані білки збирали центрифугуванням культури при 8000g протягом 30 хвилин, відділяючи супернатанти від осадів. Супернатанти фільтрували через фільтри з розміром пор 0,45 мікрон і визначали концентрацію білка за допомогою аналізу BCA (Sigma). Білки готували для електрофорезу шляхом преципітації з 1/9 об'ємом 100% льодяної TCA, на льоді, протягом від 45 до 120хв., після чого центрифугували при 17600g, протягом 30хв. Осади промивали у холодному 100% ацетоні і розчиняли в 1X Laemmli буфері (для 1-вимірних SDS-PAGE гелів) або у буфері для приготування зразка для 2D гелів (8М сечовини, 2М тіосечовини, 4%

CEAPS, 20мМ Tris, 0,002% бромоефену синього). Для 2D гелів заздалегідь додавали DDT до 6мг/мл і ІРГ буфер (pH3-10: Amersham Biosciences) до 0,5%. 18см Immobiline Dry Strips (pH3-10: Amersham) регідратували у зразку протягом ночі при 20°C. Потім зразки концентрували при 15°C до 65000 Vh. Після концентрування стрипи зрівнювали в EB+10мг/мл DTT протягом 15 хвилин і потім в EB+25мг/мл йодоацетаміду протягом 15 хвилин (EB - це 50мМ Tris, 6М сечовини, 30% гліцерину, 2% SDS, pH8,8). Зрівноважені стрипи наносили на верхню частину SDS-PAGE гелів великого формату (12% або 14% акриламід) з використанням 0,5% розчину агарози в SDS-PAGE буфері+0,002% бромоефену синього, і гелі піддавали електрофорезу, доки барвник не вийде за межі гелю.

Гелі забарвлювали Sypro Ruby, згідно з інструкціями виробників (BioRad), і візуалізували на світлостолі UV або за допомогою MS/MS на мас-спектрометрі LCQ Deca з іонною пасткою (Thermo Finnigan), оснащеному системою рідинної хроматографії з нанопотоком (LC Packings-Dionex). З гелів, візуалізованих на світлостолі UV, цікавлячі плями виділяли вручну. Внутрішньогелеве розщеплення білків проводили на Investigator ProGest Robot (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI), як описано (23). Зразки з високим вмістом білка аналізували за допомогою LC-MS системи, що складається з системи рідинної хроматографії з нанопотоком, оснащеної FAMOS Autosampler (LC Packings-Dionex, San Francisco, CA), і мас-спектрометра LCQ Deca з іонною пасткою (Thermo Finnigan, San Jose, CA) (24).

Колонки зі зворотною фазою PicoFrit Columns PFCT7515-PP18-5 (New Objective, Woburn, MA, USA) використовували для розділення пептидів і ефлюент з колонки розпилювали безпосередньо в мас-спектрометрі. Використовували швидкість потоку 200нл/хв., і загальний час детекції одного зразка дорівнював 45хв.

Зразки з низьким вмістом білка аналізували на мас-спектрометрі API QSTAR Pulsar Hybrid MS/MS (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, Canada) (12), оснащеному Nanospray Ion Source (Proxeon, Odense, Denmark). Перед аналізом зразки очищали і концентрували на ZipTips (Millipore, Billerica, MA). API QSTAR Pulsar також використовували для сиквенсу пептидів de novo.

Спектри досліджували за базою даних NCBI (Bethesda, MD) за допомогою пошукових систем Mascot (Matrixscience) або Sonar (Proteometrics Canada Ltd.).

Конструкція транскрипційних злиттів cat і аналіз CAT

ПЛР фрагменти, що несуть промотори і всі розташовані вище регуляторні елементи *leg* (LEE1) і *tir* (LEE5) цитробактеру розщеплювали за допомогою *Bat* HI Hind III і клонували у плазмиду pKK232-8, що містить позбавлений промоторів ген *cat*. Тут показані позиції, що займаються клонованими фрагментами. Активність CAT, що визначається цим злиттям у різних штаммах цитробактеру, визначали, як описано вище (21, 22). Зразки відбирали у

різні проміжки часу з бактеріальних культур, що росли на DMEM, як описано вище.

Аналіз послідовностей і способи біоінформатики

Аналіз послідовностей ДНК і білків і пошук гомології за допомогою BLASTN, TBLASTN і BLASTP проводили з використанням програм, доступних на вебсайті NCBI (<http://www.ncbi.nih.org/>). Використовували бази даних з сайтів NCBI, Sanger Genome Centre (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes>) і SwissProt (<http://www.expasy.org/sprot/>). Позиції LEE PAI, так само як і профагів, у геномі EHEC були одержані з даних, створених програмою IslandPath

<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandpath/>) (13).

Саузерн-блот аналіз

Зразки геномної ДНК для саузерн-блот аналізу готували з використанням набору DNeasy Tissue (Qiagen). Проби готували шляхом розщеплення pNleA-HA ферментами Sall і BglII для одержання фрагментів з 500н.п., які мітили з використанням набору BrightStar Psoralen-Biotin Nonisotopic Labeling (Ambion).

П'ять мікрограмів кожного зразка геномної ДНК повністю розщеплювали в 25 одиницях BamHI, EcoRI і PstI протягом ночі. Зразки розводили в 1% агарозному гелі за допомогою електрофорезу і переміщували на найлонову мембрану BrightStar-Plus (Ambion) шляхом пасивної, слабколузної низхідної елюції. ДНК перехресно зв'язували з мембраною опроміненням мембрани УФ світлом протягом 2хв., після чого висушували 30хв. при 80°C.

Мембрану передгібридизували промиванням в 10мл ультратутливого гібридизаційного буфера ULTRAhyb (Ambion) при 42°C протягом 30хв. Десять мікролітрів одержаної проби потім додавали до передгібридизованої мембрани у буфері і пробу гібридизували до мембрани при 42°C протягом ночі. Мембрану промивали 2 рази по 5хв. у м'якому буфері зниженої жорсткості (Ambion) і 2 рази по 15хв. у м'якому буфері підвищеної жорсткості (Ambion) при кімнатній температурі. Гібридизовану пробу вивчали за допомогою набору BrightStar BioDetect Nonisotopic Detection (Ambion), після чого фотографували на плівку Kodak.

Створення анти-NleA анטיісероватки

Кодуючу ділянку *nleA* ампліфікували з геномної ДНК EHEC і клонували в *his*-мічений вектор експресії (pET28a, Novagen), використовуючи наступні праймери: 5'TTCCATATGAACATTCAACCGACC (SEQ ID NO: 54) і 5'GGAATTCAATAATAGCTGCCATCC (SEQ ID NO: 55). Цю плазмиду вводили в BL21 (λ DE3), вирощували до оптичної щільності 600 (A600) від 0,8 та індукували за допомогою 0,5мМ IPTG при 20°C протягом 16 годин. Білок, мічений His, очищали на колонці Ni-NTA, згідно з інструкціями виробника (Qiagen). Фракції, що містять NleA, об'єднували і додавали тромбін (500:1), білок діалізували протягом ночі проти 20мМ tris pH8,2, 50мМ NaCl. На наступний день білок вміщували на колонку моноQ FPLC з використанням лінійного градієнта від 50 до 500мМ NaCl. Фракції, що містять NleA, об'єднували. Після цієї стадії чистота білка була >90%. Очищений білок використовували для імуні-

зації двох щурів Sprague Dawley чоловічої статі, 300мкг/щур, із застосуванням повного ад'юванту Фрейнда (Sigma), і одержану антисироватку афінно очищали з використанням активованого гелю з імуноафінною підтримкою Affi-Gel 15, згідно з інструкціями виробника (BioRad). Для імунофлуоресцентних експериментів антисироватку потім очищали абсорбцією проти ацетонвмісних порошків, одержаних з клітин HeLa і з ЕНЕС NleA, як описано в (45). Специфічність антисироватки підтверджували аналізом вестерн-блоту клітинних екстрактів з дикого типу ЕНЕС і ЕНЕС NleA.

Імуноблот-аналіз

Зразки для аналізу шляхом вестерн-блоту розділяли шляхом SDS-PAGE (від 9% до 12% поліакриламід). Білки переносили на нітроцелюлозу і блокували імуноблот в 5% розчині знежиреного сухого молока (NFDМ) у ТБS, рН7,2, що містить 0,1% Tween 20 (ТБSТ), протягом ночі при 4°C, і потім інкубували з первинними антитілами в 1% NFDМ ТБSТ протягом 1 год. при кімнатній температурі (RT). Мембрани промивали 6 разів в ТБSТ і потім інкубували з 1:5000 розчином кон'югованих з пероксидазою хрому козячих анти-мишачих (H+L) антитіл (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) протягом 1 год. при RT. Потім мембрани промивали, як описано вище. Комплекси антиген-антитіло візуалізували поліпшеним набором хемілюмінесцентного визначення (Amersham), після чого фотографували на плівку Kodak (Perkin Elmer). Використовували наступні первинні антитіла: анти-НА.11 (Covance), DnaK (Stressgen), анти-ЕНЕС Tіr, анти-NleA (дане дослідження), анти-кальнексин (Stressgen), анти-кальретикулін (Affinity Bioreagents), анти-тубулін (Sigma).

Імунофлуоресценція

Клітини HeLa вирощували на скляному покритті у 24-ямкових плашках для клітинних культур та інфікували протягом 6 годин 1 мкл (ЕНЕС) витриманої протягом ночі культури з OD ~0,4. Через 6 годин після інфікування клітини промивали 3 рази у PBS, що містить Ca²⁺ і Mg²⁺, і фіксували в 2,5% параформальдегіді у PBS протягом 15хв. при кімнатній температурі. Клітини робили проникними в 0,1% сапоніні у PBS, блокували в 5% козячий сироватці або 5% BSA у PBS+0,1% сапоніну та інкубували з наступними первинними антитілами, розведеними у блокуючому розчині протягом 1 години при кімнатній температурі: анти-ЕНЕС Tіr, 1:1000; анти-E.coii 0157 (Difco), 1:200; афінно очищені щурячі поліклональні анти-NleA (дане дослідження), 1:100; анти-манозидаза II (люб'язно надана Dr. Marilyn Farquhar, UCSD), 1:1000. Після 3 промивань у PBS/сапоніні, клітини інкубували у вторинних антитілах (Alexa-488 або -568-кон'юговані анти-мишачі, кролика, щура (Molecular Probes) 1:400), протягом 30хв. при кімнатній температурі, промивали 3 рази у PBS/сапоніні і один раз у PBS, і вміщували на скляні пластинки з використанням towіol+DABCO. Для візуалізації полімеризованого актину, до вторинних антитіл додавали Alexa-488-кон'югований фалоїдин (Molecular Probes) у співвідношенні 1:100. При виявленні клітини інкубували з 5мкг/мл брефелдином А (Boehringer Mannheim) протягом 30 хвилин перед

фіксацією. Зображення одержували з використанням мікроскопа Zeiss Axioskop, оснащеного цифровою камерою Empix DVC1300, і аналізували з використанням програмного забезпечення візуалізації Northern Eclipse, або мікроскопа BioRad Radiance Plus confocal, з використанням програмного забезпечення Lasersharp.

Фракціонування інфікованих реципієнтних клітин

Для кожного зразка дві однакові 100мм чашки з культурою клітин HeLa інфікували диким типом ЕНЕС-pNleA-НА або ЕНЕСescN-pNleA-НА, з використанням вихідної MOI 1:10. Через 6 годин після інфікування клітини відмивали три рази льодяним PBS і піддавали біохімічному фракціонуванню, як описано раніше (30, 49). Коротко, клітини ресуспендували в 300мкл гомогенізаційного буфера (3мМ імідазолу, 250мМ сахарози, 0,5мМ EDTA, рН7,4) з додаванням коктейлю інгібіторів протеаз COMPLETE (Roche), і механічно руйнували пропусканням через голку 22 розміру. Гомогенат центрифугували на низькій швидкості (3000g) протягом 15 хвилин при 4°C для осадження нерозрізнених клітин, бактерій, ядер і компонентів клітинного скелета (низькошвидкісний осад). Супернатант піддавали високошвидкісному ультрацентрифугуванню (41000g) протягом 20 хвилин при 4°C у роторі TLS55 центрифуги TL100 (Beckman) для відділення мембран реципієнтних клітин (осад) від цитоплазми (супернатант). Осади ресуспендували в 300мкл 1X Laemmli буфері, а супернатант додавали до 1X Laemmli буфера з використанням 5X маточного розчину. Рівні об'єми всіх фракцій розділяли шляхом SDS-PAGE (9% поліакриламід), переносили на нітроцелюлозу і аналізували способом вестерн-блоту.

Для екстракційних досліджень мембран, зв'язаних з NleA, дві 100мм чашки з культурою інфікованих клітин HeLa фракціонували, як описано вище для кожної умови екстракції. Високошвидкісні осади (фракція мембран реципієнта) ресуспендували в 300мкл одного з наступних екстракційних буферів: (i) 10мМ Tris, 5мМ MgCl₂, рН7 М NaHCO₃, 5мМ MgCl₂, рН11,4; (iv) 10мМ Tris, 5мМ MgCl₂, 1% Triton X-100, рН7,4. Екстракцію проводили на льоду шляхом піпетування зразків вгору і вниз кожні 5 хвилин протягом 30 хвилин, і зразки рецентрифугували при 100000g протягом 30 хвилин. Осад (нерозчинна фракція) ресуспендували в 300мкл Laemmli буфера, а супенатант (розчинна фракція) преципітували в 10% трихлороцтовій кислоті на льоді протягом 30 хвилин, відмивали в 100% ацетоні і ресуспендували в 300 мкл Laemmli буфера. Рівні об'єми розділяли шляхом SDS-PAGE (9% поліакриламід), переносили на нітроцелюлозу і аналізували способом вестерн-блоту.

Аналіз інфікування мишей C rodentium

П'ятитижневих мишей C3H/HeJ (Jackson Laboratory) і аутбредних швейцарських мишей NIH (Harlan Sprague-Dawley) вирощували у віварії Університету Британської Колумбії строго дотримуючись правил, встановлених Комітетом захисту тварин Університету Британської Колумбії і Канадською радою з використання лабораторних тварин. Дикий тип C rodentium і мутанти з делеції

єю *pleA* вирощували на LB бульйоні протягом ночі при постійному струшуванні при 200 об./хв., і 100 мкл культур використовували для інфікування мишей через травний тракт. Інфекційний агент титрували послідовними розведеннями і посівами і розраховували до кількості 4×10^8 КОЕ/миша для обох груп. Для інфікування високочутливих C3H/HeJ мишей *C. rodentium*, виживання інфікованих мишей визначали щодня протягом курсу інфікування. Для оцінки гіперплазії товстої кишки, перші 4 см дистальної товстої кишки, починаючи з анального отвору, відбирали і зважували після видалення всієї фекальної маси. Для оцінки бактеріальної колонізації, тканини товстої кишки і фекальні маси гомогенізували у PBS, з використанням Polytron Tissue Homogenizer, і послідовно розводили перед посадкою на агар MacConkey (Difco Laboratories). Тканину товстої кишки і фекальні маси об'єднували для визначення загального бактеріального обсіменіння товстої кишки миші до моменту услипання. Агар MacConkey є селективним для грамнегативних бактерій, на якому *C. rodentium* утворює колонії з високим ступенем відмінності і характерними рисами морфології, не типовими для *E. coli* (26). Для гістологічного аналізу останні 0,5 см товстої кишки інфікованої миші фіксували в 10% нейтральному буферному формаліні, витримували, розрізали на фрагменти по 3 мм і забарвлювали гематоксиліном і еозином. Гістологічний аналіз проводили у Лабораторії морфологічних робіт відділення патології і медичної лабораторії університету Британської Колумбії.

Приклад 2

Аналіз регуляції експресії гена LEE

Щоб з'ясувати, які гени в LEE регулюють експресію гена LEE у *C. rodentium*, аналізували LEE мутантів на експресію *EspB* і *Tir*, які кодуються оперонами LEE4 і LEE5 (*Tir*), відповідно. Загальні клітинні лізати бактерій, вирощених на DMEM, аналізували способом вестерн-блоту з анти-*Tir* і анти-*EspB* сироватками. Ці результати підтвердили важливу роль *Ler* в експресії LEE, оскільки *Tir* і *EspB* не вироблялися в Δler . Як і очікувалося, Δtir і $\Delta espB$ не виробляли *Tir* і *EspB*, відповідно. *Tir* не візуалізували в $\Delta cesT$, відповідно до ролі *CesT*, як шаперону для стабільності і секреції *Tir* (18, 19). На здивування, інший білок, що кодується LEE, *orf11*, також був необхідний для експресії *Tir* і *EspB*. Експресія *Tir* і *EspB* в $\Delta orf11$ відповідала плазміді, що несе тільки *Citrobacter orf11* (Фіг.8). Ген *orf11* широко представлений в А/Е патогенах, і як EHEC, так і EPEC *orf11* комплементарні *Citrobacter* $\Delta orf11$ (Фіг.8), показуючи, що *Orf11* функціонально еквівалентний у позитивній регуляції експресії гена LEE в А/Е патогенах.

Аналіз послідовностей показує, що *Orf11/GrlA* демонструє 23% ідентичності *CaIF*, транскрипційному активатору оперонів *cai* і *fix* *Enterobacteriaceae* (15) і 37% ідентичності одержаній амінокислотній послідовності неохарактеризованого продукту *Salmonella*, що кодується геном, який знаходиться нижче краю оперону *std* (16) (Фіг.7). На фігурі цей гомолог *Salmonella* показаний як SGH (*Salmonella* *GrlA* гомолог). Всі три білки

містять передбачену *helix-turn-helix* мотивну характеристику ДНК зв'язувальних білків.

Для визначення ієрархії *Orf11* і *Ler* у регуляції експресії гена LEE, створили подвійний мутант *ler* і *orf11* в *C. rodentium*. Тоді як експресія *Tir* і *EspB* в Δler $\Delta orf11$ може бути частково відновлена експресією *Ler* у транс-положенні, подібна експресія *Orf11* не має такого ефекту (Фіг.8), дозволяючи припустити, що *Orf11* діє вище *Ler* у каскаді регуляції. Розширений аналіз праймерів підтверджує цю регуляторну ієрархію, показуючи, що промотор *Citrobacter ler* подібний до EPEC *ler* і його експресія знижена в $\Delta orf11$.

Роль *Orf11* у регуляції експресії *ler* була надалі продемонстрована при спостережанні активності транскрипційних злиттів між регуляторними ділянками оперонів LEE1 (*Ler*) (*pLEE1-CAT*) або LEE5 (*Tir*) (*pLEE5-CAT*) і репортерним геном *cat* у штаммах *Citrobacter* WT, Δler і $\Delta orf11$, вирощених на модифікованому середовищі Дульбеко (DMEM) протягом 6 годин. Активність злиття LEE1-*cat* зменшувалася в $\Delta orf11$, а активність злиття LEE5-*cat* виражено знижувалася як в Δler , так і в $\Delta orf11$. Ці результати показують, що *Orf11* є новим позитивним регулятором експресії *Ler*, який істотно сприяє експресії інших оперонів LEE. Оскільки *Orf11* діє вище, ніж *Ler*, у каскаді регуляції, він був названий *GrlA* (для загального регулятора LEE-активатора).

Приклад 3

Ідентифікація ефекторів, які секретуються TTSS, що кодується LEE

А/Е патогени секретують деякі білки у тканинну культуру або мінімальне середовище, але секретовані білки є в основному транслокаторами *EspA*, *EspB* і *EspD*. Секретовані білки концентрували преципітацією з TCA з супернатанту бактеріальних культур, вирощених на DMEM, і аналізували з використанням 12% SDS-PAGE, після чого забарвлювали Кумасі Синім. *C. rodentium*, що несе плазмиду, яка містить *orf11/grlA*, секретував, щонайменше, на 300% більше *EspA*, *EspB* і *EspD*, ніж штам WT.

Для виявлення ефекторів, кодованих LEE *цитробактеру*, мітили різні білки, що кодуються LEE, не залучені до TTS і адгезії клітин-реципієнтів, подвійним гемаглютиніновим (2H) епітопом на вуглецевому кінці і аналізували їх секрецію у WT і мутантних *C. rodentium*. Тільки *Tir*, *EspG*, *EspF*, *EspH* і *Map* секретувалися TTSS, що кодується LEE в *C. rodentium*, дозволяючи припустити, що LEE кодує тільки 5 ефекторів. Раніше невиявлений білок з молекулярною масою 54 кДа (p54) був легко визначений забарвлюванням Кумасі у мутанті, який також мав високий рівень секреції *Tir*, дозволяючи припустити, що він являє собою новий уявний ефектор, який кодується поза LEE.

Для ідентифікації p54 і визначення, чи дійсно додаткові ефектори кодуються поза LEE в *C. rodentium*, скористалися здатністю *GrlA* збільшувати експресію гена LEE і/або секрецію типу III, і ввели плазмиду *grlA* у мутанти, які секретують ефектори, але не транслокатори. Над-експресія *GrlA* значно збільшує (більш ніж на 400%) секрецію *Tir* у цих мутантах, за відсутності секреції транслокаторів. Спостерігали, щонайменше, 6 додат-

кових секретованих білків, що означає, що TTSS, який кодується LEE, секретує декілька додаткових білків, що не кодуються LEE.

Для ідентифікації цих білків секретовані білки аналізували з використанням 2-D гелів. Оскільки для деяких з ефекторів, що кодуються LEE (EspF, EspH і Map) були передбачені лужні значення pI, з EspF, що має максимальний pI 11,00, секретовані білки були спочатку сфокусовані на Immobiline Dry

Strips з кислотним (pH3-10) і лужним (pH6-11) градієнтами, а потім розділені в 12% і 14% SDS-PAGE, відповідно. Гелі забарвлювали Sypro Ruby, вибрані білкові плями діставали вручну і аналізували з використанням мас-спектрометрії і побудови білків de novo.

Цей аналіз підтвердив, що Tir, EspF, EspG, EspH і Map, кодовані LEE, були секретовані типом III (Таблиця 2).

Таблиця 2

Ефектори і уявні ефектори, які секретуються TTSS, що кодується LEE, в

C. Rodentium

Серійний номер	Пропонована назва	Встановлена молекулярна маса	Встановлений pI	Генна локалізація	Гомологи в EHEC та інших патогенах
5	Tir	68	5,0	LEE	Tir, постійний у всіх A/E патогенах
10	EspG	44	7,3	LEE	EspG, постійний у всіх A/E патогенах
Cl i C2	Map	23	9,0	LEE	Map, постійний у всіх A/E патогенах
C3	EspF	31	11,0	LEE	EspF, постійний у всіх A/E патогенах
C5 i C6	EspH	21	8,7	LEE	EspH, постійний у всіх A/E патогенах
7	NleA	54	5,8	He-LEE	EHEC Z6024 в О-районі 71 біля профагу CP-933P
12	NleB	39	5,9	He-LEE	EHEC Z4328 в О-районі 122, REPEC LEE-зв'язаний RorfE, і S.typhimurium STMFl. Також має гомологію з Z0985 О-районом 36
13	NleC	40	4,6	He-LEE	EHEC Z0986 в О-районі 36 біля профагу CP-933 K
14	NleD	28	7,1	He-LEE	EHEC Z0990 в О-районі 36, у тому ж О-районі, що і Z0985 і Z0986. Також має подібність до ефектору HopPtoH томата P.syringae pv
17	NleE	27	6,3	He-LEE	EHEC Z4329 у тому ж О-районі 122, як і Z4328, REPEC LEE-зв'язаний RorfD і S. flexneri ORF122

19	NleF	24	4,7	He-LEE	ЕНЕС Z6020, у тому ж О-районі 71, як і Z6024. Деяка подібність до гіпотетичних білків в <i>Yersinia pestis</i> і <i>Helicobacter pylori</i>
20	NleG	26	5,8	He-LEE	Ідентифікована пептидна послідовність: QQENAPSS(I/L)QTR. Гомологів у базі даних не знайдено.

На додаток до п'яти ефекторів, що кодуються LEE, ідентифікували сім секретованих білків, що не кодуються LEE, які, можливо, є ефекторами. Ці секретовані білки, що кодуються поза LEE, були відповідно позначені як NleA (p54), NleB, NleC, NleD, NleE, NleF і NleG (QQENAPSS(I/L)QTR; SEQ ID NO: 59) (для ефекторів, що не кодуються LEE), щоб відрізнити їх від секретованих білків/ефекторів, що кодуються LEE (Esp) (таблиця 2). Серед семи ідентифікованих білків тільки NleG був унікальний для *C. rodentium*, а інші 6 білків мали постійно присутні гомологи в ЕНЕС 0157 (таблиця 2). ЕНЕС гомологи кодуються генами, об'єднаними у трьох окремих районах генома, при цьому кожний район кодує, щонайменше, два білки, які демонструють гомологію до секретованих білків *C. rodentium* (таблиця 2). Гени Z6024 і Z6020, що кодують гомологи NleA і NleF, розташовані в ЕНЕС О-районі 71, зв'язаному з профагом CP-933P. Подібним чином, гени Z4328 і Z4329, що кодують гомологи NleB і NleE, розташовані в ЕНЕС О-районі 122, а гени, що кодують гомологи NleC і NleD (Z0986 і Z0990), розташовані в О-районі 36 (таблиця 2, Фіг.9). Крім того, Z4328 (О-район 122) має сильну гомологію з Z0985, геном, розташований після Z0986 в О-районі 36.

Гомологи всіх шести нових ЕНЕС ефекторних генів також представлені і подібно організовані в ЕНЕС, послідовність генома якого визначена (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/>). Крім Z6024, що демонструє 89% нуклеотидної ідентичності гену ЕНЕС, інші 5 генів ЕНЕС показують більш ніж 95% ідентичність їх гомологам в ЕНЕС. Більш того, деякі з цих ефекторів також постійно присутні в інших патогенних бактеріях. NleD/Z0990 має подібність до ефектору типу III HopPtoH томати *P. syringae* pv. (41, 42). NleE/Z4329 має значну гомологію з RorFD ЕПЕС кролика (РЕПЕС) і Orf212 *S. flexneri* (8, 33), тоді як NleB/Z4328 має значну гомологію з RorFE РЕПЕС і двома гіпотетичними білками *S. typhimurium*. Гени для Z4328 і Z4329 суміжно розташовані в ЕНЕС, подібно до розташу-

вання генів rorFD і rorFE в РЕПЕС (8). Однак rorFD і rorFE розташовані після LEE в РЕПЕС, тоді як їх аналоги в ЕНЕС знаходяться у районі (О-район 122), віддаленому від LEE. О-район 122 ЕНЕС, що несе Z4328 і Z4329, також містить гени, що кодують два цитотоксини, так само, як і гомолог PagC, важливий Pho/PhoQ-регульований вірулентний фактор *S. enterica* (3, 43). Три О-райони в ЕНЕС, які кодують нові ефектори, мають динуклеотидне зміщення і низький GC% вміст, відмітні особливості PAI (9). Крім того, вони або асоційовані з профагом, або фланковані мобільними інсерційними послідовностями, і не представлені у геномі непатогенної *E. coli* (3), дозволяючи припустити горизонтальне перенесення цих генів. Загалом, це дозволяє припустити важливе значення цих районів і знову ідентифікованих ефекторів *Citrobacter* і ЕНЕС у вірулентності. Це також показує, що, хоча вони відрізняються один від одного, відповідні патогени підтримують дивно постійний набір PAI, незважаючи на відмінні локалізації PAI у бактеріальних хромосомах.

Приклад 4

Ідентифікація NleA

Хоча тип Ш-секреція вважається, як правило, контакт-залежною (46), визначені умови культури *in vitro* можуть спонукати ЕНЕС секретувати ефектори типу III в екстрацелюлярне середовище у процесі росту у рідкій культурі (28, 51). Супернатанти культури готували з дикого типу ЕНЕС (wt) і тип ПІ-секретуючого мутанта (escN-), вирощеного в умовах, що індукують тип Ш-секрецію. Аналіз секретованих білків з використанням SDS-PAGE виявив один надмірний білок з великою молекулярною масою, спільний для секретованих білків як зразків дикого типу, так і escN-, і декілька інших надмірних білків, унікальних для зразка дикого типу (Фіг.10А). Секретовані білки розділяли 2-вимірним електрофорезом і надмірні виділені білкові плями діставали з гелю і аналізували мас-спектрометрично (Фіг.10В, Таблиця 1).

Таблиця 1

Номер плями	ID	Значення e	# пептидів	Передбачена мол. маса (кДа)	Експериментальна мол. маса (кДа)	Передбачений pI	Експериментальний 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

Пляму №1, яка була присутньою у супернатантах культур як дикого типу, так і *escN*-, ідентифікували як EspP, плазмід-кодований білок ЕНЕС, який секретується по аутотранспортному механізму, незалежному від секреції типу III (25). Чотири основних плями (№2, 3, 4, 5) були унікальні для супернатантів дикого типу. Три з цих плям ідентифікували як відомі секретовані білки типу III, що кодуються LEE: Tir (пляма №2), EspB (пляма №4) і EspA (пляма №5) (Фіг.10B, таблиця 1). Пляму №3 ідентифікували як білок з передбаченою молекулярною масою 48кДа, що кодується відкритою рамкою зчитування генома ЕНЕС, але поза LEE (Фіг.10C). Цей білок назвали NleA, для ефектора A, що не кодується LEE.

Приклад 5

Характеристика локусу, що містить *nleA*

Ген *nleA* розташований в O-районі: районі генома ЕНЕС, відсутнього у геномі непатогенного штаму K-12 *E. coli* (3). Район між останнім геном, постійно присутнім у кістяку K12 *E. coli* (*YciE*), і генами, що кодують структурні білки фагу, містить декілька фрагментів уявної транспозази і один фрагмент уявної рекомбінази (Фіг.11A). Аналіз цього району за допомогою Islandpath, програми, створеної для ідентифікації PAI (13), показує, що всі ORF цього району мають динуклеотидні зміщення і вміст GC, відмінні від показників генома ЕНЕС. 10 ORF цього району мають вміст GC, щонайменше, на 1 стандартне відхилення нижчий показників генома ЕНЕС, тоді як 2 з 6 ORF мають вміст GC, щонайменше, на 1 стандартне відхилення вищий показників генома ЕНЕС. Взяті разом, ці результати дозволяють припустити, що *nleA* розташований в PAI, що містить горизонтально-переміщені гени. Декілька інших ORF цього району мають властивості, що дозволяють припустити їх роль у вірулентності, включаючи уявний шаперон (Z2565) і два білки, подібних до тип III-секретованих білків інших патогенів (Z6021, Z6020).

Для подальшого дослідження природи і поширеності гена *nleA* одержували проби *nleA* і використовували саузерн-блот на панелі геномної ДНК інших A/E патогенів і непатогенного штаму *E. coli*. Як показано на Фіг.11B, ген *nleA* був представлений у всіх досліджених A/E патогенах, але був відсутній у непатогенній *E. coli*. Аналіз у процесі геномної послідовності ЕРЕС виявив, що *nleA* знаходиться безпосередньо близько від місця інсерції фагу у геномі ЕРЕС. *nleA* також присутній у

профагу інтимін-позитивного, не-0157 ЕНЕС штаму, O84:H4, але відсутній у непатогенних штаммах *E. coli*, уропатогенній *E. coli*, які не містять LEE. *nleA* також відсутній в інших патогенах, що містять TTSS, таких як *Salmonella* і *Shigella*. Таким чином, *nleA* представляється специфічним компонентом A/E патогенів. Численні дослідження послідовностей гена *nleA* з *C. rodentium*, ЕРЕС, ЕНЕС і O84:H4 виявили високий ступінь стійкості даної послідовності у цих чотирьох A/E патогенах (Фіг.11C).

Приклад 6

NleA секретується системою секреції типу III, що кодується LEE

ЕНЕС і ЕРЕС ефектори TTSS, що кодується LEE, описані у наш час, кодуються у LEE, безпосередньо близько до генів, що кодують секрецію самого апарату. Для визначення, чи залежна секреція *NleA* від TTSS, що кодується LEE, епітопомічену версію *NleA* експресували з плазміди у дикий тип ЕНЕС і *escN*-штам, які є дефіцитними за секрецією типу III (47). Як показано на Фіг.12A, хоча HA-мічений *NleA* експресували до однакового рівня у дикуму типі ЕНЕС і *escN*-ЕНЕС, білок секретувався в екстрацелюлярне середовище тільки бактеріями *NleA*-HA-трансформованого дикого типу. DnaK, несекретований бактеріальний білок, використовували як контроль відсутності несекретованих білків у зразках, що секретують білок (Фіг.12B). Tir секретувався незмінним і *NleA*-HA-трансформованими штамми дикого типу, але не секретувався *escN*-штамом (Фіг.12C), підтверджуючи очікувані TTSS фенотипи. Подібні результати були одержані для експресії епітоп-міченого *NleA* у дикуму типі ЕРЕС і декількох тип III-секретуючих мутантів ЕРЕС, що показує, що *NleA* також може секретуватися ЕРЕС TTSS.

Приклад 7

NleA транслокується у реципієнтні клітини

При вирощуванні ЕНЕС в умовах, що індують секрецію типу III, два типи білків секретуються в екстрацелюлярне середовище. Для визначення, чи є *NleA* транслукатором або транслуканим ефектором, досліджувалася секреція і транслокація типу III за відсутності *NleA* шляхом створення мутантного штаму з делецією. Аналізували профілі секретованих білків штаму дикого типу і *NleA* мутантного ЕНЕС штаму. Зразок дикого типу містив надмірний білок з молекулярною масою приблизно 50кДа, який був відсутній серед білків, секретованих *NleA* (Фіг.13A). Аналіз вестерн-блоту з антисироваткою проти *NleA* продемонстрував, що

50кДа NleA був представлений серед білків, секретованих диким типом і був відсутній у зразку Δ nleA (Фіг.13B). Однак, за винятком присутності або відсутності NleA, профілі секретованих білків штамів дикого типу і Δ nleA були ідентичними (Фіг.13A). Таким чином, NleA не потрібний для секреції інших тип III секретованих ефекторів. Для визначення, чи є NleA необхідним для транслокації інших тип III ефекторів у клітини реципієнта, клітини HeLa інфікували диким типом ЕНЕС і ЕНЕС Δ nleA і спостерігали транслокацію і функціонування Tіg з використанням імуофлуоресцентного забарвлювання інфікованих клітин. Формування ложа диким типом ЕНЕС і мутантом Δ nleA вивчали, піддаючи інфіковані клітини імуофлуоресценції з анти-ЕНЕС і анти-Tіg антитілами і спостерігаючи філаменти актину з використанням фалоїдину. Результати показали, що ЕНЕС Δ nleA адгезувалися до клітин HeLa на однаковому рівні з диким типом ЕНЕС. Імуофлуоресцентне забарвлювання показало, що Tіg був транслокований у реципієнтні клітини і зосереджений під інфекційними бактеріями, як у штамі дикого типу, так і у штамі Δ nleA ЕНЕС. Для підтвердження функціональної транслокації Tіg інфіковані клітини забарвлювали флуоресцентним фалоїдином для візуалізації полімеризованого актину, залученого до формування ложа під адгезованими бактеріями. У клітинах, інфікованих як диким типом, так і Δ nleA ЕНЕС, актинові ложа були доказом того, що транслокація і функціонування інших ефекторів типу III можуть відбуватися за відсутності NleA. Ці результати також показують, що NleA не потрібний для формування ложа.

Оскільки NleA не грає ролі у секреції або транслокації інших ефекторів, досліджували, чи транслокується сам NleA. Клітини HeLa інфікували протягом 6 годин диким типом або escN-ЕНЕС, що експресують НА-мічений NleA і піддавали субклітинному фракціонуванню і аналізу вестерн-блоту з анти-НА антитілами. Як показано на Фіг.14A, NleA транслокується у реципієнтні клітини, де зв'язується з мембранною фракцією реципієнтних клітин. Транслокація NleA не спостерігалася у процесі інфікування клітин тип III секретуючим мутантом, що експресує НА-мічений NleA, що означає, що транслокація NleA і зв'язування з мембранною реципієнта є TTSS-залежними. Аналіз вестерн-блоту фракцій з антитілами до білків, специфічних для кожної фракції, підтвердив відсутність перехресної контамінації фракцій. Кальнексин, інтегральний мембранний білок реципієнтних клітин, був відсутній у цитоплазматичній фракції, а тубулін, цитоплазматичний білок реципієнтних клітин, був відсутній у мембранній фракції реципієнтних клітин. DnaK, несекретований бактеріальний білок, був присутнім тільки у низькошвидкісному осаді, демонструючи відсутність бактеріальної контамінації мембран реципієнта і цитозольних фракцій. NleA і DnaK був відсутній у низькошвидкісному осаді у тип III мутант-інфікованих клітинах, у зв'язку з залежністю типу III від адгезії ЕНЕС. Для підтвердження несподіваної відсутності NleA у тип III мутант-інфікованих зразках, у зв'язку з залежністю типу III від адгезії ЕНЕС, проводили подібні експе-

рименти, експресуючи і вводячи NleA-НА за допомогою дикого типу і тип III мутанту ЕНЕС, оскільки адгезія ЕНЕС до клітин HeLa не залежить від тип III секреції. NleA був присутнім у мембранній фракції клітин, інфікованих диким типом, але не штамом тип III мутанту ЕНЕС. І NleA, і DnaK були присутніми у низькошвидкісних осадових фракціях клітин, інфікованих диким типом і тип III мутантом ЕНЕС.

Для вивчення природи зв'язування NleA з мембранами реципієнтних клітин мембранні фракції інфікованих реципієнтних клітин, що містять НА-мічений NleA, екстрагували на льоді, при визначених умовах, і рецентрифугували для одержання розчинних і нерозчинних мембранних фракцій (Фіг.14B). Ці фракції були піддані аналізу вестерн-блоту з анти-НА антитілами для визначення НА-міченого NleA. Обробкою вищою сіллю (1M NaCl) або лужним рН (0,2mM Na₂CO₃, рН11,4) видаляли білки, які периферійно зв'язані з мембранами електростатичними або гідрофільними взаємодіями, відповідно. Зв'язок NleA з мембранами реципієнтних клітин витримував руйнування такою обробкою (Фіг.14B, верхня панель), так само, як і кальнексин, інтегральний мембранний білок (Фіг.14B, середня панель). Навпаки, значна кількість кальретикуліну, периферійного мембранного білка, була видалена з мембранної фракції у процесі обробки, як вищою сіллю, так і лужним рН (Фіг.14B, нижня панель). Обробка мембранних фракцій неіонним детергентом Triton X-100, який розчиняє інтегральні мембранні білки, такі як кальнексин (Фіг.14B, середня панель), майже повністю розчинила NleA, внаслідок чого НА-мічений NleA білок перейшов з нерозчинної фракції у розчинну (Фіг.14B, верхня панель). Ці результати показують, що NleA транслокується у реципієнтні клітини, де поводить себе як інтегральний мембранний білок. Дійсно, аналіз послідовності білка NleA декількома програмами прогнозування трансмембранних доменів передбачив один або два уявних трансмембранних домени у цій послідовності (Фіг.11C).

Приклад 8

NleA локалізується у комплексі Гольджі реципієнта

Потім визначали субклітинну локалізацію NleA у реципієнтних клітинах. Клітини HeLa інфікували диким типом ЕНЕС або ЕНЕС Δ nleA і піддавали імуофлуоресценції з антитілами проти NleA і манозидази II. Деякі зразки обробляли брэфелдином А протягом 30 хвилин перед фіксацією. Проводили двохкільорове шарувате забарвлювання NleA і манозидази II. Клітини HeLa трансфікували експресуючою конструкцією, що кодує білок злиття GFP-NleA, і піддавали імуофлуоресценції з антитілами проти манозидази II.

Імуофлуоресцентне забарвлення клітин HeLa, інфікованих диким типом ЕНЕС, з використанням анти-NleA антитіл, приводило до утворення перинуклеарних частинок барвника, які були відсутніми у клітинах, інфікованих ЕНЕС Δ nleA або у не інфікованих клітинах. Ці частинки не були схожі на забарвлювання, що одержують з маркерами для пізніх ендосом, лізосом, ER, мітохондрій

або ядер. Однак, дуже подібні частинки барвника спостерігалися, коли клітини дозabarвлювали з анти-NleA і антитілами до маркерів комплексу Гольджі, включаючи манозидазу II, де два білки були локалізовані поряд. Для підтвердження локалізації NleA у комплексі Гольджі інфіковані клітини інкубували з брефелдином А, грибовим метаболітом, що руйнує структуру комплексу Гольджі (27), перед фіксацією та імуофлуоресценцією. Обробка брефелдином А викликала дифузію забарвлювання манозидазою II і NleA, як і очікувалося для білків, локалізованих у комплексі Гольджі. Співлокалізацію NleA спостерігали з декількома іншими маркерами для комплексу Гольджі, а також спостерігали локалізацію у комплексі Гольджі в експериментах, що досліджували епітоп-мічений NleA, забарвлений антитілами до мітки, що зв'язували як HA, так і FLAG епітопні мітки. Для визначення, чи потребує локалізація NleA у комплексі Гольджі інших бактеріальних факторів або є власною властивістю NleA, клітини трансфікували експресуючою конструкцією, що кодує білок злиття GFP-NleA. Трансфікований NleA GFP також розміщується у комплексі Гольджі, де перекривається з забарвлюванням манозидазою II.

Таким чином, одержані результати показують, що NleA локалізується у комплексі Гольджі. Спостереження, що трансфікований білок злиття GFP-NleA локалізується у комплексі Гольджі, дозволяє припустити, що білок NleA містить інформацію, націлену на комплекс Гольджі, і не потребує інших бактеріальних факторів для його досягнення. NleA, введений у бактерії, також локалізується у комплексі Гольджі.

Приклад 9

NleA необхідний для вірулентності

Високий ступінь стійкості послідовності NleA в А/Е патогенах (Фіг.11 С) дозволяє припустити, що NleA грає подібну роль в інфекції. *S. rodentium* є природним патогеном у мишей (53) і використовується як модельна система для вивчення А/Е патогенезу. Для чутливих ліній інфекція *S. rodentium* є фатальною і, як правило, викликає смерть інфікованих мишей між 6 і 10 днем зараження (54). Більш стійкі лінії мишей не вмирають від інфекції *S. rodentium*, але піддаються колонізації з розвитком кишкового запалення і гіперплазії товстого кишечника (54).

Для визначення ролі NleA у вірулентності створили штам *S. rodentium* з делецією *nleA* і підтвердили відсутність NleA за допомогою вестерн-блоту спільних бактеріальних екстрактів з NleA антисироваткою (Фіг.16А). Мишей інфікували різними кількостями бактерій дикого типу або $\Delta nleA$ через шлунковий зонд. У мишей СЗН-HeJ, чутливих до *S. rodentium*, NleA був абсолютно необхідний для вірулентності. Всі миші СЗН-HeJ, інфіковані диким типом *S. rodentium*, померли між 6 і 10 днем зараження (n=9), тоді як всі $\Delta nleA$ -інфіковані миші (n=13) показали деякі легкі симптоми захворювання, такі як рідкі випорожнення, але як і раніше додавали у вазі, були активні протягом інфекції і всі вижили (Фіг.16В). Більш того $\Delta nleA$ -інфіковані миші були стійкі до подальшого зараження диким типом *S. rodentium* (n=5, Фіг.16В). Таким чином,

хоча штам $\Delta nleA$ не є патогенним для чутливих мишей, він взаємодіє з реципієнтом у достатній мірі для стимуляції захисного імунітету.

На відміну від мишей СЗН-HeJ, інфекція *S. rodentium* не є летальною для аутобредних швейцарських мишей NIH. У цих мишей колонізація *S. rodentium* товстої кишки веде до запалення кишечника, гіперплазії товстого кишечника і слабких симптомів діареї. Швейцарських мишей NIH інфікували диким типом *S. rodentium* або штамом $\Delta nleA$ і утиспляли на 10 день зараження. Миші, інфіковані штамом $\Delta nleA$, мали у товстому кишечнику на 10 день, в середньому, титр *S. rodentium* у 20 разів нижчий (за Фіг.16С).

Гістологічний аналіз товстого кишечника інфікованих швейцарських мишей NIH проводили шляхом інфікування мишей диким типом *S. rodentium* або штамом $\Delta nleA$ і утиспляли на 10 день зараження. Останні 0,5см товстої кишки інфікованих мишей фіксували у 10% нейтральному буферному формаліні, обробляли, робили зрізи по 3 мкм і забарвлювали гематоксиліном і еозином. Тканинні зрізи всіх мишей вивчали і фотографували з використанням об'єктивів 5X і 63X. Результати показують, що у гістологічних аналізах біопсій, взятих з анального краю інфікованих мишей, виявлена велика кількість бактерій у тканинах, інфікованих диким типом, і незначне число бактерій у зразках, інфікованих $\Delta nleA$. Всі тварини, інфіковані диким типом *S. rodentium*, демонстрували патологічні ознаки гіперплазії товстого кишечника, тоді як миші, інфіковані $\Delta nleA$, не мали ознак гіперплазії. Зразки, інфіковані диким типом, демонстрували виражене запалення і гіперплазію, до ступеня, коли зникав просвіт кишечника і зовнішній м'язовий шар був візуально розтягнутий для вміщення збільшеного об'єму епітелію. Навпаки, $\Delta nleA$ -інфіковані зразки демонстрували відносно нормальну гістологію. Відносна вираженість кишкового запалення і гіперплазії також виявлялася у відмінності ваги товстого кишечника, до часу утисплення, у двох групах мишей (Фіг.16Б). Миші, інфіковані диким типом, мали також збільшену селезінку, у порівнянні з $\Delta nleA$ -інфікованими мишами, що виявлялося у збільшенні ваги селезінки.

Таким чином, продемонстрували виражений вплив NleA на вірулентність на мишачій моделі захворювання. У чутливих мишей присутність функціонуючого NleA в *S. rodentium* веде до летальної інфекції протягом 10 днів. Миші, інфіковані штамом, дефіцитним за NleA, показують незначні симптоми і обов'язково виживають після інфекції. У більш стійких мишачих ліній, де інфекція *S. rodentium* не є летальною, NleA необхідний для розвитку гіперплазії товстого кишечника, і на 10 день інфекції менша кількість бактерій з $\Delta nleA$ мутантом присутня у кишечнику реципієнта. Ці дослідження показують явну участь NleA у вірулентності *S. rodentium*. Ці результати ЕНЕС інфікування клітин HeLa продемонстрували, що *in vitro* NleA не знижує адгезію бактерій на реципієнтних клітинах або транслокацію інших ефektorів, дозволяючи припустити, що NleA може діяти на рівні ускладнення процесу виведення у клітини-реципієнта, а не збільшення бактеріальної адгезії. Більш того,

стійкість *AnleA*-інфікованих мишей до подальшого зараження диким типом *C. rodentium* доводить, що колонізації штамом піе мутанта і його взаємодії з реципієнтом досить для стимуляції імунітету реципієнта. Це відрізняє його від тип III-мутантів *C. rodentium*, які не колонізують реципієнта і не створюють захисту від подальшого зараження. Таким чином, піеА мутантні штами можуть використовуватися як ослаблені штами вакцини.

Посилання

Наступні публікації включені сюди як посилання.

1. Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
2. Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, L., Dougan, G., Kaper, J.B., and Knutton, S. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 30: 911-921.
3. Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Май, 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., 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 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409: 529-533.
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 of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 28: 1-4.
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 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 66: 3810-3817.
6. Zhu, C., Agin, T.S., Elliott, S.J., Johnson, L.A., 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. *Infect Immun* 69:2107-2115.
7. Deng, W., Li, Y., Vallance, B.A., and Finlay, B.B. (2001) Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun* 69: 6323-6335.
8. Tauschek, M., Strugnell, R.A., and Robins-Browne, R.M. (2002) Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of rabbit-specific strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 44: 1533-1550.
9. Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54: 641-679.
10. G.R. Cornells, J. Cell. Biol 158, 401 (2002).
11. U.S. Gmenheid, B. B. Finlay, *Nature* 422, 775 (2003).
12. 1. Chernushevich, A. Loboda, B. Thomson, J. Mass Spectrom. 36, 849 (2001).

13. Hsiao, W., Wan, I, Jones, S.J., and Brinkman, aiding detection of genomic islands in prokaryotes. *Bioinformatics* 19: 418-420.

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.

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

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

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).

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

20. Vallance, B.A., Deng, W., De Grado, M., Chan, C, Jacobson, K., and Finlay, *Infect Immun* 70: 6424-6435.

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

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

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

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

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.

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 and the *CaiF* activator. *Mol Microbiol* 34: 562-575.

27. Chardin, P., and McCormick, F. (1999) Brefeldin A: 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 *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infect Immun* 67: 2389-2398.

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

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

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

32. Griffin, P.M., Ostroff, S.M., Tauxe, R.V., Greene, 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.

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: 53-86.

35. Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997) Enteropathogenic *E. coli* (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-Browne, R.M., Sasakawa, C., and Kaper, Infect Immun 69: 4027-4033.

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

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

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

40. Tu, X., Nisan, I., Yona, C., Hanski, E., and Rosenshine, I. (2003) EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 47: 595-606.

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

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

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

44. Gruenheid, S., DeViney, R., Blatt, 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.

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

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

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.

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.

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.

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 actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol Microbiol* 48: 95-115.

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. Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. *Journal of Experimental Medicine* 188: 1907-1916.

59. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5 (3): 163-187 (1990).

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

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

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

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.

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

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

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: 2074-82.
81. Hopp et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1981) 78: 3824-3828.
82. *Immunology* 58 (2): 245-250 (1986).
83. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 68 (3): 201-208 (1982).
84. *J. Immunol. Methods* 97 (2): 159-164 (1987).
85. *J. Controlled Release* 7: 123-132 (1988).
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. Sci. USA*. 87: 2264-2268.
87. Knodler, L.A., J. Celli, W.D. Hardt, B.A. Vallance, 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 Microbiol* 43: 1089-103.
88. Kodak Laboratory Chemicals Bulletin 56 (1): 1-5 (1986).
89. Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6: 292,1976
90. Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6: 511, 1976.
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.
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.
95. Miyagishi M, and Taira K. (2002) *Nature Biotechnol.* 20: 497-500.
96. Myers and Miller, *CABIOS*, 1989, 4: 11-17.
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. 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. *Infect Immun* 71: 1505-12
98. Paddison PJ, et al. (2002). *Genes & Dev.* 16: 948-958.
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.
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 Methods in Enzymology* 3(1): 66-77.
103. Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff. 1992 "Amino acid substitution matrices from protein blocks." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89 (biochemistry): 10915-10919.
104. Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff. 1993. "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: 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.
110. 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, Kodarna 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.

Інші варіанти здійснення

Хоча тут описані різні варіанти здійснення, багато адаптацій і модифікацій може бути зроблено у межах об'єму винаходу відповідно до загальних знань фахівців у даній галузі. Такі модифікації включають в себе заміни відомих еквівалентів будь-якого аспекту винаходу для досягнення того ж результату, по суті, тим же шляхом.

Застосовувані тут інвентарні номери відносяться до інвентарних номерів багатьох баз даних, включаючи GenBank, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), DNA Database of Japan (DDBJ), або Genome Sequence Data Base (GSDB), для нуклеотидних послідовностей, і включаючи Protein Information Resource (PIR), SWISSPROT, Protein Research Foundation (PRF), і Protein Data Bank (PDB) (послідовності для дозволених структур), а

також до результатів трансляції з анотованих кодуєчих областей в GenBank, EMBL, DDBJ, або RefSeq, для поліпептидних послідовностей. Чисельні інтервали включають числа, що визначають інтервал. У специфікації слово «що включає» застосовується як необмежений термін, по суті еквівалентний виразу «що включає як необмежувальні приклади», і вираз «включає» має відповідне значення. Цитування наведених тут посилань не має на увазі припущення, що такі посилання являють собою попередній по відношенню до даного винаходу рівень техніки.

Всі публікації включені у даний опис як посилання так, як якби кожна окрема публікація була конкретно і окремо вказана як включена у даний опис як посилання, і була б повністю наведена у даному описі. Винахід відноситься до всіх варіантів здійснення і варіацій, по суті, описаних тут і вище, з посиланням на приклади і креслення.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA, et al.

<120> БАКТЕРІАЛЬНІ ФАКТОРИ ВІРУЛЕНТНОСТІ І ВАРИАНТИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<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 ggaatgtggg      180
gaaacaacgg ctctattaag cttgataaaa gatgaaggcc tgctctcagg actagataaa      240
tatcttgctc ctcaccttga agaaggctcc cttgggaaaa aagcattgga tacgtttggg      300
ttattcaatg ttactcaaat ggcattagag ataccagtt ccgttccagg catatctggg      360
aaatatgggtg ttcagatgaa cattgtaaaa ccagacatac atccaacaac cgggaactat      420
tttttacagc tatttcctct gcatgacgaa atagggttta acttcaaaga tcttcctggc      480
ccattaaaaa atgcattaac caacagcagt atatcggcta ctgcatcgac tgtagccccc      540
acaccaaacy acccaatgcc atgggtttgga ttaactgctc aagtggttcg taatcatggg      600
gtagaacttc ctatagtcaa aaccgaaaat ggatggaagc ttgtagggga aacacctctt      660
actccagatg gcccacaagc caattatacg gaagaatggg ttatcaggcc gggagaagca      720
gattttaaat atggaacatc gccattacag gcaactcttg gactggagtt tggcgcat      780
tttaagtggg atttagataa tcctaatacc aaatatgcca tccttaccaa tgctgccgca      840
aatgctattg gtgctgctgg aggggtttgc gtatccaaag tccccggcat agatccaatg      900
ctgtcccttc atgtcgggtgc aatgcttggg caagcagcgg ggcagccgtg acaatgtaat      960
acccccggat taaagccaga cactatttta tgggtggcag gcgcgacatt tggagctgct      1020
gatttaataa aagccgaatt tgataaagt cggttcactg actaccctcg tatatggttc      1080
catgcacggg aaggagcttt attcccaaat aagcaagaca ttgcccggtg aacaggcgca      1140
gacataaaag ctatggaaga aggcgtaccc gttggacatc aacatccaaa accggaggat      1200
gtgggtcatc atatcgaagg tggcaattca ccacatcata atccatcaaa ttatgttgac      1260
acctttgaaa taatccaaga aacaagggtc taa                                     1293

```

<210> 2

<211> 1323

<212> ДНК

<213> Ентеропатогенна *E. coli*

<400> 2

```

atgaacattc aaccgatcgt aacatccgga atcaccacac aaaacaatcg acatcatcac      60
gcagaacaaa cgtcccctac acaaataccg caatccgaat tacctaattg atgcgaaacg      120
ggatttggtt ttcatatccc agaggatatg cagcgacatg caccggaatg cggtgaaaca      180
acagctctac tgagcttgat aaaagatgaa ggtctgctct ctgggctgga taaatatctt      240
gcacctcatc ttgaagaagg ctctgcagga aaaaaagcat tggatatgtt tggtttattc      300
aatgtctctc agatggcatt agaaataccc agcaccgttc cgggtatctc tggtaaatat      360
ggtgtccagc taaacattgt aaaaccagat attcatccta catcaggtaa ttatttttta      420
cagatatctc ctttgcatga tgaaataggt attaatttta aagaccttcc tggtcatta      480
aaaaatgcat taagcaacag caatatacca accactgtat cgactgctgc atccactatt      540
gcatcagcca ctacttcgac ggtaaccacc gcgtcaaaaag acccaatacc atgggttgga      600
ttaacagctc aagtagttcg taatcatggg gtggaacttc ctatagtcaa aactgaaaat      660

```

```

ggatggaagc ttgttggaga aactcctctt actcctgatg gcccacaaagc aaattataact 720
gaagagtggg tgatcagacc gggagaagca gatttttaaat atggtgcac tcactacag 780
gcaactctag ggctggagtt tggcgacat ttcaagtggg atttagataa ccctaatact 840
aaatatgccc ttcttaccaa tgctgccgca aatgcgcttg gtgctgtagg gggatttgca 900
gtatccagat ttactggtac agatccaatg ttaagtcctc atatcggtgc aatggttggg 960
caagcagcgg ggcatgccat acagtataat acccccggat taaagccaga cactatttta 1020
tgggtgggcag gtactactct tggactggct gatttaaaca aggccgagtt tggagaggcc 1080
agattcactg actatcctcg tatatggtgg catgcaagag aaggtgccat tttcccaaat 1140
aaagcagata ttgaacatgc cacaggggct gatatacgcg caatggaaga aggtgtatct 1200
gttggacaac ggcattccaaa tccagaggat gtggtcatca atatcgaaag caataactca 1260
ccatcatata acccatcaaa ttatgttgat accgttgata taatccaaga aacaagagtc 1320
taa

```

<210> 3

<211> 1326

<212> ДНК

<213> Ентеромеморатична E. coli

<400> 3

```

atgaacattc aaccgaccat acaatctgga atcacctcac aaaacaatca acatcatcaa 60
acagaacaaa taccctctac acaaataccg caatccgaat tacctctagg atgccaagct 120
ggatttgttg ttaatatctc agatgatata cagcaacatg caccggaatg cggtgaaaca 180
acagctctac tgagcttgat aaaagataaa ggtctgctct cagggtctaga cgaatatata 240
gctcctcacc ttgaagaagg atccatagga aaaaaaacat tggatatgtt tggtttattc 300
aatgtttacc aaatggcatt agagatacct agttccgttt caggcatctc tggtaaatat 360
ggtgtccagc taaacattgt aaaaccagat attcatccta catcaggtaa ttatttttta 420
cagatatctc ctctgcatga tgaaataggt ttttaatttta aagaccttc tggcccgtaa 480
aaaaatgcat taagcaacag taatatatca accactgcag tgcgactat tgcacgact 540
ggaacatcag ccactacttc gacggtaacc accgagccaa aagacccaat accatggttt 600
ggattaacag ctcaagtggg tgcgaatcat ggtgtagaac ttcctatagt caaaactgaa 660
aatggatgga agcttgttgg agaaacacca ctactcctg atgggcccga agcaaattac 720
acggaggagt gggttatcag accgggagaa gcagatttta aatatggtgc atctccatta 780
caggcaactc tagggctgga gtttggcgca catttcaagt gggattttaga taaccctaata 840
actaaatatg ccgttcttac caatgctgcc gcaaatgcgc ttggtgcttt agggggattt 900
gcagtatcca gatttgctag tacagatcca atgttaagtc ctcatatcgg tgcaatgggt 960
gggcaagcag cagggcacgc catacagtat aataccctg gattaagacc agacactatt 1020
ttatgggtgg ctggtgcgac actgggggct gccgatttaa acaaggccga gtttgaagta 1080
gctagattca ctgactatcc tcgtatatgg tggcacgcaa gagaaggagc tattttcccc 1140
aataaagcag atattgaaca tgccacaggt gctgatatac gcgcaatgga agaaggatct 1200
cctgttggac agcggcatcc aaatccagag gatgtggtta tcgatatcga aagcaatggc 1260
ttaccacatc ataatccatc aaatcatgtt gatattcttg atataatcca agaaacaaga 1320
gtctaa

```

<210> 4

<211> 614

<212> ДНК

<213> Citrobacter rodentium

<400> 4

```

tattcttttt cagtgggttg aagcaaggcc agagcgatac ggaaaagggtg aagtaccgat 60
attgaatacc aaagagcatc cgtatttgag caatattata aatgctgcaa aaatagaaaa 120
tgagcgcgta ataggagtac tggtagacyg agactttact tatgagcaaa gaaaaggatt 180
tctcagctct gaagatgaac atcaaaatat aaagataata tatcgggaaa atgttgattt 240
cagtatgtat gataaaaaac tgtctgatat ttatcttgaa aatattcatg aacaagaatc 300
atatccagcg agtgagagag ataattatct gttaggctta ttaagagaag agttaaaaaa 360
tattccatcc ggaaaggact ctttgattga atcatatgca gaaaaagag gtcatacttg 420
gtttgatttt ttttagaaact tggcgggtatt gaaggggggg ggggttgttt cagagacggg 480
taaaactgga tgccataaca tatctccatg tgggggatgt atatatcttg atgcagatat 540
gattattact gataaattag gtgtcctgta tgctcctgat ggtatcgctg tgcatgtaga 600
ttgtaatgat gaga

```

<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	atttctcagt	cttgaagatg	aacatcaaaa	180
tataaagata	atatatcggg	aaaatgttga	tttcagtatg	tatgataaaa	aactgtctga	240
tatttatctt	gaaaatattc	atgaacaaga	atcatatcca	gcgagtgaga	gagataatta	300
tctgttggtt	ttaagagaag	agttaaaaaa	tattccatac	ggaaaggact	ctttgattga	360
atcatatgca	gaaaaaagag	gtcatacttg	gtttgatttt	tttagaaact	tggcgggtatt	420
gaaggggggg	gggttggtta	cagagacggg	taaaactgga	tgccataaca	tatctccatg	480
tggggggtat	atatatcttg	atgcagatat	gattattact	gataaattag	gtgtcctgta	540
tgctcctgat	ggtat					555

<210> 6

<211> 990

<212> ДНК

<213> *Ентеропатогенна Е. coli*

<400> 6

atgttatctt	cattaaatgt	ccttcaatcc	agcttcagag	gaaagacagc	tttatcaa	60
agtacacttc	tccagaaagt	ttcttttgct	ggaaaagaat	attctctgga	acctattgat	120
gaaagaaccc	ctattctttt	tcagtgggtt	gaagcaaggc	cagagcgata	cgaaaaagga	180
gaagtaccaa	tattgaatac	caaagaacat	ccgtatttga	gcaatattat	aaatgctgca	240
aaaatagaaa	atgagcgtat	aatcgggtgtg	ctggtagatg	gaaattttac	ttatgaacaa	300
aaaaaggaat	ttctcaatct	tgaaaatgaa	catcaaaaata	taaaaataat	ctaccgagca	360
gatgtggatt	tcagcatgta	tgataaaaaa	ctatctgata	tttaccttga	aaatatccat	420
aaacaagaat	cataccctgc	cagtgcagag	gataattatc	tgtaggctt	attaagagaa	480
gagttaaaaa	atatcccgaga	aggtaaggac	tctttgattg	agtcatatgc	agaaaaaaga	540
gaacatactt	ggtttgattt	tttcaggaat	ttggccatat	tgaaggctgg	aagtttgttt	600
acagagacgg	gaaaaactgg	atgccataac	atatcgccct	gtagcggatg	tatatatctt	660
gatgccgaca	tgattattac	cgataaatta	ggagtcctgt	atgctcctga	tggtatcgct	720
gtgcatgtag	attgtaattga	tgagataaaa	agtccttgaaa	atgggtgcgat	agttgtcaat	780
cgtagtaatc	atccagcatt	acttgcaggc	ctcgatatta	tgaagagtaa	agttgacgct	840
catccatatt	atgatggtct	aggaaagggt	atcaagcggc	attttaacta	ttcatcgcta	900
cacaattata	atgctttttg	tgatttttatt	gaatttaagc	atgaaaatat	tataccgaat	960
accagtatgt	ataccagcag	ttcatggtaa				990

<210> 7

<211> 990

<212> ДНК

<213> *Ентерогеморагічна Е. coli*

<400> 7

atgttatctt	cattaaatgt	ccttcaatcc	agcttcagag	gaaagacagc	tttatcaa	60
agtacacttc	tccagaaagt	ttcttttgct	ggaaaagaat	atcctctgga	acctattgat	120
gaaaaaaccc	ctattctttt	tcagtgggtt	gaagcaaggc	cagagcgata	cgaaaaagga	180
gaagtaccaa	tattgaatac	caaagaacat	ccgtatttga	gcaatattat	aaatgctgca	240
aaaatagaaa	atgagcgtat	aatcgggtgtg	ctggtagatg	gaaattttac	ttatgaacaa	300
aaaaaggaat	ttctcagtct	tgaaaatgaa	tatcaaaaata	taaaaataat	ctaccgagca	360
gatgtggatt	tcagcatgta	tgataaaaaa	ctatctgata	tttaccttga	aaatatccat	420
aaacaagaat	cataccctgc	cagtgcagag	gataattatc	tgtaggctt	attaagagaa	480
gagttaaaaa	atatcccgaga	aggtaaggac	tctttgattg	agtcatatgc	agaaaaaaga	540
gaacatactt	ggtttgattt	tttcaggaat	ttggccatgt	tgaaggctgg	aagtttgttt	600
acagagacgg	gaaaaactgg	atgccataac	atatcgccct	gtagcggatg	tatatatctt	660
gatgccgaca	tgattattac	cgataaatta	ggagtcctgt	atgctcctga	tggtatcgct	720
gtgcatgtag	attgtaattga	tgagataaaa	agtccttgaaa	atgggtgcgat	agttgtcaat	780
cgtagtaatc	atccagcatt	acttgcaggc	ctcgatatta	tgaagagtaa	agttgacgct	840
catccatatt	atgatggtct	aggaaagggt	atcaagcggc	attttaacta	ttcatcgcta	900
cacgattata	atgctttttg	tgatttttatt	gaatttaagc	atgaaaatat	tataccgaat	960
accagtatgt	ataccgagcag	ttcatggtaa				990

<210> 8

<211> 993

<212> ДНК

<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 8

```

atgaaaattc cctcactcca gccagcttc aactttttcg cccagcagg atactctgct 60
gccgttgctc ccaatcggtc ggacaatgcc tatgctgatt acgtattgga tataggcaag 120
cgaataccac tttccgcgga agatttaggc aacctatatg aaaatgtcat tcgcgccgtt 180
cgtgacagcc gtagcaagct catagatcag catacggtcg atatgattgg taacactata 240
cttgatgctt tgagccgac acaaaccttt cgtgatgccg taagctatgg cattcataat 300
aaggaggtag acattgggtg cattaataac agaaacgaat acgagctcaa cggagaatcc 360
cccgtaaaag ttgatgatat tcaatcacta acctgtaccg aattatatga atacgatgtc 420
gggcaagaac caattttacc catttgcgag gcaggagaaa acgataacga agagccttat 480
gtcagtttta gtgttgcgcc agatactgac tcttatgaga tgccatcgtg gcagggaagg 540
ctgattcacg agattattca tcatgtgact ggagctagcg atccgtctgg agatagtaat 600
atagagctag gaccacgga gattctcgca cgtcgtgtcg ctcaagagct gggatggact 660
gtccccgact tcataggata tgcagagcca gatcgtgaag ctcatcttag gggacgtaac 720
ctgaatgccc ttcgacaggc ggccatgcca catgaagata atgagaggac tttcttcgaa 780
aggctgggta tgatcagtga tcgatatgag gcgagtcctg atttcacaga gtattccgct 840
gtgtctaaca tagaatatgg atttatccag caacatgatt ttcccgggtt ggctatcgac 900
gataatttac aggatgcaaa tcagatccaa ctctatcatg gagcacctta tatctttaca 960
ttcggggatg tggacaaaca caatcagcgc tga 993

```

<210> 9

<211> 993

<212> ДНК

<213> *Ентеропатогенна E. coli*

<400> 9

```

atgaaaattc cctcattaca gtccaacttc aactttttcg ccccggcagg atactctgct 60
cccattgctc ctaatcgtgc tgaaaatgcc tatgcggatt acgttttgga tataggtaag 120
cgaataccac tttccgcagc agatttaagc aacgtatacg aaagtgtaat acgcgccgtc 180
catgacagcc gtagcaggct tatcgatcag catacagtcg atatgatcgg caacactgta 240
cttgatgctt tgagccgac acagacattt cgtgatgccg taagctatgg cattcataat 300
gagaaggtag acattgggtg cattaataac agaaacgaat acgagcttaa cgaagaatct 360
tctgtcaaaa ttgatgatat tcaatcacta acctgtaacg aattatatga atatgatgtc 420
gggcaagagc caattttccc catttgcgaa gcaggagaaa acgataacga agagccttat 480
gtcagtttta gtgttgcgcc agatactgac tcttatgaga tgccatcgtg gcagggaagg 540
ctgattcacg agattattca tcatgttact ggatctagcg atccatctgg agatagtaat 600
atagagtttag gaccacgga gattctcgca cgtcgtgtcg ctcaagaact gggatggagt 660
gttcccgaact tcaaaggata tgcagagcca gaacgtgaag ctcatcttag gttacgtaac 720
ctgaatgccc ttcgacaggc tgccatgagg catgaagaga atgagagggc tttcttcgaa 780
aggctgggta cgtatcagtga ccgatatgag gcgagtcctg atttcacaga gtattccgct 840
gtgtctaaca taggatacgg atttatccag caacatgatt ttccctggatt ggctataaac 900
gataatttac aggatgcaaa tcagatccaa ctgtatcatg gcgccctta tatttttaca 960
tttggggatg tggacaaaca caatcagcga tga 993

```

<210> 10

<211> 993

<212> ДНК

<213> *Ентерогеморagicна E. coli*

<400> 10

```

atgaaaattc cctcattaca gtccaacttc aactttttcg ccccggcagg atactctgct 60
cccattgctc ctaatcgtgc tgaaaatgcc tatgcggatt acgttttgga tataggtaag 120
cgaataccac tttccgcagc agatttaagc aacgtatacg aaagtgtaat acgcgccgtc 180
catgacagcc gtagcaggct tatcgatcag catacagtcg atatgatcgg caacactgta 240
cttgatgctt tgagccgac acagacattt cgtgatgccg taagctatgg cattcataat 300
gagaaggtag acattgggtg cattaataac agaaacgaat acgagcttaa cgaagaatct 360
tctgtcaaaa ttgatgatat tcaatcacta acctgtaacg aattatatga atatgatgtc 420
gggcaagagc caattttccc catttgcgaa gcaggagaaa acgataacga agagccttat 480
gtcagtttta gtgttgcgcc agatactgac tcttatgaga tgccatcgtg gcagggaagg 540
ctgattcacg agattattca tcatgttact ggatctagcg atccatctgg agatagtaat 600
atagagtttag gaccacgga gattctcgca cgtcgtgtcg ctcaagaact gggatggagt 660
gttcccgaact tcaaaggata tgcagagcca gaacgtgaag ctcatcttag gttacgtaac 720

```

ctgaatgcc	ttcgacaggc	tgccatgagg	catgaagaga	atgagagggc	tttcttcgaa	780
aggctgggta	cgatcagtga	ccgatatgag	gcgagtcctg	atctcacaga	gtattccgct	840
gtgtctaaca	taggatacgg	atctatccag	caacatgatt	ttcctggatt	ggctatcaac	900
gataatttac	aggatgcaaa	tcagatccaa	ctgtatcatg	gcgcccctta	tatttttaca	960
tttggggatg	tggacaaaaca	caatcagcaa	tga			993

<210> 11

<211> 708

<212> ДНК

<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 11

atgagcccta	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
acatcccgac	tcaaatcaga	aaaactggca	atacatctcg	attctgctga	gttaggggtg	300
atagcacact	gcaatgcgga	tgctgaaaac	tcccaggaa	ctggctccga	ctttcactgt	360
aatctgaatg	cagttgaata	tccctgcggg	caaggaaata	gcctggtaga	ctttcatgca	420
tgcatgtgtt	tccatgaact	tctccacgtt	ttccacaatt	taaatggaga	gcgctgaaa	480
gttgagagtt	ctcaaccaga	attacaaaaca	cactccccac	ttttactcga	agaagccagg	540
actgttgggt	tgggtgcttt	ttctgaagaa	gttctttcag	aaaataaatt	tcgtgaagag	600
attgggatgc	cccgagaaac	attctacccg	cacgattcat	ctctcattca	tgatgacaat	660
acagtgactc	agagattcca	gcggaaaaaa	ctgcatccgt	tacttttag		708

<210> 12

<211> 699

<212> ДНК

<213> *Ентеропатогенна E. coli*

<400> 12

atgagcccta	cgtccctcaa	cttgggtatta	catcagtcac	caacgtcgag	ctcaatgtca	60
gatacacagata	tcgagtcctc	tgtaaaaagca	tcgagcggtc	aatggataaa	aaataatccg	120
caacttcggt	tccaggggac	tgatcataat	atataatcagc	agattgaagc	agcactcgat	180
aagattggct	ctacagagac	agggcggtga	ctcctgaatg	ctattgaatc	aatatcccga	240
cttaaatcag	aaacagtggg	aatacacctc	aactcttcca	gactaggagt	tatggcacat	300
agagatatag	atgctgagaa	ccatcggggg	actggttccg	atcttccactg	taatctgaat	360
gcagttgaat	atccctgtgg	ggaggggatt	agcgtggtgg	actttcatgc	gactattgtt	420
tttcatgagt	tgctccatgt	ttccacaaat	ttaaatgggg	agcgtttgaa	agttgagagt	480
tcccgaccag	aatcacaaaa	atactctcca	cttttactcg	aagaagccag	gactgttggg	540
ttgggggctt	tttcagagga	ggtgctttca	gaaaataaat	tccgcgaaga	gattgggatg	600
ccccgtagaa	cctcctaccc	gcacgactca	gctcttatcc	atgatgacaa	tacagtgagt	660
ctgggattcc	aacaggtaa	actgcatcca	ttgcttttag			699

<210> 13

<211> 699

<212> ДНК

<213> *Ентерогеморагічна E. coli*

<400> 13

atgagcccta	cgtccctcaa	cttgggtatta	catcagtcac	caaggtcgag	ctcaatgtca	60
gatacacagata	tcgagtcctc	tgtaaaaagca	tcgagcggtc	aatggataaa	aaataatccg	120
caacttcggt	tccaggggac	tgatcataat	atataatcagc	agattgaagc	agcactcgat	180
aagattggct	ctacagagac	agggcggtga	ctcctgaatg	ctattgaatc	aatatcccga	240
cttaaatcag	aaacagtggg	aatacacctc	aactcttcca	gactaggagt	tatggcacat	300
agagatatag	atgctgagaa	ccatcggggg	actggttccg	atcttccactg	taatctgaat	360
gcagttgaat	atccctgtgg	ggaggggatt	agcgtggtgg	actttcatgc	gactattgtt	420
tttcatgagt	tgctccatgt	ttccacaaat	ttaaatgggg	agcgtttgaa	agttgagagt	480
tcccgagcag	aatcacaaaa	atactctcca	cttttactcg	aagaagccag	gactgttggg	540
ttgggggctt	tttcagagga	ggtgctttca	gaaaataaat	tccacgaaga	gattgggatg	600
ccccgtagaa	cctcctaccc	gcrcgactca	gctcttatcc	atgatgacaa	tacagtgagt	660
ctgggattcc	aacaggtaa	actgcatcca	ttgcttttag			699

<210> 14

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

<400> 14
 tactttaatg aatcacccaa tgtatatgat aagaagtata tatctggcgt aactagagga 60
 gtagctgaac taaaacagga aggatttatt aacgagaaag ccaggcgact tgcttatatg 120
 caagcaatgt attctgtatg tccggaagag tttaaaccta tttccagaaa cgaagctagt 180
 acaccggaag gcagctggct aacagttata tccggaaaac gcccaatggg acagttttct 240
 gtagatagct tatatcatcc tgacttacat gcattgtgtg agcttccgga tatttgttgc 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
 atgtccggaa gagtttaaac ctatttccag aaacgaagct agtacaccgg aaggcagctg 180
 gctaacagtt atatccggaa aacgcccatt gggacagttt tctgtagata gcttatatca 240
 tccgacttca catgcattgt gtgagcttcc ggatatttgt tgcaagatct tccctaaaga 300
 aaacaatgat tttttgtata tagtgattgt gtacagaaat gacagccctc tgggagaaca 360
 acgagcaaat cgatttatag aattatataa tataaaaaga gacatcatgc aggaattaaa 420
 ttatgaatct ccagagttaa aggctgtgaa atctgaaatg attatt 466

<210> 16
 <211> 675
 <212> ДНК
 <213> Ентеропатогенна *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
 gattttacatg cattatgtga gcttccggac atttgttgta agatcttccc taaagaaaat 420
 aatgattttt tatacatagt tgttgtgtac agaaatgaca gccctctagg agaacaacgg 480
 gcaaatagat ttatagaatt atataatata aaaagagata tcatgcagga attaaattat 540
 gagttaccag agttaaaggc agtaaaatct gaaatgatta tcgcacgtga aatgggagaa 600
 atcttttagct acatgcctgg ggaaatagac agttatatga aatacataaa taataaaactt 660
 tctaaaattg agtag 675

<210> 17
 <211> 675
 <212> ДНК
 <213> Ентерогеморагічна *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
 gattttacatg cattatgtga gcttccggac atttgttgta agatcttccc taaagaaaat 420
 aatgattttt tatacatagt tgttgtgtac agaaatgaca gccctctagg agaacaacgg 480
 gcaaatagat ttatagaatt atataatata aaaagagata tcatgcagga attaaattat 540

gagttaccag	agttaaaggc	agtaaaatct	gaaatgatta	tcgcacgtga	aatgggagaa	600
atcttttagct	acatgcctgg	ggaaatagac	agttatatga	aatacataaa	taataaaactt	660
tctaaaattg	agtag					675

<210> 18

<211> 570

<212> ДНК

<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 18

atgtttaccaa	caagtgggttc	ttcagcaa	at	ctttactcat	ggatgtatat	ctcaggaaaa	60
gagaatccctt	cgactccgga	atcagtaagt	gaacttaatc	ataatcattt	tctttctcct		120
gaattacagg	agaaactgga	tggtatgttc	gccatatatt	catgtgccag	aaacaatgat		180
gagcgtgaga	atattttacc	ggagctaagg	gattttgtaa	gtagccta	ggataagaga		240
aacaatgtgt	ttgaggtgat	aaatgaagat	actgatgagg	tgaccggagc	tctgagagcg		300
ggaatgacga	tagaggacag	ggatagttat	atcagggatc	ttttttttct	gcattcattg		360
aaagtaaaaa	ttgaggaaa	cagacaagat	aaagaggatt	ggaaatgtaa	agttttatgat		420
ctgctatgtc	cgcattcattc	ttcagagcta	tatggggatc	tacgggcaat	caaatgcctc		480
gttgaaggat	gcagtgatga	tttttagtcct	tttgatacta	ttaaggtgcc	ggatccttact		540
tacaacaaag	gatctttaca	atgtggatga					570

<210> 19

<211> 519

<212> ДНК

<213> *Citrobacter rodentium*

<400> 19

agcaaatctt	tactcatgga	tgtatatctc	aggaaaagag	aatccttcga	ctccggaatc	60
agtaagtga	cttaatcata	atcattttct	ttctcctgaa	ttacaggaga	aactggatgt	120
tatgttcgcc	atatattcat	gtgccagaaa	caatgatgag	cgtgagaata	tttaccgcga	180
gctaagggat	tttgtaagta	gcctaattgga	taagagaaac	aatgtgtttg	agggtataaa	240
tgaagatact	gatgaggtga	ccggagctct	gagagcggga	atgacgatag	aggacaggga	300
tagttatatc	agggatcttt	tttttctgca	ttcattgaaa	gtaaaaattg	aggaaagcag	360
acaagataaa	gaggattgga	aatgtaaagt	ttatgatctg	ctatgtccgc	atcattcttc	420
agagctatat	ggggatctac	gggcaatcaa	atgcctcgtt	gaaggatgca	gtgatgattt	480
tagtcctttt	gatactatta	aggtgccgga	tcttactta			519

<210> 20

<211> 570

<212> ДНК

<213> *Ентеропатогенна E. coli*

<400> 20

atgtttaccaa	caagtgggttc	ttcagcaa	at	ctttattcat	ggatgtatgt	atcaggaaga	60
ggtaaccctt	cgactccgga	atcagtaagt	gagcttaatc	ataatcactt	tctttctcct		120
gaattacaag	ataaacttga	tggtatgttc	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	agttttataat		420
ctgctatgtc	cgcattcactc	ttcagagcta	tatgggtgatc	tacgagcaat	gaaatgcctc		480
gtggaaggat	gcagtgatga	ttttaatcct	tttgatatta	ttagggatcc	agatccttact		540
tacaacaaag	gatctttaca	atgtggatga					570

<210> 21

<211> 570

<212> ДНК

<213> *Ентерогеморагічна E. coli*

<400> 21

atgtttaccaa	caagtgggttc	ttcagcaa	at	ctttattcat	ggatgtatgt	atcaggaaga	60
ggtaaccctt	cgactccgga	atcagtaagt	gagcttaatc	ataatcactt	tctttctcct		120
gaattacaag	ataaacttga	tggtatgttc	tctatatatt	catgtgccag	aaataataat		180
gagcttgagg	aaatttttca	agagctaagt	gcttttgtaa	gtgggctgat	ggataagaga		240

aatagtgtat ttgaggtgag aaatgaaaat actgatgagg ttgtcggagc gctgagggcg
 ggaatgacga tagaggacag ggatagttat atcagggatc ttttttttct gcattcattg
 aaagtaaaaa ttgaggaaaag tagacaaggc aaagaagatt cgaaatgtaa agttttataat
 ctgctatgtc cgcatacttc ttcagagcta tatggtgatc tacgagcaat gaaatgcctc
 gtggaaggat gcagtgatga ttttaatcct tttgatatta ttaggggtacc agatcttact
 tacaacaaaag gatctttaca atgtggatga

<210> 22

<211> 430

<212> Билок

<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
 305 310 315 320

Thr Pro Gly Leu Lys Pro Asp Thr Ile Leu Trp Trp Ala Gly Ala Thr
 325 330 335

Phe Gly Ala Ala Asp Leu Asn Lys Ala Glu Phe Asp Lys Val Arg Phe
 340 345 350

Thr Asp Tyr Pro Arg Ile Trp Phe His Ala Arg Glu Gly Ala Leu Phe
 355 360 365

Pro Asn Lys Gln Asp Ile Ala Arg Val Thr Gly Ala Asp Ile Lys Ala
 370 375 380

Met Glu Glu Gly Val Pro Val Gly His Gln His Pro Lys Pro Glu Asp
 385 390 395 400

Val Val Ile Asp Ile Glu Gly Gly Asn Ser Pro His His Asn Pro Ser
 405 410 415

Asn Tyr Val Asp Thr Phe Glu Ile Ile Gln Glu Thr Arg Val
 420 425 430

<210> 23

<211> 440

<212> Білок

<213> Ентеропатогенна 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> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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> Білок
 <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> Білок
<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> Білок
<213> Ентеропатогенна *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> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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

101

94206

102

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> Білок

<213> Ентерогеморагічна E. coli

<400> 29

104

[illegible]

105

94206

106

<210> 30
 <211> 330
 <212> Білок
 <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

107					94206					108									
305					310					315					320				
Phe Gly Asp Val					Asp Lys His Asn Gln Arg														
					325					330									
<210> 31																			
<211> 330																			
<212> Білок																			
<213> Ентеропатогенна 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 Ph														

109

94206

110

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> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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

111

94206

112

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> Білок

<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

113

94206

114

210

215

220

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

<210> 34
 <211> 232
 <212> Білок
 <213> Ентеропатогенна 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> Білок
 <213> Ентерогеморарічна E. coli

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (208)..(208)

<223> Xaa = Arg a6o 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> Білок

<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

117

94206

118

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> Білок
 <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> Білок
 <213> Ентеропатогенна 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> Білок
 <213> Ентерогеморагічна 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

```


121

94206

122

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> Білок

<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

123

94206

124

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> Білок

<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> Білок

<213> Ентеропатогенна *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

125

94206

126

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>	Білок
<213>	Ентеростеморагічна <i>E. coli</i>
<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				

127

94206

128

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> Штучный

<220>
<223> Праймер Z6024F

<400> 44
agatctgaag gagatattat gaacattcaa ccgaccatac 40

<210> 45
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер Z6024R

<400> 45
ctcgaggact cttgtttctt cgattatatc aaag 34

<210> 46
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер NT10

<400> 46
ccggtacctc taaccattga cgactcgc 28

<210> 47
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер NT11

<400> 47
aacctgcaga actaggatc tctaattgcc 29

<210> 48
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер NT12

<400> 48
aacctgcagc tgactatcct cgtatatgg 29

129

94206

130

<210> 49
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер NT13

<400> 49
ccgagctcag gtaatgagac tgtcagc

27

<210> 50
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер del1F

<400> 50
ggtaccacca cacagaataa tc

22

<210> 51
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер del1R

<400> 51
cgctagccta tatactgctg ttgggt

26

<210> 52
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер del2F

<400> 52
gctagctgac aggcaactct tggactgg

28

<210> 53
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер del2R

<400> 53
gagctcaaca taatttgatg gattatgat

29

<210> 54
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучный

<220>
<223> Праймер

<400> 54

ttccatatga acattcaacc gacc

24

<210> 55
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучний

<220>
 <223> Праймер

<400> 55
 ggaattcaat aatagctgcc atcc

24

<210> 56
 <211> 135
 <212> Білок
 <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> Білок
 <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

133

94206

134

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> Білок

<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> Білок

<213> Citrobacter rodentium

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)
 <223> Xaa = Ile або 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> Ентерогеморагічна E. coli

```
<400> 60
atgcttttcac cgataaggac aactttccat aactcagtaa atatagtga gagttcacc 60
tgtcaaacgg tttcttttgc aggaaggaa tatgagtaa aggtcattga tgaaaaaacg 120
cctattcttt ttcagtggtt tgaacctaat cctgaacgat ataagaaaga tgaggttcca 180
atagttaata ctaagcagca tccctattta gataatgtca caaatgcggc aaggatagag 240
agtgatcgta tgataggat ttttggtgat ggcgattttt cagtcaacca aaagactgct 300
ttttcaaaa tggaacgaga ttttgaaaat gtaatgataa tctatcggga agatgttgac 360
ttcagtatgt atgacagaaa actatcagat atttatcatg atatttatg tgaacaaagg 420
ttacgaactg aagacaaaag agatgaatac ttggtgaatc tggttagaga agagctgagg 480
gaaatttcaa aggcgcagga ttctttgatt tctatgtatg caaagaaaag aaatcatgca 540
tggtttgatt tcttcagaaa ttttagcctta taaaagcag gagagatatt caggtgcaca 600
tataatacaa agaatacagg tatttcattc ggggaggggt gtatctatct tgatattgat 660
atgatactta caggtaagct tgggtacaata tatgctcctg atggaatttc aatgcatgtg 720
gatcgctcgt atgatatgtt aaatattgaa aatagtcaa taattgttaa ccgtgttaat 780
catcctgctc tacttgaggg actttctttt atgcatagta aagtagatgc tcatccatat 840
tatgatgggt tggggaaagg agttaagaaa tattttaatt ttacaccatt acataattat 900
aatcattttt gtgactttat tgagttaaac caccctaata taatcatgaa cacaagtcag 960
tatacatgca gttcatggta a 981
```

<210> 61
 <211> 531
 <212> ДНК
 <213> Ентерогеморагічна E. coli

```
<400> 61
atgaatgtcc ttcgagctca agtagcatct agcggctcag gggagtttac attaggtaat 60
gagactgtca gcattgtatt taatgaaacc gatgggcgtt ttctatccag cggcagtagt 120
gggggattgc ttactgagtt attcctttat ggggttaata acggccctga agctcttcgc 180
gataggatgc tcagtatgct ttcggactca ggtgaagcac aatcgcaaga gattattcag 240
gacaaaatat ctcaatgtaa gtttcctgtt agttcaggaa atttcagtg cccgccagag 300
tctattcagt gtccaattac actagagaga cccgaagaag gagtgtttgt caaaaattca 360
gatagttcgg cagtatgctg cttatttgat ttgtatgcat tttctcgttt agctagttaa 420
ggctcatatc atccactgac ccgagaacca ataacggcat caatgattat aagtcctgat 480
aaatgtgttt atgatcctat caagggaacc ttcattataa aagatagtta a 531
```

<210> 62
 <211> 912
 <212> ДНК
 <213> Ентерогеморагічна E. coli

```
<400> 62
atgttatcgc cctcttctat aaatttgagg tgttcatgga attctttaac cagaaacctg 60
acttcgcctg ataactgtgt tttatcctct gtaagggatg ctgctgttca ctctgatagc 120
gggacgcaag taacggttgg caacagaaca tatcgtgttg tggtcactga taataagttt 180
tgcgttacaa gagaaagtca tagtggttgt tttactaatc tggtgcacag gttgggatgg 240
cctaaggagg agattagcag aaaaattgag gctatgctga atacatcgcc agtgagcacg 300
actatagaaa gaggtctgtg tcattcgaac agacctgatt tacctccagt ggattatgcg 360
acgccggagt tacctccagc ggattatact caatcagagt tgccgagggt tagcaacaat 420
aaatcacccg tgccaggtaa tgttatttgt aaagggtgta atgctgtcgt gtatgaagat 480
atggaagata caacaaaagt gttgaagatg tttactatat ctcaaagcca tgaagagggtg 540
acaagcgaag ttcgttggtt caatcagtat tatgggtccg ggagtgcaga gaaaatatat 600
```


137

94206

138

```

aatgataatg gaaatgttat tggattataga atgaataaaa taaatgggga atctcttttg 660
gatattccat cattaccagc acaagctgaa caggctatctt acgatatggt tgacagactg 720
gagaaaaaag gaattctttt tgttgatata acagaaacaa atgttttata tgatcgtatg 780
agaaatgaat ttaatccaat agatatatca tcttataatg tttctgatat ttcattggagt 840
gaacatcaag tcatgcaatc ttatcacgga ggaaagctgg atcttattag tgtagtatta 900
agtaagatat aa 912

```

<210> 63

<211> 882

<212> ДНК

<213> Ентерогеморарічна E. coli

<400> 63

```

atgttatcgc catattctgt aaatttgagg tgttcattgga attctttaac cagaaacctg 60
acttcgcctg ataatcgtgt tttatcctct gtaagggatg ctgccgttca ttctgataat 120
ggggcgcaag taaagggttg caacagaaca tatcgtgttg ttgccaccga taataagttt 180
tgcgttacaa gagaaagtca tagtggtgtt tttactaatc tgttgacacg gctgggatgg 240
cctaaggggg agattagcag gaaaattgag gtcattgctga atgcatcacc agtgagcgct 300
gctatggaaa gaggcattgt tcattcgaac agacctgatt tacctcctgt tgattatgca 360
ccgccagagt taccgagtgt ggactataac aggttgtcag tacctggtaa tgttattggc 420
aaagggggga acgctgtagt atatgaagat gctgaggatg caacaaaagt cctgaagatg 480
tttactacat ctcaaagcaa tgaagaggtg acaagcgaag ttcgttgctt caaccaatat 540
tatggtgccc ggagtgcaga aaaaatatat ggcaataatg gtgatattat tggattataga 600
atggataaaa taaatggaga atcgctttta aatatttcgt ccttgccagc acaggctgag 660
catgctattt acgatatggt tgatagactg gagcaaaaag gaattctttt tgtcgataca 720
acagagacaa atgtcttata tgaccgcgcg aagaatgagt ttaatccaat agatatatca 780
tcttataatg tttccgaccg ttcattggagt gaaagtcaaa taatgcaatc ttatcatggc 840
ggaaagcaag atcttattag tgtggtatta agtaaaattt ag 882

```

<210> 64

<211> 153

<212> ДНК

<213> Ентерогеморарічна E. coli

<400> 64

```

atggtaatgc ctggattagt atcatatata tcatcgactt cattcgcgaa tgagatggcg 60
gagatgcgtc agcaggtaat ggaagggcag attggtggat ttctcctggg aggggagaga 120
gttagagttt cttatttatt tcaattgcat taa 153

```

<210> 65

<211> 576

<212> ДНК

<213> Ентерогеморарічна E. coli

<400> 65

```

atgccattaa cctcagatat tagatcacat tcatttaatc ttgggggtgga ggttggtcgt 60
gccgaattg tagccaatgg ggcgcggagat attacagtcg gtggtgaaac tgtcagtatt 120
gtgtatgatt ctactaatgg ggcgttttca tccagtggcg gtaatggcgg attgctttct 180
gagttattgc ttttgggatt taatagtggg cctcgagccc ttggtgagag aatgctaagt 240
atgctttcgg actcagtgga agcacaatcg caagagagta ttcagaacaa aatatctcaa 300
tgtaagtttt ctgtttggtc agagagactt cagtgcgccg ttgaggctat tcagtgtcca 360
attacactgg agcagcctga aaaagggtatt tttgtgaaga attcagatgg ttcagatgta 420
tgtactttat ttgatgcgcg tgcattttct cgtttgggtg gtgaaggctt accccaccca 480
ctgaccgggg aaccaataac ggcattcaata attgtaaaac atgaagaatg catttatgac 540
gataccagag gaaacttcat tataaagggt aattga 576

```

<210> 66

<211> 630

<212> ДНК

<213> Ентерогеморарічна E. coli

<220>

<221> misc_feature

<222> (439)..(439)

<223> n = будь-який нуклеотид

<400> 66

atgcctgtta	ccaccttaag	tatcccaagt	atatctcaat	tatctcctgc	aagagtacag	60
tctttgcagg	atgcagccag	acttgaaaagt	ggaataagaa	tatccattgg	tagtggccaa	120
tattctgttc	actatgtcca	actactggat	ggattttcag	ttgaaccggt	gagaggaggc	180
ttactggata	ggctattggg	gcgtgagcat	cgaatggata	gaagggtgt	ggctctggaa	240
aggcaattaa	atggaggtgt	cgatttttta	agtagtgta	ataactattt	tcagagtgtc	300
atggcagaac	acagagaaaa	taaaacaggt	aataaaatat	taatggaaaa	aataaattct	360
tgtgtatttg	gaacggattc	taatcacttt	tcttgcccgg	agtcattttt	gacatgcccg	420
ataacgctgg	acacacctna	gactggagt	ttcatgagaa	actcacgagg	tgctgagata	480
tgctctctat	atgataagga	tcggttagtg	caacttggtg	aaactggtgg	aactcatcct	540
ctgagtcgag	aacctataac	agaatcaatg	attatgagaa	aagacgaatg	tcactttgat	600
gcaaaaagag	aagctttttg	ttgtaagtga				630

<210> 67

<211> 642

<212> ДНК

<213> Ентерогеморагічна E. coli

<400> 67

atgcctgtag	atttaacgcc	ttatatattta	cctgggggta	gttttttgtc	tgacattcct	60
caagaaacct	tgtctgagat	acgtaatcag	actattcgtg	gagaagctca	agtaagactg	120
ggtgagttga	tggtgtcaat	acgacctatg	caggtaaatg	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	ttatgaggaa	ttcaatgaat	480
tcaaattgtt	gtatgttgta	tgataaaatg	tcattaatat	atcttggtta	aacaagggag	540
gctcatcctt	tgagcaggga	atcaatcgca	gtttcaatga	ttgtagggaag	agataattgt	600
gcttttgact	ctgacagagg	taacttcggt	ttaaaaaatt	aa		642

<210> 68

<211> 642

<212> ДНК

<213> Ентерогеморагічна E. coli

<400> 68

atgcctgtag	atttaacgcc	ttatatattta	cctgggggta	gttttttgtc	tgacattcct	60
caagaaacct	tgtctgagat	acgtaatcag	actattcgtg	gagaagctca	aataagactg	120
ggtgagttga	tggtgtcaat	acgacctatg	caggtaaatg	gatattttat	gggaagtctt	180
aaccaggatg	gtttatcgaa	tgataaatatc	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
tcaaattgtt	gtatgttgta	tgataaaatg	gcattaatac	atcttggtta	aacaagggag	540
gctcatcctt	tgagcaggga	atcaatcgca	gtttcaatga	ttgtagggaag	agataattgt	600
gcttttgacc	ctgacagagg	taacttcggt	ttaaaaaatt	aa		642

<210> 69

<211> 630

<212> ДНК

<213> Ентерогеморагічна E. coli

<400> 69

atgcctgtta	ccaccttaag	tatcccaagt	atatctcaat	tatctcctgc	aggagtacag	60
tctttgcagg	atgctgccag	acttgaaaagt	ggaataagaa	tatccattgg	tagtggccaa	120
tattctgttc	actatgtcca	gctactggat	ggattttcag	ttgaaccggt	gagaggaggc	180
ttactggata	ggctattggg	gcgtgagcat	cgaatggaga	gaagggtgt	ggctctggaa	240
aggcaattaa	atggaggtgt	cgatttttta	agtagtgta	ataactattt	tcagagtgtc	300
atggcagaac	acagagaaaa	taaaacaagt	aataaaatq	taatggaaaa	aataaattct	360
tgtttattta	gacctgattc	taatcacttt	tcttgcccgg	agtcattttt	gacatgcccg	420

141

94206

142

ataacgctgg	acacacctga	gactgggggtg	ttcatgagaa	actcacgagg	tgctgagata	480
tgctctctat	atgataagga	cgcgttagtg	caacttggtg	aaactgggtg	agctcatcct	540
ctgagtcgag	aacctataac	agaatcaatg	attatgagaa	aagatgaatg	tcactttgat	600
acaaaaagag	aagctttttt	ttgtaagtga				630

<210> 70

<211> 576

<212> ДНК

<213> Ентерогеморагічна E. coli

<400> 70

atgccattaa	cctcagatat	tagatcacat	tcatttaatc	ttgggggtgga	ggttgttcgt	60
gcccgaattg	tagccaatgg	gcgcggagat	attacagtcg	gtggtgaaac	tgtagctatt	120
gtgtatgatt	ctactaatgg	gcgcttttca	tccagtggtg	gtaatggcgg	attgctttct	180
gagttattgc	ttttgggatt	taatagtggg	cctcgagccc	ttgggtgagag	aatgctaagt	240
atgcttttcg	actcaggtga	agcacaatcg	caagagagta	ttcagaacaa	aatatctcaa	300
tgtaagtttt	ctgtttgtcc	agagagactt	cagtgcctgc	ttgaggctat	tcartgtcca	360
attacactgg	agcagcctga	aaaagggtatt	tttgtgaaga	attcagatgg	ttcagatgta	420
tgtactttat	ttgtgcccgc	tgcattttct	cgtttggttg	gtgaaggctt	acccaccca	480
ctgacccggg	aaccaataac	ggcatcaata	attgtaaaac	atgaagaatg	catttatgac	540
gataccagag	gaaacttcgt	tataaagggt	aattga			576

<210> 71

<211> 510

<212> ДНК

<213> Ентерогеморагічна E. coli

<400> 71

atggacgctt	ttattgtaga	tctgtttcaa	ggggaactat	attcgggttt	aagccataca	60
gaactagccg	atatcattag	attggctgat	tctgttgaaa	atcaattgaa	tgagggcaat	120
tcattttctt	atgtattcag	tacatatatg	gggcagggtta	tttctgaatt	tatgcatagt	180
aatgataaca	gaattgaatt	gttacagcgg	cgattacatt	catgttcatt	tttagttaat	240
attgaagaaa	tgtctttacat	agatgaagca	ttacagtgcc	cgattacgct	ggcaattcct	300
caacgagggt	tttttttaag	aaatgctgaa	ggttccagag	tatgtagttt	atatgatgaa	360
atggctcttt	ctcgtataat	taatgatggg	atgcatcacc	cactaagcag	agagccaata	420
acattatcaa	tgcttggtgg	cagagagcag	tgtgagtttg	attgcagtat	cggtcacttt	480
acggtgagga	gtgattgtta	ttcagtgtag				510

<210> 72

<211> 231

<212> ДНК

<213> Ентерогеморагічна E. coli

<400> 72

atggcagacc	gcaaacagca	ccgcgctatc	gcggagcgtc	gtcacatcca	gactgaaatc	60
aaccgcagac	tttcccgcgc	atcacgcgtc	gcgcaaatca	tgacatcaa	tatgctgcat	120
gagcgcagcc	acgcactatc	aaacattttat	tccgcctctg	ttttcagcta	tctggcggat	180
gatctgcacg	agtttcaaca	gtcatccag	cagcaaaaca	aactccatta	a	231

<210> 73

<211> 176

<212> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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		

143

94206

144

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> Білок
 <213> Ентеремопарічна 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

145

94206

146

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> Білок
 <213> Ентереморарічна 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

147

94206

148

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> Білок
 <213> Ентерогеморагічна 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> Білок
 <213> Ентерогеморагічна 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

149

94206

150

```

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> Білок
<213> Ентерогеморагічна E. coli

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (147)..(147)
<223> Хаа = будь-яка амінокислота

<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

```

151

94206

152

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> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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

153

94206

154

<212> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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

```

155

94206

156

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> Білок
 <213> Ентерогеморагічна 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

157

94206

158

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> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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> Білок

<213> Ентерогеморагічна 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

159

94206

160

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

Послідовність ДНК NleA *Citrobacter rodentium*

ATGAACATTCAACCGAACATACATTCCGGAATCACCACACAGAATAATCAACAACATCATCAGCAGAA
CAAGTGCCTGTCTCTAGCTCAATACCGCGATCAGATTTACCTCCAAATTGCGAAGCTGGATTGTGTG
CATATTCAGAGGATATACAGCAACATGTACCGGAATGTGGTGAAACAACGGCTCTATTAAGCTTGATA
AAAGATGAAGGCTGCTCTCAGGACTAGATAAATATCTTGCTCCTCACCTTGAAGAAGGCTCCCTTGGG
AAAAAGCATTGGATACGTTTGGTTTATCAATGTTACTCAAATGGCATTAGAGATACCCAGTTCGGT
CCAGGCATATCTGGTAAATATGGTGTTCAGATGAACATTGTAAAACAGACATACATCCAACAACCGGG
AACTATTTTTTACAGCTATTTCTCTGCATGACGAAATAGGTTTAACTTCAAAGATCTTCTGGCCCA
TTAAAAAATGCATTAACCAACAGCAGTATATCGGCTACTGCATCGACTGTAGCCCCACACCAACGAC
CCAATGCCATGGTTTGGATTAACTGCTCAAGTGGTTCGTAATCATGGTGTAGAACTTCCTATAGTCAAA
ACCGAAAATGGATGGAAGCTTGTAGGGGAAACACCTCTTACTCCAGATGGCCCCAAAGCCAATTATACG
GAAGATGGGTTATCAGGCCGGGAGAGCAGATTTAAATATGGAACATCGCCATTACAGGCAACTCTT
GGACTGGAGTTTGGTGCGCATTTTAAAGTGGGATTTAGATAATCCTAATACCAATATGCCATCCTTACC
AATGCTGCCGCAATGCTATTGGTGCTGCTGGAGGGTTTTCGGGTATCCAAAGTCCCGGCATAGATCCA
ATGCTGTCCCTCATGTGCGTGCAATGCTTGGGCAAGCAGCGGGGCATGCCGTACAATGTAATACCCCC
GGATTAAAGCCAGACACTATTTTATGGTGGGCAGGCGCGACATTTGGAGCTGCTGATTTAATAAAGCC
GAATTTGATAAAGTGCAGTTCACTGACTACCTCGTATATGGTTCCATGCACGGGAAGGAGCTTTATTC
CCAAATAAGCAAGACATTGCCCGTGTAAACAGGCGCAGACATAAAAGCTATGGAAGAAGGCGTACCCGTT
GGACATCAACATCCAAAACCGGAGGATGTGGTCATCGATATCGAAGGTGGCAATTCACCACATCATAAT
CCATCAAAATTATGTTGACACCTTTGAAATAATCCAAGAAACAAGGGTCTAA (SEQ ID NO:1)

Фиг. 1A

Послідовність білка NleA *Citrobacter rodentium*

MNIQPNIHSGITTONNQHHNAEQVPVSSSIPRDLPPNCEAGFVVHIPEDIQQHVPECGETTALLSLI
KDEGLLSGLDKYLAPHLEEGSLGKKALDTFGLFNVQMALEIPSSVPGISGKYGVQMNIVKPDHPTTG
NYFLQLFPLHDEIGFNFKDLPGPLKNALTNSSISATASTVAPTNDPMPWFGLTAQVVRNHGVELPIVK
TENGWKLVGETPLTPDGPKANYTEEWVIRPGEADFKYGTSPLQATLGLFEGAHFKWDLDNPNTKYAILT
NAAANAIGAAGGFAVSKVPGIDPMLSPHVGMGLQAAGHAVQCNTPGLKPDITLWWAGATFGAADLNKA
EFDKVRFTDYPRIWFHAREGALFPNKQDIARVTGADIKAMEEGVPVGHQHPKPEDVVIDIEGGNSPHHN
PSNYVDTFEIIQETRV (SEQ ID NO:22)

Фиг. 1B

Послідовність ДНК NleA ентеропатогенної *E. coli*

atgaacattcaaccgatcgtaacatccggaatcaccacacaaaaaatcgacatcatcacgcagaacaa
acgtccoctacacaaataccgcaatccgaattacctaattggatgcgaaacgggatttgtgttcataatc
ccagaggatatgcagcgacatgcaccggaatgcggtgaaacaacagctctactgagcttgataaaagat
gaaggctctgctctctgggctggataaatatcttgacacctcatcttgaagaaggctctgcaggaaaaaa
gcattggatatgtttggtttattcaatgtctctcagatggcattagaaataccagcaccgttccgggt
atctctggtaaatatggtgtocagctaaacattgtaaaaccagatattcatcctacatcaggtaattat
tttttacagatatccctttgcatgatgaaatagggtatttaatttttaagaccttctgtgtccattaaaa
aatgcattaagcaacagcaatataccaaaccactgtatcgactgctgcatccactattgcatcagccact
acttogacggtaaccacggctcaaaagacccaataccatgggttggattaacagctcaagtagttcgt
aatcatgggtgtggaacttctatagtaaaaactgaaaatggatggaagcttgttggaagaaactcctct
actcctgatggcccaagcaaatatactgaagagtgggtgatcagacggggagaagcagatttttaa
tatggtgcatctccactacaggcaactctagggtctggagtttggcgacatttcaagtgggatttagat
aacccataactaaatatgccgttcttaccatgctgcccgaatgcgcttgggtgtgtagggggattt
gcagtatccagatttactggtacagatccaatgttaagtcctcatatcggtgcaatgggtgggcaagca
gcccgggcatgccatacagataatacccccgattaaagccagacactattttatgggtggcaggtact
actcttgactggctgatttaaaacaaggccgagtttggagaggccagattcactgactatcctcgtata
tggtggcatgcaagagaagggtgccattttcccaataaaagcagatattgaacatgccacaggggctgat
atacgcgcaatggaagaagggtgtatctggtggacaacggcatccaaatccagaggatgtggtcatcaat
atcgaaagcaataactcaccacatcataaccatcaaattatgttgataccgttgatataatccaagaa
acaagagtctaa (SEQ ID NO:2)

Фіг. 1C

Послідовність білка NleA ентеропатогенної *E. coli*

MNIQPIVTSGITTONNRHHAEQTSPTQIPQSELPNGCETGFVVHIFEDMQRHAPECGETTALLSLIKD
EGLLSGLDKYLAPHLEEGSAGKKALDMFGLFNVSQMALEIPSTVPGISGKYGVQLNIVKPDHPTSGNY
FLQIFPLHDEIGINFKDLPGPLKNALSNSNIPTTVSTAASITASATSTVTTASKDPIPWFGLTAVVVR
NHGVELPIVKTENGWKLVGETPLTPDGPKNANYTEEWVIRPGEADFKYGASPLQATLGLEFGAHFKWDL
NPNTKYAVLTNAANALGAVGGFAVSRTGTDPMLSPHIGAMVGGQAAGHAIQYNTPLKPDITILWWAGT
TLGLADLNKAEFGEARFTDYPRIWWHAREGAIFPNKADIEHATGADIRAMEEGVSVGQRHPNPEDVVIN
IESNNSPHHNPSNYVDITVDIIQETRV (SEQ ID NO:23)

Фіг. 1D

Послідовність ДНК NleA ентерогеморагічної *E. coli*

ATGAACATTCAACCGAACCATACAACTCTGGAATCACCTCACAAAACAATCAACATCATCAACAGAACAA
ATACCTCTACACAAATACCGCAATCCGAATTACCTCTAGGATGCCAAGCTGGATTTGTGTAAATATT
CCAGATGATATACAGCAACATGCACCGGAATGCGGTGAAACAACAGCTCTACTGAGCTTGATAAAAGAT
AAGGTCTGCTCTCAGGGCTAGACGAATATATAGCTCCTCACCTTGAAAGAGGATCCATAGGALAAAAA
ACATTGGATATGTTTGGTTTATTCATGTATTACCCAAATGGCATTAGAGATACCTAGTTCCGTTTCAGGC
ATCTCTGGTAAATATGGTGTCCAGCTAAACATTGTAAAACCAGATATTATCCTACATCAGGTAATTAT
TTTTTACAGATATTCCCTCTGCATGATGAAATAGGTTTTAATTTTAAAGACCTTCCTGGCCCGTTAAAA
AATGCATTAAGCAACAGTAATATATCAACCACTGCAGTGTGCACTATTGCATCGACTGGAACATCAGCC
ACTACTTCGACGGTAACCACCGAGCCAAAAGACCCAATACCATGGTTTGGATTAAACAGCTCAAGTGGTT
CGTAATCATGGTGTAGAACTTCTATAGTCAAACTGAAATGGATGGAAGCTTGTTGGAGAAACACCA
CTTACTCCTGATGGGCCGAAAGCAAATTACACGGAGGAGTGGGTTATCAGACCGGGAGAAGCAGATTTT
AAATATGGTGCATCTCCATTACAGGCAACTCTAGGGCTGGAGTTTGGCGCACATTTCAAGTGGGATTTA
GATAACCTTAATACTAAATATGCCGTTCTTACCAATGCTGCGCAAAATGCGCTTGGTGCTTTAGGGGGA
TTTGCAGTATCCAGATTTGCTAGTACAGATCCAAATGTTAAGTCCTCATATCGGTGCAATGGTTGGGCAA
GCAGCAGGGCATGCCATACAGTATAATACCCCTGGATTAAAGCCAGACACTATTTTATGGTGGGCTGGT
GCGACACTGGGGGCTGCCGATTTAAACAAGGCCGAGTTTGAAGTAGCTAGATTCACTGACTATCCTCGT
ATATGGTGGCAGCAAGAGAAGGAGCTATTTCCCAATAAAGCAGATATTGAACATGCCACAGGTGCT
GATATACCGCAATGGAAGAAGGTATCCCTGTTGGACAGCGGCATCCAAATCCAGAGGATGTGGTAATC
GATATCGAAAGCAATGGCTTACCACATCATTAATCCATCAATCATGTTGATATCTTTGATATAATCCAA
GAAACAAGAGTCTAA (SEQ ID NO:3)

Фіг. 1E

Послідовність білка NleA ентеропатогенної *E. coli*

mnigptiqsgitsqnnqhhqteqipstqipqselpgicqagfvvniipddiqqhapedgetallslid
kgllsgldeyiaiphleegsigkktldmfglfnvtqmaleipssvsgisgkygvqlnivkpdihptsgny
flqifplhdeigfnfkdlpgplknalsnsnisttastvstiatstgtsattstvttepkdpipwfgltaqvv
rnhgvelpivktengwklvgetpltpdgpkanyteewvirpgeadfkypasplqatlglefahfkwdl
dnpntkyavltnaaanalgalfavsfastdpmlsphigamvggaaghaiqyntpglkdtilwwag
atlgadlnkaefevarftdypriwwharegaifpnkadiehatgadirameegipvgqqrhpnpedvvi
diesnglphhnpshvdiidietrv (SEQ ID NO:24)

Фіг. 1F

Послідовність ДНК NleB *Citrobacter rodentium*

tattctttttcagtggtttgaagcAAGGCCAGAGCGATACGGAAAAGGTGAAGTACCGATATTGAATAC
CAAAGAGCATCCGTATTTGAGCAATATTATAAATGCTGCAAAAATAGAAAATGAGCGcgTAATaGGAGT
ACTGGTAGACGGAGACTTTACTTATGAGCAAAGAAAAGAAATTTCTCAGTCTTGAAGATGAACATCAAAA
TATAAAGATAATATATCGGGAAAATGTTGATTTCAGTATGTATGATAAAAACTGTCTGATATTTATCT
TGAAAATATTTCATGAACAAGAATCATATCCAGCGAGTGAGAGAGATAATTATCTGTTaGGcTTaTTAAG
AGAAGAGTTAAAAAATATTCCATACGGAAAGGACTCTTTGATTGAATCATATGCAGAAAAAGAGGTCA
TACTTGGTTTGATTTTTTAGAACTTGGCGGTATTGAAGGGGGGGGGTGTGTACAGAGACGGGTAA
AACTGGATGCCATAACATATCTCCATGTGGGGGATGTATATCTTGATGCAGATATGATTATTACTGA
TAAATTAGGTGTCCTGTATGCTCCTGATGGTATcgtgtgcatgtagattgtaatgatgaga (SEQ
ID NO:4)

Фіг. 2A

AAGGCCAGAGCGATACGGAAAAGGTGAAGTACCGATATTGAATACCAAAGAGCATCCGTATTTGAGCAA
TATTATAAATGCTGCAAAAATAGAAAATGAGCGTAATGGAGTACTGGTAGACGGAGACTTTACTTATGA
GCAAGAAAAGAAATTTCTCAGTCTTGAAGATGAACATCAAAATATAAAGATAATATATCGGGAAAATGT
TGATTTTCAGTATGTATGATAAAAACTGTCTGATATTTATCTTGAATAATTTCATGAACAAGAATCATA
TCCAGCGAGTGAGAGAGATAATTATCTGTTGGTTTTAAGAGAAGAGTTAAAAAATATTCCATACGGAAA
GGACTCTTTGATTGAATCATATGCAGAAAAAGAGGTCACTTGGTTTGATTTTTTAGAACTTGGC
GGTATTGAAGGGGGGGGGTGTGTACAGAGACGGGTAAACTGGATGCCATAACATATCTCCATGTGG
GGGATGTATATATCTTGATGCAGATATGATTATTACTGATAAATTAGGTGTCCTGTATGCTCCTGATGG
TAT (SEQ ID NO:5)

Фіг. 2B

Послідовність білка NleB *Citrobacter rodentium*

ILFQWFPEARPERYKGGEVPIILNTKEHPYLSNIIINAAKIENERVIGVLVDGDFTYEQRKEFLSLEDEHQN
IKIIYRENVDFSMYDKKLSDIYLENIHEQESYPASERDNYLLGLLREELKNIPYKDSLIESYAEKRGH
TWFDFFRNLAFLKGGGLFTETGKTGCHNISPCGGCIYLDADMIITDKLGVLYAPDGIAVHVDCNDE
(SEQ ID NO:25)

Фіг. 2C

RPERYGKGEVPIILNTKEHPYLSNIINA AKIENERVIGVLVDGDFTYEQRKEFLSLEDEHQNIKIYREN
VDFSMYDKKLSDIYLENIHEQESYPASERDNYLLGLLREELKNIIPYKDSLIESYAEKRGHTWFDFFRN
LAVLKGGGLFTETGKTGCHNISPCGGCIYLDADMIITDKLGVLYAPDG (SEQ ID NO:26)

Фіг. 2D

Послідовність ДНК NleB ентеропатогенної *E. coli*

atgttatcttcattaaatgtccttcaatccagcttcagaggaaagacagctttatcaaatagtacactt
ctccagaaaagtttcttttctggtgaaaagaatattctctggaacctattgatgaaagaacccctattctt
tttcagtggtttgaagcaaggccagagcgatacgaataaaggagaagtaccaatattgaataccaaagaa
catccgtattttgagcaatattataaatgctgcataaataagaaatgagcgataatcggtgtgctggtta
gatggaaaattttacttatgaacaaaaaaggaaatttctcaatcttgaaaatgaacatacaaatataaaa
ataatctacogagcagatgtggatttcagcatgtatgataaaaaactatctgatattttaccttgaaaat
atccataaacaagaatcataccctgccagtgagaggataattatctgttaggcttattaagagaagag
ttaaaaaatatcccagaaggtaaggactctttgattgagtcataatgcagaaaaaagagaacataacttg
tttgattttttcaggaatttgccatattgaaggctggaagtttgtttacagagacgggaaaaaactgga
tgccataacatatcgccctgtagcggatgtatatattcttgatgccgacatgattattaccgataaatta
ggagtctctgtatgctcctgatggatcgctgtgcagtagattgtaatgatgagataaaaaagcttgaa
aatggtgcgatagttgtcaatcgtagtaataatcatccagcattacttgcaggcctcgatattatgaagagt
aaagttgacgctcatccatattatgatggtctaggaagggtatcaagcggcattttaactattcatcg
ttacacaattataatgctttttgtgattttattgaatttaagcatgaaaatattataccgaataaccagt
atgtataaccagcagttcatggtta (SEQ ID NO:6)

Фіг. 2E

Послідовність білка NleB ентеропатогенної *E. coli*

MLSSLNLVQSSFRGKTALSNSTLLQKVSFAGKEYSLEPIDERTPILFQWFEARPERYKGEVPIILNTKE
HPYLSNIINA AKIENERIIGVLVDGNFTYEQKKEFLNLENEHQNIKIYRADVDFSMYDKKLSDIYLEN
IHKQESYPASERDNYLLGLLREELKNIPEGKDSLIESYAEKREHTWFDFFRNLA LKAGSLFTETGKTG
CHNISPCSGCIYLDADMIITDKLGVLYAPDGI AVHVCNDEIKSLENGAIVNRSNHPALLAGLDIMKS
KVDAPHYYDGLGKGKIKRHFNYSSLHNYNAFCDFIEFKHENIIPNTSMYTSSSW (SEQ ID NO:27)

Фіг. 2F

Послідовність ДНК NleB ентерогеморагічної *E. coli*

ATGTTATCTTCATTAAATGTCCTTCAATCCAGCTTCAGAGGAAAGACAGCTTTATCAAATAGTACACTT
CTCCAGAAAAGTTTCTTTTCTGCTGGAAGAAGATATCCTCTGGAACCTATTGATGAAAAAACCCCTATTCTT
TTTCAGTGGTTTGAAGCAAGGCCAGAGCGATACGAAAAAGGAGAAGTACCAATATTGAATACCAAAGAA
CATCCGTATTTGAGCAATATTATAATGCTGCAAAAATAGAAAATGAGCGTATAATCGGTGTGCTGGTA
GATGGAATTTTACTTATGAACAAAAAAGGAATTTCTCAGTCTTGAAAATGAATATCAAAATATAAAA
ATAATCTACCGAGCAGATGTGGATTTCAGCATGTATGATAAAAACTATCTGATATTTACCTTGAAAAT
ATCCATAAACAAGAATCATACCCCTGCCAGTGAGAGGGATAATTATCTGTTAGGCTTATTAAGAGAAGAG
TTAAAAATATCCAGAAAGGTAAGGACTCTTTGATTGAGTCATATGCAGAAAAAGAGAACATCTTGG
TTTGATTTTTTTCAGGAATTTGGCCATGTTGAAGGCTGGAAGTTTGTTTACAGAGACGGGAAAACTGGA
TGCCATAACATATCGCCCTGTAGCGGATGTATATATCTTGATGCCGACATGATTATTACCGATAAATTA
GGAGTCTGTATGCTCCTGATGGTATCGCTGTGCATGTAGATTGTAATGATGAGATAAAAAGCTTGA
AATGTTGCGATAGTTGTCAATCGTAGTAATCATCCAGCATTACTTGCAGGCCCTCGATATTATGAAGAGT
AAAGTTGACGCTCATCCATATTATGATGGTCTAGGAAAGGGTATCAAGCGGCATTTTAACATTTATCG
TTACACGATTATAATGCTTTTGTGATTTTATTGAATTTAAGCATGAAAATATTATACCGAATACCAGT
ATGTATACCTGCAGTTCATGGTAA (SEQ ID NO:7)

Фіг. 2G

Послідовність білка NleB ентерогеморагічної *E. coli*

mlsslrvlqssfrgkltalsnstllqkvsfagkeyplepidektpilfqwfearperyekgevpilntke
 hpylsnliinaakieneriigvlvdgnftyegkkeflsleneyqnikiiyradvdfsmysdkklsdiyen
 ihkqesypaserdnyllgllreelknipegkdsliesyakrehtwdfdrnlamlkagslfttgktg
 chnispcsgoiyldadmiitdklgvlyapdgiavhvdndeikslengaivvnrsnphallagldimks
 kvdahpyydgkglgkikrhfnyslhdynafcdfiefkheniipntsmyscsw (SEQ ID NO:28)

Фіг. 2H

MLSPIRTTFHNSVNIQSSPCQTVSFAGKEYELKVIDEKTPILFQWFEPNPERYKKDEVPIVNTKQHPY
 LDNVTNAARIESDRMIGIFVDGDFSVNQKTAFSKLERDFENVMIYREDVDFSMYDRKLSDIYHDIICE
 QRLRTEDKRDEYLLNLEKELREISKAQDSLISMYAKKRNHAWFDFRNLALLKAGEIFRCTYNTKNHG
 ISFGEGCIYLDMDMILTGLGTIYAPDGISMHVDRRNSVNIENSAIIVNRSNHPALLEGLSFMHRSKVD
 AHPYYDGLGKGVKKYFNETPLHNYNHFCDFIEFNHPNIIIMNTSQYTCSSW (SEQ ID NO:29)

Фіг. 2I

Послідовність ДНК NleB ентерогеморагічної *E. coli*

atgctttcac cgataaggac aactttccat aactcagtaa atatagtgca gagttcaccc
 tgtcaaacgg tttcttttgc aggaaaggaa tatgagttaa aggtcattga tgaaaaaacg
 cctattcttt ttcagtggtt tgaacctaat cctgaacgat ataagaaaga tgagggtcca
 atagttaata ctaagcagca tccctattta gataatgtca caaatgcggc aaggatagag
 agtgatcgta tgataggtat ttttggtgat ggcgattttt cagtcaacca aaagactgct
 ttttcaaaat tggaacgaga ttttgaaaat gtaatgataa tctatcgga agatgttgac
 ttcagtatgt atgacagaaa actatcagat atttatcatg atattatatg tgaacaaagg
 ttacgaactg aagacaaaag agatgaatac ttggtgaatc tgtagagaa agagctgagg
 gaaatttcaa aggcgcagga ttctttgatt tctatgtatg caaagaaaag aaatcatgca
 tggtttgatt tcttcagaaa tttagcotta ttaaaagcag gagagatatt caggtgcaca
 tataatacaa agaatacagg tatttcatto ggggaggggt gtatctatct tgatatggat
 atgatactta caggtaagct tggtaacaata tatgctcctg atggaatttc aatgcatgtg
 gatcgctgta atgatatgtt aaatatgaa aatagtgcga taattgttaa ccgtagtaat
 catcctgctc tacttgaggg actttctttt atgcatagta aagtagatgc tcatccatat
 tatgatggtt tggggaaagg agttaagaaa tattttaatt ttacaccatt acataattat
 aatcattttt gtgactttat tgagtttaac caccctaata taatcatgaa cacaagtcag
 tatacatgca gttcatggt a (SEQ ID NO:60)

Фіг. 2J

Послідовність ДНК NleC *Citrobacter rodentium*

ATGAAAATTCCCTCACTCCAGCCCAGCTTCAACTTTTTCGCCCCAGCAGGATACTCTGCTGCCGTTGCT
 CCCAATCGTTCGGACAATGCCTATGCTGATTACGTATTGGATATAGGCAAGCGAATACCACTTTCCGCG
 GAAGATTTAGGCAACCTATATGAAAATGTCATTCCGCGCCGTTCCGTGACAGCCGTAGCAAGCTCATAGAT
 CAGCATACGGTCGATATGATTGGTAACACTATACTTGATGCTTTGAGCCGATCACAAACCTTTTCGTGAT
 GCCGTAAGCTATGGCATTCTATAAAGGAGGTACACATTGGTTGCATTAAATACAGAAACGAATACGAG
 CTCAACGGAGAATCCCCCGTCAAAGTTGATGATATTCAATCACTAACCTGTACCGAATTATATGAATAC
 GATGTCGGGCAAGAACCAATTTTACCCATTTGCGAGGCAGGAGAAACGATAACGAAGAGCCTTATGTC
 AGTTTTAGTGTTCGCCAGATACTGACTCTTATGAGATGCCATCGTGGCAGGAAGGGCTGATTACCGAG
 ATTATTCATCATGTGACTGGAGCTAGCGATCCGCTCGGAGATAGTAATATAGAGCTAGGACCCACGGAG
 ATTCTCGCACGTCGTGTCGCTCAAGAGCTGGGATGGACTGTCCCGACTTCATAGGATATGCAGAGCCA
 GATCGTGAAGCTCATCTTAGGGGACGTAACCTGAATGCCCTTCGACAGGCGGCCATGCGACATGAAGAT
 AATGAGAGGACTTTCTTCGAAAGGCTGGGTATGATCAGTGATCGATATGAGGCGAGTCCTGATTTTACA
 GAGTATCCGCTGTGTCTAACATAGAATATGGATTTATCCAGCAACATGATTTTCCCGGGTTGGCTATC
 GACGATAATTTACAGGATGCAAATCAGATCCAACCTCTATCATGGAGCACCTTATATCTTTACATTCGGG
 GATGTGGACAAACACAATCAGCGCTGA (SEQ ID NO:8)

Fig. 3A

Послідовність білка NleC *Citrobacter rodentium*

MKIPSLQPSFNFFAPAGYSAAVAPNRS DNAYADYVLDIGKRIPLSAEDLG NLYENVIRAVRDSRSKLID
 QHTVDMIGNTILDALSRSTFRDAVSYGIHNKEVHIGCIKYRNEYELNGESPVKVDDIQSLTCTELYEY
 DVGQEPILPICEAGENDNEEPYVSFSVAPDTSYEMPSWQEGLIHEIIHHVTGASDPGSDSNIELGPTE
 ILARRVAQELGWTVPDFIGYAE PDREAH LRGRNLNALRQAAMRHEDNERTFFERLGMISDRYEASPDFT
 EYSAVS NIEYGF IQQHDFPGLAIDDNLQDANQIQLYH GAPIYIFTFGDV DKNQR (SEQ ID NO:30)

Fig. 3B

Послідовність ДНК NleC ентеропатогенної *E. coli*

atgaaaattccctcattacagttccaactttcaacttttccgccccggcaggataactctgctcccatttgct
 cctaactcgtgctgaaaatgcctatgcggtattacgttttggatataggttaagcgaataccactttccgca
 gcagatttaagcaacgtatagcaagtgtaatacgcgcgctccatgacagccgtagcaggttatcgat
 cagcatacagtcgatatgatcggcaacactgtacttgatgctttgagccgatcacagacatttcgtgat
 gccgtaagctatggcattcataatgagaaggtacacattggttgcatataacagaaacgaatacagag
 ctaacgaagaatcttctgtcaaaattgatgatattcaatcactaacctgtaacgaattatatgaatat
 gatgtcgggcaagagccaattttcccatgttgcgaagcaggagaaaacgataacgaagagccttatgtc
 agtttttagtggttgcgcagataactgactcttatgagatgccatcgtggcaggaaggactgattcacgag
 attattcatcatgttactggatctagcgtatccatctggagatagtaataatagagtttaggacccaccgag
 attctcgacgtcgtgtcgtcgaagaactgggagtgaggtgttcccgacttcaaaggatatgcagagcca
 gaacgtgaagctcatcttaggttacgtaacctgaatgcccttcgacaggctgccatgaggcatgaagag
 aatgagagggctttcttcgaaaggctgggtacgatcagtgacgatgatgaggcaggtcctgatttcaca
 gagtattocgctgtgtcctaacaataggtacggttatccagcaacatgattttcctggattggctatc
 aacgataatttacaggatgcaaatcagatccaactgtatcatggcgcccttatatttttacatttggg
 gatgtggacaaaacacaatcagcgatga (SEQ ID NO:9)

Fig. 3C

Послідовність білка NleC ентеропатогенної *E. coli*

MKIPSLQSNFNSAPAGYSAPIAPNRAENAYADYVLDIGKRIPLSAADLSNVYESVIRAVHDSRSLID
QHTVDMIGNTVLDALSRSTFRDAVSYGIHNEKVHIGCIKYRNEYELNEESSVKIDDIQSLTCNELY
DVGQEPFIPICEAGENDNEEPYVSFSVAPDTSYEMPSWQEGLIHEIIHHVTGSSDPSGDSNIELGPTE
ILARRVAQELGWSVPDFKGYAEPEREHLRLRLNALRQAAMRHEENERAFFERLGTISDRYEASPDFT
EYSAVSNIGYGFIIQHDFFGLAINDNLQDANQIQLYHGAPYIFTFGDVKHNQR (SEQ ID NO:31)

Фіг. 3D

Послідовність ДНК NleC ентерогеморагічної *E. coli*

ATGAAAATTCCTCATACAGTCCAACTTCAACTTTTCCGCCCGGCAGGATACCTCTGCTCCCATTTGCT
CCTAATCGTGCTGAAAATGCCTATGCGGATTACGTTTGGATATAGGTAAGCGAATACCCTTTCCGCA
GCAGATTTAAGCAACGTATACGAAAGTGTAATACGCGCCGTCATGACAGCCGTAGCAGGCTTATCGAT
CAGCATACAGTCTGATATGATCGGCAACACTGTACTTGATGCTTTGAGCCGATCACAGACATTTCTGAT
GCCGTAGCTATGGCATTCATAATGAGAAGGTACACATTGGTTGCATTAAATACAGAAACGAATACGAG
CTTAACGAAGAATCTTCTGTCAAAATTGATGATATTCATCACTAACCTGTAACGAATTATATGAATAT
GATGTCGGGCAAGAGCCAATTTTCCCATTTGCGAAGCAGGAGAAAACGATAACGAAGAGCCTTATGTC
AGTTTTAGTGTTGCGCCAGATACTGACTCTTATGAGATGCCATCGTGCGCAGGAGGACTGATTCACGAG
ATTATTCATCATGTTACTGGATCTAGCGATCCATCTGGAGATAGTAATATAGAGTTAGGACCCACCGAG
ATTCTCGCACGTCGTGTCGCTCAAGAACTGGGATGGAGTGTTCCTCGACTTCAAAGGATATGCAGAGCCA
GAACGTGAAGCTCATCTTAGGCTACGTAACCTGAATGCCCTTCGACAGGCTGCCATGAGGCATGAAGAG
AATGAGAGGGCTTTCTTCGAAAGGCTGGGTACGATCAGTGACCGATATGAGGCGAGTCTGATTTTACA
GAGTATTCGCTGTGTCTAACATAGGATACGGATTTATCCAGCAACATGATTTCTCTGGATTGGCTATC
AACGATAATTTACAGGATGCAAATCAGATCCAACTGTATCATGGCGCCCTTATATTTTACATTTGGG
GATGTGGACAAACACAATCAGCAATGA (SEQ ID NO:10)

Фіг. 3E

Послідовність білка NleC ентерогеморагічної *E. coli*

mkipslqsnfnfsapagysapiapnraenayadyvldigkriplsaadlsnvyesviravhdsrsrlid
qhtvdmigntvldalrsstfrdavszygihnekvhigcikeynelneessvkiddiqlstcnelzey
dvqgepifpiceagendneepvsvfsvapdtdsyempswqegliheiihhvtgssdpsgdsnielgpte
ilarrvaqelgwsvpdfkgyaepereahlrlrlnalrqaamrheenerafferlgtisdryeaspdft
eysavsnigygfiqhdffpglaindnlqdanqilyhgapyiftfgdvdkhnqq (SEQ ID NO:32)

Фіг. 3F

Послідовність ДНК NleD *Citrobacter rodentium*

ATGCGCCCTACATCCCTAACCTGACATTACCTTCGTTACCTCTACCTCATCTTCAAATTCAATTTCA
GCCACAGACATTCATCTCTGTAAATAATGTCGGGTGTGCGCTGGGTGAAAACAACCAACAACTCTGT
TTCCACGGGACTGACCTTAAATCTACAGCATCTTGAAGCTGCCCTCGATAAGATCGAATCCACAGAC
ACTGGACGTACTCTTTTGAAGTGTATGAATTAACATCCCGACTCAAATCAGAAAACTGGCAATACAT
CTCGATTCTGCTGAGTTAGGGGTGATAGCACTGCAATGCGGATGCTGAAAACCTCCCGAGGAAGTGGC
TCCGACTTTCACTGTAATCTGAATGCAGTTGAATATCCCTGCGGGCAAGGAATTAGCCTGGTAGACTTT
CATGCATGCATGTTTTCCATGAATCTCCACGTTTTCCACAATTTAAATGGAGAGCGCCTGAAAGTT
GAGAGTTCTCAACAGAAATTACAACACACTCCCACTTTTACTCGAAGAAGCCAGGACTGTTGGGTTG
GGTGCTTTTCTGAAGAAGTTCTTTTCAGAAAAATAAATTTCTGTAAGAGATTGGGATGCCCGCAGAAC
TTCTACCCGACGATTCATCTCTCATTCATGATGACAATACAGTGACTCAGAGATTCCAGCGGAAAAA
CTGCATCCGTTACTTTAG (SEQ ID NO:11)

Фіг. 4A

Послідовність білка NleD *Citrobacter rodentium*

MRPTSLNLTLPSPSPSSNSISATDIQSLVKMSGVRWVKNNQQLCFHGTDLKIYQHLEAALDKIESTD
TGRLLNCIELTSRLKSEKLAIHLDSAE LGVIAHCNADAENS RGTGSD FHCNLNAVEYPCGQGISLVDF
HACIVFHELLHVFNHNLGERLKVES SQPELQTHSP LLEEARTVGLGAFSEEV LSENKFREEIGMPRRRT
FYPHDSSLIHDDNTVTQRFQRKKLHPLL (SEQ ID NO:33)

Фіг. 4B

Послідовність ДНК NleD ентеропатогенної *E. coli*

atgogccctacgtccctcaacttgggtattacatcagtcacacgtcgagctcaatgtcagatacagat
atcgagtcctctgtaaaagcatcgagcggttcaatggataaaaaataatccgcaacttcgtttccagggg
actgatcataatatatcagcagattgaagcagcactcgataagattggctctacagagacagggcgt
gtactcctgaatgctattgaatcaatatcccgacttaaatcagaaacagtggttaatacacctcaactct
tcagactaggagttatggcacatagagatatagatgctgagaacccatcgggggactggttccgatttt
caactgtaatctgaatgcagttgaatatccctgtggggaggggattagcgtggtggactttcatgcgact
attgtttttcatgagttgctccatgttttccacaatttaaatggggagcgtttgaaagttgagagttcc
cgaccagaatcacaaaaatactctccacttttactcgaagaagccaggactggtgggttgggggctttt
tcagaggaggtgctttcagaaaaataattccgcgaagagattgggatgccccgtagaacctcctaccg
cacgactcagctcttattcatgatgacaatacagtgagtcgtgggattccaacaggtaagactgcaccca
ttgcttttag (SEQ ID NO:12)

Фіг. 4C

Послідовність білка NleD ентеропатогенної *E. coli*

MRPTSLNLVLHQSSSTSSMSDTDIESLVKASSVQWIKNNPQLRFQGTDNHNIYQQIEAALDKIGSTETGR
VLLNAIESISRLKSETVVIHLNSSLRGVMAHRDIDAENHRGTGSD FHCNLNAVEYPCGEGISVVDHAT
IVFHELLHVFNHNLGERLKVES SRPESQKYSPL LLEEARTVGLGAFSEEV LSENKFREEIGMPRRTSYP
HDSALIHDDNTVSLGFQQVRLHPLL (SEQ ID NO:34)

Фіг. 4D

Послідовність ДНК NleD ентерогеморагічної *E. coli*

ATGCGCCCTACGTCCCTCAACTTGGTATTACATCAGTCATCAAGGTCGAGCTCAATGTCAGATACAGAT
ATCGAGTCTCTTGTAAAAGCATCGAGCGTTCAATGGATAAAAAATAATCCGCAACTTCGTTTCCAGGGG
ACTGATCATAATATATATATCAGCAGATTGAAGCAGCACTCGATAAGATTGGCTCTACAGAGACAGGGCGT
GTACTCCTGAATGCTATTGAATCAATATCCCGACTTAAATCAGAAACAGTGGTAATACACCTCAACTCT
TCCAGACTAGGAGTTATGGCACATAGAGATATAGATGCTGAGAACCATCGGGGGACTGGTTCCGATTTT
CACTGTAATCTGAATGCAGTTGAATATCCCTGTGGGGAGGGGATTAGCGTGGTGGACTTTCATGCGACT
ATTGTTTTTTCATGAGTTGCTCCATGTTTTCCACAATTTAAATGGGGAGCGTTTGAAAGTTGAGAGTTCC
CGAGCAGAATCACAAAAATACTCTCCACTTTTACTCGAAGAAGCCAGGACTGTTGGGTGGGGGCTTTT
TCAGAGGAGGTGCTTTCAGAAAATAAATTCACGAAGAGATTGGGATGCCCGTAGAACCTCCTACCCG
CRGACTCAGCTCTTATTCATGATGACAATACAGTGAGTCTGGGATTCCAACAGGTAAGACTGCATCCA
TTGCTTTTAG (SEQ ID NO:13)

Фіг. 4E

Послідовність білка NleD ентерогеморагічної *E. coli*

mrptslnlvlhqsrrssmsdtdieslvkassvqwiknpqlrfqgtdhniyqqieaaldkigstetgr
vllnaiesisrlksetvvihlnssrlgvmahrdidaenhrgtgsdfhcnlnaveypcgegisvvdhfat
ivfhellhvfhnlnngerlkvessraesqkyspllleartvlgafseevlsenkfheeigmprtsyp
xdsalihddntvslgfgqvrhlhpl1 (SEQ ID NO:35)

Фіг. 4F

Послідовність ДНК NleE *Citrobacter rodentium*

tactttaatgaatcaccCAATGTATATGATAAGAAGTATATATCTGGCGTAACTAGAGGAGTAGCTGAA
CTAAACAGGAAGGATTTATTAACGAGAAAGCCAGGCGACTTGCTTATATGCAAGCAATGTATTCTGTA
TGTCCGGAAGAGTTTAAACCTATTTCCAGAAACGAAGCTAGTACACCGGAAGGCAGCTGGCTAACAGTT
ATATCCGGAACGCCCAATGGGACAGTTTTCTGTAGATAGCTTATATCATCCTGACTTACATGCATTG
TGTGAGCTTCCGGATATTTGTTGCAAGATCTTCCCTAAAGAAAACAATGATTTTTTGTATATAGTGATT
GTGTACAGAAATGACAGCCCTCTGGGAGAACACGAGCAAATCGATTTATAGAATTATATAATATAAAA
AGAGACATCATGCAGGAATTAAATTATGAATCTCCAGAGTTAAAGGCTGTGAAATCTGAAATGATTATT
gcacgtgaaatgggagaaatcctt (SEQ ID NO:14)

Фіг. 5A

CAATGTATATGATAAGAAGTATATATCTGGCGTAACTAGAGGAGTAGCTGAACTAAACAGGAAGGATT
TATTAACGAGAAAGCCAGGCGACTTGCTTATATGCAAGCAATGTATTCTGTATGTCCGGAAGAGTTTAA
ACCTATTTCCAGAAACGAAGCTAGTACACCGGAAGGCAGCTGGCTAACAGTTATATCCGGAACGCC
AATGGGACAGTTTTCTGTAGATAGCTTATATCATCCTGACTTACATGCATTGTGTGAGCTTCCGGATAT
TTGTTGCAAGATCTTCCCTAAAGAAAACAATGATTTTTTGTATATAGTGATTGTGTACAGAAATGACAG
CCCTCTGGGAGAACACGAGCAAATCGATTTATAGAATTATATAATATAAAAAGAGACATCATGCAGGA
ATTAAATTATGAATCTCCAGAGTTAAAGGCTGTGAAATCTGAAATGATTATT (SEQ ID NO:15)

Фіг. 5B

Послідовність білка NleE *Citrobacter rodentium*

YFNESPNVYDKKYISGVTRGVAELKQEGFINEKARRLAYMQAMYSVCPEEFKPISRNEASTPEGSWLTV
ISGKRPMGQFSVDSLYHPDLHALCELPDICCKIFPKENNDFLYIVIVYRNDSPLEQQRANRFIELYNIK
RDMQELNYESPELKAVKSEMI IAREMGEI (SEQ ID NO:36)

Фіг. 5C

NVYDKKYISGVTRGVAELKQEGFINEKARRLAYMQAMYSVCPEEFKPISRNEASTPEGSWLTVISGKR
PMGQFSVDSLYHPDLHALCELPDICCKIFPKENNDFLYIVIVYRNDSPLEQQRANRFIELYNIKRDMQ
ELNYESPELKAVKSEMI (SEQ ID NO:37)

Фіг. 5D

Послідовність ДНК NleE ентеропатогенної *E. coli*

atgattaatcctgttactaatactcagggcgtgtccctataaataactaaatatgctgaacatgtggtg
 aaaaatattttacccgaaaattaaacatgattacttttaataatcaccgaatatatatgataagaagtat
 atatccggtataaaccagaggagtagctgaactaaaacaggaagaatttggttaacgagaaagccagacgg
 ttttcttatatgaagactatgtattctgtatgtccagaagcgtttgaacctatttccagaaatgaagcc
 agtacaccggaaggaagctggctaacagttatatccggaacgccaatggggcagttttctgtagat
 agtttatacaatcctgatttacatgcattatgtgagcttccggacatttggtgtaagatcttccctaaa
 gaaaataatgattttttatacatagttgtgtgtacagaaatgacagccctctaggagaacaacgggca
 aatagatttatagaattatataataaaaaagagatatcatgcaggaattaaattatgagttaccagag
 ttaaaggcagtaaaatctgaaatgattatcgacgtgaaatgggagaaatcttagctacatgcctggg
 gaaatagacagttatatgaaatacataataataaactttctaaaattgagtag (SEQ ID NO:16)

Фіг. 5E

Послідовність білка NleE ентеропатогенної *E. coli*

MINPVTNTQGVSPINTKYAEHVVKNIYPKIKHDYFNESPNIIDKKYISGITRGVAELKQEEFVNEKARR
 FSYMKTMYSVCPEAFEPISRNEASTPEGSWLTVISGKRPMGQFSVDSLNPDLHALCELDPDICCKIFPK
 ENNDFLYIVVYRNDSPLEQRANRFIELYNIKRDMQELNYELPELKAVKSEMIAREMGEIFSYMPG
 EIDSYMKYINNKLKSKIE (SEQ ID NO:38)

Фіг. 5F

Послідовність ДНК NleE ентерогеморагічної *E. coli*

ATGATTAATCCTGTACTAATACTCAGGGCGTGTCCCTATAAATACTAAATATGCTGAACATGTGGTG
 AAAAATATTTACCCGGAAATTAAACATGATTACTTTAATGAATCACCCAATATATATGATAAGAAGTAT
 ATATCCGGTATAACCAGAGGAGTAGCTGAACATAAACAGGAAGAATTGTGAACGAGAAAGCCAGACGG
 TTTTCTTATATGAAGACTATGTATTCTGTATGTCCAGAAGCGTTTGAACTATTTCCAGAAATGAAGCC
 AGTACACCGGAAGGAAGCTGGCTAACAGTTATATCCGGAACGCCCCAATGGGGCAGTTTCTGTAGAT
 AGTTTATACAATCCTGATTTACATGCATTATGTGAGCTTCCGGACATTTGTTGTAAGATCTTCCCTAAA
 GAAAAATATGATTTTTTATACATAGTTGTGTGTACAGAAATGACAGCCCTCTAGGAGAACAACGGGCA
 AATAGATTTATAGAATTATATAATATAAAAAGAGATATCATGCAGGAATTAAATTATGAGTTACCAGAG
 TTAAAGGCAGTAAATCTGAAATGATTATCGCACGTGAAATGGGAGAAATCTTTAGCTACATGCCTGGG
 GAAATAGACAGTTATATGAAATACATAAATAAATAAATTTCTAAAATTGAGTAG (SEQ ID NO:17)

Фіг. 5G

Послідовність білка NleE ентерогеморагічної *E. coli*

minpvtntqgvspintkyaehvvkniypeikhdynfnespniydkkyisgitrgvaelkqeeffvnekarr
 fsymktmysvcpeafepisrneastpegswltvisgkrpmgqfsvdslynpdldhalceldpdicckifpk
 enndflyivvyrndsplgeqranrfielynikrdimqelnyelpelkavksemiaremgeifsympg
 eidsymkyinnklskie (SEQ ID NO:39)

Фіг. 5H

Послідовність ДНК NleF *Citrobacter rodentium*

atgttaccacaagaagggttcttcAGCAAATCTTTACTCATGGATGTATATCTCAGGAAAAGAGAATCCT
TCGACTCCGGAATCAGTAAGTGAACCTTAATCATAATCATTTTCTTTCTCCTGAATTACAGGAGAACTG
GATGTTATGTTCCGCATATATTCATGTGCCAGAAACAATGATGAGCGTGAGAATATTTACCCGGAGCTA
AGGGATTTTGTAAGTAGCCTAATGGATAAGAGAAACAATGTGTTTGAGGTGATAAATGAAGATACTGAT
GAGGTGACCGGAGCTCTGAGAGCGGGAATGACGATAGAGGACAGGGATAGTTATATCAGGGATCTTTTT
TTTCTGCATTCAATTGAAAGTAAAAATTGAGGAAAGCAGACAAGATAAAGAGGATTGGAATGTAAAGTT
TATGATCTGCTATGTCCGCATCATTTCTTCAGAGCTATATGGGGATCTACGGGCAATCAAATGCCTCGTT
GAAGGATGCAGTGATGATTTTAGTCCTTTTGATACTATTAAGGTGCCGGATCTTACTTAcaacaaagga
tctttacaatgtggatga (SEQ ID NO:18)

Фіг. 6A

AGCAAATCTTTACTCATGGATGTATATCTCAGGAAAAGAGAATCCTTCGACTCCGGAATCAGTAAGTGA
ACTTAATCATAATCATTTTCTTTCTCCTGAATTACAGGAGAACTGGATGTTATGTTCCGCATATATTC
ATGTGCCAGAAACAATGATGAGCGTGAGAATATTTACCCGGAGCTAAGGGATTTTGTAAGTAGCCTAAT
GGATAAGAGAAACAATGTGTTTGAGGTGATAAATGAAGATACTGATGAGGTGACCGGAGCTCTGAGAGC
GGGAATGACGATAGAGGACAGGGATAGTTATATCAGGGATCTTTTTTTCTGCATTCAATTGAAAGTAAA
AATTGAGGAAAGCAGACAAGATAAAGAGGATTGGAATGTAAAGTTTATGATCTGCTATGTCCGCATCA
TTCTTCAGAGCTATATGGGGATCTACGGGCAATCAAATGCCTCGTTGAAGGATGCAGTGATGATTTTAG
TCCTTTTGATACTATTAAGGTGCCGGATCTTACTTA (SEQ ID NO:19)

Фіг. 6B

Послідовність білка NleF *Citrobacter rodentium*

MLPTSGSSANLYSWMYISGKENPSTPESVSELNHNHFLSPELQEKLDVMFAIYSCARNNDERENIYPEL
RDFVSSLMDKRNNVFEVINEDTDEVTGALRAGMTIEDRDSYIRDLFFLHSLKVKIEESRQDKEDWKCKV
YDLLCPHHSSELYGDLRAIKCLVEGCSDDFSPFDTIKVPDLTYNKGSLQC (SEQ ID NO:40)

Фіг. 6C

ANLYSWMYISGKENPSTPESVSELNHNHFLSPELQEKLDVMFAIYSCARNNDERENIYPELRDFVSSLM
DKRNNVFEVINEDTDEVTGALRAGMTIEDRDSYIRDLFFLHSLKVKIEESRQDKEDWKCKVYDLLCPHH
SSELYGDLRAIKCLVEGCSDDFSPFDTIKVPDL (SEQ ID NO:41)

Фіг. 6D

Послідовність ДНК NleF ентеропатогенної *E. coli*

atgttaccacaagaagggttcttcagcaaatctttattcatggatgtatgtatcaggaagaggtaaccct
tcgactccggaatcagtaagtgagcttaatacataatcactttctttctcctgaattacaagataaactt
gatgttatgggtctctatatattcatgtgccagaaataataatgagcttgaggaaatttttcaagagcta
agtgccttttgtaagtggtgctgatggataagagaaatagtgtatttgagggtgagaaatgaaaatactgat
gaggttgctggagcgctgagggcggaatgacgatagaggataggatagttatatcagggatcttttt
tttctgcattcattgaaagtaaaaattgaggaaagtagacaaggcaagaagattcgaaatgtaaagtt
tataatctgctatgtccgcatcactcttcagagctatatggtgatctacgagcaatgaaatgcctcgtg
gaaggatgcagtgatgttttaataccttttgatattattagggtaccagatcttacttacaacaaagga
tctttacaatgtggatga (SEQ ID NO:20)

Фіг. 6E

Послідовність білка NleF ентеропатогенної *E. coli*

MLPTSGSSANLYSWMYVSGRGNPSTPESVSELNNHFLSPQLQDKLDVMVSIYSCARNNNELEEIFQEL
SAFVSGGLMDKRNSVFEVRNENTDEVVGALRAGMTIEDRDSYIRDLFFLHSLKVKIEESRQKEDSKCKV
YNLLCPHSSSELYGDLRAMKCLVEGCSDDFNPFDIIRVPDLTYNKGSLQCG (SEQ ID NO:42)

Фіг. 6F

Послідовність білка NleF *Citrobacter rodentium*

ATGTTACCAACAAGTGGTTCTTCAGCAAATCTTTATTCATGGATGTATGTATCAGGAAGAGGTAACCTT
TCGACTCCGGAAATCAGTAAGTGAGCTTAATCATAATCACTTTCTTTCTCCTGAATTACAAGATAAACTT
GATGTTATGGTCTCTATATATTCATGTGCCAGAAATAATAATGAGCTTGAGGAAATTTTCAAGAGCTA
AGTGCTTTTGTAAAGTGGGCTGATGGATAAGAGAAATAGTGTATTTGAGGTGAGAAATGAAATACTGAT
GAGGTTGTCCGAGCGCTGAGGGCGGGAATGACGATAGAGGACAGGGATAGTTATATCAGGGATCTTTT
TTCTGCATTTCATTGAAAGTAAAAATGAGGAAAGTAGACAAGGCAAAGAAGATTGAAATGTAAAGTT
TATAATCTGCTATGTCCGCATCACTCTTCAGAGCTATATGGTGATCTACGAGCAATGAAATGCCTCGTG
GAAGGATGCAGTGATGATTTTAATCCTTTTGATATATTAGGGTACCAGATCTTACTTACAACAAAGGA
TCTTTACAATGTGGATGA (SEQ ID NO:21)

Фіг. 6G

Послідовність ДНК NleF ентерогеморагічної *E. coli*

mlptsgssanlyswmyvsggrgnpstpesvselnnhflspqlqdkldvmvsiyscarnnneleEIFQEL
safvsgglmdkrnsVFEVRNENTDEVVGALRAGMTIEDRDSYIRDLFFLHSLKVKIEESRQKEDSKCKV
ynllcphssseLYGDLRAMKCLVEGCSDDFNPFDIIRVPDLTYNKGSLQCG (SEQ ID NO:43)

Фіг. 6H

SGH MCPDNTHAKKQYLTPGNDIHYPGQTNHDACFIPVSVRQYA
 CaiF MCEG-----YV
 GrlA M-----ESKNSDYVIPDSVKNYN

***** * +++++ +** ** *+ ++
 SGH GEPLYIIIVAHWCLLOQNWWVORNOIAEAFHITARRASYLIA
 CaiF EKPLYLLIAEWMMAENRWVIAREISIHFDIEHSAVNTLT
 GrlA GEPLYILVSLWCKLQEKWISRNDIAEAFGINLRRASFIIT

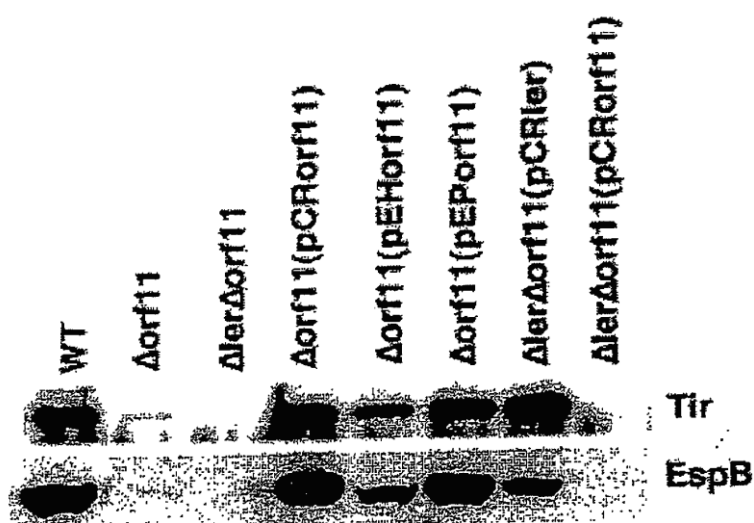
Мотив спіраль-поворот-спіраль

**+ + + + + + +
 SGN YLRKTSRVVVICRHQTLPN-KARRYEIY-VIRVLDSTPT
 CaiF YILSEVTEISCEVKMIP-NKLEGRGCQCQRLVKVVDIDEQ
 GrlA YISRRKEKISFRVRYVSYGNLHYKRLEIF-IYNVNLEAAP

+ + *+ ** +
 SGN STRREKAGPP-----LVSKRRVGNNGDRSM--ANELWNRLC
 CaiF IYARLRNNSREKLVGVKTPRIPAVPLTELNRQKQWQMH-
 GrlA TESHVSTGPK-----RKTLRVGNNGIVG---QSSIWNEM-

+++* + +
 SGN SNRNAGKILKKKEDEDDGT (170 aa)
 CaiF ----LSKSMRR (131 aa)
 GrlA -----IMRRKKE----S (135 aa)

Фиг. 7



Фиг. 8

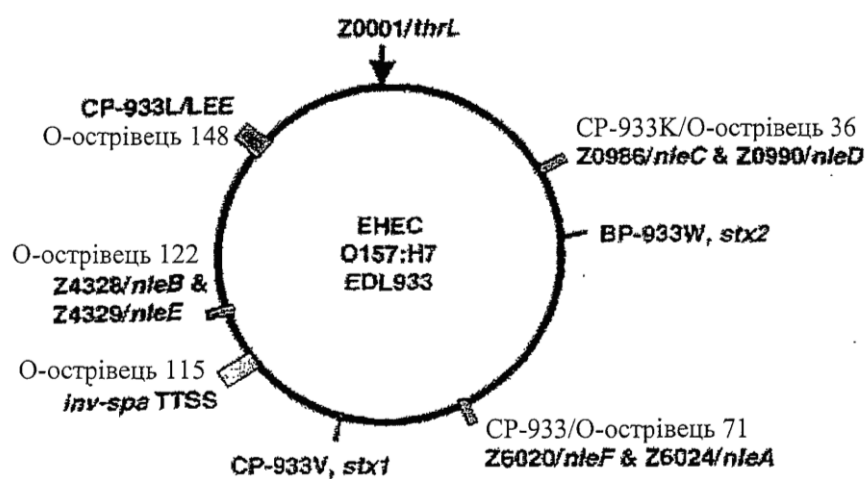
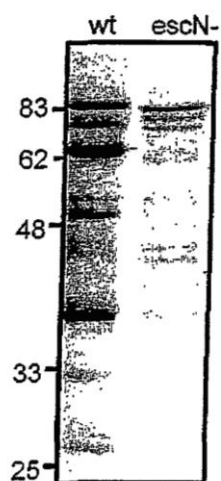


Fig. 9

A.



B.

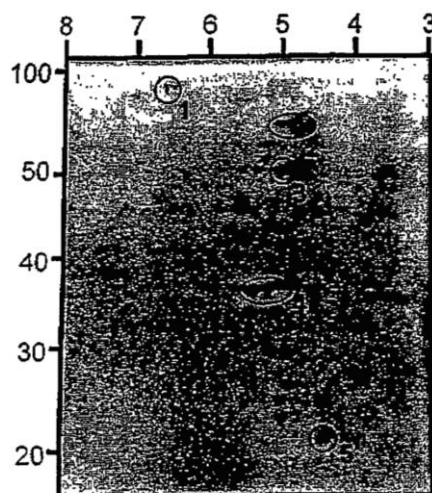
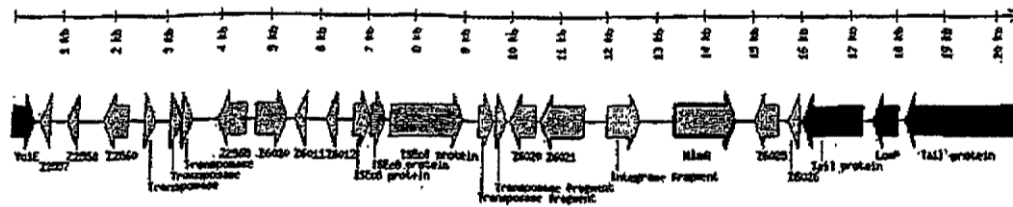
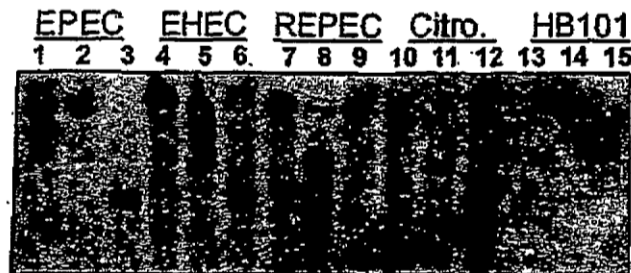


Fig. 10

A.



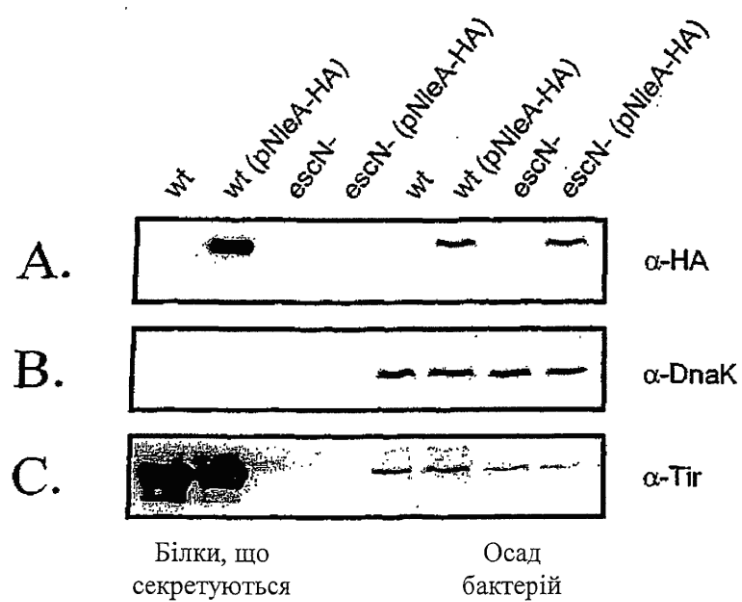
B.



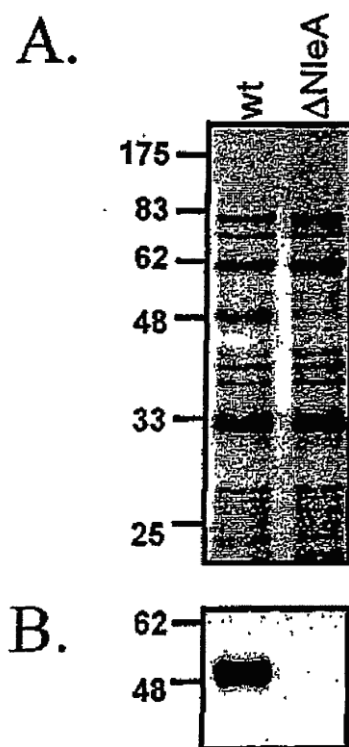
C.

EHEC	MNIQPTIQSGITSQNNQ-NNQTEQIPF-TQIPQSEPLGCGAGFVNNIFDDIQCHAPCCG	58
O84_H4TV.....T.....R.....P.....N.....E.....	58
EPECIVT.....T.....R.....HA.....TSP.....N.....ET.....H.....E.....M.....R.....	58
CitrobacterN.....H.....T.....Q.....HA.....V.....VSS.....R.....D.....FN.....E.....K.....E.....V.....	60
EHEC	ETTALLSLIKDRGLLSGLDEYIAPHLEEGSIGKKTLDMFGLFNVTQMALEIPSS-VSGIS	117
O84_H4E.....K.....A.....A.....S.....T.....P.....	118
EPECE.....K.....L.....L.....A.....T.....P.....	117
CitrobacterE.....K.....L.....L.....A.....T.....P.....	119
EHEC	GKYGVQLNIVXPDHFTSGMYFLQIFFLHDEIGFNFKOLPGPLKNALENSNIETAVS--	175
O84_H4H.....S.....TI	178
EPECI.....P.....VST--	175
CitrobacterH.....T.....L.....T.....S.....	172
EHEC	-----TIASGTSTATTSTVTTEPKDPLFWGLTAQVVRNHGVELPIVK	218
O84_H4	ASAATSAATSAATSTAVS-----	238
EPEC	-----A.....IA.....AS.....	217
Citrobacter	-----A.....APT.N.....H.....	207
EHEC	TENGWKLIVGETELTPDGPICANYTESWVINFGEADFKYGASPLQATLGLEFGAHFKWDLN	278
O84_H4T.....V.....A.....LPGV.....A.....S.....A.....L.....V.....CY.....	298
EPECV.....TG.....	277
CitrobacterI.....I.....A.....KVPGT.....V.....L.....V.....C.....	267
EHEC	PNTKYAVLTNAANALGALGGFAVSREFASTDPHLSPEHIGAMVQQAAGHAIQYNTPGLKPD	358
O84_H4T.....V.....A.....LPGV.....A.....S.....A.....L.....V.....CY.....	358
EPECV.....TG.....	337
CitrobacterI.....I.....A.....KVPGT.....V.....L.....V.....C.....	327
EHEC	TILWAGATLGAADLNKASPEVARPTDYFRINNHAREGAIFFPKADIETATGADIRAMEE	592
O84_H4T.....L.....G.....E.....AR.....	418
EPECT.....L.....GE.....	397
CitrobacterF.....DKV.....F.....L.....Q.....ARV.....K.....	587
EHEC	GIFVGRHFPNEDVVIDIESNGLPHHNPNSNHVDIPDIIQETRV	441
O84_H4	.V..DH..H.....S--..N....Y..TV...S... 459	
EPEC	.VS.....N....NS.....Y..TV..... 440	
Citrobacter	.V...HQ..K.....GNS.....Y..T.E..... 430	

Fig. 11

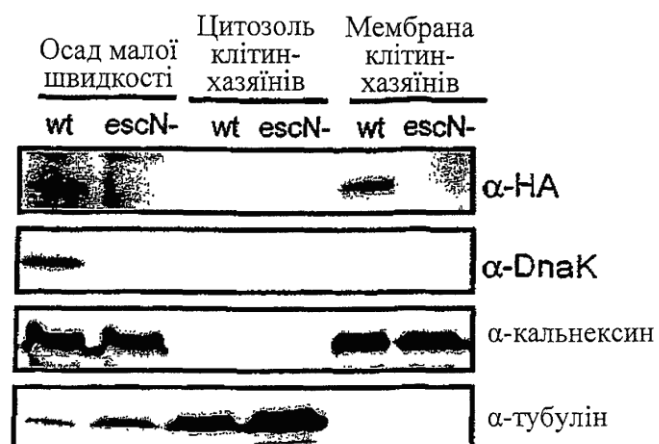


Фиг. 12

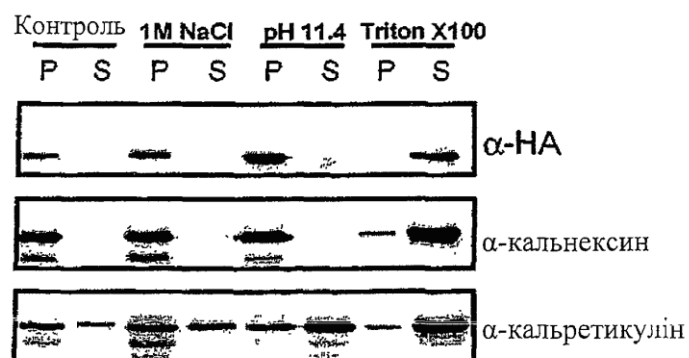


Фиг. 13

A.

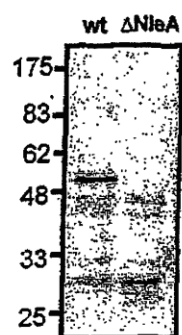


B.

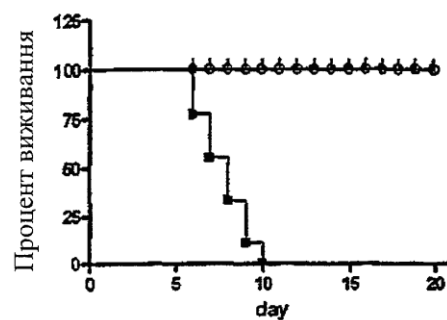


Фіг. 14

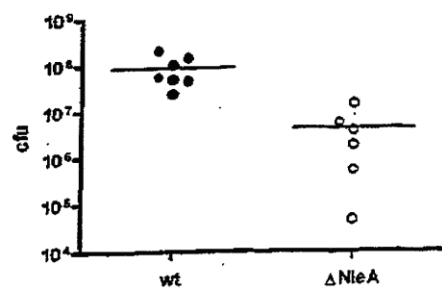
A.



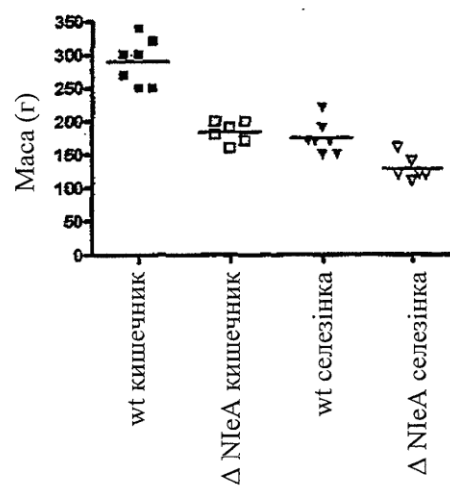
B.



C.



D.



Фіг. 15

Нуклеотидна послідовність NleG ентерогеморагічної *E. coli*

ATGAATGTCCTTCGAGCTCAAGTAGCATCTAGCGGTCGAGGGGAGTTTACATTAGGTAAT
GAGACTGTCAGCATTGTATTTAATGAAACCGATGGGCGTTTTCTATCCAGCGGCAGTAGT
GGGGGATTGCTTACTGAGTTATTCCTTTATGGGTTAATAACGGCCCTGAAGCTCTTCGC
GATAGGATGCTCAGTATGCTTTCGGACTCAGGTGAAGCACAATCGCAAGAGAGTATTAG
GACAAAATATCTCAATGTAAGTTTCCTGTTAGTTCAGGAAATTTCCAGTGCCCGCCAGAG
TCTATTTCAGTGTCCAATTACACTAGAGAGACCCGAGAAGGAGTGTTTGTCAAAAATTCA
GATAGTTCGGCAGTATGCTGCTTATTTGATTTTGATGCATTTTCTCGTTTAGCTAGTGAA
GGCTCATATCATCCACTGACCCGAGAACCAATAACGGCATCAATGATTATAAGTCCTGAT
AAATGTGTTTATGATCCTATCAAGGGAACTTCATTATAAAAGATAGTTAA
(SEQ ID NO: 61)

Fig. 16A

Послідовність білка NleG ентерогеморагічної *E. coli*

MNVLRAQVASSGRGEFTLGNETVSIVFNETDGRFLSSGSSGGLLTELFLYGFNNGPEALDRMLSLSD
SGEASQSESIQDKISQCKFPVSSGNFQCPPEISIQCFITLERPEEGVFVKNSDSSAVCCCLFDFDAFSRLA
SEGSYHPLTREBITASMIISPDKCVYDPIKGNFLIKDS (SEQ ID NO: 73)

Fig. 16B

Нуклеотидна послідовність NleH1 ентерогеморагічної *E. coli*

ATGTTATCGCCCTCTTCTATAAAATTTGGGATGTTTCATGGAATCTTTAACCAGAAACCTG
ACTTCGCCTGATAATCGTGTTTTATCCTCTGTAAGGGATGCTGCTGTTCACTCTGATAGC
GGGACGCAAGTAACGGTTGGCAACAGAACATATCGTGTTGTGGTCACTGATAATAAGTTT
TGCGTTACAAGAGAAAGTCATAGTGGTTGTTTTACTAATCTGTTGCACAGGTTGGGATGG
CCTAAGGGAGAGATTAGCAGAAAAATTGAGGCTATGCTGAATACATCGCCAGTGAGCACG
ACTATAGAAAGAGGCTCTGTTTCATTCGAAACAGACCTGATTTACCTCCAGTGGATTATGCG
CAGCCGGAGTTACCTCCAGCGGATTATACTCAATCAGAGTTGCCGAGGGTTAGCAACAAT
AAATCACCCGTGCCAGGTAATGTTATTGGTAAAGGTGGTAATGCTGTCGTGATGAAGAT
ATGGAAGATACAACAAAAGTGTGAAGATGTTTACTATATCTCAAAGCCATGAAGAGGTG
ACAAGCGAAGTTCGTTGTTTCAATCAGTATTATGGTTCCGGGAGTGACAGAGAAAAATAT
AATGATAATGGAATGTTATTGGTATTAGAATGAATAAAATAAATGGGGAATCTCTTTTG
GATATTCATCATTACCAGCACAGCTGAACAGGCTATTTACGATATGTTTGACAGACTG
GAGAAAAAGGAATCTTTTTTGTGATACAACAGAAACAAATGTTTATATGATCGTATG
AGAAATGAATTTAATCCAATAGATATATCATCTTATAATGTTTCTGATATTTCATGGAGT
GAACATCAAGTCATGCAATCTTATCACGGAGGAAAGCTGGATCTTATTAGTGTAGTATTA
AGTAAGATATAA
(SEQ ID NO: 62)

Fig. 17A

Послідовність білка NleH1 ентерогеморагічної *E. coli*

MLSPSSINLGCWNSLFRNLTPDNRLSSVRDAAVHSDSGTQVTVGNRTRYRVVVDNKF
CVTRESHSGCFNTLLHRLGWPKGEISRKIEAMLNTSPVSTTIERGSVHSNRPDLPVVDYA
QPELPADYDTQSELPRVSNNKSPVPGNVIGKGGNAVVEDMEDTTKVLKMTISQSHEEV
TSEVRCFNQYYGSGSAEKIYNDNGNVIGIRMNKINGESLLDIPSLPAQAEQAIYDMFDRL
EKKGILFVDTTETNVLYDRMRNEFNPIDISSYNVSDISWSEHQVMQSYHGGKLDLISVVL
SKI (SEQ ID NO: 74)

Fig. 17B

Нуклеотидна послідовність NleH2 ентерогеморагічної *E. coli*

ATGTTATCGCCATATTCTGTAAATTTGGGATGTTTCATGGAATTCCTTAACCAGAAACCTG
 ACTTCGCCTGATAATCGTGTCTTTATCCTCTGTAAGGGATGCTGCCGTTTCATTCTGATAAT
 GGGGCGCAAGTAAAGGTTGGCAACAGAACATATCGTGTGTTGCCACCGATAATAAGTTT
 TGGGTTACAAGAGAAAGTCATAGTGTTGTTTACTAATCTGTTGCACAGGCTGGGATGG
 CCTAAGGGGGAGATTAGCAGGAAAATTGAGGTCATGCTGAATGCATCACCAGTGAGCGCT
 GCTATGGAAAGAGGCATTGTTTCATTTCGAACAGACCTGATTTACCTCCTGTTGATTATGCA
 CCGCCAGAGTTACCGAGTGTGGACTATAACAGGTTGTCAGTACCTGGTAATGTTATTGGC
 AAAGGGGGGAACGCTGTAGTATATGAAGATGCTGAGGATGCAACAAAAGTCCTGAAGATG
 TTTACTACATCTCAAAGCAATGAAGAGGTGACAAGCGAAGTTCGTTGCTTCAACCAATAT
 TATGGTGCCGGGAGTGCAGAAAAAATATATGGCAATAATGGTGATATTATTGGTATTAGA
 ATGGATAAAATAAATGGAGAATCGCTTTTAAATATTTTCGTCCTTGCCAGCACAGGCTGAG
 CATGCTATTTACGATATGTTTGATAGACTGGAGCAAAAAGGAATTCCTTTTGTGCGATACA
 ACAGAGACAAATGTCTTATATGACCGCGCGAAGAATGAGTTTAAATCCAATAGATATATCA
 TCTTATAATGTTTCCGACCGTTCATGGAGTGAAGTCAAATAATGCAATCTTATCATGGC
 GGAAAGCAAGATCTTATTAGTGTGGTATTAAAGTAAATTTAG (SEQ ID NO: 63)

Фіг. 18A

Послідовність білка NleH2 ентерогеморагічної *E. coli*

MLSPYSVNLGCSWNSLTRNLSPDNRVLSSVRDAAVHSDNGAQVKVGNRTYRVVATDNKF
 CVTRESHSGCFTNLLHRLGWPKGEISRKIEVMLNASPVSAAMERGIVHSNRPDLPVPDYA
 PPELPSVDYNRLSVPGNVIGKGGNAVVEDAEDATKVLKMFSTTSQSNEEVTSEVRCFNQY
 YGAGSAEKIYGNGDIIIGIRMDKINGESLLNISSLPAQAEHAIYDMFDRLEQKGILFVDT
 TETNVLYDRAKNEFNPIDISSYNVSDRSWSESQIMQSYHGGKQDLISVVLSKI (SEQ ID NO: 75)

Фіг. 18B

Нуклеотидна послідовність Z2076 ентерогеморагічної *E. coli*

ATGGTAATGCCTGGATTAGTATCATATATATCATCGACTTCATTCCGGAATGAGATGGCG
 GAGATGCGTCAGCAGGTAATGGAAGGGCAGATTGGTGGATTTCTCCTGGGAGGGGAGAGA
 GTTAGAGTTTCTTATTTATTTCAATTGCATTAA (SEQ ID NO: 64)

Фіг. 19A

Послідовність білка Z2076 ентерогеморагічної *E. coli*

MVMPGLVSYISSTSFANEMAEMRQQVMEGQIGGFLGGERVVRVSYLFQLH
 (SEQ ID NO: 76)

Фіг. 19B

Послідовність ДНК NleE ентерогеморагічної *E. coli*

ATGCCATTAACTCAGATATTAGATCACATTCATTTAATCTTGGGGTGGAGGTTGTTCTG
 GCCCGAATTGTAGCCAATGGGCGCGGAGATATTACAGTCGGTGGTGAACTGTCAGTATT
 GTGTATGATTCTACTAATGGGCGCTTTTCATCCAGTGGCGGTAATGGCGGATTGCTTTCT
 GAGTTATTGCTTTTGGGATTTAATAGTGGTCCCTCGAGCCCTTGGTGAGAGAATGCTAAGT
 ATGCTTTCGGACTCAGGTGAAGCACAATCGCAAGAGAGTATTGAGAACAAAATATCTCAA
 TGTAAGTTTCTGTTTGTCCAGAGAGACTTCAGTGCCCGCTTGAGGCTATTGAGTGTCCA
 ATTACACTGGAGCAGCCTGAAAAGGTATTTTGTGAAGAATTGAGATGGTTGAGATGTA
 TGTACTTTATTTGATGCCGCTGCATTTTCTCGTTTGGTTGGTGAAGGCTTACCCACCCA
 CTGACCCGGGAACCAATAACGGCATCAATAATTGTAACATGAAGAATGCATTTATGAC
 GATACCAGAGGAACTTCATTATAAAGGGTAATTGA (SEQ ID NO: 65)

Фіг. 20A

Послідовність білка NleE ентерогеморагічної *E. coli*

MPLTSDIRSHSFNLGVEVVRARIVANGRGDITVGGTVSIVYDSTNGRFSSSGGNGGLLS
 ELLLLGFNSGPRALGERMLSMLSDSGEASQESIQNKISQCKFSVCPERLQCPLEAIQCP
 ITLEQPEKGIFVKNSDGSDVCTLFDAAAFRLVGEGLPHPLTREPIITASIIVKHEECIYD
 DTRGNFIKGN (SEQ ID NO: 77)

Фіг. 20B

Нуклеотидна послідовність Z2150 ентерогеморагічної *E. coli*

atgcctgtta ccacottaag tatcccaagt atatctcaat tatctcctgc aagagtacag
 tctttgcagg atgcagccag acttgaaagt ggaataagaa tatccattgg tagtggccaa
 tattctgttc actatgtcca actactggat ggattttcag ttgaaccggt gagaggaggc
 ttaactggata ggctattggg gcgtgagcat cgaatggata gaagggctgt ggctctggaa
 aggcaattaa atggaggtgt cgatttttta agtagtggtta ataactattt tcagagtgtc
 atggcagaac acagagaaaa taaaacaggt aataaaatat taatggaaaa aataaattct
 tgtgtatttg gaacggattc taatcacttt tcttgccogg agtcattttt gacatgcccg
 ataacgctgg acacacctna gactggagtg ttcatgagaa actcacgagg tgctgagata
 tgctctctat atgataagga tgcgttagtg caacttggtg aaactgggtg aactcatcct
 ctgagtcgag aacctataac agaatcaatg attatgagaa aagacgaatg tcactttgat
 gcaaaaagag aagctttttg ttgtaagtga
 (SEQ ID NO: 66)

Фіг. 21A

Послідовність білка Z2150 ентерогеморагічної *E. coli*

MPVTTLSIPSISQLSPARVQSLQDAARLESIGIRISIGSQYSVHYVQLLDGFSVEPVRGGLLDRLGRE
 HRMDRRAVALERQLNGGVDFLSSVNNYFQSVMAEHRENKTGNKILMEKINSVFGTDSNHFSCPEFLT
 CPITLDTPTXGTFMRNSRGAEICSLYDKDALVQLVETGGTHPLSREPITESMIMRKDECHFDAKREAF
 CK (SEQ ID NO: 78)

Фіг. 21B

Нуклеотидна послідовність Z2151 ентерогеморагічної *E. coli*

ATGCCTGTAGATTTAACGCCTTATATTTTACCTGGGGTTAGTTTTTTGTCTGACATTCCCT
CAAGAAACCTTGTCTGAGATACGTAATCAGACTATTTCGTGGAGAAGCTCAAGTAAGACTG
GGTGAGTTGATGGTGTCAATACGACCTATGCAGGTAATGGATATTTTATGGGAAGTCTT
AACCAGGATGGTTTATCGAATGATAACATCCAGATTGGCCTTCAATATATAGAACATATT
GAACGTACACTTAATCATGGTAGTTTGACAAGCCGTGAAGTTACAGTACTGCGTGAAATT
GAGATGCTCGAAAATATGGAATTGCTTTCTAACTACCAGTTAGAGGAGTTGTTAGATAAA
ATTGAAGTATGTGCATTTAATGTGGAGCATGCACAATTGCAAGTGCCAGAGAGCTTACGA
ACATGCCCTGTTACATTATGTGAACCAGAAGATGGGGTATTTATGAGGAATTCAATGAAT
TCAAATGTTTGTATGTTGTATGATAAAATGTCATTAATATATCTTGTAAACAAGGGCG
GCTCATCCTTTGAGCAGGGAATCAATCGCAGTTTCAATGATTGTAGGAAGAGATAATTGT
GCTTTTGAACCTGACAGAGGTAACCTTCGTTTTAAAAAATTAA (SEQ ID NO: 67)

Фіг. 22A

Послідовність білка Z2151 ентерогеморагічної *E. coli*

MPVDLTTPYILPGVSFLSDIPQETLSEIRNQTIRGEAQVRLGELMVSIRPMQVNGYFMGSL
NQDGLSNDNIQIGLQYIEHIERTLNHGSLTSREVTVLREIEMLENMELLSNYQLEELLDK
IEVCAFNVENHAQLQVPESLRTCPVTLCEPEDGVFMRNSMNSNVCMPLYDKMSLIYLVKTRA
AHPLSRESIAVSMIVGRDNCADFSDRGNFVLKN (SEQ ID NO: 79)

Фіг. 22B

Нуклеотидна послідовність Z2337 ентерогеморагічної *E. coli*

ATGCCTGTAGATTTAACGCCTTATATTTTACCTGGGGTTAGTTTTTTGTCTGACATTCCCT
CAAGAAACCTTGTCTGAGATACGTAATCAGACTATTTCGTGGAGAAGCTCAAATAAGACTG
GGTGAGTTGATGGTGTCAATACGACCTATGCAGGTAATGGATATTTTATGGGAAGTCTT
AACCAGGATGGTTTATCGAATGATAATATCCAGATTGGCCTTCAATATATAGAACATATT
GAACGTACACTTAATCATGGTAGTTTGACAAGCCGTGAAGTTACAGTACTGCGTGAAATT
GAGATGCTCGAAAATATGGATTGCTTTCTAACTACCAGTTAGAGGAGTTGTTAGATAAA
ATTGAAGTATGTGCATTTAATGTGGAGCATGCACAATTGCAAGTGCCAGAGAGCTTACGA
ACATGCCCTGTTACATTATGTGAACCAGAAGATGGGGTATTTATGAGGAATTCAATGAAT
TCAAATGTTTGTATGTTGTATGATAAAATGGCATTAAATACATCTTGTAAACAAGGGCG
GCTCATCCTTTGAGCAGGGAATCAATCGCAGTTTCAATGATTGTAGGAAGAGATAATTGT
GCTTTTGAACCTGACAGAGGTAACCTTCGTTTTAAAAAATTAA (SEQ ID NO: 68)

Фіг. 23A

Послідовність білка Z2337 ентерогеморагічної *E. coli*

MPVDLTTPYILPGVSFLSDIPQETLSEIRNQTIRGEAQIRLGELMVSIRPMQVNGYFMGSL
NQDGLSNDNIQIGLQYIEHIERTLNHGSLTSREVTVLREIEMLENMDLLSNYQLEELLDK
IEVCAFNVENHAQLQVPESLRTCPVTLCEPEDGVFMRNSMNSNVCMPLYDKMALIHLVKTRA
AHPLSRESIAVSMIVGRDNCADFDPDRGNFVLKN (SEQ ID NO: 80)

Фіг. 23B

Нуклеотидна послідовність Z2338 ентерогеморагічної *E. coli*

ATGCCTGTTACACCTTAAGTATCCCAAGTATATCTCAATTATCTCCTGCAGGAGTACAG
TCTTTGCAGGATGCTGCCAGACTTGAAAGTGGATAAGAATATCCATTGGTAGTGGCCAA
TATTCTGTTCACTATGTCCAGCTACTGGATGGATTTTCAGTTGAACCGGTGAGAGGAGGC
TTACTGGATAGGCTATTGGGGCGTGAGCATCGAATGGAGAGAAGGGCTGTGGCTCTGGAA
AGGCAATTAAATGGAGGTGTCGATTTTTTAAGTAGTGTAAATACTATTTTCAGAGTGTCT
ATGGCAGAACACAGAGAAAATAAAACAAGTAATAAAATATTAATGGAAAAATAAATTCT
TGTTTATTTAGACCTGATTCTAATCACTTTTCTTGCCCGGAGTCATTTTGGACATGCCCCG
ATAACGCTGGACACACCTGAGACTGGGTGTTTCATGAGAACTCACGAGGTGCTGAGATA
TGCTCTCTATATGATAAGGACGCGTTAGTGCAACTTGTGAACTGGTGGAGCTCATCCT
CTGAGTCGAGAACCTATAACAGAAATCAATGATTATGAGAAAAGATGAATGTCACCTTGAT
ACAAAAGAGAAGCTTTTGTGTGTAAGTGA (SEQ ID NO: 69)

Фіг. 24А

Послідовність білка Z2338 ентерогеморагічної *E. coli*

MPVTTLSIPSISQLSPAGVQSLQDAARLES GIRISIGSGQYSVHYVQLLDGFSVEPVRGG
LLDRLLGREHMERRAVALERQLNGGVDFLSSVNNYFQSVMAEHRENKTSNKILMEKINS
CLFRPDSNNHFCPESEFLTCPITLDTPETGVFMRNSRGAETCSLYDKDALVQLVETGGAHP
LSREPITESMIMRKDECHFDTKREAFCK (SEQ ID NO: 81)

Фіг. 24В

Нуклеотидна послідовність Z2339 ентерогеморагічної *E. coli*

ATGCCATTAACTCAGATATTAGATCACATTCATTTAATCTTGGGGTGGAGGTGTTTCGT
GCCCGAATTGTAGCCAATGGGCGCGGAGATATTACAGTCGGTGGTGAACTGTCAGTATT
GTGTATGATTCTACTAATGGGCGCTTTTCATCCAGTGGCGGTAATGGCGGATTGCTTTCT
GAGTTATTGCTTTTGGGATTTAATAGTGGTCCTCGAGCCCTTGGTGAGAGAATGCTAAGT
ATGCTTTCCGACTCAGGTGAAGCACAATCGCAAGAGAGTATTCAGAACAAAATATCTCAA
TGTAAGTTTTCTGTTTGTCCAGAGAGACTTCAGTGCCCGCTTGAGGCTATTCARTGTCCA
ATTACACTGGAGCAGCCTGAAAAGGTATTTTGTGAAGAATTCAGATGGTTCAGATGTA
TGTACTTTTATTGATGCCGCTGCATTTTCTCGTTTGGTTGGTGAAGGCTTACCCACCCA
CTGACCCGGGAACCAATAACGGCATCAATAATTGTAAACATGAAGAATGCATTTATGAC
GATACCAGAGGAACTTCGTTATAAAGGTAATTGA (SEQ ID NO: 70)

Фіг. 25А

Послідовність білка Z2339 ентерогеморагічної *E. coli*

MPLTSDIRSHSFNLGVEVVRARIVANGRGDITVGGETVSIVYDSTNGRFSSSGNGGLLS
ELLLLGFNSGPRALGERMLSM LSGEASQESIQNKISQCKFSVCPERLQCPLEAIQCP
ITLEQPEKGI FVKNSDGS DVCTLFDAAFSRLVGEGLPHPLTREPI TASIIVKHEECIYD
DTRGNFVIKGN (SEQ ID NO: 82)

Фіг. 25В

Нуклеотидна послідовність Z2560 ентерогеморагічної E. coli

atggacgctt ttattgtaga tcctgttcaa ggggaactat attcggggtt aagccataca
gaactagccg atatcattag attggctgat tctgttgaaa atcaattgaa tggaggcaat
tcattttottg atgtattcag tacatatatg gggcagggtta tttctgaatt tatgcatagt
aatgataaca gaattgaatt gttacagcgg cgattacatt catgttcatt tttagttaat
attgaagaaa tgtcttacat agatgaagca ttacagtgcc cgattacgct ggcaattcct
caacgaggtg tttttttaag aaatgctgaa ggttccagag tatgtagttt atatgatgaa
atggctcttt ctcgataaat taatgatggg atgcatcacc cactaagcag agagccaata
acattatcaa tgcttggtgc cagagagcag tgtgagtttg attgcagtat cggtcacttt
acggtgagga gtgattgtta ttcagtgtga (SEQ ID NO: 71)

Фіг. 26А

Послідовність білка Z2560 ентерогеморагічної E. coli

MDAFIVDPVQGLYSGLSHTLADIIRLADSVENQLNGGNSFLDVFSYMGQVISEFMHSNDNRIEL
RRLHSCSFLVNIEEMS YIDEALQCPITLAI PQRGVFLRNAEGSRVCSLYDEMA LSRIINDGMHNP LS
PITLSMLVAREQCEFDCSIGHFTVRSDCYSV (SEQ ID NO: 83)

Фіг. 26В

Нуклеотидна послідовність Z2976 ентерогеморагічної E. coli

ATGGCAGACCGCAAACAGCACCGCGCTATCGCGGAGCGTCGTCACATCCAGACTGAAATC
AACCGCAGACTTTCCCGCGCATCACGCGTCGCGCAAATCATGCACATCAATATGCTGCAT
GAGCGCAGCCAGCACTATCAAACATTTATCCGCCTCTGTTTTCAGCTATCTGGCGGAT
GATCTGCACGAGTTTCAACAGCTCATCCAGCAGCAAACAAACTCCATTAA (SEQ ID NO: 72)

Фіг. 27А

Послідовність білка Z2976 ентерогеморагічної E. coli

MADRKQHRAIAERRHIQTEINRRLSRASRVAQIMHINMLHERSHALSNIYSASVFSYLAD
DLHEFQQLIQQNKLH (SEQ ID NO: 84)

Фіг. 27В