

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039922**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.03.28**

**(21)** Номер заявки  
**201890914**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.11.17**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/70** (2006.01)  
**C12N 15/74** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C07K 14/195** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)

**(54) ДОСТАВКА БЕЛКА БАКТЕРИЯМИ**

**(31)** 15195493.0

**(32)** 2015.11.19

**(33)** EP

**(43)** 2018.12.28

**(86)** PCT/EP2016/078087

**(87)** WO 2017/085235 2017.05.26

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**УНИВЕРСИТЕТ БАЗЕЛЬ (CH)**

**(72)** Изобретатель:  
**Иттиг Симон, Амштуц Марлиз,  
Каспер Кристоф (CH)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** US-A1-2015140037

Y. ZHANG ET AL: "Type III Secretion System-Dependent Translocation of Ectopically Expressed Yop Effectors into Macrophages by Intracellular Yersinia pseudotuberculosis", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 79, no. 11, 15 August 2011 (2011-08-15), pages 4322-4331, XP055204813, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.05396-11 the whole document

US-A1-2008187520

WO-A2-2008019183

WO-A2-0002996

L K J STADLER ET AL: "The use of a neutral peptide aptamer scaffold to anchor BH3 peptides constitutes a viable approach to studying their function", CELL DEATH AND DISEASE, vol. 5, no. 1, 30 January 2014 (2014-01-30), pages 1-9, XP055315981, ISSN: 2041-4889, DOI:10.1038/cddis.2013.564 the whole document

WO-A1-2015042705

WO-A1-2015177197

SIMON J. ITTIG ET AL: "A bacterial type III secretion-based protein delivery tool for broad applications in cell biology", THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY : JCB, vol. 211, no. 4, 23 November 2015 (2015-11-23), pages 913-931, XP055356396, US ISSN: 0021-9525, DOI: 10.1083/jcb.201502074 the whole document -& ITTIG SIMON J ET AL: "Supplemental material to A bacterial type III secretion-based protein delivery tool for broad applications in cell biology", THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 211, no. 4, 23 November 2015 (2015-11-23), pages S21-S29, XP002768396, ISSN: 1540-8140, DOI: 10.1083/jcb.201502074 the whole document

**(57)** Настоящее изобретение относится к рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммам и их применению для доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в эукариотические клетки.

**B1**

**039922**

**039922**

**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммам и их применению для доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в эукариотические клетки.

### Уровень техники

В течение многих лет в биологических исследованиях клеток для изучения функций белка применялись методы транзientной трансфекции. Указанные методы как правило приводят к существенному превышению количества исследуемого белка, что может вести к чрезмерно упрощенным моделям сигнализации. Для белков, контролирующих скоротечные процессы сигнализации, данный белок живет гораздо дольше, чем контролируемое им событие сигнализации. Более того, транзientная сверхэкспрессия на основе трансфекции ДНК приводит к гетерогенной и несинхронизированной популяции клеток, что усложняет функциональные исследования и затрудняет подходы с точки зрения "-омик". Помимо этого, масштабирование таких анализов очень дорого. Некоторые из вышеупомянутых проблем решаются существующими методиками, например микроинъекциями или протеофекцией очищенных белков, стратегией индуцируемой транслокации для быстрого нацеливания передающихся через плазмиды малых ГТФаз на клеточную мембрану или добавлением очищенных белков, слитых с проникающими через мембрану бактериальными токсинами. Но все указанные методики требуют много времени и усилий, и, насколько известно авторам настоящего изобретения, ни одна из них не соответствует всем указанным критериям.

Бактерии выработали другие механизмы для непосредственного впрыскивания своих белков в клетки-мишени [1]. Секреторная система третьего типа (Т3SS), используемая такими бактериями, как *Yersinia*, *Shigella* и *Salmonella* [2], работает как нано-шприц, который вводит так называемые бактериальные эффекторные белки в клетки-хозяева. Бактериальные белки, которые секретируются посредством Т3SS, называемые эффекторами, содержат короткий N-концевой сигнал секреции [3]. Внутри бактерий некоторые эффекторы связаны шаперонами. Шапероны могут маскировать токсичные домены, они способствуют экспозиции сигнала секреции и поддерживают субстраты в компетентной для секреции конформации, тем самым облегчая секрецию. При индукции секреции АТФаза, прилегающая к Т3SS, удаляет шапероны, и эффекторы движутся в несвернутом или только частично свернутом виде через иглу, а затем снова сворачиваются в цитоплазме хозяина.

Систему Т3S и ранее использовали для доставки гибридных пептидов и белков в клетки-мишени. В случае если изучаемая бактерия является труднодоступной методами генетики (например, *Chlamydia trachomatis*), доставляли гетерологичные бактериальные эффекторы Т3SS. Часто репортерные белки сливали с возможными сигналами секреции Т3SS в соответствии с требованиями исследований для доставки Т3SS-зависимого от белка, например, в случае аденилатциклазы *Bordetella pertussis*, мышинной DHFR или фосфорилируемой метки. Доставку пептидов выполняли в основном с целью вакцинации. Это касалось вирусных эпитопов, бактериальных эпитопов (лиστεриолизин O), а также пептидов, представляющих эпитопы раковых клеток человека. В немногих случаях функциональные эукариотические белки доставлялись для модуляции клетки-хозяина, например, в случае нанотел [4], ядерных белков (Стереккомбиназа, MyoD) [5, 6] или III10 и IL1ra [7]. Ни одна из вышеупомянутых систем не обеспечивает доставку одиночного белка, поскольку в каждом случае все равно кодируется один или несколько эндогенных эффекторных белков. Кроме того, используемые векторы не были рассчитаны на то, чтобы обеспечить простое клонирование других фрагментов ДНК, кодирующих выбранные белки, препятствуя широкому применению такой системы. Неожиданно было обнаружено, что доставка повторяющихся доменов гетерологичных белков или комбинаций доменов разных гетерологичных белков в эукариотические клетки увеличивает воздействие на желаемый клеточный путь.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммам и их применению для доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в эукариотические клетки. В настоящем изобретении предложены грамотрицательные бактериальные штаммы и их применение, позволяющее транслоцировать повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, таких как различные эффекторы типа III, но также эффекторы типа IV, вирусные белки и, самое главное, функциональные эукариотические белки. Предложены средства для флуоресцентного отслеживания доставки, для релокализации к ядру и, в частности, для удаления придатков бактерии после доставки в клетку-хозяина. Представленная система на основе Т3SS обеспечивает масштабируемую, быструю, синхронизированную, гомогенную и настраиваемую доставку повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков, являющихся объектом исследования. Система доставки по настоящему изобретению пригодна для введения повторяющихся доменов эукариотического белка эукариот или двух или более доменов различных эукариотических белков у живых животных и может использоваться в терапевтических целях.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному грамотрицательному бактериальному штамму, трансформированному вектором, который содержит в направлении от 5' до 3':

промотор; первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки от бактериального T3SS-эффекторного белка, функционально связанного с указанным промотором; а также вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, причем гетерологичные белки выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному грамотрицательному бактериальному штамму, трансформированному вектором, который содержит в направлении от 5' до 3': первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки или ее фрагмент из бактериального эффекторного белка; а также вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, причем гетерологичные белки выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, который содержит в направлении от 5' до 3': первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки или ее фрагмент из бактериального эффекторного белка; а также вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, причем гетерологичные белки выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, который содержит в направлении от 5' до 3': промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки от бактериального T3SS-эффекторного белка, функционально связанного с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, причем гетерологичные белки выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков.

Настоящее изобретение также относится к способу доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в эукариотическую клетку, включающему следующие указанные этапы:

i) культивирование грамотрицательного бактериального штамма; а также  
ii) контактирование эукариотической клетки с грамотрицательным бактериальным штаммом i), причем слитый белок, который содержит сигнал доставки от бактериального эффектора T3SS и повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, экспрессируется посредством этого грамотрицательного бактериального штамма и транслоцируется в эукариотическую клетку.

Настоящее изобретение также относится к способу доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в эукариотическую клетку, включающему следующие указанные этапы:

i) культивирование грамотрицательного бактериального штамма;  
ii) контактирование эукариотической клетки с грамотрицательным бактериальным штаммом i), причем слитый белок, который содержит сигнал доставки от бактериального эффектора T3SS и повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, экспрессируется посредством этого грамотрицательного бактериального штамма и транслоцируется в эукариотическую клетку; а также

iii) расщепление слитого белка, так что повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков отщепляются от сигнала доставки из бактериального T3SS-эффекторного белка.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к библиотеке грамотрицательных бактериальных штаммов, причем повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов

различных гетерологических белков, кодируемых второй ДНК-последовательностью вектора экспрессии указанных грамотрицательных бактериальных штаммов, представлены доменами человеческого или мышинового белка, и каждый домен человеческого или мышинового белка, экспрессируемый грамотрицательным бактериальным штаммом, отличается в аминокислотной последовательности.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - описание доставки белка Т3SS. (А) Схематическое изображение секреции зависимого от Т3SS белка в окружающую среду (секреция *in vitro*) (слева) или в эукариотические клетки (справа). I: показана система секреции типа 3. II: белки, секретиромые в окружающую среду, III: белки, транслоцированные через мембрану в цитозоль эукариотических клеток (VII). VI: показан участок двух бактериальных мембран, в которые введена Т3SS, и цитозоль бактерии внизу. IV: слитый белок, присоединенный к N-концевому фрагменту YopE<sub>1-138</sub> (V) (B) In-vitro секреция I: *Y. enterocolitica* E40 дикого типа, II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или III: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBadSi<sub>2</sub> по данным Вестерн-блоттинга на совокупности бактериальных лизатов (IV) и осажденных супернатантов культуры (V) с использованием антитела к YopE.

Фиг. 2 - описание доставки белка Т3SS в эпителиальные клетки. (А) Иммунофлуоресцентное окрашивание с анти-мус антителом на клетках HeLa, инфицированных при MOI=100 в течение 1 ч следующими бактериями I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2. (B) Количественная оценка интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания с анти-мус антителом из (A) в клетках HeLa. Данные были объединены из n=20 сайтов, "усы" погрешности - стандартная погрешность среднего. I: неинфицированная клетка, II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или III: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2. На оси Y отложена интенсивность окрашивания с анти-мус антителом (условные единицы), на оси X - время инфицирования в минутах (C) Количественная оценка интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания анти-мус антителом в клетках. Клетки HeLa инфицировали в течение 1 ч бактериями *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2 при MOI, обозначенной на оси X. Данные были объединены из n=20 сайтов, указанные погрешности - стандартная погрешность среднего. На оси Y отложена интенсивность окрашивания с анти-мус антителом (условные единицы).

Фиг. 3 - модификации доставки белка на основе Т3SS позволяют осуществить ядерную локализацию слитого белка YopE<sub>1-138</sub> (EGFP). Сигнал EGFP в клетках HeLa, инфицированных бактериями I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd ΔyopB, несущими плазмиды III: +YopE<sub>1-138</sub>-EGFP или IV: +YopE<sub>1-138</sub>-EGFP-NLS при MOI=100. Сигнал EGFP показан в "a", для сравнения локализации ядра были окрашены в "b".

Фиг. 4 - модификации доставки белка на основе Т3SS позволяют удалить придаток YopE<sub>1-138</sub>. Клетки HeLa инфицированы двумя разными штаммами *Y. enterocolitica* одновременно, что достигается простым смешиванием двух бактериальных суспензий. Один штамм доставляет протеазу TEV, слитую с YopE<sub>1-138</sub>, в то время как другой штамм доставляет исследуемый белок, слитый с YopE<sub>1-138</sub>, с линкером, содержащим двойной сайт расщепления протеазой TEV. После доставки белка в эукариотическую клетку протеаза TEV будет отщеплять придаток YopE<sub>1-138</sub> от изучаемого белка (A) Лизированные дигитонином клетки HeLa, неинфицированные (II) или после инфицирования (MOI=100) в течение 2 ч бактериями I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и III: +pBadSi<sub>2</sub>, IV: +YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV-FLAG-INK4C, V: +YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV-Flag-INK4C и дальнейшей обработки в течение ночи очищенной протеазой TEV и VI: +YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV -Flag-INK4C и второй штамм +YopE<sub>1-138</sub>-TEV были проанализированы вестерн-блоттингом с анти-INK4C (изображено в "a") на присутствие YopE<sub>1-138</sub> - 2x сайт расщепления TEV-Flag-INK4C или его расщепленной формы Flag-INK4C. В качестве контроля загрузки был выполнен вестерн-блоттинг с анти-актин-антителом (изображено в "b"). В одном случае (V) лизированные клетки инкубировали в течение ночи с очищенной протеазой TEV. (B) Нормализованная на актин количественная оценка интенсивности окрашивания анти-INK4C (показанной в (произвольных единицах) по оси y) из (A) с размером полноразмерной YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV-Flag-INK4C, где образец IV взят за 100%. I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и IV: +YopE<sub>1-138</sub>-2x TEV-сайт расщепления Flag-INK4C, V: +YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV-Flag-INK4C с дальнейшей обработкой в течение ночи очищенной протеазой TEV и VI: +YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV-Flag-INK4C и второй штамм +YopE<sub>1-138</sub>-TEV. Данные были объединены из n=2 независимых экспериментов, обозначенные погрешности представляют стандартную ошибку среднего (C) Лизированные дигитонином клетки HeLa, неинфицированные (II) или после инфицирования (MOI=100) в течение 2 ч штаммами I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и III: + pBadSi<sub>2</sub>, IV: +YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV -ET1-Мус, V: +YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV -ET1-Мус с дальнейшей обработкой в течение ночи очищенной протеазой TEV и VI: +YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV-ET1-Мус и второй штамм +YopE<sub>1-138</sub>-TEV были проанализированы вестерн-блоттингом анти-Мус (показано на "a") на присутствие YopE<sub>1-138</sub>-2x сайт расщепления TEV-ET1-Мус или его расщепленной формы ET1-Мус. В качестве контроля загрузки был выполнен вестерн-блоттинг с анти-актин антителом (изображено в "b"). В одном случае (V) лизированные клетки инкубировали в течение ночи с очищенной протеазой TEV.

Фиг. 5 - доставка бактериальных эффекторных белков в эукариотические клетки (A) Клетки HeLa

были инфицированы I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd несущим II: pBad\_Si2 или III: YopE<sub>1-138</sub>-SopE при MOI=100 в течение времени, указанного над изображением (2, 10 или 60 мин). После фиксации клетки окрашивали для выявления актинового цитоскелета (B) Клетки HeLa были оставлены неинфицированными (II) или инфицированы I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd несущим III: YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Мус и в некоторых случаях коинфицированы IV: YopE<sub>1-138</sub>-SptP при MOI, указанном под штаммом (MOI 50; MOI50:MOI50 или MOI50:MOI100) в течение 1 ч. После фиксации клетки окрашивали для выявления актинового цитоскелета (показано в "a"), и присутствие слитого белка YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Мус отслеживали по окрашиванию анти-Мус (показано в "b").

Фиг. 6 - доставка бактериальных эффекторных белков в эукариотические клетки (A) Вестерн-блоттинг с антителами к Phospho-p38 ("a"), общим p38 ("b") и актину ("c") на клетках HeLa без инфицирования (II) или инфицированных в течение 75 мин штаммами I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущим III: pBad\_Si2 или IV: YopE<sub>1-138</sub>-OspF при MOI=100. Клетки стимулировали TNFα в течение последних 30 мин инфицирования, как указано (+ означает добавление TNFα, - означает отсутствие обработки TNFα) (B) Вестерн-блоттинг Phospho-Akt T308 ("a") и S473 ("b") и актина ("c") на клетках HeLa без инфицирования (II) или инфицированных в течение 22,5 или 45 мин (указано под блотами) штаммами I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущим III: pBad\_Si2, IV: YopE<sub>1-138</sub>-SopE или V: YopE<sub>1-138</sub>-SopB при MOI=100 (C) уровни цАМФ (в фмоль/лунку, показано по оси Y) в клетках HeLa, оставшихся без инфицирования (I) или инфицированных в течение 2,5 ч штаммами V: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-VerA, VI: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-VerA<sub>E305-end</sub>, VII: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-VerG<sub>Bid</sub> или VIII: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2 при MOI=100. В качестве положительного контроля для образцов добавляли холерный токсин (ХТ) в течение 1 ч II (1 мкг/мл), III (25 мкг/мл) или IV (50 мкг/мл). Данные были объединены из n=3 независимых экспериментов, обозначенные погрешности представляют стандартную ошибку среднего. Статистический анализ проводился с использованием непарного двухстороннего t-критерия ("ns" указывает на незначимое изменение, \*\* указывает р-значение <0.01, \*\*\* указывает р-значение <0,001).

Фиг. 7 - доставка tBid человека в эукариотические клетки индуцирует массивный апоптоз. (A) Вестерн-блоттинг с расщепляющей каспазой 3 p17 ("a") и актином ("b") на блоках HeLa, без инфицирования (II), или инфицированных в течение 60 мин штаммами I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущим III: pBad\_Si2, IV: YopE<sub>1-138</sub>-Bid или V: YopE<sub>1-138</sub>-t-Bid при MOI=100. В некоторых случаях клетки обрабатывали VI: стауроспорином 0,5 мкМ или VII: стауроспорином 1 мкМ (B) Лизированные дигитонином клетки HeLa, неинфицированные (II) или после инфицирования в течение 1 ч штаммами I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущим III: pBad\_Si2, IV: YopE<sub>1-138</sub>-Bid или V: YopE<sub>1-138</sub>-t-Bid при MOI=100 были проанализированы вестерн-блоттинг с анти-Bid ("a"), позволив сравнить уровни эндогенных Bid (отмечены Z) с уровнями транслоцированных YopE<sub>1-138</sub>-Bid (обозначены X) YopE<sub>1-138</sub>-tBid (обозначены Y) или YopE<sub>1-138</sub>-tBid (обозначены Y). В качестве контроля загрузки использовался вестерн-блоттинг с анти-актином (показано в "b"). В некоторых случаях клетки обрабатывали VI: стауроспорином 0,5 мкМ или VII: стауроспорином 1 мкМ (C) Клетки HeLa были оставлены неинфицированными (I) или инфицированы при MOI=100 в течение 1 ч штаммами II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2, III: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-Bid, IV: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-tBid. В некоторых случаях клетки обрабатывали V: стауроспорином 0,5 мкМ или VI: стауроспорином 1 мкМ. После фиксации клетки окрашивали для выявления актинового цитоскелета (серый цвет).

Фиг. 8 - T3SS-зависимая доставка BИМ рыбок данио индуцирует апоптоз у эмбрионов рыбок данио. (A) Эмбрионы рыбок данио возрастом 2 дня с момента оплодотворения были заражены экспрессирующим EGFP контрольным штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBadSi1 (I) или zBИМ-транслоцирующим штаммом (II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-zBИМ) путем инъекции приблизительно 400 бактерий в область заднего мозга. Через 5,5 ч эмбрионы фиксировали, окрашивали на активированную каспазу 3 (расщепляющая каспаза 3, p17, показано в "c") и анализировали на наличие бактерий (сигнал EGFP, показано в "b"). Показаны Z-проекции максимальной интенсивности для флуоресцентных изображений. Z-проекции в светлом поле показаны в "a" (B) Автоматизированный анализ изображений по Z-проекциям максимальной интенсивности записанных изображений срезов по оси Z (A). В кратком изложении, бактерии детектировали через канал EGFP. Вокруг каждой области бактериального пятна создавали кружок радиусом 10 пикселей. Перекрывающиеся области были разделены поровну между контактирующими элементами. В областях, близко окружающих бактерии, измеряли интенсивность окрашивания каспазой-3 p17 нанося на ось Y (в условных единицах). Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна-Уитни (\* указывает р-значение <0,001). Данные были объединены из n=14 для животных, инфицированных контрольным штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si1 (I) или n=19 для II: штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-zBИМ, обозначенные погрешности представляют стандартную ошибку среднего.

Фиг. 9 - tBid-зависимый фосфопротеом: Клетки HeLa инфицировали в течение 30 мин штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-t-Bid при MOI=100 и в качестве контроля штаммом *Y. enterocoli-*

tica ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2. (А) Графическое представление фосфопротеома tBid. Белки, содержащие фосфопептиды, которые претерпевали значимую регуляцию tBid-зависимым образом (серый) ( $q$ -значение  $<0,01$ ), а также известные связанные с апоптозом белки (темно-серый), представлены в сети STRING известных и прогнозируемых белок-белковых взаимодействий (высокая достоверность, балл 0,7). Представлены только белки с по меньшей мере одной связью в STRING. (В) Конфокальные изображения клеток HeLa, инфицированных либо штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2 (I) либо *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-t-Bid (II) показывают индукцию апоптотического фенотипа при доставке tBid. Клетки были окрашены для выявления ядер красителем Hoechst ("a"), на F-актин - фаллоидином ("b"), на тубулин - анти-тубулиновым антителом ("c") и на митохондрии - митотреккером ("d"). Масштабный отрезок соответствует 40 мкм.

Фиг. 10 - описание набора инструментов для доставки на основе секреции типа III. (А) Векторные карты клонирующих плазмид pBad\_Si1 и pBad\_Si2, использованных для генерации конструкций слияния с YopE<sub>1-138</sub>. Шаперон SycE и YopE<sub>1-138</sub>-гибрид находятся под нативным промотором *Y. enterocolitica*. Две плазмиды отличаются только наличием индуцируемого арабинозой EGFP, присутствующего на сайте pBad\_Si1 (В) Множественный сайт клонирования непосредственно после фрагмента YopE<sub>1-138</sub> на плазмидах pBad\_Si1 и pBad\_Si2.

Фиг. 11 - характеристика доставки белка T3SS в различные клеточные линии. Иммунофлуоресцентное окрашивание с анти-Мус на фибробластах Swiss 3T3 ("a"), клетках Jurkat ("b") и клетках HUVES ("c") без инфицирования (II), или инфицированных штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2 (I) при MOI, указанными над изображениями (MOI 25, 50, 100, 200 и 400 для HUVES) в течение 1 ч.

Фиг. 12 - T3SS-зависимость доставки бактериальных эффекторных белков в эукариотическую клетку. Лизированные дигитонином клетки HeLa после инфицирования при MOI = 100 в течение времени, указанного над блоками (0, 5, 15, 10, 60 и 120 мин) штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd ΔурВ+YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Мус (I) или *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Мус (II) были проанализированы вестерн-блоттингом с анти-Мус. Размер, соответствующий YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Мус обозначен буквой "a", а размер эндогенного белка с-Мус обозначен буквой "b".

Фиг. 13 и 14 - T3SS-зависимая секреция различных других белков в супернатант культуры. Эксперимент *in vitro* секреции I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub> слитого с указанным белком. Содержание белка в общей массе бактериальных лизатов ("А") и осажденных супернатантов культуры ("В") анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием анти-YopE-антитела. Числа на диаграмме указывают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 15A-N - штаммы *Y. enterocolitica* и *S. enterica*, используемые в этом исследовании.

Список штаммов *Y. enterocolitica* и *S. enterica*, используемых в этом исследовании, содержит сведения об исходных штаммах, плазмидах и белках для T3SS-зависимой доставки, закодированной на соответствующих плазмидах. Кроме того, представлена информация об олигонуклеотидах, используемых для конструирования соответствующей плазмиды, основной плазмиды и резистентности к антибиотикам.

Фиг. 16 - доставка мышинового tBid, мышинового ВНЗ и мышинового Вах ВНЗ в клетки V16F10 индуцирует массивный апоптоз. Клетки V16F10, неинфицированные (I) или после инфицирования (MOI=50) в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: +pBadSi\_2, III: +YopE<sub>1-138</sub>-*Y. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный tBid, IV: +YopE<sub>1-138</sub>-*F. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный Bid ВНЗ или V: +YopE<sub>1-138</sub>-*Y. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный Вах ВНЗ. После фиксации клетки окрашивали для выявления актинового цитоскелета и ядер (оба - серым цветом).

Фиг. 17 - доставка мышинового tBid, мышинового ВНЗ и мышинового Вах ВНЗ в клетки D2A1 индуцирует массивный апоптоз. Клетки D2A1, неинфицированные (I) или после инфицирования (MOI=50) в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: +pBadSi\_2, III: +YopE<sub>1-138</sub>-*F. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный tBid, IV: +YopE<sub>1-138</sub>-*F. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный Bid ВНЗ или V: +YopE<sub>1-138</sub>-*F. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный Вах ВНЗ. После фиксации клетки окрашивали для выявления актинового цитоскелета и ядер (оба - серым цветом).

Фиг. 18 - доставка мышинового tBid, мышинового ВНЗ и мышинового Вах ВНЗ в клетки HeLa вызывает массовый апоптоз. Клетки HeLa, неинфицированные (I) или после инфицирования (MOI=50) в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: +pBadSi\_2, III: +YopE<sub>1-138</sub>-*Y. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный tBid, IV: +YopE<sub>1-138</sub>-*F. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный Bid ВНЗ или V: +YopE<sub>1-138</sub>-*F. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный Вах ВНЗ. После фиксации клетки окрашивали для выявления актинового цитоскелета и ядер (оба - серым цветом).

Фиг. 19 - доставка мышинового tBid, мышинового ВНЗ и мышинового Вах ВНЗ в клетки 4T1 индуцирует массивный апоптоз. Клетки 4T1, неинфицированные (I) или после инфицирования (MOI = 50) в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: +pBadSi\_2, III: +YopE<sub>1-138</sub>-*Y. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный tBid, IV: +YopE<sub>1-138</sub>-*Y. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный Bid ВНЗ или V: +YopE<sub>1-138</sub>-*Y. enterocolitica* кодон-оптимизированный мышинный Вах ВНЗ. После фиксации клетки окрашивали для выявления актинового цитоскелета и ядер (оба - серым цветом).

Фиг. 20 - доставка мышинового tBid штаммом *S. enterica*, выращенным в условиях, индуцирующих

SPI-1 T3SS, в эукариотические клетки индуцирует апоптоз. Вестерн-блоттинг расщепляющей каспазы 3 p17 на клетках HeLa, неинфицированные (I) или после инфицирования в течение 4 ч III: *S. enterica* aroA, несущим IV: SteA<sub>1-20</sub>-t-Bid, V: SteA<sub>FL</sub>-Bid, VI: SopE<sub>1-81</sub>-t-Bid или VII: SopE<sub>1-105</sub>-t-Bid при MOI=100. Для этого эксперимента все штаммы *S. enterica* aroA выращивали в условиях, индуцирующих T3SS SPI-1. В некоторых случаях клетки обрабатывали II: стауроспорином 1 мкМ. Указанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 21 - доставка мышинового tBid штаммом *S. enterica*, выращенным в условиях, индуцирующих SPI-1 T3SS, в эукариотические клетки индуцирует апоптоз. Вестерн-блоттинг расщепляющей каспазы 3 p17 на клетках HeLa, неинфицированные (I) или после инфицирования в течение 4 ч III: *S. enterica* aroA, несущим IV: SteA<sub>1-20</sub>-t-Bid, V: SteA<sub>FL</sub>-Bid, VI: SopE<sub>1-81</sub>-t-Bid или VII: SopE<sub>1-105</sub>-t-Bid при MOI=100. Для этого эксперимента все штаммы *S. enterica* aroA выращивали в условиях, индуцирующих T3SS SPI-1. В некоторых случаях клетки обрабатывали II: стауроспорином 1 мкМ. Указанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 22 - T3SS-зависимая секреция *S. enterica* различных белков клеточного цикла в супернатант культуры. Эксперимент *in vitro* секреции *S. enterica* aroA+either SteA<sub>FL</sub> (I, III, V, VII) или SopE<sub>1-105</sub> (II, IV, VI, VIII), слитых с белками, перечисленными ниже. I и II: Ink4a-MyсHis; III и IV: Ink4c-MyсHis; V и VI: Mad2-MyсHis; VII и VIII: Cdk1-MyсHis. Содержание белка в осажденных культуральных супернатантах ("A") и совокупном бактериальном лизате ("B") анализировали Вестерн-блоттингом с использованием анти-мус антитела. Указанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 23 - T3SS-зависимая секреция различных известных пептидов, препятствующих клеточному циклу, в супернатант культуры. Эксперимент *in vitro* секреции I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad\_Si2. II-VII: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>, слитых с белками, перечисленными ниже: II: Ink4A<sub>84-103</sub>; III: p107/RBL1<sub>657-662</sub>; IV: p21<sub>141-160D149A</sub>; V: p21<sub>145-160D149A</sub>; VI: p21<sub>17-33</sub>; VII: циклин D21<sub>39-147</sub>. Содержание белка в осажденных культуральных супернатантах ("A") и совокупном бактериальном лизате ("B") анализировали Вестерн-блоттингом с использованием анти-YopE антитела. Указанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 24 - слияние доставленного T3SS белка с убиквитином позволяет удалить придаток YopE<sub>1-138</sub>. Клетки HeLa инфицированы штаммом, доставляющим изучаемый белок, присоединенный к YopE<sub>1-138</sub>, с непосредственно слитым убиквитином (YopE<sub>1-138</sub>-Ubi). После доставки белка в эукариотическую клетку эндогенные убиквитин-специфичные протеазы будут отщеплять придаток YopE<sub>1-138</sub>-Ubi от изучаемого белка. Лизированные дигитонином клетки HeLa, неинфицированные (I) или после инфицирования (MOI 100) в течение 1 ч II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-Flag-INK4C-MyсHis или III: +YopE<sub>1-138</sub>-Flag-убиквитин-INK4C-MyсHis были проанализированы вестерн-блоттингом с анти-INK4C на присутствие IV: YopE<sub>1-138</sub>-Flag-убиквитин-INK4C-MyсHis или V: YopE<sub>1-138</sub>-Flag-INK4C-MyсHis, расщепленной формы VI: INK4C-MyсHis и VII: эндогенного INK4C.

Фиг. 25 - схематическое представление гетерологичных белков и их доменов, которые могут быть доставлены через бактериальную T3SS. I: Полноразмерный белок человека/мыши с доменами, окрашенными в разные оттенки серого, II: Усеченный белок человека/мыши с доменами, окрашенными в разные оттенки серого, III: Мотив/домен только полноразмерного белка человека/мыши, IV: Мотив/домен только повторяющихся (слева) или комбинация двух разных мотивов/доменов полноразмерного белка человека/мыши (справа).

Фиг. 26 - доставка ВНЗ-доменов мышинового Tbid и мышинового Вах в эукариотические клетки и их слитые повторы индуцируют апоптоз в раковых клетках. Клетки меланомы мыши В16F10 инфицировали при MOI, составляющей 5, 10, 25 и 50 (слева направо при каждом условии) соответствующих бактерий, как показано, в течение 4 ч. Влияние на жизнеспособность клеток оценивали путем подсчета числа клеток посредством подсчета ядер. I: число ядер. II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2, III: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-Bid-ВНЗ, IV: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-(Bid-ВНЗ)<sub>2</sub> и V: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-(Bid-ВНЗ)-(Вах-ВНЗ). Ядра окрашивали красителем Hoechst. Изображения были получены с использованием автоматизированного микроскопа, а число клеток автоматически определяли с помощью программы CellProfiler.

Фиг. 27 - доставка ВНЗ-доменов мышинового Tbid и мышинового Вах в эукариотические клетки и их слитые повторы индуцируют апоптоз в раковых клетках. Клетки рака молочной железы 4T1 мыши инфицировали при MOI, составляющей 5, 10, 25 и 50 (слева направо при каждом условии) соответствующих бактерий, как показано, в течение 4 ч. Влияние на жизнеспособность клеток оценивали путем подсчета числа клеток посредством подсчета ядер. I: число ядер. II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad\_Si2, III: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-Bid-ВНЗ, IV: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-(Bid-ВНЗ)<sub>2</sub> и V: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-(Bid-ВНЗ)-(Вах-ВНЗ). Ядра окрашивали красителем Hoechst. Изображения были получены с использованием автоматизированного микроскопа, а число клеток автоматически определяли с помощью программы CellProfiler.

Фиг. 28 - доставка синтетических увеличенных проапоптотических белков. Доставка одиночных

синтетических белков, состоящих из одиночных или tandemных повторов ВНЗ-доменов, взятых из проапоптотических белков t-BID или BAX, приводит к усиленной индукции апоптоза в раковых клетках 4T1 и B16F10. Клетки 4T1 (I) или B16F10 (II) инфицировали *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T, кодирующим на pBad-MycHisA IV: YopE<sub>1-138</sub>-tBID ВНЗ расширенный домен, V: YopE<sub>1-138</sub>-linker-tBID ВНЗ, VI: YopE<sub>1-138</sub>-tBID ВНЗ, VII: YopE<sub>1-138</sub>-(tBID ВНЗ)<sub>2</sub>, VIII: YopE<sub>1-138</sub>-tBID ВНЗ - BAX ВНЗ или IX: YopE<sub>1-138</sub>-BAX ВНЗ - tBID ВНЗ. Для каждого штамма выполняли титрование бактерий, добавленных к клеткам (МОИ), определяли количество клеток и вычисляли IC<sub>50</sub> с использованием нелинейной регрессии. Показана МОИ для IC<sub>50</sub> (III).

Фиг. 29 - индукция апоптоза pYV-кодированными синтетическими проапоптотическими белками. Доставка одиночного или tandemного повторения ВНЗ-домена BID, закодированного на pYV, приводит к индукции апоптоза в раковых клетках 4T1 и B16F10. Клетки 4T1 (I) или B16F10 (II) инфицировали *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ+IV: pYV-YopE<sub>1-138</sub>-ВНЗ-Bid, или V: +pYV-YopE<sub>1-138</sub>-(ВНЗ-Bid)<sub>2</sub> или VI: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ pBad-MycHisA-YopE<sub>1-138</sub>-(ВНЗ-Bid)<sub>2</sub> в течение 3 ч. Для каждого штамма выполняли титрование бактерий, добавленных к клеткам (МОИ), определяли количество клеток и вычисляли IC<sub>50</sub> (III) с использованием нелинейной регрессии.

Фиг. 30 - колонизация опухолей в/в введенным *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T в модели аллотрансплантата рака молочной железы 4T1. Количества бактерий в опухолях обозначены в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм ткани (III). Количества бактерий оценивали в опухолях на 8-й (I) и 14-й (II) день после инфицирования. Каждая точка представляет отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения.

Фиг. 31: Биораспределение в/в введенного *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T в модели аллотрансплантата рака молочной железы 4T1. Количества бактерий в крови (I), селезенке (II), печени (III), легких (IV) и опухоли (V) обозначены в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм ткани или на мл крови (VI). Количества бактерий оценивали на 14-й день после инфицирования. Каждая точка представляет отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия указывает предел обнаружения. \* указывает на мышь с большими метастазами, обнаруженными на легких.

Фиг. 32 - замедление прогрессирования опухоли у мышей дикого типа Balb/C после п/к аллотрансплантации клеток рака молочной железы 4T1. дикого типа Balb/C после п/к аллотрансплантации клетками рака молочной железы 4T1 в/в инъецировали I: PBS или II:  $1 \times 10^7$  *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ+pYV-YopE<sub>1-138</sub>(ВНЗ-Bid)<sub>2</sub>, после достижения опухолью размера 150-250 мм<sup>3</sup>. День в/в инъекции бактерий определялся как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (III, дни 0-9 после инъекции бактерий) циркулем. Относительный объем опухоли, нормированный на объем опухоли в день 0, указан (IV) в мм<sup>3</sup>. Среднее значение обозначено символами, изображенные погрешности отображают стандартную ошибку среднего. Статистическая значимость измеряется с помощью двухстороннего дисперсионного анализа, \* обозначает p-значение <0,05, \*\* - p-значение <0,005.

Фиг. 33 - прогрессирование опухоли у мышей дикого типа Balb/C после п/к аллотрансплантации клеток рака молочной железы 4T1. Мышам дикого типа Balb/C после п/к аллотрансплантации клетками рака молочной железы 4T1 в/в инъецировали I: PBS или II:  $1 \times 10^7$  *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, после достижения опухолью размера 150-250 мм<sup>3</sup>. День в/в инъекции бактерий определялся как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (III, дни 0-9 после инъекции бактерий) циркулем. Относительный объем опухоли, нормированный на объем опухоли в день 0, указан (IV) в мм<sup>3</sup>. Среднее значение обозначено символами, изображенные погрешности отображают стандартную ошибку среднего.

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммам и их применению для доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в эукариотические клетки.

Для целей интерпретации настоящего описания используются следующие определения, и, в соответствующих случаях, термины, используемые в единственном числе, также включают множественное число и наоборот. Следует понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не является единственно возможной.

Термин "грамотрицательный бактериальный штамм", используемый в настоящей заявке, включает следующие бактерии:

*Aeromonas salmonicida*,  
*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*,  
*Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*,  
*Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*,  
*Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachmoatis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter rodentium*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Edwardsiella tarda*,  
*Endozoicomonas elysicola*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Mesorhizobium loti*, *Myxococcus xanthus*, *Pantoea agglomerans*, *Photobacterium damsela*, *Photorhabdus luminescens*, *Photorabdus temperate*, *Pseudoalteromonas spongiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium sp*,  
*Salmonella enterica* и другие *Salmonella sp*, *Shigella flexneri* и другие *Shigella sp*,  
*Sodalis glossinidius*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio campellii*, *Vibrio caribbenthicus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio tubiashii*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Предпочтительными грамотрицательными бактериальными штаммами, предложенными в соответствии с настоящим изобретением, являются грамотрицательные бактериальные штаммы, состоящие из семейств Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae. Грамотрицательный бактериальный штамм, предложенный согласно настоящему изобретению, обычно используется для доставки гетерологичных белков бактериальной ТЗСС в эукариотические клетки *in vitro* и/или *in vivo*, предпочтительно *in vivo*.

Используемый в настоящей заявке термин "рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм" относится к грамотрицательному бактериальному штамму, генетически трансформированному с помощью вектора. Подходящим вектором для настоящего изобретения является, например, вектор экспрессии, вектор для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности или фрагмент ДНК или РНК для инсерции или модификации хромосомы или плазмиды вирулентности.

Термин "рекомбинантные грамотрицательные бактериальные штаммы, дефицитные по продуцированию по меньшей мере одного функционального эффекторного белка ТЗСС", используемый в настоящей заявке, относится к рекомбинантному грамотрицательному бактериальному штамму, в котором по меньшей мере один эффекторный белок ТЗСС мутировал таким образом, что результирующий рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм больше не способен продуцировать функциональную форму, по меньшей мере, одного эффекторного белка ТЗСС, т.е. экспрессия такого эффекторного гена прекращена, так что полученные рекомбинантные грамотрицательные бактериальные штаммы не производят никакого из по меньшей мере одного эффекторного белка ТЗСС или так что каталитическая активность кодируемого эффекторного белка прекращена, так что по меньшей мере один продуцируемый эффекторный белок ТЗСС не обладает своей каталитической активностью, например не выполняет свои эффекторные функции. Для целей доставки белков система секреции и транслокации рекомбинантных грамотрицательных бактериальных штаммов, которые дефицитны по продуцированию по меньшей мере одного функционального эффекторного белка ТЗСС, должна быть нативной. Используемый в настоящей заявке термин "эффекторный белок ТЗСС" или "бактериальный эффекторный белок ТЗСС" относится к белкам, которые естественным образом вводятся системами ТЗС в цитозоль эукариотических клеток и к белкам, которые естественным образом секретируются системами ТЗС, которые могут, например, образовывать пору транслокации в эукариотическую мембрану (включая порообразующие транслокаторы (такие как YopB и YopD бактерии *Yersinia*) и верхушечные белки, такие как LcrV *Yersinia*). Предпочтительно используют белки, которые естественным образом вводятся системами ТЗС в цитозоль эукариотических клеток. Указанные факторы вирулентности парализуют или перепрограммируют эукариотическую клетку в пользу патогена. Эффекторы ТЗС демонстрируют большой репертуар биохимической активности, модулируют функцию важнейших регуляторных молекул хозяина и включают

AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE, семейство белков GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaB, IpaC, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopB, YopD YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA.

Термины "грамотрицательный бактериальный штамм, дефицитный по продуцированию аминокислоты, необходимой для роста" и "ауксотрофный мутант", используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к грамотрицательным бактериальным штаммам, которые не способны расти в отсутствие по меньшей мере одной экзогенно поставляемой незаменимой аминокислоты или ее предшественника. Аминокислотой, по продуцированию которой штамм является дефицитным, может быть, например, аспаргат, мезо-2,6-диаминопимелиновая кислота, ароматические аминокислоты или лейцин-аргинин [8]. Такой штамм может быть получен, например, делецией гена аспаргат-бета-полуальдегиддегидрогеназы (*Δasd*). Такой ауксотрофный мутант не может расти в отсутствие экзогенной мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты [9]. Мутация, например делеция гена аспаргат-бета-полуальдегиддегидрогеназы, предпочтительна в данном случае для грамотрицательного бактериального штамма, дефицитного по аминокислоте, необходимой для роста, описанного в настоящем изобретении.

Термин "грамотрицательный бактериальный штамм, дефицитный по продуцированию адгезивных белков, связывающимся с поверхностью эукариотической клетки или внеклеточным матриксом", относится к мутантным грамотрицательным бактериальным штаммам, которые не экспрессируют по меньшей мере один адгезивный белок по сравнению с адгезивными белками, экспрессируемыми соответствующим штаммом дикого типа. Адгезивные белки могут включать, например, удлинённые полимерные адгезивные молекулы, такие как пилусы/фимбрии или нефимбриальные адгезины. Фимбриальные адгезины включают пилусы типа 1 (такие как фим-пилусы *E. coli* с адгезином *FimH*), P-пилусы (такие как Pap-пилусы с адгезином *PapG* из *E. coli*), пилусы типа 4 (такие как белок пилин, например из *P. aeruginosa*) или карлины (белки *Csg* с адгезином *CsgA* из *S. enterica*). Нефимбриальные адгезивные белки включают тримерные аутопортёрные адгезины, такие как *YadA* из *Y. enterocolitica*, *WpaA* (*B. pseudomallei*), *Hia* (*H. influenzae*), *BadA* (*B. henselae*), *NadA* (*N. meningitidis*) или *UspA1* (*M. catarrhalis*) а также другие аутопортёрные адгезины, такие как *AIDA-1* (*E. coli*), а также другие адгезины/инвазины, такие как *InvA* от *Y. enterocolitica* или *Intimin* (*E. coli*), или члены семейства *Dg* или семейства *Afa* (*E. coli*). Термины *YadA* и *InvA*, используемые в настоящей заявке, относятся к белкам из *Y. enterocolitica*. Аутопортёр *YadA* [10, 11] связывается с различными формами коллагена, а также с фибронектином, тогда как инвазин *InvA* [12-14] связывается с  $\beta$ -интегринами в мембране эукариотической клетки. Если грамотрицательный бактериальный штамм представлен штаммом *Y. enterocolitica*, данный штамм предпочтительно дефицитен по *InvA* и/или *YadA*.

Используемый в настоящей заявке термин "семейство Enterobacteriaceae" включает семейство грамотрицательных, палочковидных, факультативно анаэробных бактерий, встречающихся в почве, воде, растениях и животных, которые часто являются патогенами у позвоночных животных. Бактерии этого семейства имеют сходную физиологию и демонстрируют консервативность в пределах функциональных элементов и генов соответствующих геномов. Помимо оксидаза-отрицательности, все члены этого семейства являются ферментаторами глюкозы, и большинство из них - восстановители нитратов. Бактерии семейства Enterobacteriaceae по настоящему изобретению могут быть любыми бактериями из этого семейства и в частности включают, не ограничиваясь указанными, бактерии следующих родов:

*Escherichia, Shigella,*

*Edwardsiella, Salmonella, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus,*

*Erwinia, Morganella, Providencia, или Yersinia.*

В более конкретных вариантах осуществления изобретения указанная бактерия представляет собой виды

*Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*,  
*Escherichia vuneris*, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*, *Shigella dysenteriae*,  
*Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*,  
*Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter*  
*agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*,  
*Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Erwinia*  
*amylovora*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri*,  
*Providencia alcalifaciens*, или *Morganella morganii*.

Предпочтительно грамотрицательный бактериальный штамм выбирают из группы, состоящей из родов

*Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*,  
*Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Ralstonia*,  
*Xanthomonas*, *Chromobacterium*, *Sodalis*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Rhizobiae*,  
*Aeromonas*, *Photobacterium*, *Bordetella* и *Desulfovibrio*,

более предпочтительно из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, и *Pseudomonas*, наиболее предпочтительно из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*.

Используемый в настоящей заявке термин "*Yersinia*" включает все виды *Yersinia*, включая *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*. Предпочтительным является вид *Yersinia enterocolitica*.

Используемый в настоящей заявке термин "*Salmonella*" включает все виды *Salmonella*, включая *Salmonella enterica* и *S. bongori*. Предпочтительным является вид *Salmonella enterica*.

Используемый в настоящей заявке термин "промотор" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, регулирующей экспрессию транскрипционной единицы. "Область промотора" - регуляторная область, способная связывать РНК-полимеразу в клетке и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности в прямом направлении (в направлении 3'). В пределах области промотора находится сайт инициации транскрипции (наглядно определяемый при картировании нуклеазой S1), а также связывающие белок домены (консенсусные последовательности), ответственные за связывание РНК-полимеразы, такой как предполагаемая область-35 и блок Прибнова. Термин "функционально связанный" при описании взаимосвязи между двумя областями ДНК просто означает, что они функционально связаны друг с другом и расположены на одном и том же фрагменте нуклеиновой кислоты. Промотор функционально связан с структурным геном, если он контролирует транскрипцию ген и расположен на том же фрагменте нуклеиновой кислоты, что и ген. Обычно промотор функционален в указанном грамотрицательном бактериальном штамме, т.е. промотор способен экспрессировать слитый белок по настоящему изобретению, т.е. промотор способен экспрессировать слитый белок по настоящему изобретению без дальнейшего применения генной инженерии или экспрессии других белков. Кроме того, функциональный промотор не должен быть естественным антагонистом бактериальной Т3SS.

Используемый в настоящей заявке термин "доставка" относится к транспортировке белка из рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма в эукариотическую клетку, включая стадии экспрессии гетерологичного белка в рекомбинантном грамотрицательном бактериальном штамме, секретирования экспрессированного белка(-ов) из такого грамотрицательного бактериального штамма и транслоцирования секретированного белка(-ов) таким грамотрицательным бактериальным штаммом в цитозоль эукариотической клетки. Соответственно, термины "сигнал доставки" или "сигнал секреции", которые используются в настоящей заявке взаимозаменяемо, относятся к полипептидной последовательности, которая может быть распознана системой секреции и транслокации этого грамотрицательного бактериального штамма и направляет доставку белка из грамотрицательного бактериального штамма в эукариотические клетки.

Термин "сигнал доставки от бактериального эффекторного белка", используемый в настоящей заявке, относится к сигналу доставки из бактериального эффекторного белка, функционального в данном рекомбинантном грамотрицательном бактериальном штамме, т.е. который позволяет экспрессируемому гетерологичному белку в рекомбинантном грамотрицательном бактериальном штамме секретироваться из такого рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма с помощью системы секреции, такой как, например, система секреции III типа, или транслоцироваться таким рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом в цитозоль эукариотической клетки с помощью системы секреции, такой как, например, система секреции III типа. Термин "сигнал доставки от бактериального эффекторного белка", используемый в настоящей заявке, также включает фрагмент сигнала доставки от бактериального эффекторного белка, т.е. более короткие версии сигнала доставки, например сигнал доставки, содержащий до 10, предпочтительно до 20, более предпочтительно до 50, еще более предпочтительно до 100, в особенности до 140 аминокислот сигнала доставки, например природного сигнала доставки. Таким

образом, нуклеотидная последовательность, такая как, например, последовательность ДНК, кодирующая сигнал доставки от бактериального эффекторного белка, может кодировать сигнал доставки полной длины или его фрагмент, причем фрагмент обычно содержит до 30, предпочтительно до 60, более предпочтительно до 150, еще более предпочтительно до 300, в особенности до 420 нуклеиновых кислот.

Используемый в настоящей заявке термин "секреция" белка относится к транспортировке гетерологичного белка вовне через клеточную мембрану рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма. "Транслокация" белка относится к транспортировке гетерологичного белка от рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма через плазматическую мембрану эукариотической клетки в цитозоль такой эукариотической клетки.

Используемый в настоящей заявке термин "эукариотические клетки" включает, например, следующие эукариотические клетки:

Hi-5, HeLa, Hek, HUVECs, 3T3,

CHO, Jurkat, Sf-9, HepG2, Vero, MDCK, Mefs, THP-1, J774, RAW, Caco2, NCI60,

DU145, Lncap, MCF-7, MDA-MB-438, PC3, T47D, A549, U87, SHSY5Y,

Ea.Hy926, Saos-2, 4T1, D2A1, B16F10,

и первичные человеческие гепатоциты.

"Эукариотические клетки", упоминаемые в настоящей заявке, также называются "клетками-мишенями" или "целевыми эукариотическими клетками".

Используемый в настоящей заявке термин "эффекторный белок T3SS" относится к белкам, которые в природных условиях вводятся системами T3S в цитозоль эукариотических клеток, и белки, которые в природных условиях секретируются системами T3S, которые могут, например, образовывать поры транслокации в эукариотической мембране (включая порообразующие транслокаторы (такие как YopB и YopD бактерии *Yersinia*) и верхушечные белки, такие как *Yersinia* LcrV). Предпочтительно используют белки, которые в природных условиях вводятся системами T3S в цитозоль эукариотических клеток. Указанные факторы вирулентности парализуют или перепрограммируют эукариотическую клетку в пользу патогена. Эффекторы T3S демонстрируют большой репертуар биохимической активности и модулируют функцию важнейших регуляторных молекул хозяина [2, 15] и включают

AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB,

AvrPphC, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2,

AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE,

семейство белков GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2,

HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaB, IpaC, IpaH, IpaH7.8,

IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB,

PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SipB,

SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB,

SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ,

SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2,

Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopB, YopD YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO,

YopP, YopT, YpkA.

Эффекторные гены T3SS бактерии *Yersinia* были клонированы, например, из *Y. enterocolitica*, включая YopE, YopH, YopM, YopO, YopP/YopJ и YopT [16]. Соответствующие эффекторные гены могут быть клонированы из *Shigella flexneri* (например, OspF, IpgD, IpgB1), *Salmonella enterica* (например, SopE, SopB, SptP), *P. aeruginosa* (например, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) или *E. coli* (например, Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ). Последовательности нуклеиновых кислот указанных генов доступны специалистам в данной области, например, в базе данных Genebank (yopH, yopO, yopE, yopP, yopM, yopT из NC\_002120 GI:10955536, эффекторные белки *S. flexneri* из AF386526.1 GI:18462515, эффекторные белки *S. enterica* из NC\_016810.1 GI:378697983 или FQ312003.1 GI:301156631, эффекторы *P. aeruginosa* из AE004091.2 GI:110227054 или CP000438.1 GI:115583796 и эффекторные белки *E.coli* из NC\_011601.1 GI:215485161).

Для целей настоящего изобретения гены обозначаются буквами в нижнем регистре и выделяются курсивом для отличия от белков. В случае если гены (обозначенные буквами в нижнем регистре и курсивом) следуют за названием бактериальных видов (например, *E. coli*), они относятся к мутации соответствующего гена в соответствующих бактериальных видах. Например, YopE относится к эффекторному белку, кодируемому геном yopE. Сочетание *Y. enterocolitica* yopE обозначает *Y. enterocolitica*, имеющую мутацию в гене yopE.

Используемые в настоящей заявке термины "полипептид", "пептид", "белок", "полипептидный" и "пептидный" используются взаимозаменяемо для обозначения ряда аминокислотных остатков, связан-

ных друг с другом пептидными связями между альфа-амино- и карбоксигруппами смежных остатков. Предпочтительными являются белки, которые имеют аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 10 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот.

В соответствии с настоящим изобретением "домен гетерологичного белка" включает домены белков природного происхождения и включает также домены искусственно сконструированных белков. Используемый в настоящей заявке термин "домен гетерологичного белка" относится к домену гетерологичного белка, отличному от домена эффекторного белка T3SS, или к домену, отличному от домена, содержащего его N-концевой фрагмент, с которым он может быть слит для получения слитого белка. В частности, термин домена гетерологичного белка, используемый в настоящей заявке, относится к домену гетерологичного белка, который не принадлежит к протеому, т.е. всему природному набору белков специфического рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма, предложенного и используемого по изобретению, например который не принадлежит к протеому, т.е. всему природному набору белков специфического бактериального штамма родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*. Обычно домен гетерологичного белка имеет животное происхождение, включая человеческое происхождение. Предпочтительно доменом гетерологичного белка является домен человека. Более предпочтительно доменом гетерологичного белка является домен белка, выбранного из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. Особенно предпочтительно доменом гетерологичного белка является домен белка, выбранного из группы, состоящей из белков участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, репортерных белков, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. Еще более предпочтительными являются домены гетерологичных белков, выбранных из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла и белков с анкириновым повтором. Наиболее предпочтительными являются домены белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, таких как животные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, предпочтительно домены гетерологичных белков человека, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза.

Термин "повторяющиеся домены гетерологичного белка", в контексте настоящей заявки, относится к слитому белку, состоящему из нескольких повторов домена гетерологичного белка, где указанные домены могут быть либо непосредственно слиты друг с другом, либо между доменами может быть введен вариабельный линкер, например линкер между 1 и 30, предпочтительно между 2 и 15, более предпочтительно между 3 и 10 аминокислотами. Предпочтительно используют повторяющиеся идентичные домены или повторяющиеся домены, которые имеют идентичность аминокислотной последовательности более 80%, обычно более 85%, предпочтительно более 90%, еще более предпочтительно более 95%, в особенности - более 96%, более конкретно более 97%, еще более конкретно более 98%, наиболее конкретно более 99%. Также предпочтительными являются идентичные домены, которые имеют идентичность аминокислот 100%. Предпочтительно два повторяющихся домена, более предпочтительно два повторяющихся идентичных домена или два повторяющихся домена, имеющих идентичность аминокислотной последовательности более 90%, предпочтительно более 95%, наиболее предпочтительно 100%, содержат слитый белок, как он определен в настоящей заявке. В настоящем изобретении также рассматриваются более двух повторяющихся доменов, например три, четыре, пять или шесть повторяющихся доменов.

Термин "два или более доменов различных гетерологичных белков", в контексте настоящей заявки, относится к слитому белку, состоящему из одного или нескольких повторений по меньшей мере двух доменов различных гетерологичных белков, например, по меньшей мере, двух доменов гетерологичных белков, имеющих идентичность аминокислотной последовательности 80% или менее, где указанные различные домены могут быть либо напрямую слиты друг с другом, либо где между доменами может быть введен вариабельный линкер, например линкер между 1 и 30, предпочтительно между 2 и 15, более предпочтительно между 3 и 10 аминокислотами.

Предпочтительно два домена различных гетерологичных белков содержат слитый белок, как он определен в настоящей заявке. В настоящем изобретении также рассматриваются более двух доменов различных гетерологичных белков, например три, четыре, пять или шесть доменов.

Термин "гетерологичные белки, которые принадлежат к одному и тому же функциональному классу белков" в контексте настоящей заявки относится к гетерологичным белкам, которые имеют одинаковую функцию, например гетерологичные белки, имеющие ферментативную активность, гетерологичные белки, которые действуют по одному и тому же пути, такому как, например, регулирование клеточного цикла или имеют общую специфическую функцию, например принадлежащие к одному и тому же классу бактериальных эффекторных белков. Функциональными классами белков являются, например, белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, белки, которые действуют как регуляторы клеточного цикла, белки с анкириновым повтором, белки клеточной сигнализации, репортерные белки, факторы

транскрипции, протеазы, малые ГТФазы, связанные с GPCR белки, нанотела и конструкции слияния нанотел, бактериальные эффекторы T3SS, бактериальные эффекторы T4SS или вирусные белки, которые действуют совместно в биологическом процессе установления вирулентности к эукариотическим клеткам.

Домен гетерологичного белка, экспрессированного рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом, обычно имеет молекулярную массу от 1 до 50 кДа, предпочтительно от 1 до 30 кДа, более предпочтительно от 1 до 20 кДа, наиболее предпочтительно от 1 до 10 кДа.

В соответствии с настоящим изобретением "белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза" или "гетерологичные белки человека, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза", включают, в частности, Bad, Bcl2, Bak, Bmt, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Araf1, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 10, DFFA, DFFB, ROCK1, APP, CAD, ICAD, CAD, EndoG, AIF, HtrA2, Smac/Diablo, Arts, ATM, ATR, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), IAP family, LC8, PP2B, 14-3-3 белки, PKA, PKC, PI3K, Erk1/2, p90RSK, TRAF2, TRADD, FADD, Дахх, каспазу 8, каспазу 2, RIP, RAIDD, MKK7, JNK, FLIPs, FKHR, GSK3, киназы CDK и их ингибиторы, такие как INK4-семейство (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), и Cip1/Waf1/Kip1-2-семейство (p21(Cip1/Waf1), p27(Kip1), p57(Kip2)). Предпочтительно используются Bad, Bmt, Bcl2, Bak, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, каспаза 9, каспаза 3, каспаза 6, каспаза 7, Smac/Diablo, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), LC8, PP2B, TRADD, Дахх, каспаза 8, каспаза 2, RIP, RAIDD, FKHR, киназы CDK и их ингибиторы, такие как INK4-семейство (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), наиболее предпочтительно используются BIM, Bid, усеченный Bid, FADD, каспаза 3 (и их субъединицы), Bax, Bad, Akt, киназы CDK и их ингибиторы, такие как INK4-семейство (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) [17-19]. Кроме того, белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, включают DIVA, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bid и tBid, Egl-1, Bcl-Gs, цитохром С, беклин, CED-13, BNIP1, BNIP3, Bcl-B, Bcl-W, Ced-9, A1, NR13, Bfl-1, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 8.

Белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из проапоптотических белков, антиапоптотических белков, ингибиторов путей предотвращения апоптоза и ингибиторов сигнализации или путей, способствующих выживанию. Проапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, содержащей Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Araf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, цитохром С, FADD, семейство каспазы, и киназы CDK и их ингибиторы, такие как INK4-семейство (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), или выбранные из группы, содержащей Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Araf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, цитохром С, FADD, и семейство каспазы. Предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Araf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспазы, киназы CDK и их ингибиторы, такие как INK4-семейство (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)). В равной степени предпочтительны Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Araf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспазы.

Антиапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, содержащей Bcl-2, Bcl-X1, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13, семейство IAP и Bfl-1. Предпочтительными являются Bcl-2, Bcl-X1, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13 и Bfl-1.

Ингибиторы путей предотвращения апоптоза включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bad, Noxa и Cdc25A. Предпочтительными являются Bad и Noxa.

Ингибиторы сигналов или путей, способствующих выживанию, включают белки, выбранные из группы, состоящей из PTEN, ROCK, PP2A, PHLPP, JNK, p38. Предпочтительными являются PTEN, ROCK, PP2A и PHLPP.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из белков "BH3-only", каспаз и внутриклеточных сигнальных белков регуляции рецепторов смерти апоптоза.

Белки "BH3-only" включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bad, BIM, Bid и tBid, Puma, Bik/Nbk, Bod, Hrk/Dp5, BNIP1, BNIP3, Bmf, Noxa, Mcl-1, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13. Предпочтительными являются Bad, BIM, Bid и tBid.

Каспазы включают белки, выбранные из группы, содержащей каспазу 1, каспазу 2, каспазу 3, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 8, каспазу 9, каспазу 10. Предпочтительными являются каспаза 3, каспаза 8 и каспаза 9. Внутриклеточные сигнальные белки регуляции рецепторов смерти апоптоза включают белки, выбранные из группы, состоящей из FADD, TRADD, ASC, BAP31, GULP1/CED-6, CIDEA, MFG-E8, CIDEA, RIPK1/RIP1, CRADD, RIPK3/RIP3, Crk, SHB, CrkL, DAXX, семейства 14-3-3, FLIP, DFF40 и 45, PEA-15, SODD. Предпочтительными являются FADD и TRADD.

В некоторых вариантах осуществления два домена гетерологичных белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, включают грамотрицательный бактериальный штамм и/или вектор по настоящему изобретению, предпочтительно два повторяющихся, более предпочтительно два идентичных повторяющихся домена белка, участвующего в апоптозе или регуляции апоптоза, или два домена раз-

личных белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза. В некоторых вариантах осуществления два домена гетерологичных белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, включают грамотрицательный бактериальный штамм и/или вектор по настоящему изобретению, причем один представлен доменом проапоптотического белка, а другой представлен доменом белка, который является ингибитором путей предотвращения апоптоза, или один представлен доменом проапоптотического белка, а другой представлен доменом белка, который является ингибитором передачи сигналов или путей, способствующих выживаемости.

Проапоптотические белки, охватываемые настоящим изобретением, обычно имеют альфа-спиральную структуру, предпочтительно гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и обычно содержат по меньшей мере один из доменов ВН1, ВН2, ВН3 или ВН4, предпочтительно содержат по меньшей мере один домен ВН3. Обычно проапоптотические белки, охватываемые настоящим изобретением, не обладают ферментативной активностью.

Антиапоптотические белки, охватываемые настоящим изобретением, обычно имеют альфа-спиральную структуру, предпочтительно гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями и содержащую комбинацию различных доменов ВН1, ВН2, ВН3 и ВН4, предпочтительно комбинацию различных доменов ВН1, ВН2, ВН3 и ВН4, в которых присутствуют домен ВН1 и ВН2, более предпочтительно ВН4-ВН3-ВН1-ВН2, ВН1-ВН2, ВН4-ВН1-ВН2 или ВН3-ВН1-ВН2 (от N- до C-конца). Кроме того, также охвачены белки, содержащие по меньшей мере один ВІR-домен.

Ингибиторы путей предотвращения апоптоза, охватываемых настоящим изобретением, обычно имеют альфа-спиральную структуру, предпочтительно гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями и обычно содержат один домен ВН3.

Домены ВН1, ВН2, ВН3 или ВН4 обычно имеют длину от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления домены гетерологичных белков выбирают из группы, состоящей из доменов гетерологичных белков, которые составляют в длину от приблизительно 5 до приблизительно 200, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 150, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 100, наиболее предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 50, в частности от приблизительно 5 до приблизительно 25 аминокислот.

Конкретным предпочтительным доменом является домен ВН3 индуктора апоптоза tBID, более конкретно - домен ВН3, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 209, 210, 211 и 212, предпочтительно SEQ ID NO: 211 или SEQ ID NO: 212. В равной степени предпочтительным является домен ВН3 регулятора апоптоза BAX, более конкретно - домен BAX, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 213, 214, 215 и 216, предпочтительно SEQ ID NO: 215 или SEQ ID NO: 216. Человеческие и мышьи последовательности приведены в SEQ ID NO: 209-216, но в равной степени включены и домены tBID и BAX ВН3 всех других видов.

В некоторых вариантах повторяющиеся домены гетерологичных белков представляют собой домен ВН3, в частности повторяющиеся домены ВН3 апоптоза индуктора tBID, более конкретно - два повторяющихся домена ВН3 апоптоза индуктора tBID, наиболее конкретно - два повторяющихся домена ВН3 апоптоза индуктора tBID, состоящего из последовательности SEQ ID NO: 202. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления вектор грамотрицательного бактериального штамма по настоящему изобретению содержит вторую последовательность ДНК, кодирующую два повторяющихся домена ВН3, более предпочтительно два повторяющихся домена ВН3 апоптоза индуктора tBID. Два повторяющихся домена предпочтительно соединены линкером длиной 1-30 аминокислот, предпочтительно длиной 2-15 аминокислот, более предпочтительно длиной 3-10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления два или более доменов различных гетерологичных белков представляют собой домены гетерологичных белков, которые принадлежат к одному и тому же функциональному классу белков, предпочтительно различные гетерологичные белки двух или более доменов представляют собой различные гетерологичные белки из класса белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза. В предпочтительном варианте осуществления два или более доменов различных гетерологичных белков представляют собой домен ВН3 индуктора апоптоза tBID и домен ВН3 регулятора апоптоза BAX, в частности слитые домены ВН3, состоящие из последовательности SEQ ID NO: 203. Два домена различных гетерологичных белков предпочтительно связаны линкером длиной 1-30 аминокислот, предпочтительно 2-15 аминокислот, более предпочтительно 3-10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичные белки представляют собой пролекарственный превращающий фермент. В указанных вариантах осуществления рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм аттенуированной вирулентности экспрессирует, а предпочтительно экспрессирует и секретирует фермент, превращающий пролекарство в лекарственное средство. Используемый в настоящей заявке термин "пролекарственный превращающий фермент" включает ферменты, превращающие нетоксичные пролекарства в токсическое лекарственное средство, предпочтительно ферменты, выбранные из группы, содержащей цитозиндезаминазу, пуриновую нуклеозидфосфорилазу, тимидинкиназу, бета-галактозидазу, карбоксилэстеразу, нитроредуктазу, карбоксипептидазы и бета-глюкуронидазы, более предпочтительно ферменты, выбранные из группы, содержащей цитозиндезами-

назу, пуриновую нуклеозидфосфорилазу, тимидинкиназу и бета-галактозидазу.

Используемый в настоящей заявке термин "сайт расщепления протеазой" относится к конкретному мотиву аминокислоты в аминокислотной последовательности, например в аминокислотной последовательности белка или слитого белка, расщепляемой специфической протеазой, которая распознает мотив аминокислоты. Обзор см. в [20]. Примерами сайтов расщепления протеазой являются аминокислотные мотивы, которые расщепляются протеазой, выбранной из группы, включающей энтерокиназу (легкую цепь), энтеропептидазу, протеазу PreScission, протеазу риновируса человека (HRV 3C), протеазу TEV, протеазу TVMV, протеазу FactorXa и тромбин.

Следующий аминокислотный мотив распознается соответствующей протеазой:

Asp-Asp-Asp-Asp-Lys: энтерокиназа (легкая цепь)/энтеропептидаза,

Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro: протеаза PreScission/протеаза риновируса человека (HRV 3C),

Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser и модифицированные мотивы на основе Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly/Ser (где X - любая аминокислота), распознаваемые протеазой TEV (вирус гравировки табака),

Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln-Ser: протеаза TVMV,

De-(Glu или Asp)-Gly-Arg: протеаза фактора Xa,

Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser: тромбин.

Сайт расщепления протеазой, в контексте настоящей заявки, представляет собой убиквитин. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления в качестве сайта расщепления протеазой используется убиквитин, т.е. третья последовательность ДНК кодирует убиквитин в качестве сайта расщепления протеазой, который может быть расщеплен специфическими протеазами процессинга убиквитина на N-концевом сайте, например, который может быть расщеплен специфическими протеазами процессинга убиквитина, называемых деубиквитинизирующими ферментами на N-концевом сайте эндогенно в клетке, куда был доставлен слитый белок. Убиквитин подвергается процессингу на его C-конце группой эндогенных убиквитин-специфических C-концевых протеаз (деубиквитинизирующих ферментов, DUBs). Расщепление убиквитина под действием DUBs должно происходить на самом C-конце убиквитина (после G76).

Под термином "индивидуум", "субъект" или "пациент" понимается позвоночное животное. В определенных вариантах осуществления позвоночное представлено млекопитающим. Млекопитающие включают, кроме прочего, приматов (включая человекообразных и нечеловекообразных приматов) и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления под млекопитающим понимается человек.

Термин "мутация" используется в настоящей заявке как общий термин и включает изменения как одиночной пары оснований, так и нескольких пар оснований. Такие мутации могут включать замещения, мутации сдвига рамки, делеции, инсерции и усечения.

Используемый в настоящей заявке термин "молекула-метка или акцепторный сайт для молекулы-метки" относится к малому химическому соединению, связывающемуся с специфической аминокислотной последовательностью, вызывая флуоресценцию связанного химического соединения, предпочтительно лигаза кумарина/акцепторный сайт кумарина (и их производные), лигаза резорфуфина/акцепторный сайт резорфуфина (и его производные) и мотив тетра-цистеина (например, Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys и производные), используемые с красителем FlAsH/ReAsH (Life Technologies) или флуоресцентным белком, таким как усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP).

Используемый в настоящей заявке термин "сигнал ядерной локализации" относится к аминокислотной последовательности, которая маркирует белок для импорта в ядро эукариотической клетки и включает предпочтительно вирусный сигнал ядерной локализации, такой как NLS большого Т-антигена SV40 (PPKKRKY).

Используемый в настоящей заявке термин "сайт множественного клонирования" относится к короткой ДНК-последовательности, содержащей несколько сайтов рестрикции для расщепления эндонуклеазами рестрикции, такими как

AclI, HindIII, SspI, MluCI, Tsp509I, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, MluI, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, BaeI, BsaXI, AflIII, SpeI, BsrI, BmrI, BglII, AfeI, AluI, StuI, ScaI, ClaI, BspDI, PI-SceI, NsiI, AseI, SwaI, CspCI, MfeI, BssSI, BmgBI, PmlI, DraIII, AleI, EcoP15I, PvuII, AlwNI, BtsIMutI, TspRI, NdeI, NlaIII, CviAII, FatI, MslI, FspEI, XcmI, BstXI, PflMI, BccI, NcoI, BseYI, FauI, SmaI, XmaI, TspMI, Nt.CviPII, LpnPI, AciI, SacII, BsrBI, MspI, HpaII, ScrFI, BssKI, StyD4I, BsaJI, BslI, BtgI, NciI, AvrII, MnlI, BbvCI, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bsu36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, StyI, BcgI, PvuI, BstUI, EagI, RsrII BsiEI, BsiWI, BsmBI, Hpy99I, MspAII, MspJI, SgrAI, BfaI, BspCNI, XhoI, EarI, AcuI, PstI, BpmI, DdeI, SfcI, AflII, BpuEI, SmlI, AvaI, BsoBI, MboII, BbsI, XmnI, BsmI, Nb.BsmI, EcoRI, HgaI, AatII, ZraI, Tth111I PflFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, SacI, BseRI, PleI, Nt.BstNBI, MlyI, HinfI, EcoRV, MboI, Sau3AI, DpnII BfuCI, DpnI, BsaBI, TfiI, BsrDI, Nb.BsrDI, BbvI, BtsI, Nb.BtsI, BstAPI, SfaNI, SphI, NmeAIII, NaeI, NgoMIV, BglI, AsiSI, BtgZI, HinPII, HhaI, BssHII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, MwoI, NheI, BmtI, SapI, BspQI, Nt.BspQI, BlpI, TseI, ApeKI, Bsp1286I, AlwI, Nt.AlwI, BamHI, FokI, BtsCI, HaeIII, PhoI, FseI, SfiI, NarI, KasI, SfoI, PluTI, AscI, EciI, BsmFI, ApaI, PspOMI, Sau96I, NlaIV, KpnI, Acc65I, BsaI, HphI, BstEII, AvaII, BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, RsaI, CviQI, BstZ17I, BciVI, Sall, Nt.BsmAI, BsmAI, BcoDI, ApaLI, BsgI, AccI, Hpy166II, Tsp45I, HpaI, PmeI, HincII, BsiHKAI, ApoI, NspI, BsrFI, BstYI, HaeII, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, MmeI, TaqαI, NruI, Hpy188I, Hpy188III, XbaI, BclI, HpyCH4V, FspI, PI-PspI, MscI, BsrGI, MseI, PacI, PsiI, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI, EaeI, preferably XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, Sall, BstBI.

Используемый в настоящей заявке термин "сайт множественного клонирования" далее относится к короткой последовательности ДНК, используемой для событий рекомбинации как, например, в стратегии Gateway-клонирования, или для таких методик, как сборка Гиббсона или клонирование TOPO.

Термин "штамм *Yersinia* дикого типа", в контексте настоящей заявки, относится к встречающемуся в природных условиях варианту (такому, как *Y. enterocolitica* E40), или к встречающемуся в природных условиях варианту, который содержит генетические модификации, позволяющие использовать векторы, такие как делеционные мутации в рестриционных эндонуклеазах или гены устойчивости к антибиотикам (такой как *Y. enterocolitica* MRS40, чувствительный к ампициллину дериват *Y. enterocolitica* E40). Указанные штаммы содержат хромосомную ДНК, а также немодифицированную плазмиду вирулентности (называемую pYV).

Термин "содержать" обычно используется в смысле "включения", т.е. допущения наличия одного или нескольких признаков или компонентов.

Термин "приблизительно" относится к диапазону значений  $\pm 10\%$  от заданного значения. Например, фраза "приблизительно 200" включает в себя  $\pm 10\%$  от 200 или от 180 до 220.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантный граммотрицательный бактериальный штамм трансформируется вектором, который содержит в направлении от 5' до 3':

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки или ее фрагмент из бактериального эффекторного белка;

вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'- концом указанной первой последовательности ДНК, где гетерологичные белки выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. Предпочтительно последовательность ДНК, кодирующая повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, фланкирована на своем 3'-конце последовательностью ДНК, гомологичной последовательности ДНК хромосомы или эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки от бактериального эффекторного белка или ее фрагменту. Более предпочтительно указанная

ДНК-последовательность, фланкирующая гомологичный белок на своем 3'-конце, гомологична последовательности ДНК и лежит в пределах 10 т.п.н. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки от бактериального эффекторного белка или его фрагмента. В частности, указанная нуклеотидная последовательность, фланкирующая с гомологичным белком на его 3'-конце, гомологична последовательности ДНК и находится в пределах того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки от бактериального эффекторного белка или его фрагмент. В этом варианте осуществления обычно проводят трансформацию, чтобы вставить слитые первую и вторую последовательность ДНК посредством гомологичной рекомбинации на эндогенную плазмиду вирулентности или хромосому, предпочтительно на эндогенную плазмиду вирулентности, рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма с аттенуированной вирулентностью, и слитые первая и вторая последовательность ДНК функционально связаны с промотором эндогенной плазмиды вирулентности или хромосомы, например островка хромосомной патогенности. Предпочтительно слитые первая и вторая ДНК-последовательность функционально связаны с промотором эндогенной плазмиды вирулентности. В этом варианте осуществления первая последовательность ДНК включает в себя сигнал доставки или его фрагмент из бактериального эффекторного белка, предпочтительно его фрагмент, который обеспечивает гомологичную рекомбинацию на гомологичном сайте на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, приводя к помещению второй последовательности ДНК в рамку к 3'-концу сигнала доставки хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности, функционально связанного с эндогенным промотором.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм трансформируется нуклеотидной молекулой, предпочтительно молекулой нуклеотида ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков и нуклеотидную последовательность, которая гомологична или идентична нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки от бактериального эффекторного белка или которая гомологична или идентична нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, причем сигнал доставки от бактериального эффекторного белка закодирован на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма с аттенуированной вирулентностью. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, которая гомологична или идентична нуклеотидной последовательности сигнала доставки от бактериального эффекторного белка или его фрагмента, расположена на 5'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей повторяющиеся домены гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков. Более предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов с различными гетерологичными белками, фланкирована на своем 3'-конце нуклеотидной последовательностью, гомологичной последовательности ДНК хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности на 3'-конце сигнала доставки от бактериального эффекторного белка или ее фрагменту. Еще более предпочтительно указанная нуклеотидная последовательность, фланкирующая с гомологичным белком на его 3'-конце, гомологична последовательности ДНК, лежащей в пределах 10 т.п.н. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки от бактериального эффекторного белка или его фрагменту. В частности, указанная нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок на его 3'-конце, гомологична последовательности ДНК, лежащей в пределах того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки от бактериального эффекторного белка или его фрагмент. В этом варианте осуществления обычно выполняют трансформацию, чтобы вставить нуклеотидную последовательность, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, в эндогенную плазмиду вирулентности или хромосому рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма с аттенуированной вирулентностью на 3'-конце сигнала доставки от бактериального эффекторного белка, кодируемого хромосомой или эндогенной плазмидой вирулентности, причем повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых с сигналом доставки, экспрессируются и секретируются.

В случае когда рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм с аттенуированной вирулентностью представлен штаммом *Yersinia*, эндогенная плаزمида вирулентности для инсерции представляет собой *rYV* ("плазмида вирулентности *Yersinia*"). В случае когда рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм с аттенуированной вирулентностью представлен штаммом *Salmonella*, эндогенной локализацией для инсерции является один из кластеров генов, называемых *Spil* или *SpilI* ("*Salmonella* pathogenicity island", островок патогенности сальмонеллы), место, где эффекторный белок закодирован на другом участке или, альтернативно, одна из плазмид вирулентности сальмонеллы (*SVP*).

Предпочтительно первую и вторую ДНК-последовательность или нуклеотидную молекулу вставляют в эндогенную плазмиду вирулентности на нативном сайте бактериального эффекторного белка, например на нативном сайте фактора вирулентности, предпочтительно в случае когда рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм с аттенуированной вирулентностью представлен штаммом

*Yersinia*, на нативном сайте YopE или другом Yop (YopH, YopO, YopP, YopM, YopT), предпочтительно на нативном сайте YopE или в случае когда рекомбинантный граммотрицательный бактериальный штамм с аттенуированной вирулентностью представлен штаммом *Salmonella* в нативном сайте эффекторного белка, кодируемого в SpiI, SpiII или закодированном на другом участке, предпочтительно на нативном сайте эффекторного белка кодируемого в SpiI или SpiII, более предпочтительно на нативном сайте SopE или SteA. Предпочтительно первая и вторая последовательности ДНК или нуклеотидная молекула функционально связаны с нативным промотором бактериального эффекторного белка, присутствующего на эндогенной плазмиде вирулентности, например, в случае когда рекомбинантный граммотрицательный бактериальный штамм с аттенуированной вирулентностью представлен штаммом *Yersinia* - с нативным промотором из гена вирулона *Yersinia*, как описано ниже, более предпочтительно с нативным промотором YopE или другим промотором Yop (YopH, YopO, YopP, YopM, YopT), предпочтительнее нативным промотором YopE или в случае когда рекомбинантный граммотрицательный бактериальный штамм с аттенуированной вирулентностью представлен штаммом *Salmonella* - с нативным промотором из островка патогенности SpiI или SpiII или из эффекторного белка, закодированном на другом участке, как описано ниже, более предпочтительно с нативным промотором SopE, InvB или SteA.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает рекомбинантный граммотрицательный бактериальный штамм, причем указанный граммотрицательный бактериальный штамм выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает рекомбинантный граммотрицательный бактериальный штамм, причем указанный граммотрицательный бактериальный штамм выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*. Предпочтительно граммотрицательным бактериальным штаммом является *Yersinia strain*, более предпочтительно штамм *Yersinia enterocolitica*. Наиболее предпочтительным является *Yersinia enterocolitica* E40 (0:9, биотип 2) [21] или его чувствительные к ампициллину производные *Y. enterocolitica* MRS40 (также называемые *Y. enterocolitica* подвид *palaearctica* MRS40) согласно [22]. *Y. enterocolitica* E40 и его производное *Y. enterocolitica* согласно [22] идентичен *Y. enterocolitica* подвид *palaearctica* E40 и его производному *Y. enterocolitica* подвид *palaearctica* MRS40, согласно [23-25]. Также предпочтительно граммотрицательным бактериальным штаммом является *Salmonella strain*, более предпочтительно штамм *Salmonella enterica*. Наиболее предпочтительным является *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium SL1344 согласно описанию в коллекции культур Министерства здравоохранения Англии (NCTC 13347).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения сигнал доставки из бактериального эффекторного белка T3SS включает бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, причем эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент могут содержать сайт связывания шаперонов. Эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, который содержит сайт связывания шаперонов, особенно полезен в качестве сигнала доставки в настоящем изобретении. Предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбирают из группы, включающей

SopE,

SopE2, SptP, YopE, ExoS, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD,  
SipC, SifA, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopT, YopH, YpkA, Tir, EspF,  
TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, SspH1, VopF, ExoS, ExoT, HopAB2,  
HopD, AvrRpt2, HopAO1, HopPtoD2, HopU1, семейство белков GALA, AvrBs2,  
AvrD1, AvrBS3, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB,  
IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB,  
AvrPphC, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1,  
HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, HopD, и AvrXv3.

Более предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбирают из группы, включающей

SopE, SptP, YopE, ExoS, SopB, IpgB1, IpgD,

YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT,

из которых наиболее предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из IpgB1, SopB, SptP, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, в частности YopE или его N-концевой фрагмент.

В равной степени предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбирают из группы, включающей

SopE, SopE2, SptP,

SteA, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SifB, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, AvrRpt2, HopAO1, HopU1,

семейство белков

GALA, AvrBs2, AvrD1, YopO, YopP, YopE, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphE<sub>Pto</sub>, AvrPpiB<sub>Pto</sub>, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD, и AvrXv3.

В равной степени более предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбирают из группы, включающей SopE, SptP, SteA, SifB, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopT, из которых в равной степени наиболее предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, включающей IpgB1, SopE, SopB, SptP, SteA, SifB, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE, и YopT, в частности SopE, SteA, или YopE или его N-концевой фрагмент, более конкретно - SteA или YopE или его N-концевой фрагмент, наиболее конкретно YopE или его N-концевой фрагмент. В некоторых вариантах осуществления сигнал доставки от бактериального эффекторного белка T3SS, кодируемого первой ДНК-последовательностью, содержит бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, где его N-концевой фрагмент включает по меньшей мере первые 10, предпочтительно по меньшей мере первые 20, более предпочтительно по меньшей мере первые 100 аминокислот бактериального T3SS-эффекторного белка.

В некоторых вариантах осуществления сигнал доставки из бактериального эффекторного белка T3SS, кодируемого первой последовательностью ДНК, содержит бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, причем эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент содержит сайт связывания шаперонов. Предпочтительные эффекторные белки T3SS или его N-концевой фрагмент, которые содержат сайт связывания шаперонов, включают следующие комбинации сайта связывания шаперонов и эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента:

SycE-YopE, InvB-SopE, SicP-SptP, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpsS-ExoS, CesF-EspF, SycD-YopB, SycD-YopD. More preferred are SycE-YopE, InvB-SopE, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpsS-ExoS, CesF-EspF.

Наиболее предпочтительным является YopE или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперонов SycE, такой как N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий N-концевые 138 аминокислот эффекторного белка YopE, обозначенные в настоящей заявке как YopE<sub>1-138</sub> и как показано в SEQ ID NO: 2, или SopE или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперонов InvB, такой как N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий N-концевые 81 или 105 аминокислот эффекторного белка SopE, обозначенные в настоящей заявке как SopE<sub>1-81</sub> или SopE<sub>1-105</sub> соответственно, и в соответствии с SEQ ID NO: 142 или 143.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения грамотрицательный бактериальный штамм представлен штаммом *Yersinia*, а сигнал доставки от бактериального эффекторного белка T3SS, кодируемого первой последовательностью ДНК, содержит эффекторный белок YopE или N-концевую часть, предпочтительно эффекторный белок YopE *Y. Enterocolitica* или его N-концевую часть. Предпочтительно сайт связывания SycE входит в N-концевую часть эффекторного белка YopE. В связи с указанным N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE может содержать N-концевые 12, 16, 18, 52, 53, 80 или 138 аминокислот [26-28]. Наиболее предпочтительным является N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий N-концевые 138 аминокислот эффекторного белка YopE, например, как описано в работе Forsberg и Wolf-Watz [29], обозначенный в настоящей заявке как YopE<sub>1-138</sub>, и в соответствии с SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения грамотрицательный бактериальный штамм представлен штаммом *Salmonella*, а сигнал доставки от бактериального эффекторного белка T3SS, кодируемого первой последовательностью ДНК, содержит эффекторный белок SopE или SteA или его N-концевую часть, предпочтительно эффекторный белок SopE или SteA *Salmonella enterica* или его N-концевую часть. Предпочтительно сайт связывания шаперонов находится в N-концевой части эффекторного белка SopE. В связи с указанным N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE может содержать N-концевые 81 или 105 аминокислот. Наиболее предпочтительным является SteA полной длины и N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащего N-концевые 105 аминокислот эффекторного белка, например, в соответствии с SEQ ID NO: 142 или 143.

Специалистам в данной области известны методы идентификации полипептидных последователь-

ностей эффекторного белка, которые способны доставлять белок. Например, один такой метод описан Sory et al. [21]. В кратком изложении, полипептидные последовательности, например, из различных частей белков Yop могут быть слиты в рамке с репортерным ферментом, таким как активированный кальмодулином аденилатциклазный домен (или Суа) циклолизина *Bordetella pertussis*. Доставка гибридного белка Yop-Суа в цитозоль эукариотических клеток подтверждается появлением активности циклоазы в инфицированных эукариотических клетках, что приводит к накоплению цАМФ. Используя такой подход, специалист в данной области может определить, при желании, минимальную необходимую последовательность, т.е. непрерывную аминокислотную последовательность самой короткой длины, которая способна доставлять белок, см., например, [21]. Соответственно, предпочтительные сигналы доставки по настоящему изобретению состоят, по меньшей мере, из минимальной последовательности аминокислот эффекторного белка T3SS, который способен доставлять белок.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к мутантным рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммам, в частности к рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммам, которые дефицитны по продуцированию по меньшей мере одного функционального эффекторного белка T3SS. В соответствии с настоящим изобретением такой мутантный грамотрицательный бактериальный штамм, например такой мутантный штамм *Yersinia* может быть получен путем введения по меньшей мере одной мутации в, по меньшей мере, один ген, кодирующий эффектор. Предпочтительно такие гены, кодирующие эффектор, включают YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ и YopT для штамма *Yersinia*. Предпочтительно такие гены, кодирующие эффектор, включают

AvrA, CigR, GogB, GtgA, GtgE, PipB, SifB,

SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopB/SigD, SopA, SpiC/SsaB,

SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SopD, SopE, SopE2, SspH1, SspH2,

PipB2, SifA, SopD2, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SteC, SteA, SteB, SteD,

SteE, SpvB, SpvC, SpvD, SrfJ, SptP,

для штамма *Salmonella* strain. Наиболее предпочтительно все гены, кодирующие эффектор, подвергаются делеции.

Специалист в данной области может использовать любое количество стандартных методов для генерации мутаций в указанных эффекторных генах T3SS. Sambrook et al. описывают в целом такие методы. См. Sambrook et al. [30]. В соответствии с настоящим изобретением мутация может быть выполнена в промоторной области гена, кодирующего эффектор, так что экспрессия такого эффекторного гена прекращается.

Мутация также может быть выполнена в кодирующей области гена, кодирующего эффектор, так что каталитическая активность кодируемого эффекторного белка прекращается. "Каталитическая активность" эффекторного белка обычно относится к функции против клетки-мишени эффекторного белка, т.е. токсичности. Такая активность определяется каталитическими мотивами в каталитическом домене эффекторного белка. Специалистам в данной области хорошо известны подходы к идентификации этого каталитического домена и/или каталитических мотивов эффекторного белка. См. например, [31, 32]. Соответственно, одной предпочтительной мутацией по настоящему изобретению является делеция всего каталитического домена. Другой предпочтительной мутацией является мутация сдвига рамки в гене, кодирующего эффектор, так что каталитический домен отсутствует в белковом продукте, экспрессированном из такого гена со сдвигом рамки. Наиболее предпочтительной мутацией является мутация с делецией всей кодирующей области эффекторного белка. Другие мутации также рассматриваются в настоящем изобретении, такие как небольшие делеции или замены пар оснований, которые генерируются в каталитических мотивах эффекторного белка, приводя к разрушению каталитической активности данного эффекторного белка.

Мутации, которые генерируются в генах функциональных эффекторных белков T3SS, могут быть введены в конкретный штамм с помощью ряда методов. Один из таких методов включает клонирование мутированного гена в "суицидальный" вектор, который способен вводить мутантную последовательность в штамм посредством аллельного обмена. Пример такого "суицидального" вектора описан в [33].

Таким способом мутации, генерируемые в нескольких генах, могут последовательно вводиться в грамотрицательный бактериальный штамм, приводя к получению полимутанта, например, шестикратно мутантного рекомбинантного штамма. Порядок введения указанных мутантных последовательностей не важен. В некоторых случаях может быть желательным изменить только некоторые, но не все эффекторные гены. Соответственно, настоящее изобретение дополнительно относится к полимутантам *Yersinia*, отличным от шестикратных мутантов *Yersinia*, например двойным мутантам, тройным мутантам, четверным мутантам и пятикратно мутантным штаммам. Для доставки белков система секреции и транслокации данного мутантного штамма должна быть нативной.

Предпочтительным рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом по настоящему изобретению является рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм, который дефицитен по меньшей мере, по одному, предпочтительно по меньшей мере по двум, более предпочтительно по

меньшей мере по трем, еще более предпочтительно по меньшей мере по четырем, конкретно по меньшей мере по пяти, более конкретно по меньшей мере, по шести, наиболее конкретно всем эффекторным белкам T3SS, например шестикратно мутантный грамотрицательный бактериальный штамм, в котором все гены, кодирующие эффектор, мутированы таким образом, что полученный грамотрицательный бактериальный штамм больше не продуцирует никаких функциональных эффекторных белков.

Более предпочтительным рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом по настоящему изобретению является шестикратно мутантный штамм *Yersinia*, в котором все гены, кодирующие эффектор, мутированы таким образом, что полученная *Yersinia* больше не продуцирует никаких функциональных эффекторных белков. Подобный шестикратно мутантный штамм *Yersinia* обозначается как ΔурН,О,Р,Е,М,Т для *Y. enterocolitica*. В качестве примера такой шестикратно мутант может быть получен из штамма *Y. enterocolitica* MRS40, с получением *Y. enterocolitica* MRS40 ΔурН,О,Р,Е,М,Т, который является предпочтительным.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору для использования в комбинации с рекомбинантными грамотрицательными бактериальными штаммами для доставки желаемого белка в эукариотические клетки, причем указанный вектор содержит в направлении от 5' до 3': промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки от бактериального T3SS-эффекторного белка, функционально связанного с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, причем гетерологичные белки выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков.

Промотор, гетерологичный белок и сайт расщепления протеазой, описанные выше, могут быть использованы для вектора грамотрицательного бактериального штамма.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору для использования в комбинации с рекомбинантными грамотрицательными бактериальными штаммами для доставки желаемого белка в эукариотические клетки, причем указанный вектор содержит в направлении от 5' до 3': первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки или его фрагмент от бактериального эффекторного белка;

вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, причем гетерологичные белки выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков.

Предпочтительно последовательность ДНК, кодирующая повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков вектора, фланкирована на своем 3'-конце последовательностью ДНК, гомологичной последовательности ДНК хромосомы или эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки от бактериального эффекторного белка или ее фрагменту. Более предпочтительно указанная ДНК-последовательность, фланкирующая гомологичный белок на своем 3'-конце, гомологична последовательности ДНК и лежит в пределах 10 т.п.н. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки от бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. В частности, указанная нуклеотидная последовательность, фланкирующая с гомологичным белком на его 3'-конце, гомологична последовательности ДНК и находится в пределах того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки от бактериального эффекторного белка или его фрагмент. Гетерологичный белок и сайт расщепления протеазой, согласно описанию выше, может быть использован для вектора грамотрицательного бактериального штамма.

Векторы, которые могут использоваться в соответствии с данным изобретением, зависят от используемых грамотрицательных бактериальных штаммов, известных специалисту. Векторы, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением, включают векторы экспрессии (включая синтетические или другие сгенерированные модифицированные версии эндогенных вирулентных плазмид), векторы для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности и фрагменты ДНК для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности. Экспрессирующими векторами, которые являются подходящими, например, в случае штаммов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, являются, например, pUC, pBad, pACYC, pUCP20 и плазмиды pET. Векторами для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности, подходящими, например, в случае штаммов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, являются, например, pKNG101. ДНК-фрагменты для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентно-

сти относятся к способам, используемым, например, в случае штаммов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, например, генной инженерии с помощью системы лямбда-Red. Векторы для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности или фрагментов ДНК для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности могут вставлять первую, вторую и/или третью последовательность ДНК по настоящему изобретению, так что первая, вторая и/или третья последовательность ДНК функционально связывается с эндогенным промотором рекомбинантного граммотрицательного штамма бактерий. Таким образом, если используется вектор для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности или фрагмент ДНК для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности, эндогенный промотор может кодироваться на эндогенной бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной ДНК), и только первая и вторая последовательности ДНК будут обеспечены сконструированным вектором для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности или фрагмента ДНК для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности. Альтернативно, если используется вектор для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности или нуклеотидная молекула, такая как, например, ДНК-последовательность для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности, эндогенный промотор и сигнал доставки от бактериального эффекторного белка могут быть закодированы на эндогенной бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной ДНК) и только нуклеотидная молекула, такая как, например, последовательность ДНК, кодирующая гетерологичный белок, будет обеспечена вектором для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности или нуклеотидной молекулой, такой как, например, последовательность ДНК для инсерции в хромосомы или плазмиды вирулентности. Таким образом, промотор необязательно должен содержать вектор, используемый для трансформации рекомбинантных граммотрицательных бактериальных штаммов, т.е. рекомбинантные граммотрицательные бактериальные штаммы по настоящему изобретению могут быть преобразованы вектором, который не содержит промотор. Вектор настоящего изобретения обычно используют для доставки гетерологичных белков бактериальной ТЗСС в эукариотические клетки *in vitro* и *in vivo*.

Предпочтительный вектор, например предпочтительный вектор экспрессии для *Yersinia*, выбирают из группы, состоящей из pBad\_Si-1 и pBad\_Si\_2. Вектор pBad\_Si2 был сконструирован путем клонирования фрагмента *SycE*-YopE<sub>1-138</sub>, содержащего эндогенные промоторы для YopE и SycE из очищенного pYV40 в сайт KpnI/HindIII молекулы pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglIII из pBad-MycHisA с помощью расщепления, обработки фрагмента Кленова и повторного лигирования. Далее на 3'-конце YopE<sub>1-138</sub> добавляли следующие сайты расщепления: XbaI-XhoI-BstBI- (HindIII). pBad\_Si1 аналогичен pBad\_Si2, но кодирует EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1 (Clontech) на сайте NcoI/BglIII под индуцибельным арабинозой промотором. В равной степени предпочтительным является использование модифицированных вариантов эндогенной плазмиды вирулентности *Yersinia* pYV, кодирующей гетерологичные белки, как слияния с сигнальной последовательностью ТЗСС. Предпочтительный вектор, например предпочтительный вектор экспрессии для *Salmonella*, выбирают из группы, состоящей из pSi\_266, pSi\_267, pSi\_268 и pSi\_269. Плазмиды pSi\_266, pSi\_267, pSi\_268 и pSi\_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор и фрагмент SteA<sub>1-20</sub> (pSi\_266), последовательность полной длины SteA (pSi\_267), фрагмент SopE<sub>1-81</sub> (pSi\_268) или фрагмент SopE<sub>1-105</sub> (pSi\_269), амплифицировали из геномной ДНК *S. enterica* SL1344 и клонировали в сайт NcoI/KpnI вектора pBad-MycHisA (Invitrogen).

Векторы настоящего изобретения могут включать в себя другие элементы последовательности, такие как последовательность 3'-терминации (включая стоп-кодон и поли (А)-последовательность), или ген, придающий лекарственную устойчивость, которая позволяет выбирать трансформанты, получившие данный вектор. Векторы по настоящему изобретению могут быть трансформированы рядом известных способов в рекомбинантные граммотрицательные бактериальные штаммы. Для целей настоящего изобретения указанные способы трансформации для введения вектора включают, кроме прочего, электропорацию, опосредованную фосфатом кальция трансформацию, конъюгацию или их комбинации. Например, вектор может быть трансформирован в первый штамм стандартной процедурой электропорации. Далее такой вектор можно перенести из первого штамма в желаемый штамм путем конъюгации; такой процесс также называется "мобилизацией". Трансформанты (т.е. граммотрицательные бактериальные штаммы, поглотившие вектор) могут быть выбраны, например, с помощью антибиотиков. Указанные методы хорошо известны в данной области техники. См., например, [21].

В соответствии с настоящим изобретением промоторами вектора экспрессии рекомбинантного граммотрицательного бактериального штамма по изобретению может быть нативный промотор эффекторного белка ТЗСС соответствующего штамма или совместимого бактериального штамма или промотор, используемый в векторах экспрессии, которые являются подходящими, например, в штаммах *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, например pUC и pBad. Такими промоторами являются промотор T7, промотор Plac или промотор Ara-bad.

Если рекомбинантным граммотрицательным бактериальным штаммом является штамм *Yersinia*, промотор может быть взят от гена вирулона *Yersinia*. "Гены вирулона *Yersinia*" относятся к генам на плазмиде pYV *Yersinia*, экспрессия которой контролируется как температурой, так контактом с клеткой-мишенью. Такие гены включают гены, кодирующие элементы механизма секреции (гены Ysc), гены, ко-

дирующие транслокаторы (YopB, YopD и LcrV), гены, кодирующие контрольные элементы (YopN, YaeA и LcrG), гены, кодирующие эффекторные шапероны T3SS (SycD, SycE, SycH, SycN, SycO и SycT) и гены, кодирующие эффекторы (YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopT и YopP/YopJ), а также другие белки, кодируемые рYV, такие как VirF и YadA. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения промотор является нативным промотором функционального эффекторного кодирующего гена T3SS. Если рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом является штамм *Yersinia*, промотор выбирают из любого из YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM и YopP/YopJ. Более предпочтительно промотор выбирают из YopE или SycE.

Если рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом является штамм *Salmonella*, промотор может быть из островка патогенности SpiI или SpiII или из эффекторного белка, закодированного в другом участке. Такие гены включают гены, кодирующие элементы механизма секреции, гены, кодирующие транслокаторы, гены, кодирующие контрольные элементы, гены, кодирующие эффекторные шапероны T3SS, и гены, кодирующие эффекторы, а также другие белки, кодируемые SPI-1 или SPI-2. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения промотор является нативным промотором функционального эффекторного кодирующего гена T3SS. Если рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом является штамм *Salmonella*, промотор выбирают из любого из эффекторных белков. Более предпочтительно промотор выбирают из SopE, InvB или SteA.

В предпочтительном варианте осуществления вектор, например вектор экспрессии, содержит последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой. Генерация функционального и общеприменимого сайта расщепления позволяет отщепить сигнал доставки после транслокации. Поскольку сигнал доставки может препятствовать корректной локализации и/или функционированию транслоцированного белка в клетках-мишенях, введение сайта расщепления протеазой между сигналом доставки и представляющим интерес белком впервые обеспечивает доставку почти нативных белков в эукариотические клетки. Предпочтительно сайтом расщепления протеазой является мотив аминокислоты, который расщепляется протеазой или ее каталитическими доменами, выбранными из группы, включающей энтерокиназу (легкую цепь), энтеропептидазу, протеазу PreScission, протеазу риновируса человека (HRV 3C), протеазу TEV, протеазу TVMV, протеазу FactorXa и тромбин, более предпочтительно мотив аминокислоты, который расщепляется протеазой TEV. В равной степени предпочтительным сайтом расщепления протеазой является мотив аминокислоты, который расщепляется протеазой или ее каталитическими доменами, выбранными из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы риновируса человека 3C, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы FactorXa, протеаза процессинга убиквитина, называемая деубиквитинизирующими ферментами, и тромбина. Наиболее предпочтительным является мотив аминокислоты, который расщепляется протеазой TEV или протеазой процессинга убиквитина.

Таким образом, в следующем варианте осуществления настоящего изобретения гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки эффекторного белка T3SS протеазой. Предпочтительными способами расщепления являются способы, в которых:

- a) протеаза транслоцируется в эукариотическую клетку рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом, как описано в настоящей заявке, экспрессирующим слитый белок, который содержит сигнал доставки от эффекторного белка T3SS и протеазу в качестве гетерологичного белка; или
- b) протеаза экспрессируется конститутивно или транзитивно в эукариотической клетке.

Обычно рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм, используемый для доставки желаемого белка в эукариотическую клетку, и рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм, транслоцирующий протеазу в эукариотическую клетку, различны.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вектор содержит также последовательность ДНК, кодирующую молекулу-метку или акцепторный сайт для молекулы-метки. Указанная дополнительная последовательность ДНК, кодирующая молекулу-метку или акцепторный сайт для молекулы-метки, обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом второй последовательности ДНК. Предпочтительную молекулу-метку или акцепторный сайт для молекулы-метки выбирают из группы, состоящей из усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP), кумарина, акцептора кумариновой лигазы, резорурфина, лигазы акцепторного сайта резорурфина, мотива тетра-цистеина, используемого с красителем FIAsh/ReAsH (Life Technologies). Наиболее предпочтительным является резорурфин и акцепторный сайт лигазы резорурфина или EGFP. Использование молекулы-метки или акцепторного сайта для молекулы-метки приведет к присоединению молекулы-метки к представляющему интерес гетерологичному белку, который затем будет доставляться собственно в эукариотическую клетку, и позволит отслеживать указанный белок, например, посредством микроскопии живых клеток.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вектор содержит дополнительную последовательность ДНК, кодирующую пептидную метку. Указанная дополнительная последовательность ДНК, кодирующая пептидную метку, обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом второй последовательности ДНК. Предпочтительная пептидная метка выбирается из группы, состоящей из Мус-метки, His-метки, FLAG-метки, HA-метки, метки Strep или метки V5 или комбинации двух или более меток из указанных групп. Наиболее предпочтительной является Мус-метка, FLAG-метка, His-метка и комбинированные Мус- и His-

метки. Использование пептидной метки приведет к прослеживаемости меченого белка, например, путем иммунофлуоресценции или вестерн-блоттинга с использованием антител к меткам. Кроме того, использование пептидной метки позволяет аффинную очистку желаемого белка либо после секреции в культуральный супернатант, либо после транслокации в эукариотические клетки, в обоих случаях - с использованием метода очистки, подходящего для соответствующей метки (например, металл-хелатная аффинная очистка при использовании с His-меткой или очистка с помощью анти-Flag-антител, используемая с FLAG-меткой).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вектор содержит дополнительную последовательность ДНК, кодирующую сигнал ядерной локализации (NLS). Указанная дополнительная последовательность ДНК, кодирующая сигнал ядерной локализации (NLS), обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом второй последовательности ДНК, причем указанная дополнительная последовательность ДНК кодирует сигнал ядерной локализации (NLS). Предпочтительный NLS выбирают из группы, состоящей из NLS большого Т-антигена SV40 и его производных [34], а также других вирусных NLS. Наиболее предпочтительным является NLS большого Т-антигена SV40 и его производные.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вектор содержит сайт множественного клонирования. Указанный множественный сайт клонирования обычно расположен на 3'-конце первой последовательности ДНК и/или на 5'-конце или 3'-конце второй последовательности ДНК. Один или несколько сайтов множественного клонирования может быть представлен вектором. Предпочтительный сайт множественного клонирования выбирают из группы рестрикционных ферментов, включающих XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, Sad, SaiI, BstBI. Наиболее предпочтительными являются XbaI, XhoI, BstBI и HindIII.

Слитый белок, экспрессированный из первой и второй и опциональной третьей последовательностей ДНК вектора, также называют "слитым белком" или "гибридным белком", т.е. слитым белком или гибридом сигнала доставки и повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков.

Настоящее изобретение относится к способу доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков, как описано выше, в эукариотические клетки в клеточной культуре, а также *in-vivo*.

Таким образом, в одном варианте осуществления способ доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков включает:

- i) культивирование грамотрицательного бактериального штамма, как описано в настоящей заявке;
- ii) контактирование эукариотической клетки с грамотрицательным бактериальным штаммом i), причем слитый белок, который содержит сигнал доставки от бактериального эффекторного белка T3SS и повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков, экспрессируется указанным грамотрицательным бактериальным штаммом и транслоцируется в эукариотическую клетку; а также опционально:
- iii) расщепление слитого белка, так что повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков отщепляются от сигнала доставки от бактериального эффекторного белка T3SS.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два слитых белка, каждый из которых содержит сигнал доставки от бактериального эффекторного белка и повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов с различными гетерологичными белками, экспрессируются рекомбинантным аттенуированным грамотрицательным бактериальным штаммом и транслоцируются в эукариотическую клетку способами настоящего изобретения.

Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм может быть культивирован таким образом, чтобы экспрессировать слитый белок, который содержит сигнал доставки от эффекторного белка T3SS и повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов разных гетерологичных белков в соответствии с известными способами в области техники (например, FDA, Бактериологическое аналитическое руководство (BAM), глава 8: *Yersinia enterocolitica*). Предпочтительно рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм можно культивировать в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, например, при 28°C. Для индукции экспрессии T3SS и, например, YOPE/SycE-промотор-зависимых генов, бактерии можно выращивать при 37°C.

В предпочтительном варианте осуществления эукариотическая клетка подвергается контактированию с двумя грамотрицательными бактериальными штаммами i), причем первый грамотрицательный бактериальный штамм экспрессирует первый слитый белок, который содержит сигнал доставки от бактериального эффекторного белка T3SS и повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, а второй грамотрицательный бактериальный штамм экспрессирует второй слитый белок, который содержит сигнал доставки от бактериального эффекторного белка T3SS и повторяющиеся домены второго гетерологичного белка или двух или более доменов других вторых гетерологичных белков второго гетерологичного белка, так что первый и второй слитые белки транслоцируются в эукариотическую клетку. Указанный вариант осуществления предусматривает коинфицирование, например, эукариотических клеток двумя бактериальными штаммами в качестве действенного способа доставки, например, двух разных гибридных белков в отдельные клетки для обеспе-

чения их функционального взаимодействия.

Специалисты в данной области техники также могут использовать ряд анализов для определения того, успешно ли была выполнена доставка слитого белка. Например, слитый белок может быть обнаружен с помощью иммунофлуоресценции с использованием антител, распознающих слитую метку (например, Мус-метку). Определение также может быть основано на ферментативной активности доставляемого белка.

Настоящее изобретение относится к широкому спектру эукариотических клеток, которые могут быть мишенью данного рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма, например Hi-5 (BTI-TN-5B1-4; Life technologies B855-02), клетки HeLa, например HeLa Ccl2 (такие, как ATCC No. CCL-2), фибробласты, например 3T3 fibroblast cells (такие, как ATCC No. CCL-92) или Mef (такие, как ATCC No. SCRC-1040), Hek (такие, как ATCC No. CRL-1573), HUVECs (такие, как ATCC No. PCS-100-013), CHO (такие, как ATCC No. CCL-61), Jurkat (такие, как ATCC No. TIB-152), Sf-9 (такие, как ATCC No. CRL-1711), HepG2 (такие, как ATCC No. HB-8065), Vero (такие, как ATCC No. CCL-81), MDCK (такие, как ATCC No. CCL-34), THP-1 (такие, как ATCC No. TIB-202), J774 (такие, как ATCC No. TIB-67), RAW (такие, как ATCC No. TIB-71), Caco2 (такие, как ATCC No. HTB-37), клеточные линии NCI (такие, как ATCC No. HTB-182), DU145 (такие, как ATCC No. HTB-81), Lncap (такие, как ATCC No. CRL-1740), MCF-7 (такие, как ATCC No. HTB-22), MDA-MB cell lines (такие, как ATCC No. HTB-128), PC3 (такие, как ATCC No. CRL-1435), T47D (такие, как ATCC No. CRL-2865), A549 (такие, как ATCC No. CCL-185), U87 (такие, как ATCC No. HTB-14), SHSY5Y (такие, как ATCC No. CRL-2266s), Ea.Hy926 (такие, как ATCC No. CRL-2922), Saos-2 (такие, как ATCC No. HTB-85), 4T1 (такие, как ATCC No. CRL-2539), B16F10 (такие, как ATCC No. CRL-6475), или первичные человеческие гепатоциты (такие, как HMCPI5 Life technologies), предпочтительно HeLa, Hek, HUVECs, 3T3, CHO, Jurkat, Sf-9, HepG2 Vero, THP-1, Caco2, Mef, A549, 4T1, B16F10 и первичные человеческие гепатоциты и наиболее предпочтительно HeLa, Hek, HUVECs, 3T3, CHO, Jurkat, THP-1, A549 и Mef. Под "мишенью" подразумевается внеклеточная адгезия рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма к эукариотической клетке.

В соответствии с настоящим изобретением доставка белка может быть достигнута путем контактирования эукариотической клетки с рекомбинантным грамотрицательным бактериальным штаммом в соответствующих условиях. Для специалистов в данной области техники обычно доступны различные источники и методики в отношении условий для индуцирования экспрессии и транслокации генов вирулонов, включая желаемую температуру, концентрацию  $Ca^{++}$ , добавление индукторов, например конгокрасного, способы, которыми смешиваются рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм и клетки-мишени и тому подобное. См., например, [35]. Условия могут варьироваться в зависимости от типа эукариотических клеток-мишеней, и используемого рекомбинантного бактериального штамма. Такие вариации могут быть реализованы специалистами в данной области с использованием обычных методик.

Специалисты в данной области техники также могут использовать ряд анализов для определения того, успешно ли была выполнена доставка слитого белка. Например, слитый белок может быть обнаружен с помощью иммунофлуоресценции с использованием антител, распознающих слитую метку (например, Мус-метку). Определение также может быть основано на ферментативной активности доставляемого белка, например, посредством анализа, описанного в [21].

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает использование описанного в настоящей заявке рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма в медицине.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает использование описанного в настоящей заявке рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма при доставке повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в качестве лекарственного средства или вакцины субъекту. Повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков могут быть доставлены субъекту в виде вакцины путем контактирования грамотрицательного бактериального штамма с эукариотическими клетками, например с живым животным *in vivo*, так что повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов разных гетерологичных белков будут транслоцированы в живое животное, которое затем продуцирует антитела против повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов разных гетерологичных белков. Произведенные антитела могут быть непосредственно использованы или выделены и очищены и использованы в диагностике, в исследованиях, а также в терапии. В-клетки, продуцирующие антитела или содержащуюся в них ДНК-последовательность, могут быть использованы для дальнейшего получения специфических антител для использования в диагностике, в исследованиях, а также в терапии.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков, причем повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков доставляются *in vitro* в эукариотическую клетку.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных

белков, причем эукариотическая клетка принадлежит живому животному, и это живое животное контактирует с грамотрицательным бактериальным штаммом *in vivo*, так что слитый белок транслоцируется в это живое животное. Предпочтительным животным является млекопитающее, более предпочтительно человек.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает использование описанного выше рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма для высокопроизводительных скрининга ингибиторов для клеточного пути или события, вызванного транслоцированным гетерологичным белком(-ами).

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к библиотеке грамотрицательных бактериальных штаммов, в которой повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, кодируемые второй ДНК-последовательностью вектора экспрессии грамотрицательных бактериальных штаммов представлены собой доменами человеческого или мышинного белка, предпочтительно доменом человеческого белка, и причем каждый домен человеческого или мышинного белка, экспрессированного грамотрицательным бактериальным штаммом, отличается в аминокислотной последовательности. В качестве вектора клонирования для экспрессии можно использовать описанные выше экспрессирующие векторы.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему описанный в настоящей заявке вектор и бактериальный штамм, экспрессирующий и секретирующий протеазу, способную расщеплять сайт расщепления протеазой в составе этого вектора. Конкретный используемый вектор представляет собой вектор для использования в сочетании с бактериальным штаммом для доставки желаемого белка в эукариотические клетки, как описано выше, причем указанный вектор содержит в направлении от 5' до 3': промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки от бактериального T3SS-эффектора, функционально связанного с указанным промотором;

а вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, причем гетерологичные белки выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновым повтором, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, транскрипционных факторов, протеаз, малых ГТФаз, связанных с GPCR белков, нанотел и конструкций слияния нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков.

### Примеры

#### Пример 1.

##### А) Материалы и методы.

Бактериальные штаммы и условия роста. Штаммы, используемые в этом исследовании, приведены на фиг. 15A-N. *E. coli* Top10, используемый для очистки и клонирования плазмид, и *E. coli* Sm10  $\lambda$  pir, используемый для конъюгации, а также *E. coli* BW19610 [36], используемый для культивирования pKNG101, стандартно выращивали на чашках с агаром LB и в бульоне LB при 37°C. Для отбора векторов экспрессии применяли ампициллин в концентрации 200 мкг/мл (*Yersinia*) или 100 мкг/мл (*E. coli*). Для отбора суцидных векторов применяли стрептомицин в концентрации 100 мкг/мл. *Y. enterocolitica* MRS40 [22], не устойчивый к ампициллину E40-дериват [21] и полученные из них штаммы стандартно выращивались на сердечно-мозговом экстракте (BHI, Difco) при комнатной температуре. Ко всем штаммам *Y. enterocolitica* добавляли налидиксовую кислоту (35 мкг/мл), а всем штаммам *Y. enterocolitica* asd дополнительно добавляли 100 мкг/мл мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты (mDAP, Sigma Aldrich). *S. enterica* SL1344 обычно выращивали на чашках с агаром LB и в бульоне LB при 37°C. Для отбора векторов экспрессии в *S. enterica* применяли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Генетические манипуляции *Y. enterocolitica*. Ранее были описаны генетические манипуляции *Y. enterocolitica* [37, 38]. В кратком изложении, мутаторы для модификации или делеции генов в pYV-плазмидах или на хромосоме были сконструированы с помощью 2-фрагментной ПЦП с перекрывающимися праймерами с использованием очищенной плазмиды pYV40 или геномной ДНК в качестве матрицы, что приводило к получению 200-250 п.н. фланкирующих последовательностей с обеих сторон удаленной или модифицированной части соответствующего гена. Полученные фрагменты клонировали в pKNG101 [33] в *E. coli* BW19610 [36]. Плазмиды с верифицированной последовательностью трансформировали в *E. coli* Sm10  $\lambda$  pir, откуда плазмиды были мобилизованы в соответствующий штамм *Y. enterocolitica*. Мутанты, несущие интегрированный вектор, размножали в течение нескольких поколений без давления отбора. Затем использовали сахарозу для отбора клонов, которые потеряли вектор. Наконец, мутанты идентифицировали методом ПЦП для отбора колоний. Специфические мутаторы (pSi\_408, pSi\_419) перечислены в табл. III.

Конструирование плазмид. Для клонирования слитых белков с N-концевыми 138 аминокислотами YopE (SEQ ID NO: 2) использовали плазмиду pBad\_Si2 или pBad\_Si1 (фиг. 10). Плазида pBad\_Si2 была сконструирована путем клонирования фрагмента SycE-YopE<sub>1-138</sub>, содержащего эндогенные промоторы

для YopE и SysE из очищенного pYV40 в сайт KpnI/HindIII молекулы pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglIII pBad-MycHisA путем расщепления, обработки фрагмента Кленова и повторного лигирования. Двухнаправленный транскрипционный терминатор (Bba\_V1006; фонд iGEM) клонировали в разрыв KpnI и обрабатывали фрагмент Кленова (pBad\_Si2) или сайт разрыва BglIII (pBad\_Si1). Далее на 3'-конце YopE<sub>1-138</sub> добавляли следующие сайты расщепления: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII) (фиг. 10 B). pBad\_Si1 аналогичен pBad\_Si2, но кодирует EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1 (Clontech) на сайте NcoI/BglIII под индуцибельным арабинозой промотором. Плазмиды pSi\_266, pSi\_267, pSi\_268 и pSi\_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор и фрагмент SteA<sub>1-20</sub> (pSi\_266), последовательность SteA полной длины (pSi\_267), фрагмент SopE<sub>1-81</sub> (pSi\_268) или фрагмент SopE<sub>1-105</sub> (pSi\_269) амплифицировали из геномной ДНК *S. enterica* SL1344 и клонировали в сайт NcoI/KpnI молекулы pBad-MycHisA (Invitrogen).

Гены полной длины или их фрагменты амплифицировали специфическими праймерами, перечисленными в табл. I ниже, и клонировали в виде слияний с YopE<sub>1-138</sub> в плазмиду pBad\_Si2 или в случае z-BIM (SEQ ID NO: 21)- в pBad\_Si1 (см. табл. II ниже). Для слияния с SteA или SopE синтетические ДНК-конструкции расщепляли с помощью KpnI/HindIII и клонировали в pSi\_266, pSi\_267, pSi\_268 или pSi\_269 соответственно. В случае генов бактериальных видов в качестве матрицы использовали очищенную геномную ДНК (*S. flexneri* M90T, *Salmonella enterica* подвид *enterica* serovar *Typhimurium* SL1344, *Bartonella henselae* ATCC 49882). Для человеческих генов использовалась универсальная кДНК-библиотека (Clontech), если не указано иное (фиг. 15A-N), гены данио были амплифицированы из библиотеки к ДНК (любезный подарок М. Афольтера). Лигированные плазмиды клонировали в *E. coli* Top10. Последовательные плазмиды электропорировали в желаемый штамм *Y. enterocolitica* или *S. enterica*, используя насадки, как для стандартной электропорации *E. coli*.

Таблица I. (Праймер Nr. Si\_ : Последовательность)

285:	CATACCATGGGAGTGAGCAAGGGCGAG
286:	GGAAGATCTtACTTGTACAGCTCGTCCAT
287:	CGGGGTACCTCAACTAAATGACCGTGGTG
288:	GTTAAAGCTTtctgaatctgactcgagCGTGGCGAACTGGTC
292:	CAGTctcgagCAAATTCTAAACAAAATACTTCCAC
293:	cagtTTCGAATTAATTTGTATTGCTTTGACGG
296:	CAGTctcgagACTAACATAACACTATCCACCCAG
297:	GTTAAAGCTTTTCAGGAGGCATTCTGAAG
299:	CAGTctcgagCAGGCCATCAAGTGTGTG
300:	cagtTTCGAATCATTCTTCTTCTCTCTTCTCA
301:	CAGTctcgagGCTGCCATCCGGAA
302:	cagtTTCGAATCACAAGACAAGGCACCC
306:	GTTAAAGCTTGGAGGCATTCTGAAGatactatt
307:	CAGTctcgagCAAATACAGAGCTTCTATCACTCAG
308:	GTTAAAGCTTTCAAGATGTGATTAATGAAGAAATG
317:	cagtTTCGAACCCATAAAAAAGCCCTGTC

318: GTTAAAGCTTCTACTCTATCATCAAACGATAAAATGg  
324: CAGTctcgagTTCACCTCAAGAAACGCAAA  
339: cagfTTCGAATTTTCTCTTCTCTCTTCAcg  
341: cgtaTCTAGAAAAATGATGAAAATGGAGACTG  
342: GTTAAAGCTTtaGCTGGAGACGGTGAC  
346: CAGTctcgagTCCAGATCCAGAGTTTG  
347: GTTAAAGCTTTCACCTGGGAGGGGG  
351: CAGTctcgagctcgagTTATCTACTCATAGAACTACTTTTGCAG  
352: cgcGGATCCcagtgctctcgcgcaatta  
353: CATTATTCCTCCTAGTTAGTCAcagcaactgctgctcttctc  
354: gaaaggagcagcagttgctgTGACTAACTAGGAGGAATAAATG  
355: cgattcacggattgcttctCATTATTCCTCCAGGTA  
356: TAGTACCTGGAGGGAATAATGagaagcaatccgtaatcg  
357: cgtaTCTAGAcggctttaagtgcgacattc  
364: cgtaTCTAGACTAAAGTATGAGGAGAGAAAATTGAA  
365: GTTAAAGCTTTCAGCTTGCCGTCGT  
367: CGTAtctagaGACCCGTTCTGGTGC  
369: cgtaTCTAGAccecccaagaagaagc  
373: GTTAAAGCTTGCTGGAGACGGTGACC  
386: CGTAtctagaTCAGGACGCTTCGGAGGTAG  
387: CGTAtctagaATGGACTGTGAGGTCAACAA  
389: CGTAtctagaGGCAACCGCAGCA  
391: GTTAAAGCTTTCAGTCCATCCCATTCTg  
403: CGTAtctagatctggaatatccctggaca  
406: GTTAAAGCTTgtctgtctcaatgccacagt  
410: CAGTctcgagATGTCCGGGGTGGTg  
413: cagfTTCGAATCACTGCAGCATGATGTC  
417: CAGTctcgagAGTGGTGTGATGATGACATG  
420: cagfTTCGAATTAGTGATAAAAATAGAGTTCTTTTGTGAG  
423: CAGTctcgagATGCACATAACTAATTTGGGATT  
424: cagfTTCGAATTATACAAATGACGAATACCCTTT  
425: GTTAAAGCTTttacacctgctcttcttggcgGCTGGAGACGGTGAC  
428: CGTAtctagaATGGACTTCAACAGGAACCTT

429: CGTAtctagaGGACATAGTCCACCAGCG  
430: GTTAAAGCTTTCAGTTGGATCCGAAAAAC  
433: CGTAtctagaGAATTAATAAAAAAACACTCATCCCA  
434: CGTAtctagaCCAAAGGCAAAAGCAAAAA  
435: GTTAAAGCTTTTAGCTAGCCATGGCAAGC  
436: CGTAtctagaATGCCCCGCCCC  
437: GTTAAAGCTTCTACCCACCGTACTCGTCAAT  
438: CGTAtctagaATGTCTGACACGTCCAGAGAG  
439: GTTAAAGCTTTCATCTTCTTCGCAGGAAAAAG  
445: cgcGGATCCttatgggttcacagcaaaa  
446: CATTATTCCTCCTAGTTAGTCAaggcaacagccaatcaagag  
447: ctcttgattggctgttcctTACTAACTAGGAGGAATAAATG  
448: ttgattgcagtgacatggtgCATTATTCCTCCAGGTACTA  
449: TAGTACCTGGAGGGAATAATGcaccatgtcactgcaatcaa  
450: cgtaTCTAGAtagccgcagatggtggtatg  
451: CGTAtctagaGATCAAGTCCAACCTGGTGG  
463: CAGTctcgaggaaagctgtttaaggggc  
464: cagtTTCGAAttagcgacggcgacg  
476: GTTAAAGCTTtACTTGTACAGCTCGTCCAT  
477: CGTAtctagaGTGAGCAAGGGCGAG  
478: CAGTctcgagATGGAAGATTATACCAAAATAGAGAAA  
479: GTTAAAGCTTCTACATCTTCTTAATCTGATTGTCCa  
482: CGTAtctagaATGGCGCTGCAGCt  
483: GTTAAAGCTTTCAGTCATTGACAGGAATTTTg  
486: CGTAtctagaATGGAGCCGGCGGCG  
487: GTTAAAGCTTTCATCGGGGATGTCTg  
492: CGTAtctagaATGCGCGAGGAGAACAAGGG  
493: GTTAAAGCTTTCAGTCCCCTGTGGCTGTGc  
494: CGTAtctagaATGGCCGAGCCTTG  
495: GTTAAAGCTTtaTTGAAGATTGTGGCTCC  
504:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTAAAATCTGTATTTTCAA  
GTATGCCCCGCCCC  
505: GTTAAAGCTTCCCACCGTACTCGTCAATtc

508:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAA  
 GTATGGCCGAGCCTTG  
 509: GTTAAAGCTTTTGAAGATTTGTGGCTCCc  
 511:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAA  
 GTGTGAGCAAGGGCGAG  
 512:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAA  
 GTCCGCCGAAAAAAAAACGTAAAGTTGTGAGCAAGGGCGAG  
 513:GTTAAAGCTTtAAACTTTACGTTTTTTTTTCGGCGGCTTGTACAGCTCG  
 TCCAT  
 515:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAA  
 GTGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG  
 558: CGTATCTAGAATGACCAGTTTTGAAGATGC  
 559:GTTAAAGCTTTCATGACTCATTTCATCCAT  
 561:CGTATCTAGAATGAGTCTCTTAAACTGTGAGAACAG  
 562:GTTAAAGCTTCTACACCCCGCATCA  
 580: catgcatggATTTATGGTCATAGATATGACCTC  
 585: CAGTctcgagATGCAGATCTTCGCAAGAC  
 586: GTTAAAGCTTgctagcttcaaACCACCACGTAGACGTAAGAC  
 588: cagtTTCGAAGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG  
 612: CGGGGTACCatgaggtagcttattctgataaag  
 613: CGGGGTACCataattgtccaaatagttatgtagc  
 614: catgcatggCGGCAAGGCTCCTC  
 615: egggtaccTTATTTGTCAACACTGCC  
 616: egggtaccTGCGGGGTCTTTACTCG  
 677:TTACTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCCCCATCTGGCCCAA  
 ATTGGTGATGAAATGGATCATTAAAGCTTGGAGTA  
 678:TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTTCATCACCAATTTGGGCCAGATGGC  
 GGGCAATATTATGAATAATTTCTCGAATAGTAA  
 682:TTACTACTCGAGAAAAACTGAGCGAATGTCTGCGCCGCATTGGTGAT  
 GAACTGGATAGCTAAGCTTGGAGTA  
 683:TACTCCAAGCTTAGCTATCCAGTTCATCACCAATGCGGCGCAGACATT  
 CGCTCAGTTTTTTCTCGAGTAGTAA  
 725: TTACTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCC  
 726:  
 TACTCCAAGCTTACGGTTGAATATTATGATCCATTTTCATCACCAATTTGG  
 727:  
 TTACTATTCGAAGCCGGTGGTGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCC  
 728: TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTTCATCA  
 733:TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCGAAGAAATTATTCATAATATT  
 GCCCG  
 734:TACTCCTTCGAAGGCACCATGATCCATTTTCATCACCAATTTGG  
 735:TACTCCTTCGAATTAATGATCCATTTTCATCACCAATTTG  
 736:TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCAAAAACTGAGCGAATGTCT  
 GCG  
 737: TACTCCTTCGAAGGCACCGCTATCCAGTTCATCACCAATG  
 738:TACTCCTTCGAATTAGCTATCCAGTTCATCACCAATG

Таблица II. Клонированные слитые белки

Белок, который должен быть доставлен ТЗСС	Seq. ID. No. белка	Основная плаزمидна	Итоговое название плазмиды	Праимеры. Si Nr.:	Seq. ID. No. праимера
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	44/45 и 46/47
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE1-138)	46/47
YopE1-138-IpgB1	4	pBad_Si_2	pSi_16	292/293	48/49
YopE1-138-SopE	5	pBad_Si_2	pSi_20	296/297	50/51
YopE1-138-Rac1 Q61L	26	pBad_Si_2	pSi_22	299/300	52/53
YopE1-138-RhoA Q61E	27	pBad_Si_2	pSi_24	301/302	54/55
YopE1-138-SopE-MycHis	135	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	50/56
YopE1-138-SopB	6	pBad_Si_2	pSi_30	307/308	57/58
YopE1-138-FADD	28	pBad_Si_2	pSi_37	367/386	76/79
YopE1-138-OspF	7	pBad_Si_2	pSi_38	317/318	59/60
YopE1-138-BepG 715-end	136	pBad_Si_2	pSi_43	324/351	61/67
YopE1-138-Rac1 Q61L-MycHis	137	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	52/62
YopE1-138-Slmb1-VhH4	32	pBad_Si_2	pSi_53	341/342	63/64
YopE1-138-Bad	29	pBad_Si_2	pSi_57	346/347	65/66
YopE1-138-SptP	8	pBad_Si_2	pSi_64	364/365	74/75
YopE1-138-NLS-Slmb1-VhH4	33	pBad_Si_2	pSi_70	369/342	77/64
YopE1-138-Bid	24	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	80/82
YopE1-138-t-Bid	25	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	81/82
YopE1-138-каспаза 3 p17	22	pBad_Si_2	pSi_97	403/406	83/84
YopE1-138-GPCR GNA12	30	pBad_Si_2	pSi_103	410/413	85/86
YopE1-138-каспаза 3 p10/12	23	pBad_Si_2	pSi_106	417/420	87/88
YopE1-138-IpgD	9	pBad_Si_2	pSi_111	423/424	89/90
YopE1-138-Slmb1-VhH4-NLS	34	pBad_Si_2	pSi_112	341/425	63/91
YopE1-138-z-Bid	19	pBad_Si_2	pSi_116	428/430	92/94
YopE1-138-z-t-Bid	20	pBad_Si_2	pSi_117	429/430	93/94
YopE1-138-BepA E305-end	11	pBad_Si_2	pSi_118	433/435	95/97
YopE1-138-BepA	10	pBad_Si_2	pSi_119	434/435	96/97
YopE1-138-ET1	36	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	98/99
YopE1-138-z-BIM	21	pBad_Si_1	pSi_121	438/439	100/101
YopE1-138-VhH4 нанотело, распознающее EGFP	31	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	108/78
YopE1-138-TEV протеаза S219V	42	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	109/110
YopE1-138-EGFP	37	pBad_Si_2	pSi_140	477/476	112/111
YopE1-138-Cdk1	14	pBad_Si_2	pSi_143	478/479	113/114
YopE1-138-Mad2	15	pBad_Si_2	pSi_145	482/483	115/116
YopE1-138-Ink4A	16	pBad_Si_2	pSi_147	486/487	117/118
YopE1-138-Ink4B	17	pBad_Si_2	pSi_150	492/493	119/120
YopE1-138-Ink4C	18	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	121/122
YopE1-138-TIFA	13	pBad_Si_2	pSi_153	558/559	131/132
YopE1-138-2x TEVсайт - ET1	41	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	123/124
YopE1-138-2xTEVсайт - EGFP - NLS	39	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	127/129
YopE1-138-2xTEVсайт - NLS - EGFP	38	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	128/111
YopE1-138-2x TEVсайт - INK4C	40	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	125/126
YopE1-138-2x	43	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	130/126

TEVсайт - Flag - INK4C					
YopE1-138-мышинный Traf6	12	pBad_Si_2	pSi_166	561/562	133/134
YopE1-138-Y. enterocolitica, кодон-оптимизированный мышинный tBid, ВНЗ часть	138	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	148/149
YopE1-138-Y. enterocolitica, кодон-оптимизированный мышинный Вах, ВНЗ часть	139	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	150/151
SteA1-20	140	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	152/153
SteA	141	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	152/154
SopE1-81	142	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_268	614/615	155/156
SopE1-105	143	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	155/157
SteA1-20-S. enterica кодон-оптимизированный мышинный tBid	144	pSi_266	pSi_270	синтетическая конструкция	/
SteA-S. enterica кодон-оптимизированный мышинный tBid	145	pSi_267	pSi_271	синтетическая конструкция	/
SopE1-81-S. enterica кодон-оптимизированный мышинный tBid	146	pSi_268	pSi_272	синтетическая конструкция	/
SopE1-105-S. enterica кодон-оптимизированный мышинный tBid	147	pSi_269	pSi_273	синтетическая конструкция	/
YopE1-138-Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный Ink4A 84-103	158	pBad_Si_2	pSi_362	745/746	172/173

YopE1-138-Y. enterocolitica кодон- оптимизированный p107/RBL1 657- 662 (AAA02489.1)	159	pBad_Si_2	pSi_363	747/748	174/175
YopE1-138-Y. enterocolitica кодон- оптимизированный p21 141-160 (AAH13967.1)	160	pBad_Si_2	pSi_364	749/750	176/177
YopE1-138-Y. enterocolitica кодон- оптимизированный p21 145-160 (AAH13967.1)	161	pBad_Si_2	pSi_366	753/754	178/179
YopE1-138-Y. enterocolitica кодон- оптимизированный p21 17-33 (AAH13967.1)	162	pBad_Si_2	pSi_367	755/756	180/181
YopE1-138-Y. enterocolitica кодон- оптимизированный циклин D2 139-147 (CAA48493.1)	163	pBad_Si_2	pSi_368	757/758	182/183
SteA-Ink4a-MycHis	164	pSi_267	pSi_333	703/704	184/185
SopE1-105-Ink4a- MycHis	165	pSi_269	pSi_334	703/704	184/185
SteA-Ink4c-MycHis	166	pSi_267	pSi_335	PCR1: 705/706; PCR2: 707/708; ПЦР с перекрыв. праймерами: 705/708	186/187, 188/189
SopE1-105-Ink4c- MycHis	167	pSi_269	pSi_336	PCR1: 705/706; PCR2: 707/708; ПЦР с перекрыв. праймерами: 705/708	186/187, 188/189
SteA-Mad2-MycHis	168	pSi_267	pSi_337	709/710	190/191
SopE1-105-Mad2- MycHis	169	pSi_269	pSi_338	709/710	190/191
SteA-Cdk1-MycHis	170	pSi_267	pSi_339	711/712	192/193

SopE1-105-Cdk1-MycHis	171	pSi_269	pSi_340	711/712	192/193
YopE1-138-Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid	194	pBad_Si_2	pSi_315	синтетическая конструкция	/
YopE1-138-убиквитин	195	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	197/198
YopE1-138-убиквитин-Flag-INK4C-MycHis	196	pSi_236	pSi_237_II	588/509	199/126
YopE1-138-(Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid ВНЗ часть) готовый для инсерции дополнительных доменов	200	pBad_Si_2	pSi_357	733/735	204/205
YopE1-138-(Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный ВАХ ВНЗ часть) готовый для инсерции дополнительных доменов	201	pBad_Si_2	pSi_358	736/738	206/207
YopE1-138-(Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid ВНЗ часть) <sub>2</sub>	202	pSi_357	pSi_371	733/734	204/208
YopE1-(138-Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid ВНЗ часть - Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный ВАХ ВНЗ part	203	pSi_358	pSi_373	733/734	204/208
YopE1-138- кодон-оптимизированный мышинный tBid, ВНЗ расширенная часть	209	pBad_Si_2	pSi_353	725/726	212/213
YopE1-138-10 Aa linker - Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid ВНЗ часть	210	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	214/215
YopE1-(138-Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный Вах, ВНЗ часть - Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid, ВНЗ часть	211	pSi_357	pSi_374	736/737	206/216

Таблица III. Мутаторы для генетической модификации

Мутатор/конструкция	Вставляется:	Основная плазмида	Итоговое название плазмиды	Праймеры ySi_Nr.:	Праймеры Seq.Id No.	используется с родительским штаммом
YopE <sub>1-138</sub> -tBID BH3	pYV	pKNG101	pSi_408	Синтетический ген	/	/
YopE <sub>1-138</sub> -(tBID BH3) <sub>2</sub>	pYV	pKNG101	pSi_419	Синтетический ген	/	Штамм, мутированный с pSi_408

Секреция Yop. Индукцию уор-регулона проводили путем сдвига культивирования до 37°C в ВНИ-Ох (пермиссивные условия) [39]. В качестве источника углерода добавляли глюкозу (4 мг/мл).

Совокупность фракций клеток и супернатантов разделяли центрифугированием при 20800 g в течение 10 мин при 4°C. В качестве суммарной клеточной фракции брали ступок клеток. Белки в супернатанте осаждали 10 мас./об.% трихлоруксусной кислотой в течение 1 ч при 4°C. После центрифугирования (20 800 г в течение 15 мин) и удаления супернатанта полученный осадок промывали в ледяном ацетоне в течение ночи. Образцы снова центрифугировали, супернатант сливали и осадок высушивали на воздухе и ресуспендировали в 1×ДСН-красителе для загрузки.

Секретируемые белки анализировали с помощью ДСН-ПААГ; в каждом случае загружали на трек белки, секретируемые  $3 \times 10^8$  бактериями. Обнаружение специфических секретируемых белков методом иммуноблоттинга проводили с использованием 12,5% гелей ДСН-ПААГ. Для детектирования белков в общей массе клеток загружали  $2 \times 10^8$  бактерий на трек, если не указано иное, и перед обнаружением методом иммуноблоттинга белки разделяли на 12,5% ДСН-ПААГ гелях.

Иммуноблоттинг проводили с использованием моноклональных антител крыс против YopE (MIRA193-13A9, 1:1000, [40]). Антисыворотку предварительно дважды абсорбировали в течение ночи в отношении *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd для уменьшения фонового окрашивания. Детектирование проводили с использованием вторичных антител, направленных против антител крыс и конъюгированных с пероксидазой хрена (1:5000, Southern biotech), перед проявкой хемиллюминесцентным субстратом ECL (LumiGlo, KPM).

Культура клеток и инфицирование. HeLa Ccl2, фибробласты swiss 3T3, 4T1, B16F10 и D2A1 культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% FCS (эмбриональная телячья сыворотка) и 2 mM L-глутамин (сDMEM). Клетки HUVEC выделяли и культивировали, как описано в [41]. Клетки Jurkat и 4T1 культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% FCS и 2 mM L-глутамин. *Y. enterocolitica* выращивали в ВНИ (сердечно-мозговой экстракт) с добавками в течение ночи при комнатной температуре, разбавляли свежим ВНИ до OD<sub>600</sub>=0,2 и выращивали в течение 2 ч при комнатной температуре, с последующим температурным сдвигом в шейкере с водяной баней при 37°C в течение еще 30 мин или в течение 1 ч в случае доставки EGFP. Наконец, бактерии собирали центрифугированием (6000 gcf, 30 с) и промывали один раз DMEM, с добавками 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамин. *S. enterica* выращивали в LB с добавками в течение ночи при 37°C и разбавляли 1:40 в свежем LB и выращивали в течение 2,5 ч при 37°C (условия для индукции Spil T3SS) или культуру после ночи дополнительно инкубировали при 37°C (условия для индукции Spill T3SS). Наконец, бактерии собирали центрифугированием (6000 gcf, 30 с) и промывали один раз DMEM с добавками 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамин. Клетки, посеянные в 96-луночные (для иммунофлуоресценции) или 6-луночные (для вестерн-блоттинга) плашеты, инфицировали при указанных МОИ (множественность инфицирования) в DMEM с добавками 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамин. После добавления бактерий планшеты центрифугировали в течение 1 мин при 1750 об/мин и помещали при 37°C в течение указанных периодов времени. Внеклеточные бактерии были убиты гентамицином (100 мг/мл), в указанных случаях. Для иммунофлуоресцентного метода анализа инфекционности останавливали фиксацией 4% PFA. Для Вестерн-блоттинга клетки дважды промывали ледяным PBS и добавляли буфер PhosphoSafe (Novagen) для лизиса клеток. После инкубации на льду клетки центрифугировали (16 000 gcf, 25 мин, 4°C). Супернатанты собирали и анализировали на общее содержание белка методом Брэдфорда BSA (Pierce) перед ДСН-ПААГ и вестерн-блоттингом с использованием антител к Phospho-Akt (Ser473 и T308, оба - Cell Signaling), к актину (Millipore), к Bid (Cell Signal), к Myc (Santa Cruz), к p38 (Cell Signaling), к Phospho-p-38 (Thr180/Tyr182, Cell Signaling), к каспазе-3 p17 (Cell Signaling) и к Ink4C (Cell Signaling).

Анализ секреции с *S. enterica*. Для индукции секреции белка штаммом *S. Enterica*, бактерии *S. enterica* культивировали в течение ночи в LB, содержащем 0,3 M NaCl на орбитальном шейкере (на 150 об/мин). Затем *S. enterica* разбавляли 1:50 в свежем LB, содержащем 0,3 M NaCl, и выращивали в течение 4 ч при 37°C без встряхивания.

Совокупность фракций клеток и супернатантов разделяли центрифугированием при 20800 g в течение 10 мин при 4°C. В качестве суммарной клеточной фракции брали ступок клеток. Белки в супернатанте осаждали 10 мас./об.% трихлоруксусной кислотой в течение 1 ч при 4°C. После центрифугирования (20800 г в течение 15 мин) и удаления супернатанта полученный осадок промывали в ледяном ацетоне в течение ночи. Образцы снова центрифугировали, супернатант сливали и осадок высушивали на воздухе и ресуспендировали в 1×ДСН-красителе.

Секретируемые белки анализировали с помощью ДСН-ПААГ; в каждом случае загружали на трек белки, секретируемые  $3 \times 10^8$  бактериями. Обнаружение специфических секретируемых белков методом иммуноблоттинга проводили с использованием 12,5% гелей ДСН-ПААГ. Для детектирования белков в общей массе клеток загружали  $2 \times 10^8$  бактерий на трек, если не указано иное, и перед обнаружением методом иммуноблоттинга белки разделяли на 12,5% ДСН-ПААГ гелях. Иммуноблоттинг проводили с использованием антител к Мус (Santa Cruz).

Вестерн-блоттинг транспонированных белков T3SS из инфицированных клеток. Клетки HeLa в 6-луночных планшетах инфицировали при МОИ 100, как описано выше. В случае коинфицирования штаммом *Y. enterocolitica* с транслокацией TEV-протеазы, устанавливали OD<sub>600</sub> штаммов, и две бактериальные суспензии смешивали в пробирке в соотношении 1:1 (если не указано иное) перед добавлением в клетки. По окончании инфицирования клетки дважды промывали ледяным PBS и собирали соскребаемым в небольшом объеме ледяного PBS. После центрифугирования (16000 gcf, 5 мин, 4°C) осадок растворяли в 0,002% дигитонине, с добавкой коктейля ингибиторов протеазы (Roche complete, Roche). Растворенный осадок инкубировали в течение 5 мин на льду и затем центрифугировали (16 000 gcf, 25 мин, 4°C). Супернатанты собирали и анализировали на общее содержание белка методом Брэдфорда BCA (Pierce) перед ДСН-ПААГ и вестерн-блоттингом с использованием антитела к Мус (Santa Cruz, 9E11) или к Ink4C (Cell Signaling).

Иммунофлуоресценция. Клетки, высеванные в 96-луночные планшеты (Corning), инфицировали, как описано выше, и после фиксации 4% PFA трижды промывали PBS. Затем лунки блокировали, используя 5% козьей сыворотки в PBS 0,3% Triton X-100 в течение 1 ч при комнатной температуре. Первичное антитело (анти-Мус, Santa Cruz, 1:100) разбавляли в PBS 1% BSA и 0,3% Triton X-100 и клетки инкубировали в течение ночи при 4°C. Клетки промывали 4 раза PBS перед добавлением вторичного антитела (антимышинные AF 488, Life technologies, 1:250), разбавленного в PBS 1% BSA и 0,3% Triton X-100. При необходимости добавляли окрашивание ДНК красителем Hoechst (Life technologies, 1:2500) и/или окрашивание актином (Dy647-Phalloidin, DyeOmics). В некоторых случаях непосредственно после промывки PFA применяли только окрашивание ДНК и/или актином. Клетки инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, три раза промывали PBS и анализировали с помощью автоматического анализа изображений, как описано ниже.

Автоматизированная микроскопия и анализ изображений. Изображения регистрировали автоматически с помощью системы ImageXpress Micro (Molecular devices, Саннивейл, США). Количественную оценку интенсивности окрашивания анти-Мус проводили с использованием MetaXpress (Molecular devices, Саннивейл, США). Области внутри клеток, исключая области ядер и области, содержащие бактерии, выбирали вручную (кружки с площадью 40 пикселей) и регистрировали среднюю интенсивность.

Стимуляция TNF $\alpha$  и вестерн-блоттинг Phospho-p38. Клетки HeLa, засеянные в 6-луночных планшетах, инфицировали с МОИ100, как описано выше. Через 30 мин после инфицирования добавляли гентамицин и через 45 мин после инфицирования добавляли TNF $\alpha$  (10 нг/мл). Через 1 ч 15 мин после инфицирования клетки дважды промывали ледяным PBS и добавляли буфер PhosphoSafe (Novagen) для лизиса клеток. После инкубации на льду клетки центрифугировали (16 000 gcf, 25 мин, 4°C). Супернатанты собирали и анализировали на общее содержание белка методом Брэдфорда BCA (Pierce) перед ДСН-ПААГ и вестерн-блоттингом с использованием антител к Phospho-p38, total p38 (Cell Signaling) и антитела к актину (Millipore).

Определение уровня цАМФ инфицированных клеток HeLa. Клетки HeLa, засеянные в 96-луночные планшеты, инфицировали, как описано выше. За 30 мин до инфицирования cDMEM заменяли на DMEM с добавлением 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамин и 100 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX, Sigma Aldrich). Через 60 мин после инфицирования добавляли гентамицин и клетки дополнительно инкубировали при 37°C еще 90 мин. Определение цАМФ проводили методом конкурентного ИФА в соответствии с инструкциями производителя (Amersham, cAMP Biotrak, RPN225). В качестве положительного контроля добавляли указанное количество холерного токсина (C8052, Sigma Aldrich) в течение 1 ч к клеткам в DMEM с добавлением 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамин и 100 мкМ IBMX.

Инфицирование эмбрионов рыбок данио, визуализация и автоматизированная количественная оценка изображений. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с утвержденными правилами. Рыбки данио содержались в стандартных условиях [42]. Эмбрионы были стадированы по часам после оплодотворения (hpf) при 28,5°C [43]. В исследовании использовались следующие линии рыбок данио: рыбка дикого типа (AB/EK и EK/TL). Протокол инфицирования соответствовал рекомендациям, приведенным в [44]. Эмбрионы 12 hpf содержались в среде E3, содержащей 0,2 mM N-

фенилтиомочевины (PTU), чтобы предотвратить образование пигмента. Эмбрионы возрастом 2 дня после оплодотворения (dpf) анестезировали 0,2 мг/мл трикаина и выкладывали на 1% агаровых пластинах в E3 с помощью инструмента из волосяной петли [44]. *Y. enterocolitica* выращивали в ВНИ с добавлением 0,4% арабинозы и антибиотиков и mDap в течение ночи при комнатной температуре, разбавляли в свежем ВНИ с 0,5% арабинозой и другими добавками до  $OD_{600}=0,2$  и выращивали в течение 2 ч при комнатной температуре с последующим температурным сдвигом до 37°C в течение 45 мин. Наконец, бактерии собирали центрифугированием (6000 gcf, 30 с) и один раз промывали PBS.  $OD_{600}$  был установлен равным 2 в PBS, содержащем mDAP. 1-2 нл этой суспензии вводили в задний мозг выровненных на пластинах эмбрионов рыбок данио с использованием микроинъектора Femtojet (Eppendorf) с помощью капилляров FemtoTips II (Eppendorf), с наконечником иглы, обломанным тонким пинцетом. Время инъекции устанавливали на 0,2 с, а давление компенсации до 15 гПа (Eppendorf, Femtojet) и давление инъекции устанавливали от 600 до 800 гПа. Размер капли и, таким образом, инокулят контролировали с помощью микроскопии и контрольного посева. После микроинъекции рыбок собирали в среде E3, содержащем трикаин и PTU, и инкубировали в течение 30 мин при 37°C, затем еще 5 ч при 28°C. Для наблюдения за флуоресценцией бактериального EGFP через 1 ч после инфицирования в заднем мозге рыбок данио использовали флуоресцентный бинокулярный микроскоп (Leica), и эмбрионы с некачественной инъекцией отбрасывали. По окончании инфицирования рыбок фиксировали 2% ледяным PFA в течение 1 ч на льду и далее свежей ледяной PFA в течение ночи при 4°C. Окрашивание антител осуществляли, как описано ранее [45, 46]. В кратком изложении, эмбрионы промывали 4 раза PBS 0,1% Tween по 5 мин и пермеабилizировали PBS-T+0,5% Triton X-100 в течение 30 мин при комнатной температуре. Эмбрионы блокировали в блокирующем растворе (PBS 0,1% Tween 0,1% TritonX-100, 5% козьей сыворотки и 1% BSA) при 4°C в течение ночи. Антитело (расщепляющая каспаза-3 (Asp 175), Cell Signaling) разбавляли 1:100 в блокирующем растворе и инкубировали на шейкере при 4°C в темноте. Рыбок промывали 7 раз PBS 0,1% Tween в течение 30 мин, затем добавляли вторичное антитело (козье антитело против кролика AF647, Invitrogen, 1:500), разбавленном в блокирующем растворе, и инкубировали при 4°C в течение ночи. Личинок промывали PBS 0,1% Tween четыре раза 30 мин при 4°C и один раз в течение ночи и дополнительно промывали 3-4 раза. Изображения выполняли через конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 с использованием 40× водноиммерсионного объектива. Изображения анализировали с использованием программ Imaris (Bitplane) и Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Анализ изображения (n=14 для pBad\_Si2 или n=19 для z-BIM) выполняли с помощью программы CellProfiler [47] на Z-проекциях максимальной интенсивности записанных изображений срезов по оси Z. В кратком изложении, бактерии детектировали через канал EGFP. Вокруг каждой области бактериального пятна создавали кружок радиусом 10 пикселей. Перекрывающиеся области были разделены поровну между контактирующими элементами. В областях, близко окружающих бактерии, измеряли интенсивность окрашивания каспазой-3 p17.

Подготовка образца для фосфопротеомики. Для каждого набора условий выращивали два 6-луночных планшета клеток HeLa CCL-2 до слияния. Клетки инфицировали в течение 30 мин, как описано выше. В указанные моменты времени планшеты помещали на лед и дважды промывали ледяным PBS. Затем образцы собирали в растворе мочевины (мочевина 8 M (AppliChem), бикарбоната аммония 0,1 M (Sigma), 0,1% RapiGest (Waters), 1× PhosSTOP (Roche)). Далее, в кратком изложении, образцы перемешивали на вортексе, обрабатывали ультразвуком при 4°C (Hielscher), перемешивали в течение 5 мин на термомиксере (Эппендорф) и центрифугировали в течение 20 мин при 4°C и 16000 g. Супернатанты собирали и хранили при -80°C для дальнейшей обработки. Для измерения концентрации белка использовали анализ белка BCA (Pierce).

Фосфопептидное обогащение. Дисульфидные связи восстанавливали трис(2-карбоксивуксаный)фосфином при конечной концентрации 10 mM при 37°C в течение 1 ч. Свободные тиолы алкилировали 20 mM иодацетамидом (Sigma) при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. Избыток иодацетамида гасили N-ацетилцистеином при конечной концентрации 25 mM в течение 10 мин при комнатной температуре. Добавляли эндопептидазу Lys-C (Wako) до получения окончательного соотношения фермент/белок 1:200 мас./мас. и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем раствор разбавляли 0,1 M бикарбонатом аммония (Sigma) до конечной концентрации ниже 2 M мочевины и расщепляли в течение ночи при 37°C модифицированным трипсином (Promega) чистоты для секвенирования при отношении белка к ферменту 50:1. Пептиды обессоливали на картридже C18 Sep-Pak (Waters) и сушили под вакуумом. Фосфопептиды выделяли из 2 мг общей массы пептида с помощью  $TiO_2$ , как описано ранее [48]. В кратком изложении, сухие пептиды растворяли в растворе 80% ацетонитрила (ACN)-2,5% трифторуксусной кислоты (TFA), насыщенного фталевой кислотой. Пептиды добавляли к равному количеству уравновешенного  $TiO_2$  (гранулы размером 5 мкм, GL Sciences) в заблокированной вращаемой колонке Mobicol (MoViTec), которую инкубировали в течение 30 мин с вращением с доньшка на крышку. Колонку дважды промывали насыщенным раствором фталевой кислоты, дважды 80% ACN и 0,1% TFA, и, наконец, дважды 0,1% TFA. Пептиды элюировали с 0,3 M раствором  $NH_4OH$ . Величину pH элюатов корректировали до уровня ниже 2,5 с помощью 5% раствора TFA и 2 M HCl. Фосфопептиды

снова обессоливали с помощью микроспиновых картриджей C18 (Harvard Apparatus).

Анализ методом жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии. Хроматографическое разделение пептидов проводили с использованием нано-ЖХ системы EASY (Thermo Fisher Scientific), оборудованной колонкой ОФ-ВЭЖХ с подогревом (75 мкм×45 см), наполняемой внутри лаборатории смолой C18 с размером частиц 1,8 мкм (Reprosil-AQ Pur, Dr. Maisch). Аликвоты 1 мкг общего образца фосфопептида анализировали в установке ЖХ-МС/МС с использованием линейного градиента в диапазоне от 98% растворителя А (0,15% муравьиной кислоты) и 2%-ного растворителя В (98% ацетонитрила, 2% воды, 0,15% муравьиной кислоты) до 30% растворителя В в течение 120 мин при величине расхода 200 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре с двойным давлением LTQ-Orbitrap, с источником ионизации наноэлектрораспылением (оба - Thermo Fisher Scientific). Каждое сканирование MS1 (полученное в Orbitrap) сопровождалось диссоциацией, вызванной столкновениями (CID, полученная в LTQ), 20 наиболее распространенных ионов-предшественников с динамическим исключением в течение 30 с. Для фосфопептидного анализа 10 наиболее распространенных ионов-предшественников подвергали CID с активированной многоступенчатой активацией. Общее время цикла составляло приблизительно 2 с. Для MS1 в ячейке Orbitrap накапливали  $10^6$  ионов в течение максимального времени 300 мс и сканировали с разрешением 60 000 ПППВ (при 400 m/z). Сканы MS2 получали в нормальном режиме сканирования, при целевом значении  $10^4$  ионов и времени накопления 25 мс. Однозарядные ионы и ионы с не определенным зарядовым состоянием исключали из инициирования событий MS2. Нормализованная энергия столкновения была установлена равной 32%, и для каждого спектра получали один микроскан.

Безмаркерное количественное определение и поиск в базе данных.

Полученные исходные файлы импортировали в программный инструмент Progenesis (Nonlinear Dynamics, версия 4.0) для безмаркерной количественной оценки с использованием параметров по умолчанию. Спектры MS2 экспортировали непосредственно из программного обеспечения Progenesis в формате mgf и выполняли по ним поиск с использованием алгоритма MASCOT (Matrix Science, версия 2.4) с помощью имитационной базы данных [49], содержащей нормальные и обратные последовательности предсказанных записей SwissProt Homo sapiens (www.ebi.ac.uk, дата выпуска 16/05/2012) и обычно наблюдаемые загрязняющие вещества (всего 41 250 последовательностей), сгенерированной с использованием инструмента SequenceReverser из программного обеспечения MaxQuant (версия 1.0.13.13). Чтобы идентифицировать белки, происходящие из *Y. enterocolitica*, для не обогащенных фосфопептидом образцов, выполняли поиск в той же самой базе данных, включая предсказанные записи SwissProt для *Y. enterocolitica* (www.ebi.ac.uk, дата выпуска 15/08/2013). Допустимое отклонение для ионов-предшественников было установлено равным 10 м.д., для фрагментарных ионов - равным 0,6 Да. Критерии поиска были установлены следующим образом: требовалась полная триптическая специфичность (расщепление после остатков лизина или аргинина, за исключением следования за пролином), допускались 2 пропущенных расщепления, карбамидометилирование (C) устанавливали в качестве фиксированной модификации, а фосфорилирование (S, T, Y) или окисление (M) - в качестве переменной модификации для обогащенных или не обогащенных образцов TiO<sub>2</sub> соответственно. В заключение, результаты поиска по базе данных экспортировали в виде XML-файла и импортировали обратно в программное обеспечение Progenesis для отнесения сигналов MS1. Для количественной оценки фосфопептидов экспортировали csv-файл, содержащий пиковые интенсивности всех обнаруженных сигналов MS1, а для не обогащенных образцов был создан csv-файл, содержащий все измерения белка, основанные на суммарных интенсивностях сигналов всех обнаруженных пептидов на каждый белок. Важно отметить, что программное обеспечение Progenesis было установлено таким образом, что белки, идентифицированные схожими наборами пептидов, сгруппированы вместе и что для количественного определения белка использованы только неконфликтующие пептиды со специфическими последовательностями для отдельных белков в базе данных. Оба файла дополнительно обрабатывали с использованием самостоятельно разработанного скрипта SafeQuant v1.0 R (неопубликованные данные, доступные по адресу <https://github.com/eahrne/SafeQuant/>). В кратком изложении, это программное обеспечение устанавливает частоту ложноположительных результатов обнаружения False Discovery Rate на 1% (с учетом количества совпадений с имитационной базой данных последовательностей белка) и нормализует уровни идентифицированных пиков MS1 (экстрагированная ионная хроматограмма, ХИС) по всем образцам, т.е. просуммированная ХИС всех уверенно идентифицированных сигналов пептидов масштабируется, чтобы быть равной для всех ЖХ-МС-опытов. Затем всем количественно оцененным фосфопептидам/белкам присваивается коэффициент относительного содержания для каждого момента времени, исходя из медианной ХИС в каждый момент времени. Статистическая значимость каждого отношения определяется его q-значением (скорректированные р-значения частоты False Discovery Rate), полученным вычислением модифицированных р-значений в t-статистике [50] и корректировки для множественных сравнений [51]. Локализация фосфорилированных остатков автоматически присваивалась алгоритмом MASCOT (балл>10). Все аннотированные спектры вместе с исходными файлами MS и использованными параметрами поиска будут занесены в базу консорциума ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) через партнерский репозиторий PRIDE [52].

Выравнивание последовательностей выполняли с использованием доступного через интернет инструмента института EMBL-EBI для выравнивания нескольких последовательностей ClustalW2 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Биораспределение в мышинных моделях аллотрансплантатов опухолей 4T1.

Все эксперименты на животных были одобрены (лицензия 1908, ветеринарное управление кантона Базель-Штадт) и выполнялись в соответствии с местными руководствами (Tierschutz-Verordnung, Basel-Stadt) и швейцарским законом о защите животных (Tierschutz-Gesetz). Шестинедельных мышаей BALB/c заказывали из Janvier Labs. После по меньшей мере одной недели адаптации мышей BALB/c анестезировали изофлураном и подкожно вводили в бок 100 мкл клеток 4T1 ( $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  клеток). На протяжении всего эксперимента мышей оценивали по поведению, физическому состоянию и температуре, а также измеряли массу тела.

После развития опухоли, мышам вводили раствор десферала 8 мг/мл (10 мл/кг) внутривенной инъекцией. На следующий день мышей инфицировали *Y. enterocolitica* MRS40 или *Y. enterocolitica* MRS40 ΔНОРЕМТ ( $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  или  $1 \times 10^7$  бактерии) путем инъекции в хвостовую вену. Инокулум в/в вводимый мышам, проверяли путем посева методом разведения. В некоторых экспериментах прогрессирование опухоли отслеживалось ежедневными измерениями длины и ширины опухоли с помощью цифрового циркуля. Объем опухоли определяли как  $0,523 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$ . В соответствующие дни после инфицирования мышей умерщвляли вдыханием CO<sub>2</sub>. Образец крови немедленно изолировали путем аспирации из сердца. Изолировали печень, селезенку, легкие и опухоль и определяли их вес. Органы и опухоль гомогенизировали. В каждом образце определяли КОЕ путем нанесения последовательных разведений на чашки с агаром LB, содержащие налидиксовую кислоту (35 мкг/мл).

#### В) Результаты.

Система доставки белка на основе секреции 3 типа слитых белков YopE.

Хотя сам N-конец T3SS-эффектора *Y. enterocolitica* YopE (SEQ ID NO: 1) содержит сигнал секреции, достаточный для транслокации гетерологичного белка [26], сайт связывания шаперонов (CBS) для его шаперона (SycE) не включен [53]. Авторы настоящего изобретения выбрали N-концевые 138 аминокислот YopE (SEQ ID NO: 2) для слияния с белками, предназначенными для доставки, так как было показано, что это дает наилучшие результаты для транслокации других гетерологичных субстратов T3S [28]. Поскольку указанные N-концевые 138 аминокислот YopE содержат CBS, авторы настоящего изобретения также решили коэкспрессировать SycE. Фрагмент SycE-YopE<sub>1-138</sub>, клонированный из очищенной плазмиды вирулентности *Y. enterocolitica* pYV40, содержит эндогенные промоторы YopE и его шаперона SycE (фиг. 10). Таким образом, SycE и любые слитые белки YopE<sub>1-138</sub> индуцируются быстрым изменением температуры роста от комнатной до 37°C. Время культивирования при 37°C влияет на количество слитого белка, присутствующего в бактериях. На 3'-конце YopE<sub>1-138</sub> был добавлен сайт множественного клонирования (MCS) (фиг. 10B), за которым следуют мус и 6× His-метка и стоп-кодон.

Исходный штамм тщательно отбирали. Во-первых, для ограничения транслокации эндогенных эффекторов авторы настоящего изобретения использовали штамм *Y. enterocolitica*, с удалением всех известных эффекторов Yop H, O, P, E, M и T (обозначаемый ΔНОРЕМТ) [54]. Кроме того, авторы настоящего изобретения иногда использовали аусотрофный мутант, который не может расти при отсутствии экзогенной мезо-2,6-диаминопимелевой кислоты [55]. Указанный штамм был удален для гена аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназы (*Dasd*) и классифицирован как уровень биобезопасности 1 швейцарским агентством по безопасности (поправка к A010088/2). Кроме того, авторы настоящего изобретения удалили белки адгезии *YadA* и/или *InvA* чтобы предложить больший выбор исходных штаммов. Использование штаммов *yadA* или *yadA/invA* уменьшает индуцированную фоновую сигнализацию [56], а также влияет на доставляемое количество белка [57].

Характеризация доставки слитого белка YopE в эукариотические клетки.

В анализе секреции *in vitro* (см. фиг. 1A) искусственно индуцируется секреция белка в окружающую жидкость. После осаждения белка с помощью трихлоруксусной кислоты (TCA) использовали Вестерн-блот-анализ с анти-YopE-антителом для определения секретируемого количества белка (фиг. 1B). Если штамм wt выделяет полноразмерное YopE, штаммы ΔНОРЕМТ *asd* не делают этого. В присутствии YopE<sub>1-138</sub>-Muc-His (далее обозначается YopE<sub>1-138</sub>-Muc; SEQ ID No. 3) становится видна меньшая полоса YopE (фиг. 1B). Следовательно, фрагмент YopE<sub>1-138</sub> хорошо секретируется в описанных в настоящей заявке условиях. Чтобы проанализировать гомогенность транслокации белка в эукариотические клетки, авторы настоящего изобретения инфицировали клетки HeLa кодирующим YopE<sub>1-138</sub>-Muc штаммом и окрашивали Muc-меткой посредством иммунофлуоресценции (фиг. 2A и B). Если вначале окрашивались только бактерии, то через 30 мин после инфицирования (п.и.) становились видимыми контуры клеток, что усиливалось с увеличением времени инфицирования (фиг. 2B). Указанная тенденция хорошо отражена интенсивностью окрашивания Muc-меткой внутри клеток HeLa (фиг. 2A и B). YopE<sub>1-138</sub>-Muc обнаруживается повсеместно в клетках (фиг. 2A), за исключением ядер [58]. Примечательно, что такой подход действовал на большинство, если не на все клетки, сходным образом. Поскольку известно, что *Y. enterocolitica* инфицирует многие типы клеток [59], авторы настоящего изобретения отслежили доставку

YorE<sub>1-138</sub>-Myc в различные клеточные линии. Такое же гомогенное окрашивание анти-Myc посредством иммунофлуоресценции наблюдалось в инфицированных мышечных фибробластах, клетках Jurkat и HU-VEC (фиг. 11). Более того, подстройка значения MOI в сторону повышения или понижения позволяет модулировать количество поставляемого белка, (фиг. 2С), хотя большинство клеток все же остаются затронутыми. Низкое количество бактерий приводит не к малому количеству клеток с большим количеством доставленного белка, а скорее к большинству клеток, содержащих небольшое количество доставленного белка (фиг. 2С).

Перенаправление доставленных белков T3SS в ядро.

Поскольку сам YorE локализован в цитоплазме (фиг. 2А), представляет особый интерес проверить, не блокирует ли фрагмент YorE<sub>1-138</sub> локализацию ядерных слитых белков. Поэтому авторы настоящего изобретения добавили SV40 NLS к С-концу (и N-концу, с аналогичными результатами) YorE<sub>1-138</sub>-EGFP (SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 38 соответственно). В то время как добавление YorE<sub>1-138</sub>-EGFP (SEQ ID NO: 37) приводило к слабому цитоплазматическому окрашиванию, добавление YorE<sub>1-138</sub>-EGFP-NLS вызывало более сильный ядерный EGFP-сигнал в инфицированных клетках HeLa (фиг. 3). Это указывает на то, что фрагмент YorE<sub>1-138</sub> совместим с использованием NLS. Хотя mCherry ранее уже использовался в патогенах растений [60], указанный опыт представляет собой успешную доставку GFP-подобного белка с помощью патогенных бактерий человека или животных, кодирующих T3SS. Это подтверждает перспективность зависимой от SycE и YorE<sub>1-138</sub> стратегии для доставки многих подходящих белков.

Удаление придатка YorE<sub>1-138</sub> после транслокации слитого белка в эукариотическую клетку.

Хотя для бактериальной доставки фрагмент YorE<sub>1-138</sub> весьма полезен, он может затруднить функционирование и/или локализацию слитых белков.

Поэтому было бы оптимальным его удаление после доставки белка. С этой целью авторы настоящего изобретения ввели два сайта расщепления TEV (ENLYFQS) [61-63] между YorE<sub>1-138</sub> и партнером по слиянию (транскрипционный регулятор ET1-Myc (SEQ ID NO: 36 и 41) [64] и человеческим INK4C (SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 43)). Чтобы сохранить преимущества представленного метода, авторы настоящего изобретения дополнительно сливали протеазу TEV (вариант S219V [65]) с YorE<sub>1-138</sub> (SEQ ID NO: 42) в другом штамме *Y. enterocolitica*. Клетки HeLa были инфицированы обоими штаммами сразу. Чтобы допустить анализ только транслоцированной фракции белков, инфицированные клетки HeLa лизировали через 2 ч после инфицирования (фиг. 4) с дигитонином, который, как известно, не лизирует бактерии ([66], см. контроль на фиг. 12). Вестерн-блоттинг показал присутствие YorE<sub>1-138</sub>-2×TEV-сайт расщепления-ET1-Myc или YorE<sub>1-138</sub>-2×TEV-сайт расщепления-Flag-INK4C-Myc только тогда, когда клетки были инфицированы соответствующим штаммом (фиг. 4А и С). После расщепления в течение ночи этого клеточного лизата очищенной протеазой TEV можно наблюдать сдвинутую полосу (фиг. 4А и С). Указанная полоса соответствует ET1-Myc (фиг. 4С) или Flag-INK4C (фиг. 4А) с N-концевыми остатками сайта расщепления TEV, скорее всего, только одним серином. После коинфицирования клеток штаммом, доставляющим протеазу TEV, стал видимым тот же расщепленный фрагмент ET1-Myc или Flag-INK4C, указывая на то, что протеаза TEV, доставляемая посредством T3SS, является функциональной и что отдельные клетки были инфицированы обоими бактериальными штаммами (фиг. 4А и С). Хотя расщепление не является полным, большинство транслоцированных белков расщепляется уже через 2 ч после инфицирования, и даже ночное расщепление очищенной протеазой TEV не дает лучшей скорости расщепления (фиг. 4В). Как сообщалось ранее, TEV-протеаза-зависимое расщепление может нуждаться в оптимизации, зависящей от слитого белка [67, 68]. Следовательно зависимое от TEV-протеазы удаление придатка YorE<sub>1-138</sub> после транслокации впервые обеспечивает доставку белка T3SS почти нативных гетерологичных белков, изменяя аминокислотный состав на одну N-концевую аминокислоту. Альтернативный подход к зависимому от TEV-протеазы расщеплению YorE-фрагмента состоял во включении убиквитина в исследуемый слитый белок.

Действительно, убиквитин подвергается процессингу на своем С-конце группой эндогенных убиквитин-специфических С-концевых протеаз (деубиквитинизирующих ферментов, DUBs). Поскольку расщепление должно происходить на самом С-конце убиквитина (после G76), исследуемый белок должен быть свободен от дополнительной аминокислотной последовательности. Указанный метод тестировали на слитом белке YorE<sub>1-138</sub>-убиквитин-FLAG-INK4C-MycHis. В контрольных клетках, инфицированных YorE<sub>1-138</sub>-Flag-INK4C-MycHis-экспрессирующими бактериями, была обнаружена полоса, соответствующая YorE<sub>1-138</sub>-Flag-INK4C-MycHis, что указывает на эффективную транслокацию слитого белка (фиг. 24). Когда клетки инфицировали в течение 1 ч экспрессирующими YorE<sub>1-138</sub>-убиквитин-FLAG-INK4C-MycHis бактериями, была обнаружена дополнительная полоса, соответствующая размеру Flag-INK4C-MycHis, что указывает на то, что часть слитого белка была расщеплена. Указанный результат показывает, что введение убиквитина в слитый белок позволяет отщепить фрагмент YorE<sub>1-138</sub> без необходимости в экзогенной протеазе.

Транслокация бактериальных эффекторов типа III и типа IV SopE из *Salmonella enterica* представляет собой хорошо охарактеризованный фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), который взаимодействует с Cdc42, способствуя ремоделированию актинового цитоскелета [69]. В то время как трансло-

кация YopE<sub>1-138</sub>-Muc в клетки HeLa не оказывает эффекта, транслоцированные YopE<sub>1-138</sub>-SopE (SEQ ID NO: 5 и 135) вызывали драматические изменения в актиновой сети (фиг. 5A). Аналогичные результаты были получены с другим эффекторным белком GEF, IpgB1 из *Shigella flexneri* (SEQ ID NO: 4). Примечательно, что первые изменения в актиновом цитоскелете наблюдались уже через 2 мин после инфицирования (фиг. 5A). Таким образом, можно сделать вывод, что доставка T3SS-зависимого белка происходит сразу же после того, как инфицирование инициируется центрифугированием. Для строгого доказательства зависящего именно от T3SS транспорта один из белков T3SS, образующих поры транслокации в эукариотическую клеточную мембрану, был удален (YopB, см. [70]) (фиг. 12).

При инфицировании *Salmonella* транслокация SopE сопровождается транслокацией SptP, которая функционирует как активирующий ГТФазу белок (GAP) для Cdc42 [71]. В то время как транслокация только YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Muc (SEQ ID NO: 135) вызывала массовые реаранжировки F-актина, коинфицирование бактериями, экспрессирующими YopE<sub>1-138</sub>-SptP (SEQ ID NO: 8), устраняет указанный эффект дозозависимым образом (фиг. 5B). Окрашивание антителом Анти-Muc показало, что это ингибирование не было связано с уменьшением уровня транслокации YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Muc (фиг. 5B). В сочетании указанные результаты показали, что коинфицирование клеток двумя бактериальными штаммами является действенным методом доставки двух разных эффекторов в отдельные клетки для обеспечения их функционального взаимодействия.

Эффектор типа III *S. flexneri* OspF функционирует как фосфотреонин-лиаза, которая дефосфорилирует MAP-киназы p38 и ERK [72]. Для тестирования функциональности транслоцированного YopE<sub>1-138</sub>-OspF (SEQ ID NO: 7) авторы настоящего изобретения проследили фосфорилирование p38 после стимуляции TNF $\alpha$ . В неинфицированных клетках или в клетках, инфицированных экспрессирующими YopE<sub>1-138</sub>-Muc бактериями, TNF $\alpha$  индуцировал фосфорилирование p38. Напротив, после транслокации YopE<sub>1-138</sub>-OspF фосфорилирование, индуцированное TNF $\alpha$ , прекратилось, что показывает, что доставленный OspF активен в отношении p38 (фиг. 6A).

При инфицировании *Salmonella* эффектор SopB типа III защищает эпителиальные клетки от апоптоза за счет продолжительной активации Akt [73]. В то время как транслокация YopE<sub>1-138</sub>-Muc или YopE<sub>1-138</sub>-SopE не влияла на Akt, транслокация YopE<sub>1-138</sub>-SopB (SEQ ID NO: 6) вызывала сильное фосфорилирование Akt на T308 и S473, указывая на активную форму (фиг. 6B). Аналогичные результаты были получены с SopB-гомологом из *S. flexneri* (IpgD, SEQ ID NO: 9). В совокупности, результаты, полученные авторами настоящего изобретения, показывают, что система доставки на основе YopE<sub>1-138</sub> функционирует для всех протестированных до настоящего времени эффекторов T3S и позволяет исследовать белки, участвующие в контроле над центральными клеточными функциями, включая цитоскелет, воспаление и выживание клетки.

Ряд бактерий, включая *Agrobacterium tumefaciens*, *Legionella pneumophila* и *Bartonella henselae*, используют секрецию типа IV для инъекции эффекторов в клетки, авторы настоящего изобретения протестировали, можно ли транслоцировать эффектор типа IV VerA из *B. henselae* в клетки HeLa с помощью инструмента, разработанного авторами настоящего изобретения. Полноразмерные VerA (SEQ ID NO: 10) и VerAE305-end (SEQ ID NO: 11), содержащие C-концевой домен Bid, были клонированы, и клетки инфицировали соответствующими штаммами. Поскольку показано, что VerA индуцирует образование циклического АМФ (цАМФ) [74], после инфицирования измеряли уровень цАМФ в клетках HeLa. Принимая во внимание, что транслокация Bid-домена эффектора *B. henselae* VerG (SEQ ID NO: 136) не индуцировала цАМФ, полноразмерные VerA и VerAE305-end инициировали производство цАМФ в ожидаемых количествах [74] (фиг. 6C). Указанный результат показывает, что эффекторы типа IV также могут быть эффективно доставлены системой доставки на основе YopE<sub>1-138</sub> в целевые клетки-хозяева, и что они являются функциональными.

Транслокация эукариотических белков в эпителиальные клетки.

Чтобы показать, что человеческие белки могут транслоцироваться посредством секреции типа III, авторы настоящего изобретения гибридизировали индукторы апоптоза человека для доставки бактерией *Y. enterocolitica* в YopE<sub>1-138</sub> или для доставки бактерией *S. enterica* с SteA<sub>1-20</sub>, SteA, SopE<sub>1-81</sub> или SopE<sub>1-105</sub>. Затем авторы настоящего изобретения отслеживали транслокацию человеческого BH3-взаимодействующего агониста домена смерти (BID, SEQ ID NO: 24), который является проапоптотическим членом семейства белков Bcl-2. Он является медиатором повреждения митохондрий, вызванного каспазой-8 (CASP8). CASP8 расщепляет BID, а усеченный tBID (tBID, SEQ ID NO: 25) транслоцируется в митохондрии, где он вызывает выброс цитохрома c. Последнее приводит к свойственному способу активации каспазы 3 (CASP3), при которой он расщепляется на субъединицы 17 и 12 кДа [75]. В то время как инфицирование в течение 1 ч *Y. enterocolitica*, экспрессирующей YopE<sub>1-138</sub>-Muc или YopE<sub>1-138</sub>-BID, не вызывала апоптоза, транслокация человеческого tBID вызывала гибель клеток в большей степени, чем хорошо охарактеризованный индуктор апоптоза стауроспорин (фиг. 7A и C). Как и ожидалось, транслокация tBID приводит к производству субъединицы CASP3 p17 даже в больших количествах, чем для стауроспорина (фиг. 7A). Чтобы иметь возможность сравнивать транслоцированные количества белка с эндогенной Bid, клетки HeLa лизировали дигитонином и анализировали методом Вестерн-блоттинга с

использованием антитела к Bid (фиг. 7B). YopE<sub>1-138</sub>-tBID, доставленный системой T3SS, почти достигал эндогенных уровней Bid в клетках HeLa, тогда как доставленный YopE<sub>1-138</sub>-BID присутствовал в еще более высоких количествах (в 2,5 раза) (фиг. 7B). Глубокое картирование протеом и транскриптов клеток HeLa показало в  $4,4 \times 10^5$  копий BID на одну клетку [76]. Таким образом, можно сделать вывод, что T3SS-зависимая доставка человеческого белка достигает  $10^5$ - $10^6$  копий белка на клетку. Указанные цифры соответствуют числу копий нанотел на клетку, транслоцированных посредством T3SS *E. coli* [4]. С учетом коэффициента 10 для MOI и продолжительности инфицирования, коэффициента 3,2 для момента добавления антибиотика и для времени культивирования при 37°C перед инфицированием, доставленные копии белка/клетку могут регулироваться от 1000 копий/клетку до примерно  $10^6$  копий/клетку. В совокупности указанные результаты показали, что транслоцированный tBID был функциональным и доставлялся в адекватных количествах. Это подтвердило пригодность разработанного авторами настоящего изобретения инструмента транслокации для изучения роли белков в регуляции апоптоза, центрального аспекта цитобиологии.

Далее авторы настоящего изобретения гибридизировали мышинный tBID (кодон, оптимизированный под *Y. enterocolitica*, SEQ ID NO: 194) или BH3-домены мышинного tBID или мышинного BAX (в обоих случаях - кодон, оптимизированный под *Y. enterocolitica*, SEQ ID NO: 138 и 139), с YopE<sub>1-138</sub> для доставки *Y. enterocolitica*. В то время как инфицирование в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОPEMT asd, не доставляющей белка, или YopE<sub>1-138</sub>-Myc, не вызывало апоптоза, транслокация мышинного tBID (кодона, оптимизированного под *Y. enterocolitica*, SEQ ID NO: 194) вызывала гибель в клетках B16F10 (фиг. 16), D2A1 (фиг. 17), HeLa (фиг. 18) и 4T1 (фиг. 19). Было установлено, что транслокация домена BH3 мышинного кодона BID, оптимизированного под *Y. enterocolitica* (SEQ ID NO: 138) или мышинного кодона BAX, оптимизированного под *Y. enterocolitica* (SEQ ID NO: 139), также вызывает гибель в клетках B16F10 (фиг. 16), D2A1 (фиг. 17), HeLa (фиг. 18) и 4T1 (фиг. 19).

В то время как инфицирование в течение 4 ч бактерией *S. enterica* agoA не вызывало апоптоза, транслокация мышинного tBID вызывала апоптоз, поскольку транслокация мышинного tBID приводит к производству субъединицы CASP3 p17 (фиг. 20 и 21). Степень индукции апоптоза для слитых белков SopE была больше при использовании условий индуцирования SpiI T3SS (фиг. 20), что отражает транспорт SopE исключительно системой SpiI T3SS. Слитый с SteA<sub>1-20</sub> мышинный tBID не вызывал апоптоза, скорее всего потому, что сигнал секреции в 20 N-концевых аминокислотах SteA недостаточен для доставки слитого белка (фиг. 20 и 21). Мышиный tBID, слитый с полноразмерным SteA, приводил к индукции апоптоза в клетках HeLa (фиг. 20 и 21), в условиях как SpiI, так и в SpiII T3SS, что отражает способность SteA транспортироваться обеими T3SS. Следует отметить, что даже в условиях индуцирования SpiII T3SS ожидается частичная активность SpiII T3SS, как видно из активности слитых белков SopE в условиях индуцирования SpiII T3SS (фиг. 21).

Помимо усовершенствованных в настоящей заявке функционально транслоцированных эукариотических белков, было секретировано несколько других эукариотических белков с использованием описанного в настоящей заявке инструмента. Это включает доставку белков бактерией *Y. enterocolitica* (фиг. 13, 14 и 23) из регуляции клеточного цикла (Mad2 (SEQ ID NO: 15), CDK1 (SEQ ID NO: 14), INK4A (SEQ ID NO: 16), INK4B (SEQ ID NO: 17) и INK4C (SEQ ID NO: 18)) а также их части (INK4A 84-103 (SEQ ID NO: 158), p107 657-662 (SEQ ID NO: 159), p21 141-160 (SEQ ID NO: 160), p21 145-160 (SEQ ID NO: 161), p21 17-33 (SEQ ID NO: 162) и циклин D2 139-147 (SEQ ID NO: 163)), связанные с апоптозом белки (Bad (SEQ ID NO: 29), FADD (SEQ ID NO: 28), и каспазу 3 p17 (SEQ ID NO: 22) и p12 (SEQ ID NO: 23), Bid рыбки данио (SEQ ID NO: 19) и t-Bid (SEQ ID NO: 20)) а также их части (fBid BH3 (SEQ ID NO: 138), Bax BH3 (SEQ ID NO: 139)), сигнальные белки (мышинные TRAF6 (SEQ ID NO: 12), TIFA (SEQ ID NO: 13)), GPCR Go. субъединицу (GNA12, самую короткую изоформу, (SEQ ID NO: 30)), нанотело (vhhGFP4, (SEQ ID NO: 31)) и конструкции на основе слитых нанотел для деградации целевого белка (Slmb-vhhGFP4; (SEQ ID NO: 32, 33, 34) [77]) (фиг. 13 и 14) а также малые ГТФазы (Rac1 Q61E (SEQ ID NO: 26 и 137) и RhoA Q63L (SEQ ID NO: 27) и плекстрин-гомологичный домен из Akt человека (SEQ ID NO: 35)). Помимо функционально усовершенствованных связанных с апоптозом белков (murine tBid, SEQ ID NO: 144-147), это дополнительно включает в себя белки *S. enterica* (фиг. 22) из регуляции клеточного цикла (Mad2 (SEQ ID NO: 168-169), CDK1 (SEQ ID NO: 170-171), INK4A (SEQ ID NO: 164-165) и INK4C (SEQ ID NO: 166-167)). Хотя указанные белки не были подтверждены на функциональность, возможность T3SS-зависимой секреции различных эукариотических белков в сочетании с возможным удалением придатка YopE открывает новые перспективы для широкой применимости T3SS в цитобиологии и терапевтических применениях.

Транслокация *in vivo* усеченного Bid в эмбрионах рыбок данио индуцирует апоптоз.

Интересной особенностью этого бактериального инструмента является потенциал использования в живых животных. Данио в их эмбриональном состоянии можно сохранять прозрачными, позволяя выполнять флуоресцентное окрашивание и микроскопию [44, 78, 79]. Ранее было подробно описано несколько индукторов апоптоза рыбок данио, из которых наиболее мощным является z-BIM [80]. Поэтому авторы настоящего изобретения решили клонировать z-BIM в систему авторов настоящего изобретения.

Несмотря на его слабую гомологичность человеческому BIM, авторы настоящего изобретения проанализировали эффективность индукции апоптоза YopE<sub>1-138</sub>-z-BIM (SEQ ID NO: 21) в эпителиальных клетках человека. Клетки HeLa, инфицированные в течение 1 ч штаммом, транслоцирующим YopE<sub>1-138</sub>-z-BIM, показали явные признаки гибели клеток. Затем авторы настоящего изобретения проводили эксперименты *in vivo* с эмбрионами рыбок данио после 2 дней после оплодотворения (dpf), используя модель локализованного инфицирования путем микроинъекции бактерий в задний мозг [44]. После инфицирования в течение 5,5 ч рыбок фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали на присутствие CASP3 p17. При инфицировании штаммом, экспрессирующим YopE<sub>1-138</sub>-Myc, бактерии были видны в области заднего мозга (окрашивание "b", фиг. 8 AI), но индукции апоптоза вокруг бактерий обнаружено не было (окрашивание "c", фиг. 8 AI). Напротив, при инфицировании штаммом, доставляющим YopE<sub>1-138</sub>-z-BIM, в областях, окружающих бактерии, наблюдалось сильное увеличение присутствия расщепляющей CASP3 (фиг. 8 AII). Автоматический анализ изображений на z-проекциях максимальной интенсивности подтверждает, что бактерии транслоцирующие YopE<sub>1-138</sub>-z-BIM, индуцируют апоптоз в соседних клетках гораздо больше, чем контрольные бактерии (фиг. 8B). Это указывает на функциональность z-BIM у рыбок данио при бактериальной транслокации. Данные результаты дополнительно подтверждают применимость T3SS для доставки эукариотного белка у живых животных.

Фосфопротеомика выявляет глобальное влияние транспонированных белков на фосфорилирование белка.

Фосфорилирование представляет собой широко распространенную посттрансляционную модификацию, которая может либо активировать, либо инактивировать биологические процессы и, следовательно, является подходящей мишенью для изучения событий сигнализации [81, 82]. Несмотря на это, на сегодня не имеется системного анализа фосфорилирования при апоптозе. Чтобы проанализировать влияние человеческого tBid, доставленного в клетки HeLa, авторы настоящего изобретения использовали безмаркерный фосфопротеомический подход с помощью ЖХ/МС/МС. В трех независимых экспериментах клетки либо не подвергали обработке, либо инфицировали ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-Myc, либо ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-tBid в течение 30 мин. Клетки лизировали с последующим ферментативным расщеплением, обогащением фосфопептидами и количественной оценкой и идентификацией отдельных фосфопептидов. авторы настоящего изобретения сравнивали клетки, инфицированные ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-Myc, с клетками, инфицированными ΔНОРЕМТ asd+YopE<sub>1-138</sub>-tBid, что позволяло идентифицировать 363 tBid-зависимых события фосфорилирования. При этом 286 фосфопептидов показали увеличение фосфорилирования, тогда как 77 были менее фосфорилированы после доставки tBid, что соответствует 243 различным белкам, которые авторы настоящего изобретения и определили как фосфопротеом tBid. Для создания сети белок-белкового взаимодействия фосфопротеом tBid была использована база данных STRING [83] (фиг. 9A). Кроме того, к этой сети были добавлены 27 белков, связанных с митохондриальным апоптозом, которые создают центральный кластер. Интересно, что к этому центральному кластеру подсоединены лишь несколько белков из фосфопротеом tBid, указывая на то, что изменению при фосфорилировании подвергаются многие белки, которые до сих пор не были напрямую связаны с апоптотическими белками. Чтобы охарактеризовать биологические функции, охваченные указанным tBid-фосфопротеомом, авторы настоящего изобретения провели онтологический анализ генов с использованием инструмента функциональной аннотации базы данных для аннотации, визуализации и интегрированного обнаружения (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [84, 85]. Выявленные биологические функции показывают, что tBid влияет на различные клеточные процессы. Многие белки, участвующие в реаранжировке хроматина и регуляции транскрипции подвергаются изменению при фосфорилировании (т.е. CBX3, CBX5, TRIM28, HDAC1). Например, HDAC1 представляет собой гистондеацетилазу, играющую роль в регуляции транскрипции. Было показано, что HDAC1 может модулировать транскрипционную активность NF-κB, белка, также участвующего в апоптозе. авторы настоящего изобретения дополнительно идентифицировали кластер белков, участвующих в процессинге РНК, который, как было ранее показано, играет важную роль в регуляции апоптоза [86]. HNRPK, например, опосредует ответ p53/TP53 на повреждение ДНК и необходим для индукции апоптоза [87]. Кроме того, влияние также испытывает фосфорилирование белков, участвующих в трансляции белка. Несколько факторов эукариотической инициации (т.е. EIF4E2, EIF4B, EIF3A, EIF4G2) претерпевают изменения при фосфорилировании, что согласуется с наблюдением, что в апоптотических клетках общий синтез белка снижается. Интересно отметить, что фосфорилирование многих белков, участвующих в ремоделировании цитоскелета (например, PXN, MAP1B9, изменяется при доставке tBid. Это согласуется с наблюдением, что морфология клеток драматически изменяется при доставке tBid (фиг. 9B). Сжатие клеток и потеря ими контакта отражается тем фактом, что авторы настоящего изобретения наблюдаем фосфорилирование связанных с адгезией белков, таких как ZO2 и паксиллин. Аналогичным образом сжатие ядер сопровождается фосфорилированием ламинарных белков, таких как ламин A/C и ламин B1. В целом, доставка tBid индуцирует быстрый апоптотический ответ, также отмеченный разрывом целостности митохондрий (фиг. 9B). авторы настоящего изобретения показали, что индуцированный tBid апоптоз влияет на сотни событий фосфорилирования, участвующих в различных клеточных процессах. Хотя многие идентифицированные белки и

ранее были ассоциированы с апоптозом, относительно лишь немногих было известно, что они фосфорилируются при индукции апоптоза. Таким образом, фосфопротеомический подход дает полезный ресурс для дальнейших исследований по апоптозу.

Транслокация эукариотических гетерологичных слитых белков, состоящих из повторяющихся идентичных или вариабельных белковых доменов в эпителиальные клетки. Чтобы показать, что гетерологичные слитые белки, состоящие из повторяющихся идентичных или вариабельных доменов, могут транслоцировать посредством секреции типа III, авторы настоящего изобретения гибридизировали индукторы апоптоза мыши для доставки бактерией *Y. enterocolitica* с YopE<sub>1-138</sub>. В качестве контроля авторы настоящего изобретения гибридизировали мышинный tBID (кодон, оптимизированный под *Y. enterocolitica*, SEQ ID NO: 194) или BH3-домены мышинного tBID или мышинного BAX (в обоих случаях кодон оптимизирован под *Y. enterocolitica*, SEQ ID NO: 200 и 201) с YopE<sub>1-138</sub> для доставки бактерией *Y. enterocolitica*. Гетерологичный слитый белок состоял в одном случае из мышинного домена BH3 tBID, слитого с самим собой, образуя YopE<sub>1-138</sub>-(tBID-BH3)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 202). о втором случае гетерологичные слитые белки состояли из мышинного домена BH3 tBID, слитого с BH3-доменом мыши BAX, образуя YopE<sub>1-138</sub>-(tBID-BH3)-(BAX-BH3) (SEQ ID NO: 203). В случае мышинного tBID и мышинного BAX кодон был оптимизирован для *Y. enterocolitica*. Схематическое изображение повторяющихся идентичных доменов или комбинации различных доменов приведено на фиг. 25.

В то время как инфицирование в течение 4 ч бактерией *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, доставляющей YopE<sub>1-138</sub>-Myc не вызывала апоптоз, транслокация мышинного домена BH3 tBID (кодон, оптимизированный под *Y. enterocolitica*, SEQ ID NO: 194) вызвала гибель клеток в клетках B16F10 и 4T1 (фиг. 26 и 27), с четким дозозависимым эффектом при увеличении множественности инфицирования (MOI). Неожиданно было обнаружено, что доставленные YopE<sub>1-138</sub>-(tBID-BH3)-(BAX-BH3) или YopE<sub>1-138</sub>-(tBID-BH3)<sub>2</sub> были более активными, чем YopE<sub>1-138</sub>-(tBID-BH3) при более низком MOI (фиг. 27). Это указывает на то, что при доставке повторяющихся идентичных доменов или комбинации различных доменов белка влияние на целевой клеточный путь, такой как апоптоз, может быть увеличено.

Генерация усиленных проапоптотических бактерий.

В вышеупомянутых экспериментах показано, что доставка проапоптотических белков на основе T3SS (например, t-BID (SEQ ID NO: 25) или BIM (SEQ ID NO: 21)) эффективно индуцирует гибель клеток как в мышинных, так и в человеческих клетках, включая раковые клетки, и что указанный эффект может быть увеличен при использовании мышинного t-BID, оптимизированного для использования бактериального кодона (SEQ ID NO: 138). Это увеличение киллинга клеток, скорее всего, отражает увеличение объема производства белка и последующую доставку посредством T3SS благодаря использованию оптимальных кодонов.

Для оптимизации доставки проапоптотических белков были получены штаммы, трансформированные различными проапоптотическими белками, в соответствии с табл. IV.

Таблица IV. Штаммы, трансформированные различными проапоптотическими белками

Название штамма	Исходный штамм	Белок, доставляемый T3SS	Основная плазмида	Итоговое название плазмиды	Праймеры. Si_Nr.:	резистентность
YopE1-138-( <i>Y. enterocolitica</i> кодон-	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,	YopE1-138- <i>Y. enterocolitica</i> кодон-	pBad_Si_2	pSi_353	725/726	Nal Amp

оптимизированный мышинный tBid, ВНЗ расширенная часть)	Е,М,Т Δasd	оптимизированный мышинный tBid ВНЗ расширенный (с 4 Aa)				
YopE1-138-10 Aa линкер -(Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid ВНЗ часть)	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P, E,М,Т Δasd	YopE1-138-10 Aa линкер -Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid ВНЗ	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	Nal Amp
YopE1-(138-Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный Вах ВНЗ часть - Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid ВНЗ часть)	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P, E,М,Т Δasd	YopE1-138-Y. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный Вах ВНЗ-. enterocolitica кодон-оптимизированный мышинный tBid ВНЗ	pSi_357	pSi_37 4	736/737	Nal Amp

Укорачивание доставленных белков до эссенциальных доменов, необходимых для сигнализации (SEQ ID NO: 138 или 200), могло бы повысить эффективность киллинга клеток (фиг. 28). Безотносительно к какой-либо теории, это увеличение эффективности, вероятно, связано с увеличением количества продуцирования белка и последующей доставкой через T3SS из-за меньшего размера доставленного белка. Введение линкера между частью YopE и ВНЗ-доменом tBID (SEQ ID NO: 218) снижало эффективность, а также увеличивало ВНЗ-домен на еще 4 аминокислоты (SEQ ID NO: 217) (фиг. 28). Кроме того, были получены синтетические карго с повторами таких незаменимых доменов (например, ВНЗ-домен t-BID (SEQ ID NO: 202)) или комбинации указанных незаменимых доменов (например, ВНЗ-домен t-BID и ВНЗ-домен ВАХ (SEQ ID NO: 203 и 219)). Неожиданно было обнаружено, что tandemные повторы указанных же или разных доменов ВНЗ приводят к усиленной индукции апоптоза на раковых клеточных линиях (включая клетки 4T1 и В16F10, фиг. 28). Было обнаружено, что IC<sub>50</sub> (полумаксимальная ингибирующая концентрация), обозначающая число бактерий на эукариотную клетку (МОИ), необходимое для уничтожения 50% таких клеток, снижалась при доставке tandemных повторов ВНЗ-домена tBID по сравнению с единственным ВНЗ-доменом t-BID (фиг. 28). Это открытие было неожиданным, так как размер белка увеличивался при слиянии в качестве второго ВНЗ-домена t-BID. В связи с указанным можно ожидать снижения уровней экспрессии и доставки YopE<sub>1-138</sub>-(tBro ВНЗ)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 202) по сравнению с YopE<sub>1-138</sub>-tBID ВНЗ (SEQ ID NO: 138 или 200), и максимум может достичь эквивалентных уровней. Чтобы достичь увеличения активности в отношении киллинга клеток, слитые ВНЗ-домены tBID должны одновременно действовать параллельно при доставке системой T3SS в эукариотические клетки. В случае если в конструкции YopE<sub>1-138</sub>-(tBro ВНЗ)<sub>2</sub> будет функционировать только один ВНЗ-домен t-BID, в лучшем случае ожидается такая же эффективность, как и для YopE<sub>1-138</sub>-tBID ВНЗ. Для повышения генетической стабильности YopE<sub>1-138</sub>-(tBID ВНЗ)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 202) для исследований *in vivo* авторы настоящего

изобретения клонировали  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBro BH3)}_2$  (SEQ ID NO: 202) гомологичной рекомбинацией на плазмиде вирулентности pYV *Yersinia* на нативном сайте YopE и под нативным промотором YopE (с использованием мутаторных плазмид pSI\_408 и pSI\_419).

Такие мутаторы содержат последовательность ДНК, кодирующую желаемый белок, фланкированную последовательностями 200-250 пар оснований с обеих сторон, отвечая сайту соответствующего гена, где происходит интеграция. Указанные плазмиды трансформируются в *E. coli* Sm10  $\lambda$  pir, откуда плазмиды были мобилизованы в соответствующий штамм *Y. enterocolitica*. Мутанты, несущие интегрированный вектор, размножались в течение нескольких поколений без давления отбора. Затем использовали сахарозу для отбора клонов, которые потеряли вектор. В заключение, мутанты идентифицировали ПЦР для отбора колоний. Эндогенные белки для транспорта системой T3SS (называемые "Внешние белки *Yersinia*", *Yersinia* outer proteins - Yops) кодируются бактерией *Y. enterocolitica* на этой плазмиде из 70 тыс.о., названной плазмидой вирулентности *Yersinia* (plasmid of *Yersinia* virulence, pYV), которая далее кодирует аппарат T3SS.

Штаммы *Yersinia*, кодирующие  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}$  (SEQ ID NO: 138 или 200) или  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_2$  (SEQ ID NO: 202) на плазмиде вирулентности pYV *Yersinia* на нативном сайте YopE и под нативным промотором YopE, оценивали на их способность индуцировать апоптоз в раковых клетках (включая клетки 4T1 и B16F10, фиг. 29). Было обнаружено, что  $\text{IC}_{50}$  (полумаксимальная ингибирующая концентрация), обозначающая число бактерий на эукариотную клетку (MOI), необходимое для уничтожения 50% таких клеток, снижена при доставке tandemных повторов BH3-домена iBID по сравнению с одиночным BH3-доменом iBID, когда оба белка закодированы на плазмиде вирулентности pYV *Yersinia* на нативном сайте YopE и под нативным промотором YopE (фиг. 29). Это согласуется с результатами несущей плазмиды экспрессии доставки указанных белков (фиг. 28). Опять же, это открытие было неожиданным, так как размер белка увеличивается за счет слияния второго BH3-домена t-BID. В связи с указанным ожидается снижение уровней экспрессии и доставки  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBro BH3)}_2$  (SEQ ID NO: 202) по сравнению с  $\text{YopE}_{1-138}\text{-tBID BH3}$  (SEQ ID NO: 138 или 200) и максимум может достичь эквивалентных уровней. Чтобы достичь увеличения активности гибели клеток, слитые BH3-домены t-BID должны одновременно действовать параллельно при доставке T3SS в эукариотические клетки. В случае если будет функционален только один BH3 домен t-BID в конструкции  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_g$ , можно ожидать в лучшем случае такой же эффективности, как и с  $\text{YopE}_{1-138}\text{-t-BID BH3}$ . Кроме того, штаммы *Yers*  $\text{E}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_2$  (SEQ ID NO: 202) на плазмиде вирулентности pYV *Yersinia* на нативном сайте YopE и под нативным промотором YopE были сравнены по их способности индуцировать апоптоз в раковых клетках с доставкой  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_2$  на плазмиде экспрессии (на основе pBad-MyсHisA). В соответствии с более высоким числом копий pBad-MyсHisA (20-25 копий) по сравнению с pYV (сообщается о 1-6 копий), доставка  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_2$  (SEQ ID NO: 202) на основе pBad-MyсHisA приводила к небольшому снижению значения  $\text{IC}_{50}$  в клетках 4T1 и B16F10 (фиг. 29).

Валидация специфического роста опухоли *in vivo* до 14 дней после введения бактерий.

Эксперимент по колонизации опухоли генетически модифицированной *Y. enterocolitica* был повторен в мышинной модели сингенетического аллотрансплантата (модель рака молочной железы 4T1), причем бактериальная колонизация отслеживалась в течение двух недель. На указанный раз мышей инфицировали дозой  $1 \times 10^6$  колониеобразующих единиц (КОЕ) *Y. enterocolitica*  $\Delta\text{yopH,O,P,E,M,T}$ . Получив сходные результаты с моделью B16F10 на ранних стадиях после инфицирования, авторы настоящего изобретения смогли также показать, что колонизация опухоли стабильно обнаруживается с 8-го дня и до 14-го дня после инфицирования (фиг. 30). Кроме того, указанная колонизация остается высокоспецифичной, так во всех других оцененных органах обнаруживаются только низкие количества бактерий, (фиг. 31). Указанные данные показывают, что *Y. enterocolitica*  $\Delta\text{yopH,O,P,E,M,T}$  способна установить стойкую колонизацию опухоли, при этом противодействуя клиренсу под действием иммунной системы.

Эффективность *Y. enterocolitica*  $\Delta\text{НОРЕМТ}$  в замедлении прогрессирования опухоли

Чтобы оценить влияние  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_2$  (SEQ ID NO: 202), доставленного в опухолевые клетки *in vivo*, авторы настоящего изобретения провели исследования у мышей Balb/C дикого типа с подкожным аллотрансплантатом клеток рака груди 4T1. авторы настоящего изобретения стремились оценить штамм *Y. enterocolitica*  $\Delta\text{НОРЕМТ}$ , кодирующий  $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_2$  (SEQ ID NO: 202) на плазмиде вирулентности pYV *Yersinia* на нативном сайте YopE и под нативным промотором YopE. Мышам внутривенно вводили PBS или  $1 \times 10^7$  бактерий *Y. enterocolitica*  $\Delta\text{НОРЕМТ}$  pYV- $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_2$ , как только опухоль достигала размера 150-250 мм<sup>3</sup>. День внутривенной инъекции бактерий определялся как день 0. В течение следующих дней (дни от 0 до 9 после инъекции бактерий) объем опухоли измеряли циркулем. Объем опухоли был нормализован на объем опухоли в день 0, чтобы компенсировать любую начальную гетерогенность в размере опухоли. Обработка *Y. enterocolitica*  $\Delta\text{НОРЕМТ}$  pYV- $\text{YopE}_{1-138}\text{-(tBID BH3)}_2$  показала влияние на прогрессирование объема опухоли со статистически значимым уменьшением опухоли на 8-й, 9-й и 10-й день после введения бактерий (фиг. 32). Важно отметить, что просто *Y. enterocolitica*  $\Delta\text{НОРЕМТ}$  не влияла на прогрессирование опухоли в модели рака мышцы 4T1 (фиг. 33). Указанные данные показывают, что такие бактерии и их T3SS могут использоваться для замедления прогрессирования опухоли.

## Список источников

- 1 Hayes, C. S., Aoki, S. K. & Low, D. A. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* 44, 71-90, doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091449 (2010).
- 2 Cornelis, G. R. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811-825, doi:nrmicro1526 [pii]10.1038/nrmicro1526 (2006).
- 3 Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M. & Cornelis, G. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 58, 2840-2849 (1990).
- 4 Blanco-Toribio, A., Muyldermans, S., Frankel, G. & Fernandez, L. A. Direct injection of functional single-domain antibodies from *E. coli* into human cells. *PLoS One* 5, e15227, doi:10.1371/journal.pone.0015227 (2010).
- 5 Bichsel, C. et al. Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell Reprogram* 15, 117-125, doi:10.1089/cell.2012.0058 (2013).
- 6 Bichsel, C. et al. Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells. *PLoS One* 6, e16465, doi:10.1371/journal.pone.0016465 (2011).
- 7 Chamekh, M. et al. Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus. *J Immunol* 180, 4292-4298, doi:180/6/4292 [pii] (2008).
- 8 Hoffman, R. M. Tumor-seeking *Salmonella* amino acid auxotrophs. *Curr Opin Biotechnol* 22, 917-923, doi:S0958-1669(11)00061-9 [pii]10.1016/j.copbio.2011.03.009 (2011).
- 9 Hoang, T. T., Williams, S., Schweizer, H. P. & Lam, J. S. Molecular genetic analysis of the region containing the essential *Pseudomonas aeruginosa* *asd* gene encoding aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase. *Microbiology* 143 (Pt 3), 899-907 (1997).
- 10 Skurnik, M. & Wolf-Watz, H. Analysis of the *yopA* gene encoding the *YopI* virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* 3, 517-529 (1989).
- 11 Terti, R., Skurnik, M., Vartio, T. & Kuusela, P. Adhesion protein *YadA* of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun* 60, 3021-3024 (1992).
- 12 Isberg, R. R. & Leong, J. M. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60, 861-871, doi:0092-8674(90)90099-Z [pii] (1990).
- 13 Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 50, 769-778, doi:0092-8674(87)90335-7 [pii] (1987).
- 14 Leong, J. M., Fournier, R. S. & Isberg, R. R. Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasins protein. *EMBO J* 9, 1979-1989 (1990).
- 15 Mota, L. J. & Cornelis, G. R. The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* 37, 234-249, doi:R673752030212825 [pii]10.1080/07853890510037329 (2005).
- 16 Trosky, J. E., Liverman, A. D. & Orth, K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* 10, 557-565, doi:CM11109 [pii]10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x (2008).

- 17 Brenner, D. & Mak, T. W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21, 871-877, doi:S0955-0674(09)00160-4 [pii]10.1016/j.ceb.2009.09.004 (2009).
- 18 Chalah, A. & Khosravi-Far, R. The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* 615, 25-45, doi:10.1007/978-1-4020-6554-5\_3 (2008).
- 19 Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147, 742-758, doi:S0092-8674(11)01283-9 [pii]10.1016/j.cell.2011.10.033 (2011).
- 20 Waugh, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 80, 283-293, doi:S1046-5928(11)00203-8 [pii]10.1016/j.pep.2011.08.005 (2011).
- 21 Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* 14, 583-594 (1994).
- 22 Sarker, M. R., Neyt, C., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* 180, 1207-1214 (1998).
- 23 Howard, S. L. et al. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *Journal of bacteriology* 188, 3645-3653, doi:10.1128/JB.188.10.3645-3653.2006 (2006).
- 24 Neubauer, H., Aleksic, S., Hensel, A., Finke, E. J. & Meyer, H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol* 290, 61-64, doi:10.1016/S1438-4221(00)80107-1 (2000).
- 25 Pelludat, C., Hogardt, M. & Heesemann, J. Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun* 70, 1832-1841 (2002).
- 26 Feldman, M. F., Muller, S., Wuest, E. & Cornelis, G. R. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* 46, 1183-1197, doi:3241 [pii] (2002).
- 27 Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J Bacteriol* 187, 707-715, doi:187/2/707 [pii]10.1128/JB.187.2.707-715.2005 (2005).
- 28 Wolke, S., Ackermann, N. & Heesemann, J. The *Yersinia enterocolitica* type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. *Cell Microbiol* 13, 1339-1357, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01623.x (2011).
- 29 Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *J Bacteriol* 172, 1547-1555 (1990).
- 30 Sambrook, J. (ed David W. Russell) (*Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.* , 2001).
- 31 Alto, N. M. & Dixon, J. E. Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol* 439, 131-143, doi:S0076-6879(07)00410-7 [pii]10.1016/S0076-6879(07)00410-7 (2008).

- 32 Alto, N. M. et al. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* 124, 133-145, doi:S0092-8674(05)01229-8 [pii]10.1016/j.cell.2005.10.031 (2006).
- 33 Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109, 137-141, doi:0378-1119(91)90599-7 [pii] (1991).
- 34 Yoneda, Y. et al. A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently. *Exp Cell Res* 201, 313-320 (1992).
- 35 Cornelis, G. R. in *Molecular aspects of host-pathogen interactions* (ed SAUNDERS MoCRAE, SMYTH, STOW) (Cambridge University Press, 1997).
- 36 Metcalf, W. W., Jiang, W. & Wanner, B. L. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene* 138, 1-7 (1994).
- 37 Diepold, A. et al. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J* 29, 1928-1940, doi:emboj201084 [pii]10.1038/emboj.2010.84 (2010).
- 38 Iriarte, M., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The *rpoS* gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun* 63, 1840-1847 (1995).
- 39 Cornelis, G., Vanootegeem, J. C. & Sluiter, C. Transcription of the *yop* regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* 2, 367-379, doi:0882-4010(87)90078-7 [pii] (1987).
- 40 Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 70, 4165-4176 (2002).
- 41 Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H. & Lanz, C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci* 110 ( Pt 18), 2141-2154 (1997).
- 42 Westerfield, M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio rerio* (University of Oregon Press, Eugene, OR, 2000).
- 43 Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310, doi:10.1002/aja.1002030302 (1995).
- 44 Benard, E. L. et al. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *J Vis Exp*, doi:3781 [pii]10.3791/3781 (2012).
- 45 Blum, Y. et al. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 316, 312-322, doi:S0012-1606(08)00079-1 [pii]10.1016/j.ydbio.2008.01.038 (2008).
- 46 Herwig, L. et al. Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo. *Curr Biol* 21, 1942-1948, doi:S0960-9822(11)01140-7 [pii]10.1016/j.cub.2011.10.016 (2011).
- 47 Carpenter, A. E. et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100, doi:gb-2006-7-10-r100 [pii]10.1186/gb-2006-7-10-r100 (2006).

- 48 Bensimon, A. et al. ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage. *Sci Signal* 3, rs3, doi:10.1126/scisignal.20010343/151/rs3 [pii] (2010).
- 49 Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567, doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2 [pii]10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2 (1999).
- 50 Smyth, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3, doi:10.2202/1544-6115.1027 (2004).
- 51 Ting, L. et al. Normalization and statistical analysis of quantitative proteomics data generated by metabolic labeling. *Mol Cell Proteomics* 8, 2227-2242, doi:10.1074/mcp.M800462-MCP200M800462-MCP200 [pii] (2009).
- 52 Vizcaino, J. A. et al. The PRoteomics IDEntifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Res* 41, D1063-1069, doi:gks1262 [pii]10.1093/nar/gks1262 (2013).
- 53 Boyd, A. P., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* 182, 4811-4821 (2000).
- 54 Iriarte, M. & Cornelis, G. R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 29, 915-929 (1998).
- 55 Kudryashev, M. et al. In situ structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome. *Elife* 2, e00792, doi:10.7554/eLife.0079200792 [pii] (2013).
- 56 Schulte, R. et al. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* 14, 1471-1484 (2000).
- 57 Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. & Cornelis, G. R. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* 307, 1278, doi:307/5713/1278 [pii]10.1126/science.1107679 (2005).
- 58 Isaksson, E. L. et al. The membrane localization domain is required for intracellular localization and autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 77, 4740-4749, doi:IAI.00333-09 [pii]10.1128/IAI.00333-09 (2009).
- 59 Denecker, G. et al. Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun* 70, 3510-3520 (2002).
- 60 Sharma, S. et al. Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells. *Plant J* 74, 701-712, doi:10.1111/tpj.12148 (2013).
- 61 Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3391-3395 (1988).
- 62 Kapust, R. B., Tozser, J., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 949-955, doi:10.1016/S0006-291X(02)00574-0S0006-291X(02)00574-0 [pii] (2002).

- 63 Liang, H., Gao, H., Maynard, C. A. & Powell, W. A. Expression of a self-processing, pathogen resistance-enhancing gene construct in *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett* 27, 435-442, doi:10.1007/s10529-005-1884-9 (2005).
- 64 Weber, W. et al. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol* 20, 901-907, doi:10.1038/nbt731nbt731 [pii] (2002).
- 65 Kapust, R. B. et al. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* 14, 993-1000 (2001).
- 66 Lee, V. T., Anderson, D. M. & Schmeewind, O. Targeting of *Yersinia Yop* proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol* 28, 593-601 (1998).
- 67 Gray, D. C., Mahrus, S. & Wells, J. A. Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell* 142, 637-646, doi:S0092-8674(10)00783-X [pii]10.1016/j.cell.2010.07.014 (2010).
- 68 Henrichs, T. et al. Target-directed proteolysis at the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4246-4251, doi:102/12/4246 [pii]10.1073/pnas.0408520102 (2005).
- 69 Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. & Galan, J. E. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93, 815-826, doi:S0092-8674(00)81442-7 [pii] (1998).
- 70 Hakansson, S. et al. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* 15, 5812-5823 (1996).
- 71 Stebbins, C. E. & Galan, J. E. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 412, 701-705, doi:10.1038/3508900035089000 [pii] (2001).
- 72 Li, H. et al. The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* 315, 1000-1003, doi:315/5814/1000 [pii]10.1126/science.1138960 (2007).
- 73 Norris, F. A., Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E. & Majerus, P. W. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14057-14059 (1998).
- 74 Pulliainen, A. T. et al. Bacterial effector binds host cell adenylyl cyclase to potentiate G $\alpha$ s-dependent cAMP production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9581-9586, doi:1117651109 [pii]10.1073/pnas.1117651109 (2012).
- 75 Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501, doi:S0092-8674(00)81590-1 [pii] (1998).
- 76 Nagaraj, N. et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* 7, 548, doi:msb201181 [pii]10.1038/msb.2011.81 (2011).
- 77 Caussinus, E., Kanca, O. & Affolter, M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol* 19, 117-121, doi:nsmb.2180 [pii]10.1038/nsmb.2180 (2011).
- 78 Cosma, C. L., Swaim, L. E., Volkman, H., Ramakrishnan, L. & Davis, J. M. Zebrafish and frog models of *Mycobacterium marinum* infection. *Curr Protoc Microbiol Chapter 10, Unit 10B 12*, doi:10.1002/0471729256.mc10b02s3 (2006).

- 79 Mathias, J. R. et al. Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Dev Comp Immunol* 33, 1212-1217, doi:S0145-305X(09)00149-9 [pii]10.1016/j.dci.2009.07.003 (2009).
- 80 Jette, C. A. et al. BIM and other BCL-2 family proteins exhibit cross-species conservation of function between zebrafish and mammals. *Cell Death Differ* 15, 1063-1072, doi:cdd200842 [pii]10.1038/cdd.2008.42 (2008).
- 81 Olsen, J. V. et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648, doi:S0092-8674(06)01274-8 [pii]10.1016/j.cell.2006.09.026 (2006).
- 82 Schmutz, C. et al. Systems-Level Overview of Host Protein Phosphorylation During *Shigella flexneri* Infection Revealed by Phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics* 12, 2952-2968, doi:M113.029918 [pii]10.1074/mcp.M113.029918 (2013).
- 83 Szklarczyk, D. et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* 39, D561-568, doi:gkq973 [pii]10.1093/nar/gkq973 (2011).
- 84 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37, 1-13, doi:gkn923 [pii]10.1093/nar/gkn923 (2009).
- 85 Huang da, W. et al. DAVID gene ID conversion tool. *Bioinformatics* 2, 428-430 (2008).
- 86 Schwerk, C. & Schulze-Osthoff, K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 19, 1-13, doi:S1097-2765(05)01375-4 [pii]10.1016/j.molcel.2005.05.026 (2005).
- 87 Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A. & Kosik, K. S. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 68, 8164-8172, doi:68/19/8164 [pii]10.1158/0008-5472.CAN-08-1305 (2008).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор для трансформации рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма, который содержит в направлении от 5' до 3':

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки или его фрагмент от бактериального Т3SS-эффекторного белка, функционально связанного с указанным промотором;

при этом указанный сигнал доставки или его фрагмент от бактериального Т3SS-эффекторного белка содержит эффекторный белок, выбранный из группы, состоящей из эффекторного белка YopE или его N-концевого фрагмента, эффекторного белка SopE или его N-концевого фрагмента, и эффекторного белка SteA или его N-концевого фрагмента, и

вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка, причем указанные повторяющиеся домены гетерологичного белка содержат слитый белок, состоящий из нескольких повторов домена гетерологичного белка, или два или более доменов различных гетерологичных белков, причем указанные два или более доменов различных гетерологичных белков содержат слитый белок, состоящий из одного или нескольких повторов по меньшей мере двух доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК,

причем гетерологичные белки представляют собой белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза.

2. Вектор для трансформации рекомбинантного грамотрицательного бактериального штамма, который содержит в направлении от 5' до 3':

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки или его фрагмент из бактериального Т3SS-эффекторного белка;

при этом указанный сигнал доставки или его фрагмент от бактериального Т3SS-эффекторного белка содержит эффекторный белок, выбранный из группы, состоящей из эффекторного белка YopE или его N-концевого фрагмента, эффекторного белка SopE или его N-концевого фрагмента, и эффекторного белка SteA или его N-концевого фрагмента; и

вторую последовательность ДНК, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка, причем указанные повторяющиеся домены гетерологичного белка содержат слитый белок, состоящий из нескольких повторов домена гетерологичного белка, или два или более доменов различных гетерологичных белков, причем указанные два или более доменов различных гетерологичных белков содержат слитый белок, состоящий из одного или нескольких повторов по меньшей мере двух доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, причем гетерологичные белки представляют собой белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза.

3. Вектор по п.1 или 2, где белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из

группы, состоящей из белков BH3-only, выбранных из группы, состоящей из Bad, BIM, Bid и tBid, Puma, Bik/Nbk, Bod, Hrk/Dp5, BNIP1, BNIP3, Bmf, Noxa, Mcl-1, Bcl-Gs, Beclin 1, Egl-1 и CED-13, каспаз и внутриклеточных сигнальных белков регуляции рецепторов смерти при апоптозе.

4. Вектор по п.1 или 2, где повторяющиеся домены идентичны или где повторяющиеся домены представляют собой по меньшей мере два повторяющихся домена, имеющих идентичность аминокислотной последовательности более 80%.

5. Вектор по п.1 или 2, где повторяющийся домен представляет собой BH3-домен индуктора апоптоза tBID.

6. Вектор по п.1 или 2, где два или более доменов различных гетерологичных белков представляют собой домены гетерологичных белков, принадлежащих к одному и тому же функциональному классу белков.

7. Вектор по п.1 или 2, где два или более доменов различных гетерологичных белков представляют собой BH3-домен индуктора апоптоза tBID и BH3-домен регулятора апоптоза BAX.

8. Вектор по п.1 или 2, где указанный вектор содержит третью последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой, где третья последовательность ДНК расположена между 3'-концом указанной первой последовательности ДНК и 5'-концом указанной второй последовательности ДНК.

9. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм для доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в эукариотические клетки, трансформированный вектором по п.1.

10. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм для доставки повторяющихся доменов гетерологичного белка или двух или более доменов различных гетерологичных белков в эукариотические клетки, трансформированный вектором по п.2.

11. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по п.9 или 10, где указанный рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм дефицитен по продуцированию по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS.

12. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-11, где указанный рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*.

13. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-11, где указанный рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*.

14. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-11, где указанный рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм представлен штаммом *Yersinia*.

15. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-11, где указанный рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм представлен штаммом *Salmonella*.

16. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по п.9 или 10, где указанный рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм представлен штаммом *Yersinia* дикого типа, трансформированным вектором по п.1, или штаммом *Yersinia*, дефицитным по продуцированию по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS, трансформированным вектором по п.1, и где сигнал доставки от бактериального T3SS-эффекторного белка содержит N-концевые 138 аминокислот эффекторного белка *Y. enterocolitica* YopE.

17. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по п.9 или 10, где указанный рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм представлен штаммом *Salmonella* дикого типа, трансформированным вектором по п.1, или штаммом *Salmonella*, дефицитным по продуцированию по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS, трансформированным вектором по п.1, и в котором сигнал доставки из эффекторного белка бактерий T3SS содержит эффекторный белок *S. enterica* SteA или N-концевые 81 или 105 аминокислот эффекторного белка *S. enterica* SopE.

18. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-17, где белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из белков BH3-only, выбранных из группы, состоящей из Bad, BIM, Bid и tBid, Puma, Bik/Nbk, Bod, Hrk/Dp5, BNIP1, BNIP3, Bmf, Noxa, Mcl-1, Bcl-Gs, Beclin 1, Egl-1 и CED-13, каспаз и внутриклеточных сигнальных белков регуляции рецепторов смерти при апоптозе.

19. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-17, где повторяющиеся домены идентичны или где повторяющиеся домены представляют собой по меньшей мере два повторяющихся домена, имеющих идентичность аминокислотной последовательности более 80%.

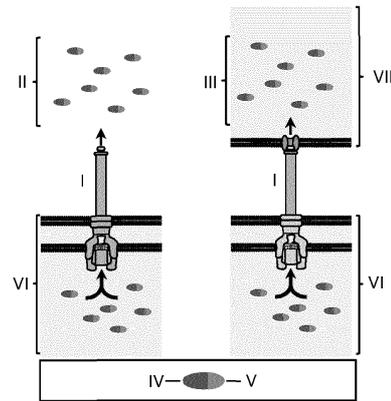
20. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-17, где повторяющийся домен представляет собой BH3-домен индуктора апоптоза tBID.

21. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-17, где два или более доменов различных гетерологичных белков представляют собой домены гетерологичных белков, принадлежащих к одному и тому же функциональному классу белков.

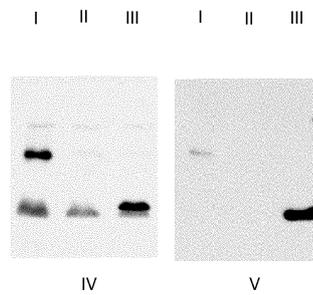
22. Рекомбинантный грамотрицательный бактериальный штамм по любому из пп.9-17, где два или более доменов различных гетерологичных белков представляют собой BH3-домен индуктора апоптоза

tBID и BH3-домен регулятора апоптоза BAX.

A

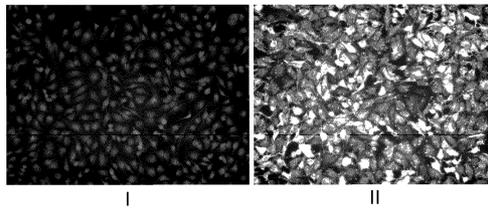


B

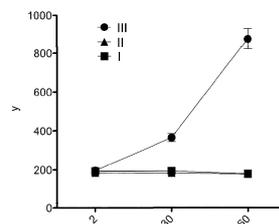


Фиг. 1

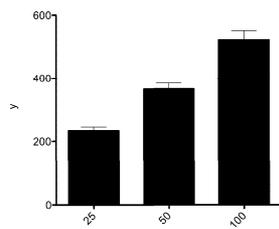
A



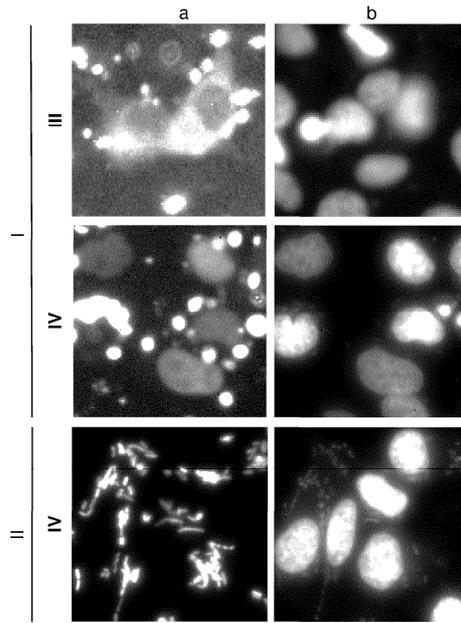
B



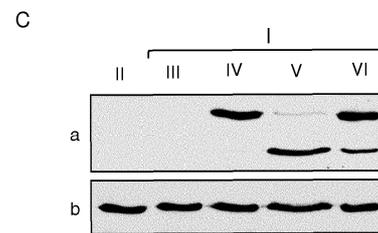
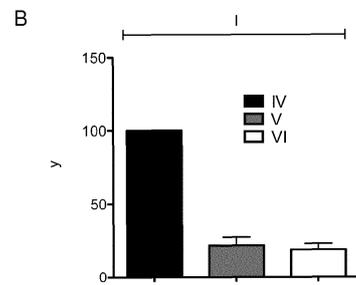
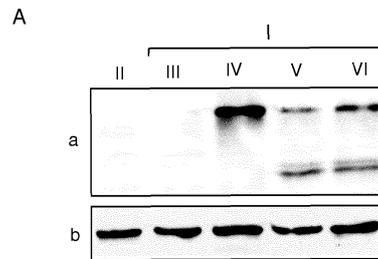
C



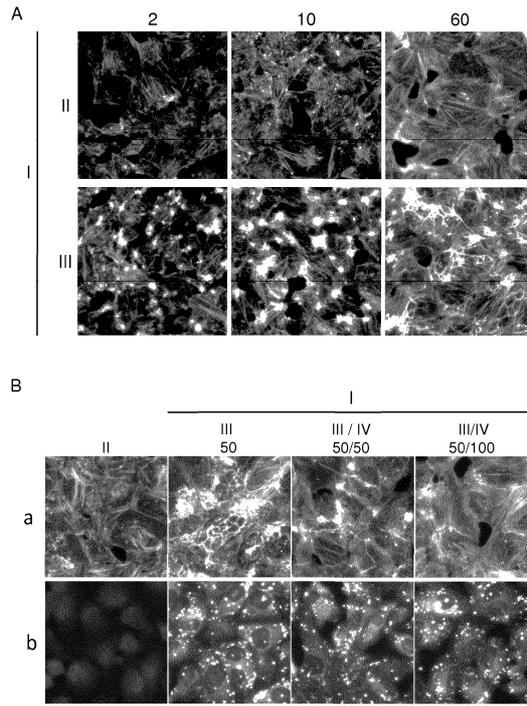
Фиг. 2



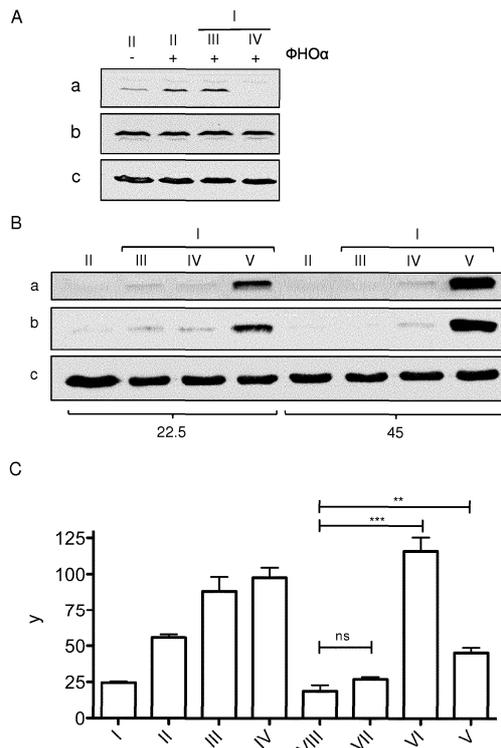
Фиг. 3



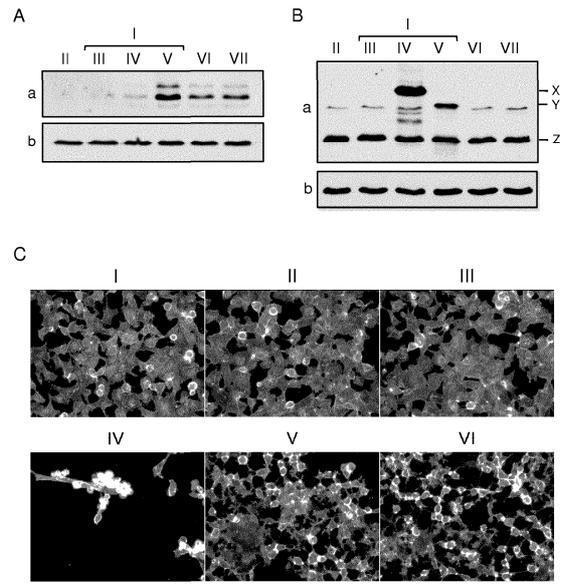
Фиг. 4



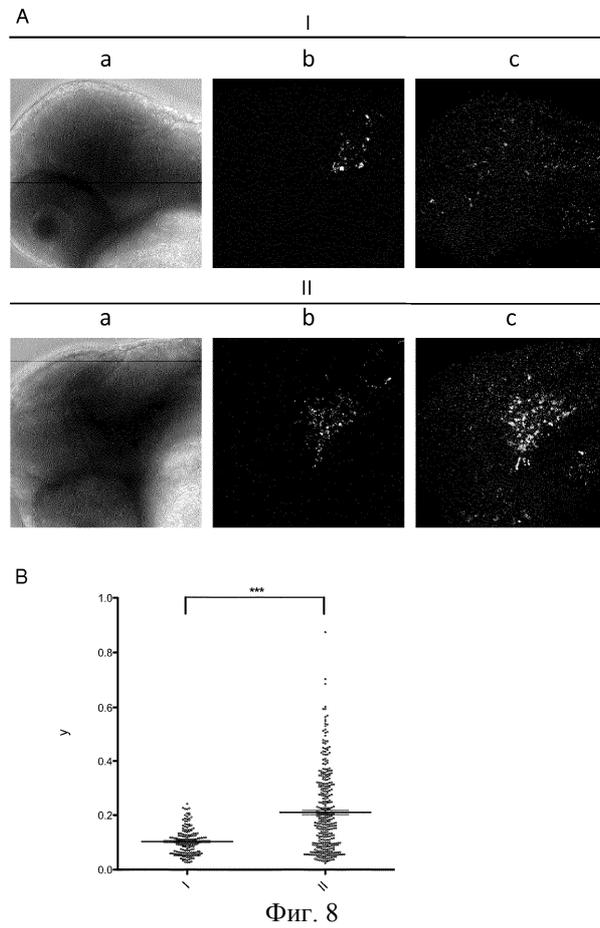
Фиг. 5



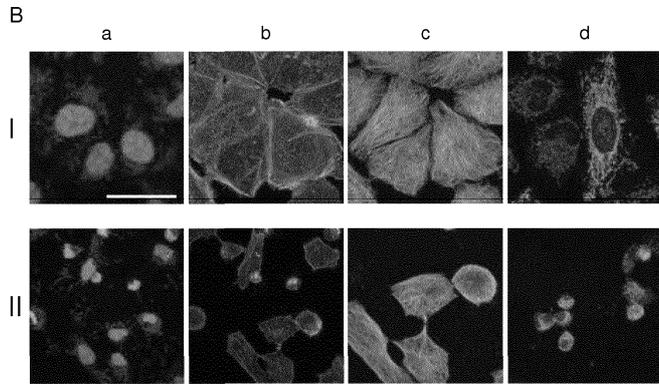
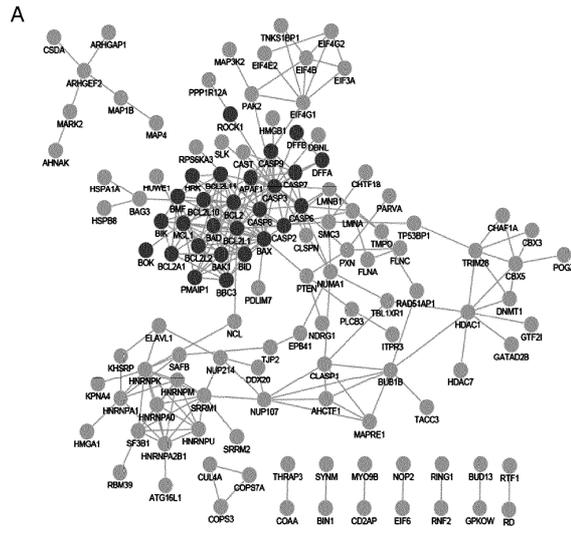
Фиг. 6



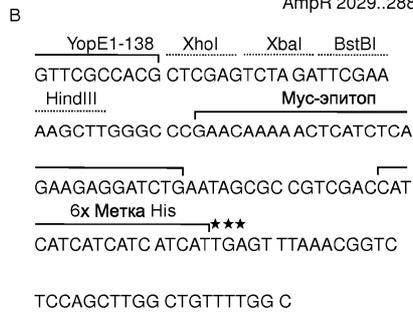
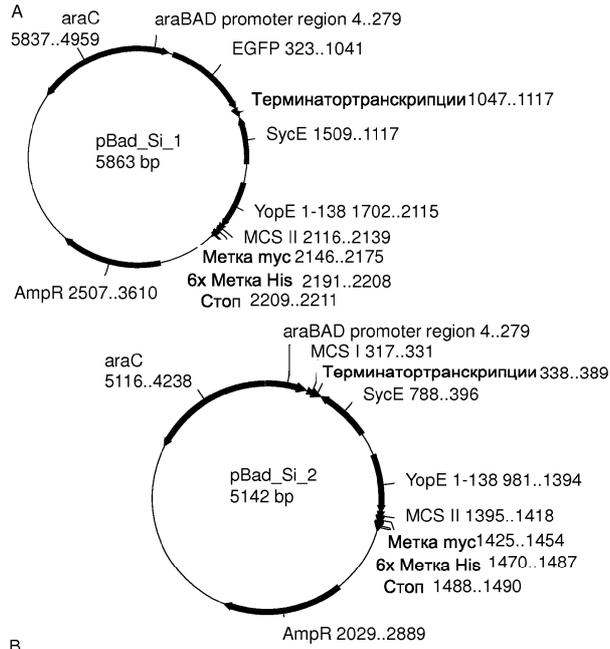
Фиг. 7



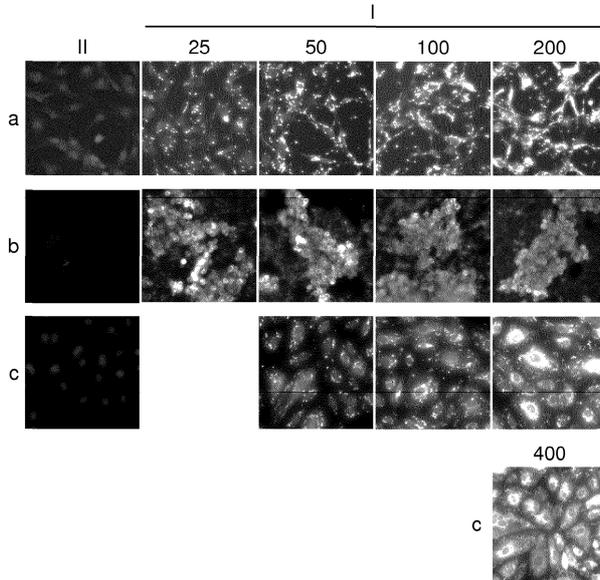
Фиг. 8



Фиг. 9

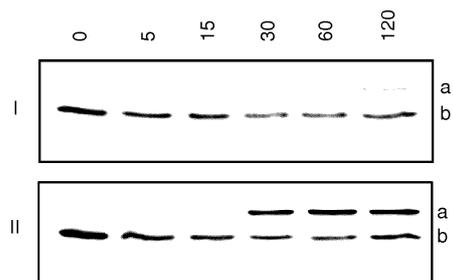


Фиг. 10

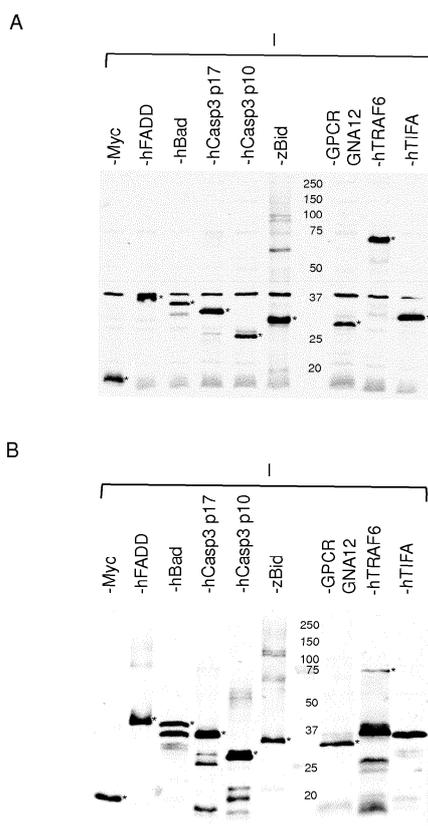


Фиг. 11

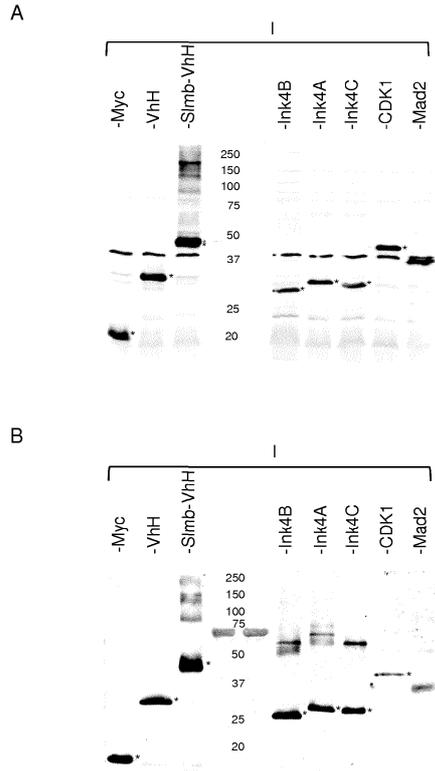
039922



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставл. с помощью T3SS	Основная плазмида	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
$\Delta$ HOPEMT	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T	MRS40 pIML421 [yopH $\Delta$ 1-352, yopO $\Delta$ 65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Iriarte and Cornelis, 1998
$\Delta$ HOPEMT asd yopB	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ yopB	MRS40 pIML421 [yopB $\Delta$ 89-217, yopH $\Delta$ 1-352, yopO $\Delta$ 65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal Kan	
$\Delta$ HOPEMT asd	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd	MRS40 asd $\Delta$ 292-610 pIML421 [yopH $\Delta$ 1-352, yopO $\Delta$ 65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Kudryashev et al., 2013
$\Delta$ HOPEMT asd inv	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd $\Delta$ invA	MRS40 asd $\Delta$ 292-610 invA $\Delta$ 352-2225::aphA-3 pIML421 [yopH $\Delta$ 1-352, yopO $\Delta$ 65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				445/446, 447/448, 449/450	Nal Kan	
$\Delta$ HOPEMT asd inv yadA	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd $\Delta$ invA $\Delta$ yadA	MRS40 asd $\Delta$ 292-610 invA $\Delta$ 587-836 (vector cointegration) yadA $\Delta$ 89-354::aphA3 pIML421 [yopH $\Delta$ 1-352, yopO $\Delta$ 65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				352/353, 354/355, 356/357	Nal Kan Tet	

Фиг. 15A

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставл. с помощью T3SS	Основная плазмида	Название получен. плазмиды	Примеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pBad_Si1	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	EGFP (Arabinose inducible), SycE-YopE1-138-MycHis fragment		pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pBad_Si2	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	SycE-YopE1-138-MycHis fragment	YopE1-138-MycHis	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_16	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-IpgB1	pBad_Si_2	pSi_16	292/293	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_20	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SopE	pBad_Si_2	pSi_20	296/297	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_22	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L	pBad_Si_2	pSi_22	299/300	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_24	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-RhoA Q61E	pBad_Si_2	pSi_24	301/302	Nal Amp	

Фиг. 15В

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмида	Название получен. плазмиды	Примеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ T asd pSi_28	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SopE-MycHis	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T yopB asd pSi_28	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔyopB Δasd		YopE1-138-SopE-MycHis	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T asd pSi_30	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SopB	pBad_Si_2	pSi_30	307/308	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T asd pSi_37	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-FADD	pBad_Si_2	pSi_37	367/386	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T asd pSi_38	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-OspF	pBad_Si_2	pSi_38	317/318	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T asd pSi_43	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-VerG 715-end	pBad_Si_2	pSi_43	324/351	Nal Amp	

Фиг. 15С

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмида	Название получен. плазмиды	Примеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_51	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L-MycHis	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ yopB asd pSi_51	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔyopB Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L-MycHis	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_53	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Slmb1-VhH4	pBad_Si_2	pSi_53	341/342	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_57	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Bad	pBad_Si_2	pSi_57	346/347	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_64	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SptP	pBad_Si_2	pSi_64	364/365	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_70	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-NLS-Slmb1-VhH4	pBad_Si_2	pSi_70	369/342	Nal Amp	

Фиг. 15D

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плаزمид	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_85	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Bid	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_87	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_97	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Caspase3 p17	pBad_Si_2	pSi_97	403/406	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_103	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-GPCR GNA12	pBad_Si_2	pSi_103	410/413	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_106	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Caspase3 p10/12	pBad_Si_2	pSi_106	417/420	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_111	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-IpgD	pBad_Si_2	pSi_111	423/424	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_112	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Slmb1-VhH4-NLS	pBad_Si_2	pSi_112	341/425	Nal Amp	

Фиг. 15E

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмид	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_116	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-z-Bid	pBad_Si_2	pSi_116	428/430	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_117	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-z-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_117	429/430	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_118	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-BerA E305-end	pBad_Si_2	pSi_118	433/435	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_119	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-BerA	pBad_Si_2	pSi_119	434/435	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_120	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-ET1	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_121	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-z-BIM	pBad_Si_1	pSi_121	438/439	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_124	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-VhH4 nanobody recognizing EGFP	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	Nal Amp	

Фиг. 15F

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмид	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_132	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-TEV protease S219V	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_140	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-EGFP	pBad_Si_2	pSi_140	477/476	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_143	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Cdk1	pBad_Si_2	pSi_143	478/479	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_145	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Mad2	pBad_Si_2	pSi_145	482/483	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_147	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4A	pBad_Si_2	pSi_147	486/487	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_150	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4B	pBad_Si_2	pSi_150	492/493	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_151	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4C	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	Nal Amp	

Фиг. 15G

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмида	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОPEMT asd pSi_153	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-TIFA	pBad_Si_2	pSi_153	558/559	Nal Amp	
ΔНОPEMT asd pSi_156	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x TEVsite - ET1	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	Nal Amp	
ΔНОPEMT asd pSi_159	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2xTEVsite - EGFP - NLS	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	Nal Amp	
ΔНОPEMT asd pSi_160	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2xTEVsite - NLS - EGFP	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	Nal Amp	
ΔНОPEMT asd pSi_161	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x TEVsite - INK4C	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	Nal Amp	
ΔНОPEMT asd pSi_164	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x TEVsite - Flag - INK4C	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	Nal Amp	
ΔНОPEMT asd pSi_166	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-murine Traf6	pBad_Si_2	pSi_166	561/562	Nal Amp	

Фиг. 15H

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмида	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОPEMT asd pSi_318	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized murine tBid BH3 part	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	Nal Amp	
ΔНОPEMT asd pSi_322	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized murine Bax BH3 part	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	Nal Amp	
S. enterica SL1344 ΔaroA	S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SL1344 ΔaroA							Hoiseth and Stocker, 1981
S. enterica ΔaroA pSi_266	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA1-20	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_267	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	Amp	

Фиг. 15I

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмида	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
S. enterica ΔaroA pSi_268	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-80	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_268	614/615	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_269	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_270	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA1-20-S. enterica codon optimized murine tBid	pSi_266	pSi_270	synthetic construct	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_271	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-S. enterica codon optimized murine tBid	pSi_267	pSi_271	synthetic construct	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_272	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-80-S. enterica codon optimized murine tBid	pSi_268	pSi_272	synthetic construct	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_273	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-S. enterica codon optimized murine tBid	pSi_269	pSi_273	synthetic construct	Amp	

Фиг. 15J

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмиды	Название получен. плазмиды	Примеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_362	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized Ink4A 84-103	pBad_Si_2	pSi_362	745/746	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_363	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized Cdk2/cyclin inhibitory peptide I	pBad_Si_2	pSi_363	747/748	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_364	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized p21 peptide 10 (DtoA)	pBad_Si_2	pSi_364	749/750	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_366	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized p21 core of peptide 10 and 11	pBad_Si_2	pSi_366	753/754	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_367	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized p21 peptide 17-33	pBad_Si_2	pSi_367	755/756	Nal Amp	

Фиг. 15K

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмиды	Название получен. плазмиды	Примеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_368	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized pep5 of G1/S cyclin D2	pBad_Si_2	pSi_368	757/758	Nal Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_333	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Ink4a-MycHis	pSi_267	pSi_333	703/704	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_334	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Ink4a-MycHis	pSi_269	pSi_334	703/704	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_335	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Ink4c-MycHis	pSi_267	pSi_335	705/706; 707/708; 705/708	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_336	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Ink4c-MycHis	pSi_269	pSi_336	705/706; 707/708; 705/708	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_337	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Mad2-MycHis	pSi_267	pSi_337	709/710	Amp	

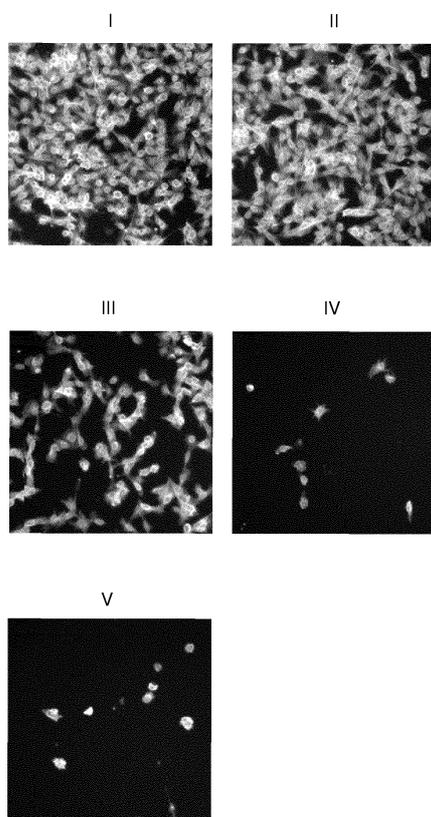
Фиг. 15L

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмиды	Название получен. плазмиды	Примеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
S. enterica ΔaroA pSi_338	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Mad2-MycHis	pSi_269	pSi_338	709/710	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_339	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Cdk1-MycHis	pSi_267	pSi_339	711/712	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_340	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Cdk1-MycHis	pSi_269	pSi_340	711/712	Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_315	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized murine tBid	pBad_Si_2	pSi_315	synthetic construct	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_236	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ubiquitin	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_237_II	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ubiquitin-Flag-INK4C-MycHis	pSi_236	pSi_237_II	588/509	Nal Amp	

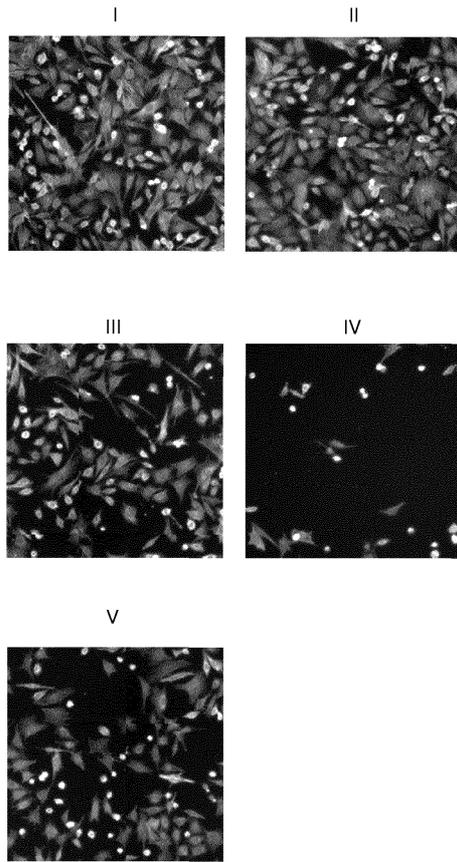
Фиг. 15M

Название штамма	Исходный штамм	Инсерируемые/соответствующие фрагменты	Белок, доставляемый с помощью T3SS	Основная плазмида	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Резистентность	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_357	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized murine tBid BH3	pBadSi_2	pSi_357	733/735	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_358	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized murine Bax BH3	pBad_Si_2	pSi_358	736/738	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_371	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(Y. enterocolitica codon optimized murine tBid BH3)2	pSi_357	pSi_371	733/734	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_373	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(Y. enterocolitica codon optimized murine tBid BH3)-(Y. enterocolitica codon optimized murine Bax BH3)	pSi_358	pSi_373	733/734	Nal Amp	

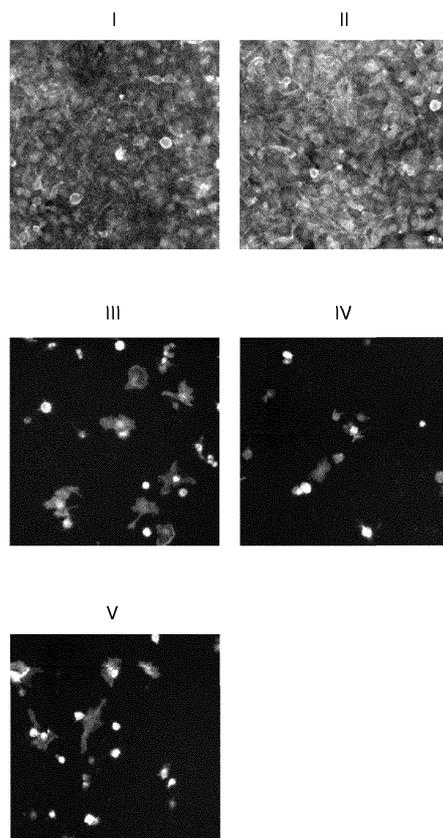
Фиг. 15N



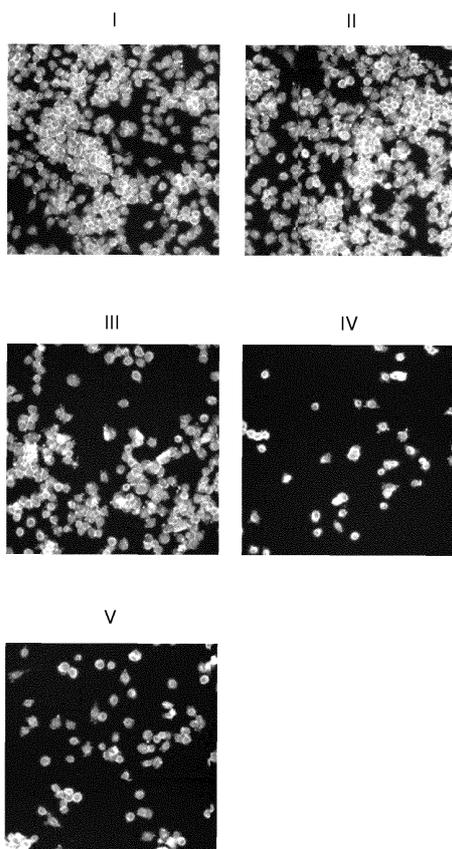
Фиг. 16



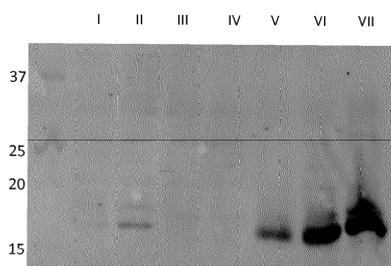
Фиг. 17



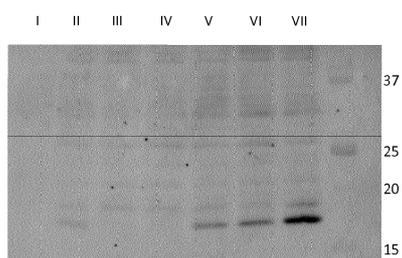
Фиг. 18



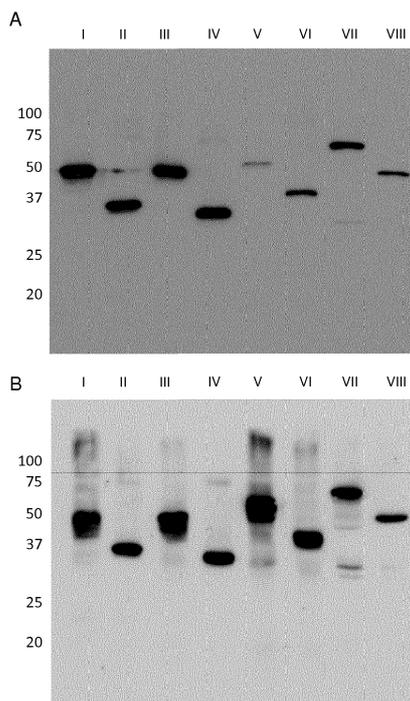
Фиг. 19



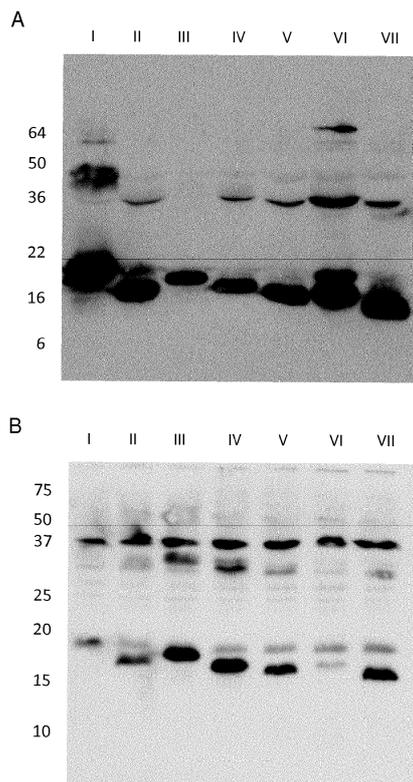
Фиг. 20



Фиг. 21

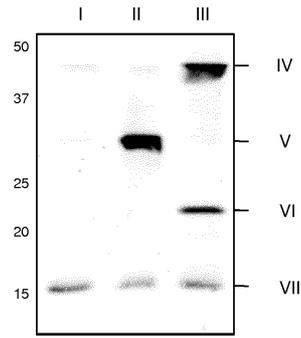


Фиг. 22

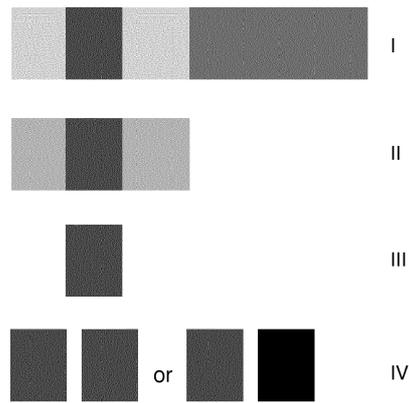


Фиг. 23

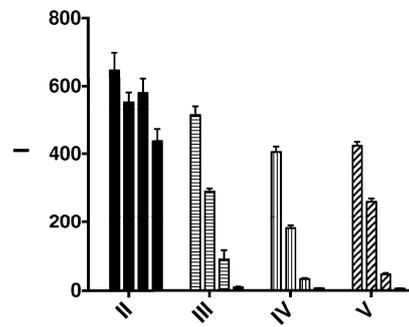
039922



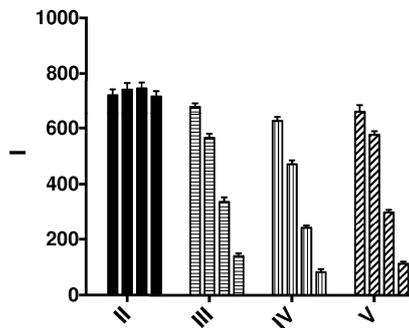
Фиг. 24



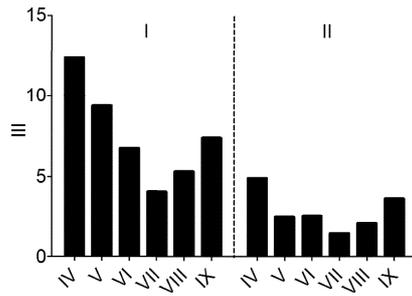
Фиг. 25



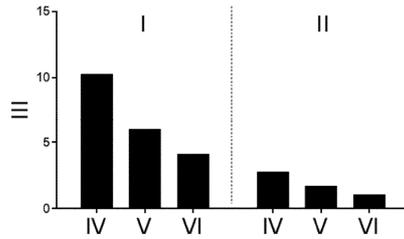
Фиг. 26



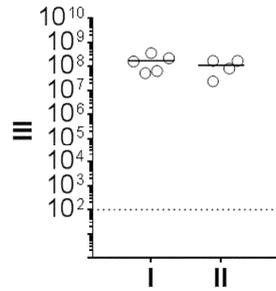
Фиг. 27



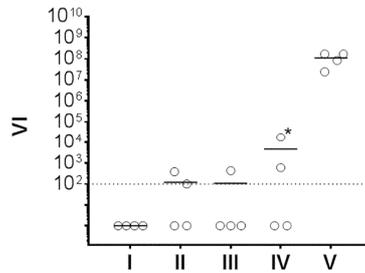
Фиг. 28



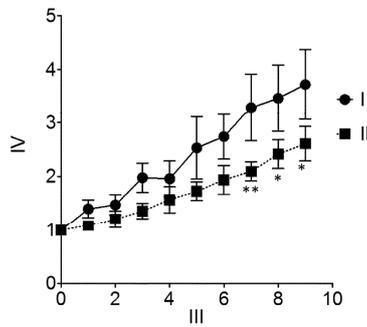
Фиг. 29



Фиг. 30

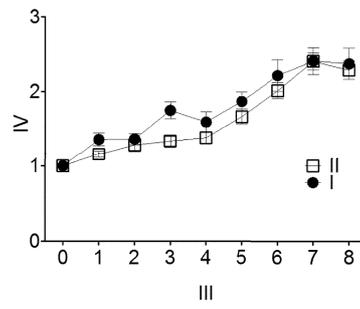


Фиг. 31



Фиг. 32

039922



Фиг. 33



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2

---