

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 041646

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.17

(21) Номер заявки
201692025

(22) Дата подачи заявки
2015.05.20

(51) Int. Cl. C07K 14/195 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

(54) ДОСТАВКА БЕЛКОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМАЯ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ

(31) 14169335.8

(32) 2014.05.21

(33) EP

(43) 2017.05.31

(86) PCT/EP2015/061086

(87) WO 2015/177197 2015.11.26

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

(72) Изобретатель:
Аррьемерлу Сесиль (FR), Иттиг
Симон (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A2-2008019183

US-A1-2008187520

WO-A2-0002996

ZHANG Y. 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 page 4323, right-hand column, paragraph 2 table 1

AHMED KAMAL ET AL.: "Apoptosis-inducing agents: a patent review (2010-2013)", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS, vol. 24, no. 3, 10 January 2014 (2014-01-10), pages 339-354, XP055173440, ISSN: 1354-3776, DOI: 10.1517/13543776.2014.877445 page 346, left-hand column, paragraph 2 - page 347, left-hand column, line 1

(57) Изобретение относится к рекомбинантному штамму грамотрицательных бактерий и его применению для доставки гетерологичных белков в эукариотические клетки.

041646 B1

041646 B1

041646 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным штаммам грамотрицательных бактерий и их применению для доставки гетерологичных белков внутрь эукариотических клеток.

Уровень техники

Методики временной (транзистентной) трансфекции в течение многих лет используются при исследованиях в области клеточной биологии для выяснения функций белков. Эти способы в целом приводят к несбалансированному увеличению присутствия изучаемого белка, которое может приводить к чересчур упрощенным моделям передачи сигнала в клетке [1]. В случае белков, контролируемых сигнальные процессы небольшой продолжительности, интересующий белок будет существовать намного дольше, чем сигнальное явление, которое он контролирует [2]. Более того, временная сверхэкспрессия с использованием трансфекции ДНК приводит к образованию гетерогенной и несинхронизированной популяции клеток, что затрудняет функциональные исследования и препятствует проведению интегральных исследований, так называемых "omics". Кроме этого, масштабирование подобных анализов до больших объемов очень затратно. Некоторые из упомянутых выше проблем решаются существующими техниками, такими как микроинъекция или протеофекция очищенными белками, стратегией индуцибельной транслокации для быстрого направления образуемых плазмидами ГТФаз к клеточной мембране [2] или добавление очищенных белков, слитых с проникающими в клетку токсинами бактерий [3]. Однако все данные техники являются затратными по времени и трудоемкими и, насколько известно, не одна из них не решает все упомянутые проблемы.

Бактерии в ходе эволюции приобрели различные механизмы, позволяющие напрямую инъецировать белки в клетки-мишени [4]. Система секреции 3-го типа (СС3Т; T3SS), используемая бактериями, такими как *Yersinia*, *Shigella* и *Salmonella* [5], действует как наношприц, который вводит так называемые эффекторный белки бактерий внутрь клеток-хозяев. Секретируемые СС3Т белки бактерий, называемые эффекторами, несут короткий сигнал секреции на N-конце [6]. Внутри бактерий некоторые эффекторы связаны шаперонами. Шапероны могут маскировать токсичные домены [7], они вносят вклад в экспозицию сигнала секреции [8, 9] и сохраняют субстраты в компетентной к секреции конформации [10], тем самым облегчая секрецию. В результате индукции секреции АТФаза, сопряженная с СС3Т, удаляет шапероны [11], и эффекторы перемещаются несвернутыми или только частично свернутыми через "иглу" [10] и снова сворачиваются, попав в цитоплазму клетки-хозяина.

Систему С3Т применяют для доставки гибридных пептидов и белков в клетки-мишени. Гетерологичные эффекторы СС3Т бактерий доставляли в случае, когда изучаемая бактерия с трудом поддается генетическим манипуляциям (например, *Chlamydia trachomatis* [12]). Часто осуществляли слияние репортерных белков с возможными сигналами секреции СС3Т, чтобы изучить требования для СС3Т-зависимой доставки белков, таких как аденилатциклаза *Bordetella pertussis* [13], дегидрофолатредуктаза мыши (ДФР) [10] или фосфорилируемая метка [14]. Доставку пептидов главным образом осуществляли с целью вакцинации. Такие пептиды включают вирусные эпитопы [15, 16], бактериальные эпитопы (листериолизин О [17]), а также пептиды, представляющие собой эпитопы опухолевых клеток человека [18]. В нескольких случаях осуществляли доставку функциональных эукариотических белков с целью модулирования работы клетки-хозяина, как это делали с нанотелами [19], ядерными белками (Срекомбиназа, MyoD) [20, 21] или интерлейкином-10 (IL10) и антагонистом рецептора интерлейкина-1 (IL1ra) [22]. Ни одна из упомянутых выше систем не позволяет осуществлять доставку единичного белка, так как в каждом случае дополнительно кодируются один или множество эндогенных эффекторных белков. Кроме того, применяемые векторы не были разработаны таким образом, чтобы обеспечивать возможность простого клонирования других фрагментов ДНК, кодирующих выбранные белки, что затрудняет широкое применение этой системы.

Таким образом, дешевый и простой способ, позволяющий осуществлять масштабируемую, быструю, синхронизируемую, гомогенную и регулируемую доставку интересующего белка в физиологических концентрациях, был бы очень полезным для множества клеточных биологов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится главным образом к рекомбинантным штаммам грамотрицательных бактерий и их применению для доставки гетерологичных белков в эукариотические клетки. Согласно настоящему изобретению предложены штаммы грамотрицательных бактерий и их применение, которое позволяет осуществлять транслокацию различных эффекторов III типа и также эффекторов IV типа, вирусных белков и, что наиболее важно, функциональных эукариотических белков. Предложены средства для флуоресцентного отслеживания доставки, релокализации в ядро и, в особенности, удаления производных бактерий (остатков бактериального происхождения) после доставки в клетку-хозяина. Это позволяет впервые осуществлять доставку практически нативных белков в эукариотическую клетку с использованием только СС3Т. Представленная система на основе СС3Т обеспечивает в результате масштабируемую, быструю, синхронизированную, гомогенную и регулируемую доставку интересующего белка. Система доставки согласно настоящему изобретению подходит для инъекции эукариотических белков живым животным и может быть применена для терапевтических целей.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному штамму грамотрицатель-

ных бактерий, выбранному из группы, состоящей из родов бактерий *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*, при этом указанный штамм грамотрицательных бактерий трансформирован вектором, который включает в направлении от 5'-конца к 3'-концу

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки, происходящий из эффекторного белка ССЗТ бактерий, функционально связанную с указанным промотором; и

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую по той же рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, при этом гетерологичный белок выбран из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному штамму грамотрицательных бактерий, трансформированному вектором, который включает в направлении от 5'-конца к 3'-концу

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки из эффекторного белка ССЗТ бактерий, функционально связанную с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую по той же рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК; и

третью последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой, при этом третья последовательность ДНК расположена между 3'-концом указанной первой последовательности ДНК и 5'-концом указанной второй последовательности ДНК.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному штамму грамотрицательных бактерий, при этом рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм бактерий *Yersinia*, и при этом указанный штамм *Yersinia* представляет собой дикий тип или штамм, дефицитный по выработке по меньшей мере одного эффекторного белка ССЗТ, и данный штамм трансформирован вектором, который включает в направлении от 5'-конца к 3'-концу

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий, при этом сигнал доставки из эффекторного белка ССЗТ бактерий включает 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE *Y. enterocolitica*, функционально связанную с указанным промотором; и

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую по той же рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному штамму грамотрицательных бактерий, при этом рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм бактерий *Salmonella*, и при этом указанный штамм *Salmonella* представляет собой дикий тип или штамм, дефицитный по выработке по меньшей мере одного эффекторного белка ССЗТ, и данный штамм трансформируют вектором, который включает в направлении от 5'-конца к 3'-концу

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки из эффекторного белка ССЗТ бактерий, при этом сигнал доставки из эффекторного белка ССЗТ бактерий включает эффекторный белок SteA *S. enterica* или 81 или 105 N-концевых аминокислот эффекторного белка SopE *S. enterica*, функционально связанную с указанным промотором; и

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, который включает в направлении от 5'-конца к 3'-концу

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки из эффекторного белка ССЗТ бактерий, функционально связанную с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК; и

третью последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой, при этом третья последовательность ДНК расположена между 3'-концом указанной первой последовательности ДНК и 5'-концом указанной второй последовательности ДНК.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу осуществления доставки гетерологичного белка внутрь эукариотической клетки, включающий следующие этапы:

i) культивирование штамма грамотрицательных бактерий; и

ii) приведение в контакт эукариотической клетки с штаммом грамотрицательных бактерий этапа i), при этом слитый белок, который включает сигнал доставки из эффекторного белка системы СЗТ и гетерологичный белок, экспрессируется штаммом грамотрицательных бактерий и происходит его транслокация внутрь эукариотической клетки.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу осуществления доставки гетерологич-

ного белка внутрь эукариотической клетки, включающему следующие этапы:

- i) культивирование штамма грамотрицательных бактерий;
- ii) приведение в контакт эукариотической клетки с штаммом грамотрицательных бактерий этапа i), при этом слитый белок, который включает сигнал доставки из эффекторного белка системы СЗТ и гетерологичный белок, экспрессируется штаммом грамотрицательных бактерий и происходит его транслокация внутрь эукариотической клетки; и
- iii) расщепление слитого белка, так что происходит отщепление гетерологичного белка от сигнала доставки от эффекторного белка системы СЗТ.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу очистки гетерологичного белка, включающему культивирование штамма грамотрицательных бактерий, так что слитый белок, который включает сигнал доставки из эффекторного белка системы СЗТ и гетерологичный белок, экспрессируется и секретируется в супернатант культуры клеток.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к библиотеке штаммов грамотрицательных бактерий, при этом гетерологичный белок, кодируемый второй последовательностью ДНК экспрессионного вектора штаммов грамотрицательных бактерий, представляет собой белок человека или мыши, и при этом каждый из белков человека или мыши, экспрессируемый штаммом грамотрицательных бактерий, отличается по аминокислотной последовательности.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - характеристика осуществляемой ССЗТ доставки белков. (А). Схематическое представление ССЗТ-зависимой секреции белков в окружающую питательную среду (секреция *in vitro*) (левая сторона) или внутрь эукариотических клеток (правая сторона). I показывает систему секреции 3 типа. II указывает на белки, секретируемые в окружающую питательную среду, III - белки, транслоцированные через мембрану в цитозоль эукариотических клеток (VII). VI показывает отрезок двух мембран бактерий, в которые вставлена ССЗТ, и цитозоль бактерий под ними. IV представляет собой слитый белок, присоединенный к N-концевому фрагменту YopE₁₋₁₃₈ (V). (B). Секреция *in vitro*: I: дикий тип *Y. enterocolitica* E40, II: штамм *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или III: штамм *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBadSi₂, как выявлено посредством вестерн-блоттингом тотальных лизатов бактерий (IV) и преципитированных культуральных супернатантов (V) с использованием анти-YopE антитела.

Фиг. 2 - характеристика осуществляемой ССЗТ доставки белков в эпителиальные клетки. (А). Анти-Мус-иммунофлуоресцентное окрашивание, проведенное на клетках HeLa, которые инфицировали при множественности заражения (МОИ) 100 в течение 1 ч штаммами I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2. (B). Количественное определение интенсивности анти-Мус-иммунофлуоресцентного окрашивания антителами на (А) внутри клеток HeLa. Данные объединяли от n=20 сайтов, указанные планки погрешности представляют собой стандартное отклонение среднего значения. I: неинфицированные клетки, II: инфицирование штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или III: инфицирование штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2. Ось y обозначает интенсивность анти-Мус-окрашивания [условные единицы], ось x обозначает время инфицирования в минутах. (C). Количественное определение интенсивности анти-Мус-иммунофлуоресцентного окрашивания внутри клеток. Клетки HeLa инфицировали в течение 1 ч штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2 при МОИ, обозначенном на оси x. Данные объединяли от n=20 сайтов, указанные планки погрешности представляют собой стандартное отклонение среднего значения. Ось y обозначает интенсивность анти-Мус-окрашивания [условные единицы (y.e.)].

Фиг. 3 - модификации доставки белков, осуществляемой на основе ССЗТ, позволяют проводить локализацию в ядре слитого белка YopE₁₋₁₃₈ (с помощью EGFP). Сигнал усиленного зеленого флуоресцентного белка (УЗФБ, EGFP) в клетках HeLa, инфицированных штаммом I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd ΔyopB, несущим плазмиды III: +YopE₁₋₁₃₈-УЗФБ или IV: +YopE₁₋₁₃₈-УЗФБ-NLS при МОИ 100. Сигнал УЗФБ показан на "a", для сравнения локализации на "b" окрашивали ядра.

Фиг. 4 - модификации доставки белков, осуществляемой на основе ССЗТ, позволяют удалять остатки YopE₁₋₁₃₈. Клетки HeLa инфицируют двумя разными штаммами *Y. enterocolitica* в одно и то же время, чего достигают простым смешиванием двух суспензий бактерий. Один штамм доставляет протеазу вируса гравировки табака (TEV), слияние которой осуществили с YopE₁₋₁₃₈, тогда как другой штамм доставляет интересующий белок, слитый с YopE₁₋₁₃₈ с помощью линкера, содержащего двойной сайт расщепления протеазой TEV. После доставки белка внутрь эукариотической клетки протеаза TEV отщепит остаток YopE₁₋₁₃₈ от интересующего белка. (А). Лизированные дигитонином клетки HeLa, неинфицированные (II) или после инфицирования (МОИ 100) в течение 2 ч штаммом I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и III: + pBadSi₂, IV: +YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4C, V: +YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4C и дополнительной обработкой в течение ночи очищенной протеазой TEV и VI: +YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4C и вторым штаммом +YopE₁₋₁₃₈-протеаза TEV, анализировали вестерн-блоттингом с анти-INK4C антителом (показано на "a") на наличие YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4C или его расщепленной формы

Flag-INK4C. В качестве контроля нанесения проводили вестерн-блоттинг с анти-актин антителом (показано на "b"). В одном случае (V) лизированные клетки инкубировали в течение ночи с очищенной протеазой TEV. (B). Нормализованное по актину количественное определение интенсивности анти-INK4C-окрашивания (показано как [у.е.] на оси y) на (A) по размеру полноразмерного YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4C, где образец IV принят за 100%. I: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd и IV: +YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4C, V: +YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4C и дополнительная обработка в течение ночи очищенной протеазой TEV и VI: +YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4C и вторым штаммом + YopE₁₋₁₃₈-протеаза TEV. Данные объединяли от n=2 независимых экспериментов, указанные планки погрешности представляют собой стандартное отклонение среднего значения. (C). Лизированные дигитонином клетки HeLa неинфицированные (II) или после инфицирования (MOI 100) в течение 2 ч штаммом I: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd и III: + pBadSi₂, IV: + YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-ET1-Мус, V: + YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-ET1-Мус и дополнительная в течение ночи обработка очищенной протеазой TEV и VI: + YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-ET1-Мус и вторым штаммом + YopE₁₋₁₃₈-протеаза TEV, анализировали вестерн-блоттингом с анти-Мус-антителом (показано на "a") на наличие YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-ET1-Мус или его расщепленной формы ET1-Мус. В качестве контроля нанесения осуществляли вестерн-блоттинг с анти-актин антителом (показано на "b"). В одном случае (V) лизированные клетки инкубировали в течение ночи с очищенной протеазой TEV.

Фиг. 5 - доставка эффекторных белков бактерий внутрь эукариотических клеток. (A). Клетки HeLa инфицировали штаммом I: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd, несущим II: pBad_Si2 или III: YopE₁₋₁₃₈-SopE, при MOI 100 в течение времени, указанного сверху над изображениями (2, 10 или 60 мин). После фиксации у клеток окрашивали актиновый цитоскелет. (B). Клетки HeLa оставляли неинфицированными (II) или инфицировали штаммом I: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd, несущим III: YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус, и в некоторых случаях коинфицировали IV: YopE₁₋₁₃₈-SptP при MOI, указанной ниже штамма (MOI 50; MOI 50:MOI 50 или MOI 50:MOI 100) в течение 1 ч. После фиксации у клеток окрашивали актиновый цитоскелет (показано на "a") и отслеживали наличие слитого белка YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус посредством окрашивания анти-Мус-антителом (показано на "b").

Фиг. 6 - доставка эффекторных белков бактерий внутрь эукариотических клеток. (A). Анализ фосфо-p38 ("a"), общего белка p38 ("b") и актина ("c") с помощью вестерн-блоттинга, проводимый на клетках HeLa, которые оставляли необработанными (II) или инфицировали в течение 75 мин при MOI 100 штаммом I: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd, несущим III: pBad_Si2 или IV: YopE₁₋₁₃₈-OspF. Клетки стимулировали фактором некроза опухолей альфа (ФНО-α, TNFα), в течение последних 30 мин инфицирования, как указано ("+" обозначает добавление ФНО-α, "-" обозначает отсутствие обработки ФНО-α). (B). Анализ фосфо-Akt T308 ("a"), и S473 ("b"), и актина ("c") с помощью вестерн-блоттинга, проведенного на клетках HeLa, которые оставляли неинфицированными (II) или инфицировали в течение 22,5 или 45 мин (указано внизу под блотами) при MOI 100 штаммом I: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd, несущим III: pBad_Si2, IV: YopE₁₋₁₃₈-SopE или V: YopE₁₋₁₃₈-SopB. (C). Уровни цАМФ (в фмоль/лунка, показаны на оси y) в клетках HeLa, которые оставляли необработанными (I) или инфицировали в течение 2,5 ч при MOI 100 штаммом V: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-BepA, VI: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-BepA_{E305-end}, VII: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-BepGBid или VIII: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2. Холерный токсин (ХТ) добавляли на 1 ч в качестве положительного контроля к образцам II (1 мкг/мл), III (25 мкг/мл) или IV (50 мкг/мл). Данные объединяли от n=3 независимых экспериментов, указанные планки погрешности представляют собой стандартное отклонение среднего значения. Статистический анализ выполняли с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента ("нз" обозначает незначительное изменение, ** обозначает p-значение <0,01, *** обозначает p-значение <0,001).

Фиг. 7 - доставка белка tBid человека внутрь эукариотических клеток индуцирует масштабный апоптоз. (A). Анализ субъединицы p17 расщепленной каспазы 3 ("a") и актина ("b") с помощью вестерн-блоттинга, проведенного на клетках HeLa, которые оставляли необработанными (II) или инфицировали в течение 60 мин при MOI 100 штаммом I: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd, несущим III: pBad_Si2, IV: YopE₁₋₁₃₈-Bid или V: YopE₁₋₁₃₈-t-Bid. В некоторых случаях клетки обрабатывали VI: 0,5 мкМ стауроспорина или VII: 1 мкМ стауроспорина. (B). Лизированные дигитонином клетки HeLa, оставленные необработанными (II), или после инфицирования в течение 1 ч при MOI 100 штаммом I: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd, несущим III: pBad_Si2, IV: YopE₁₋₁₃₈-Bid или V: YopE₁₋₁₃₈-t-Bid, анализировали вестерн-блоттингом с анти-Bid антителом ("a"), что позволяет сравнить уровни эндогенного Bid (отмечены "Z") с уровнями транслоцированного YopE₁₋₁₃₈-Bid (отмечены "X") или YopE₁₋₁₃₈-tBid (отмечены "Y"). В качестве контроля нанесения выполняли вестерн-блоттинг с анти-актин антителом (показано на "b"). В некоторых случаях клетки обрабатывали VI: 0,5 мкМ стауроспорина или VII: 1 мкМ стауроспорина. (C). Клетки HeLa оставляли необработанными (I) или инфицировали при MOI 100 в течение 1 ч штаммом II: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2, III: Y. enterocolitica ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-Bid, IV: Y. en-

terocolitica ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-tBid. В некоторых случаях клетки обрабатывали V: 0,5 мкМ стауропорина или VI: 1 мкМ стауропорина. После фиксирования у клеток окрашивали актиновый цитоскелет (серый цвет).

Фиг. 8 - ССЗТ-зависимая доставка белка ВІМ данио индуцирует апоптоз в эмбрионах данио. (А). Эмбрионы данио спустя 2 дня после оплодотворения инфицировали экспрессирующим УЗФБ контрольным штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si1 (I) или транслоцирующим zВІМ штаммом (II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-zВІМ) посредством инъекции приблизительно 400 бактерий внутрь области заднего мозга. Спустя 5,5 ч эмбрионы фиксировали, проводили окрашивание активированной каспазы 3 (расщепленная каспаза 3, субъединица p17; показано на "с") и анализировали на наличие бактерий (сигнал УЗФБ, показано на "b"). Показана максимальная интенсивность проекций по оси z для флуоресцентных изображений. Светлополюсная проекция по оси z показана на "a". (В). Автоматизированный анализ изображений по максимуму интенсивности проекций по оси z зарегистрированных изображений z-стеков из (А). Вкратце, бактерии обнаруживали через канал зеленого флуоресцентного белка (GFP-канал). Около каждой области пятна бактерий создавали окружность с радиусом 10 пикселей. Перекрывающиеся участки разделяли поровну среди контактирующих членов. В этих областях, плотно окружающих бактерии, измеряли интенсивность окрашивания субъединицы p17 каспазы 3 и откладывали ее на ось y (как [y.e.]). Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна-Уитни (***) обозначает р-значение <0,001). Данные объединяли от n=14 в случае контрольного штамма *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si1 (I) или от n=19 в случае животных, инфицированных II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-zВІМ, планки погрешности представляют собой стандартное отклонение среднего значения.

Фиг. 9 - tBid-зависимый фосфопротеом. Клетки HeLa инфицировали в течение 30 мин штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-tBid при MOI 100 и в качестве контроля инфицировали штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2. (А). Графическое представление фосфопротеомы tBid. Белки, содержащие фосфопептиды, которые в значительной степени регулировались tBid-зависимым способом (серый цвет) (q-значение <0,01), а также связанные с апоптозом известные белки (темно-серый цвет), представлены согласно данным базы STRING в виде сети известных и предполагаемых белок-белковых взаимодействий (высокая достоверность, значение 0,7). Представлены только белки по меньшей мере с одной связью в STRING. (В). Конфокальные изображения клеток HeLa, инфицированных либо штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2 (I), либо штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-tBid (II), демонстрируют индукцию апоптотического фенотипа в результате доставки tBid. У клеток окрашивали ядра красителем Хехст ("a"), F-актин красителем фаллоидином ("b"), тубулин антителами против тубулина ("c") и митохондрии митотрекером ("d"). Масштабная шкала соответствует 40 мкм.

Фиг. 10 - описание доставки, осуществляемой на основе инструментов секреции III типа. (А). Карты векторов клонирующих плазмид pBad_Si1 и pBad_Si2, применяемых для получения конструкций, слитых с YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и YopE₁₋₁₃₈-гибрид находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*. Две плазмиды различаются только по наличию индуцируемого арабинозой УЗФБ, присутствующего на плазмиде pBad_Si1. (В). Сайт множественного клонирования идет сразу за фрагментом YopE₁₋₁₃₈ на плаزمиде pBad_Si1 и pBad_Si2.

Фиг. 11 - характеристика осуществляемой ССЗТ доставки белка в различные линии клеток. Анти-Мус-иммунофлуоресцентное окрашивание, проведенное на фибробластах Swiss 3T3 ("a"), клетках Jurkat ("b") и клетках HUVEC ("c"), которые оставили необработанными (II) или инфицировали штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2 (I) при MOI, указанной сверху над изображениями (MOI 25, 50, 100, 200 и 400 для клеток HUVEC), в течение 1 ч.

Фиг. 12 - зависимость системы СЗТ от доставки эффекторных белков бактерий внутрь эукариотической клетки. Лизированные дигитонином клетки HeLa после инфицирования при MOI 100 в течение времени, указанного сверху над блотами (0, 5, 15, 10, 60 и 120 мин), штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd ΔyopB + YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус (I) или *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус (II) анализировали вестерн-блоттингом с анти-Мус-антителом. Размер, соответствующий YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус, обозначен "a", тогда как размер эндогенного белка с-Мус обозначен "b".

Фиг. 13 и 14 - ССЗТ-зависимая секреция различных других белков в культуральный супернатант. Эксперимент по секреции in vitro со штаммом I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈, слитого с белком, как указано. Содержание белка в тотальных лизатах бактерий ("А") и в преципитированных культуральных супернатантах ("В") анализировали вестерн-блоттингом с использованием анти-YopE антитела. Написанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 15А до 15М - штаммы *Y. enterocolitica* и *S. enterica*, использованные в данном исследовании. Перечень штаммов *Y. enterocolitica* и *S. enterica*, использованных в данном исследовании, предоставляющий информацию о фоновых штаммах, плазмиде и белках для ССЗТ-зависимой доставки, закодированных на соответствующих плазмиде. Дополнительно предоставлена информация об олигонуклеотидах, использованных для конструирования соответствующей плазмиды, плазмиде-основе и устойчиво-

стям к антибиотикам.

Фиг. 16 - доставка белка мыши tBid, BH3-части белка мыши Bid и BH3-части белка мыши Bax в клетки B16F10 индуцирует масштабный апоптоз. Клетки B16F10, неинфицированные (I) или после инфекции (MOI 50) в течение 2,5 ч штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: + pBadSi_2, III: +YopE₁₋₁₃₈-кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* tBid мыши, IV: + YopE₁₋₁₃₈-(кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* Bid мыши, BH3-часть) или V: + YopE₁₋₁₃₈- (кодон-оптимизированная для *Y. enterocolitica* Bax мыши, BH3-часть). После фиксирования у клеток окрашивали актиновый цитоскелет и ядра (оба серым цветом).

Фиг. 17 - доставка белка мыши tBid, BH3-части белка мыши Bid и BH3-части белка мыши Bax в клетки D2A1 индуцирует масштабный апоптоз. Клетки D2A1, неинфицированные (I) или после инфекции (MOI 50) в течение 2,5 ч штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: + pBadSi_2, III: + YopE₁₋₁₃₈-кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* tBid мыши, IV: + YopE₁₋₁₃₈-(кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* Bid мыши, BH3-часть) или V: + YopE₁₋₁₃₈-(кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* Bax мыши, BH3-часть). После фиксирования у клеток окрашивали актиновый цитоскелет и ядра (оба серым цветом).

Фиг. 18 - доставка белка мыши tBid, BH3-части белка мыши Bid и BH3-части белка мыши Bax в клетки HeLa индуцирует масштабный апоптоз. Клетки HeLa, неинфицированные (I) или после инфекции (MOI 50) в течение 2,5 ч штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: + pBadSi_2, III: + YopE₁₋₁₃₈-кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* tBid мыши, IV: + YopE₁₋₁₃₈-(кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* Bid мыши, BH3-часть) или V: + YopE₁₋₁₃₈-(кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* Bax мыши, BH3-часть). После фиксирования у клеток окрашивали актиновый цитоскелет и ядра (оба серым цветом).

Фиг. 19 - доставка белка мыши tBid, BH3-части белка мыши Bid и BH3-части белка мыши Bax в клетки 4T1 индуцирует масштабный апоптоз. Клетки 4T1, неинфицированные (I) или после инфекции (MOI 50) в течение 2,5 ч штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: + pBadSi_2, III: + YopE₁₋₁₃₈-кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* tBid мыши, IV: + YopE₁₋₁₃₈-(кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* Bid мыши, BH3-часть) или V: + YopE₁₋₁₃₈-(кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica* Bax мыши, BH3-часть). После фиксирования у клеток окрашивали актиновый цитоскелет и ядра (оба серым цветом).

Фиг. 20 - доставка tBid мыши бактериями *S. enterica*, выращенными в условиях, индуцирующих SPI-1 системы СЗТ, внутрь эукариотических клеток индуцирует апоптоз. Анализ субъединицы p17 расщепленной каспазы 3 с помощью вестерн-блоттинга, проведенного на клетках HeLa, которые оставляли необработанными (I) или инфицировали в течение 4 ч при MOI 100 штаммом III: *S. enterica* aroA, несущим IV: SteA₁₋₂₀-t-Bid, V: SteA_{FL}-Bid, VI: SopE₁₋₈₁-t-Bid или VII: SopE₁₋₁₀₅-t-Bid. Для этого эксперимента все штаммы *S. enterica* aroA выращивали в условиях, индуцирующих SPI-1 системы СЗТ. В некоторых случаях клетки обрабатывали II: 1 мкМ стауроспорина. Написанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 21 - доставка белка мыши tBid бактериями *S. enterica*, выращенными в условиях, индуцирующих SPI-2 системы СЗТ, внутрь эукариотических клеток индуцирует апоптоз. Анализ субъединицы p17 расщепленной каспазы 3 с помощью вестерн-блоттинга, проведенного на клетках HeLa, которые оставляли необработанными (I) или инфицировали в течение 4 ч при MOI 100 штаммом III: *S. enterica* aroA, несущим IV: SteA₁₋₂₀-t-Bid, V: SteA_{FL}-Bid, VI: SopE₁₋₈₁-t-Bid или VII: SopE₁₋₁₀₅-t-Bid. Для этого эксперимента все штаммы *S. enterica* aroA выращивали в условиях, индуцирующих SPI-2 системы СЗТ. В некоторых случаях клетки обрабатывали II: 1 мкМ стауроспорина. Написанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 22 - ССЗТ-зависимая секреция бактериями *S. enterica* различных белков клеточного цикла в культуральный супернатант. Эксперимент по секреции *in vitro* бактериями *S. enterica* aroA + SteA_{FL} (I, III, V, VII) или + SopE₁₋₁₀₅ (II, IV, VI, VIII), слитыми со следующими перечисленными белками: I и II: Ink4a-MycHis; III и IV: Ink4c-MycHis; V и VI: Mad2-MycHis; VII и VIII: Cdk1-MycHis. Содержание белка в преципитированных культуральных супернатантах ("А") и тотальных лизатах бактерий и ("В") анализировали вестерн-блоттингом с использованием анти-Мус антитела. Написанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 23 - ССЗТ-зависимая секреция различных известных нарушающих клеточный цикл пептидов в культуральный супернатант. Эксперимент по секреции *in vitro* со штаммом I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + pBad_Si2. II-VII: штамм *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈, слитый со следующими перечисленными пептидами: II: Ink4A₈₄₋₁₀₃; III: p107/RBL1₆₅₇₋₆₆₂; IV: p21_{141-160D149A}; V: p21_{145-160D149A}; VI: p21₁₇₋₃₃; VII: циклин D2₁₃₉₋₁₄₇. Содержание белка в преципитированных культуральных супернатантах ("А") и тотальных лизатах бактерий и ("В") анализировали вестерн-блоттингом с использованием анти-YopE антитела. Написанные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 24 - слияние доставляемого ССЗТ белка с убиквитином позволяет удалять остаток YopE₁₋₁₃₈. Клетки HeLa инфицируют штаммом, доставляющим интересующий белок, слияние которого осуществи-

ли с YopE₁₋₁₃₈, напрямую слитым с убиквитином (YopE₁₋₁₃₈-Ubi). После доставки белка внутрь эукариотической клетки эндогенные убиквитин-специфические протеазы отщепляют остаток YopE₁₋₁₃₈-Ubi от интересующего белка. Лизированные дигитонином клетки HeLa, неинфицированные (I) или после инфекции (MOI 100) в течение 1 ч штаммом II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-MycHis или III: + YopE₁₋₁₃₈-Flag-убиквитин-INK4C-MycHis анализировали вестерн-блоттингом с анти-INK4C антителом на наличие IV: YopE₁₋₁₃₈-Flag-убиквитин-INK4C-MycHis или V: YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-MycHis, расщепленной формы VI: INK4C-MycHis и VII: эндогенного INK4C.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий и их применение для доставки гетерологичных белков внутрь эукариотических клеток.

Для целей интерпретации данного описания настоящего изобретения будут применяться следующие определения и в подходящих случаях термины, используемые в единственном числе, также будут включать формы множественного числа и наоборот. Следует понимать, что терминология, используемая в настоящей заявке, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не подразумевает наложение ограничений.

Термин "штамм грамотрицательных бактерий", используемый в настоящей заявке, включает следующие бактерии: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia 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*, *Photobacterium luminescens*, *Photobacterium temperate*, *Pseudoalteromonas spongiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium* sp, *Salmonella enterica* и другие виды *Salmonella*, *Shigella flexneri* и другие виды *Shigella*, *Sodalis glossinidius*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio caribbenthicus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio tubiashii*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*. Предпочитаемые штаммы грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению представляют собой штаммы грамотрицательных бактерий, входящие в семейство Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae. Штамм грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению обычно применяют для доставки гетерологичных белков системой СЗТ бактерий внутрь эукариотических клеток *in vitro* и *in vivo*.

Термин "рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий", используемый в настоящей заявке, относится к штамму грамотрицательных бактерий, генетически трансформированному с помощью вектора. Подходящий вектор согласно настоящему изобретению представляет собой, например, экспрессионный вектор, вектор для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности или фрагмент ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности.

Термины "штамм грамотрицательных бактерий, дефицитный по выработке аминокислоты, необходимой для роста" и "ауксотрофный мутант" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к штаммам грамотрицательных бактерий, которые не могут расти при отсутствии по меньшей мере одной поступающей экзогенно жизненно необходимой аминокислоты или ее предшественника. Аминокислота, по выработке которой штамм является дефицитным, представляет собой, например, аспартат, мезо-2,6-диаминопимелиновую кислоту, ароматические аминокислоты или лейцин-аргинин [23]. Подобный штамм можно получить, например, удалением гена аспартат-β-полуальдегиддегидрогеназы (Aasd). Подобный ауксотрофный мутант не может расти при отсутствии экзогенной мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты [24]. Мутация, например, удаление гена аспартат-β-полуальдегиддегидрогеназы, являются предпочтительной в настоящей заявке для штамма грамотрицательных бактерий, дефицитного по выработке аминокислоты, необходимой для роста, согласно настоящему изобретению.

Термин "штамм грамотрицательных бактерий, дефицитный по выработке адгезивных белков, связывающихся с поверхностью эукариотической клетки или внеклеточным матриксом" относится к мутантным штаммам грамотрицательных бактерий, которые не экспрессируют по меньшей мере один адгезивный белок по сравнению с адгезивными белками, экспрессируемыми соответствующим штаммом дикого типа. Адгезивные белки могут включать, например, протяженные полимерные адгезивные молекулы, как пили/фимбрии или нефимбриальные адгезины. Фимбриальные адгезины включают пили 1 типа (такие как Fim-пили *E. coli* с адгезином FimH), Р-пили (такие как Pap-пили с адгезином PapG от *E. coli*), пили 4 типа (как белок пилин, например, от *P. aeruginosa*) или курли (белки Csg с адгезином CsgA от *S. enterica*). Нефимбриальные адгезивные белки включают тримерные автотранспортные адгезины, такие как YadA от *Y. enterocolitica*, BpaA (*B. pseudomallei*), Hia (*H. influenzae*), BadA (*B. henselae*), NadA (*N. meningitidis*) или UspA1 (*M. catarrhalis*), а также другие автотранспортные адгезины, такие как AIDA-1

(*E. coli*), а также другие адгезины/инвазины, такие как InvA от *Y. enterocolitica* или интимин (*E. coli*) или члены семейства Dg или семейства Afa (*E. coli*). Термины "YadA" и "InvA", используемые в настоящей заявке, относятся к белкам от *Y. enterocolitica*. Автотранспортный белок YadA [25, 26] связывается с различными формами коллагена, а также фибронектина, тогда как инвазии InvA [27-29] связывается с β -интегринами в мембране эукариотической клетки. Если штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Y. enterocolitica*, предпочтительно, чтобы штамм был дефицитным по InvA и/или YadA.

Используемый в настоящей заявке термин "семейство Enterobacteriaceae" включает семейство грамотрицательных палочковидных факультативно анаэробных бактерий, обнаруживаемых в почве, воде, растениях и животных, которые часто встречаются как патогены у позвоночных. Бактерии из этого семейства имеют схожую физиологию и демонстрируют консервативность в пределах функциональных элементов и генов соответствующих геномов. Наравне с тем, что они являются оксидаз-отрицательными, все члены данного семейства ферментируют глюкозу и большая часть являются нитратвосстановителями.

Бактерии Enterobacteriaceae согласно настоящему изобретению могут быть любыми бактериями из этого семейства и конкретно включают бактерии следующих родов: *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Morganella*, *Providencia* или *Yersinia*, но не ограничиваются только ими. В более конкретных вариантах реализации бактерия представляет собой бактерию вида *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *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 штамм грамотрицательных бактерий выбран 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*.

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

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

Термин "промотор", используемый в настоящей заявке, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию единицы транскрипции. "Промоторная область" представляет собой регуляторную область, способную связывать РНК-полимеразу в клетке и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности, расположенной по ходу транскрипции (в 3'-направлении). Внутри промоторной области обнаруживают сайт инициации транскрипции (удобно определенный картированием с использованием нуклеазы S1), а также белок-связывающие домены (консенсусные последовательности), ответственные за связывание РНК-полимеразы, такие как предполагаемая -35-область и бокс Прибова.

Термин "функционально связанный" при описании взаимоотношений между двумя областями ДНК просто означает, что они функционально связаны друг с другом, и они расположены на одном и том же фрагменте нуклеиновой кислоты. Промотор функционально связан со структурным геном, если он контролирует транскрипцию гена и расположен на том же самом фрагменте нуклеиновой кислоты, как и ген. Как правило, промотор является функциональным в указанном штамме грамотрицательных бактерий, т.е. промотор способен осуществлять экспрессию слитого белка согласно настоящему изобретению, т.е. промотор способен осуществлять экспрессию слитого белка согласно настоящему изобретению без дополнительного вмешательства генной инженерии или экспрессии дополнительных белков. Кроме того, функциональный промотор не должен быть естественным антагонистом по отношению к системе СЗТ бактерий.

Термин "доставка", используемый в настоящей заявке, относится к транспортированию белка из рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий в эукариотическую клетку, включая стадии экспрессирования гетерологичного белка в рекомбинантном штамме грамотрицательных бактерий, секретирования экспрессированного белка (белков) из указанного штамма грамотрицательных бактерий и транслокации секретированного белка (белков) указанным штаммом грамотрицательных бактерий внутрь цитозоля эукариотической клетки. Соответственно, термины "сигнал доставки" или "сигнал секреции", которые используются взаимозаменяемо в настоящей заявке, относятся к полипептидной последовательности, которая может быть распознана системой секреции или транслокации штамма грамотрицательных бактерий и которая направляет доставку белка из штамма грамотрицательных бактерий в эукариотические клетки.

Используемый в настоящей заявке термин "секреция" белка относится к транспортированию гетерологического белка наружу через клеточную мембрану рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий. Термин "транслокация" белка относится к транспортировке гетерологического белка из рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий через плазматическую мембрану эукариотической клетки внутрь цитозоля указанной эукариотической клетки.

Термин "эукариотические клетки", используемый в настоящей заявке, включает, например, следующие эукариотические клетки: клетки Hi-5, HeLa, Hek, клетки HUVEC, 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 гепатоциты человека. Термин "эукариотические клетки", используемый в настоящей заявке, также относится к "клеткам-мишеням" или "эукариотическим клеткам-мишеням".

Термин "эффекторный белок системы C3T", используемый в настоящей заявке, относится к белкам, инъецируемым в природных условиях C3T-системами внутрь цитозоля эукариотических клеток, и к белкам, секретируемым в природных условиях C3T-системами, которые могут, например, формировать транслоцирующую пору в эукариотической мембране (включая порообразующие белки-транслокаторы (как YopB и YopD *Yersinia*) и белки кончика иглы, как LcrV *Yersinia*). Предпочтительно применяют белки, инъецируемые C3T-системами в природных условиях внутрь цитозоля эукариотических клеток. Эти факторы вирулентности будут парализовывать или перепрограммировать эукариотическую клетку с пользой для патогенна. Эффекторы C3T-системы демонстрируют широкий спектр биохимических активностей и модулируют функцию ключевых регуляторных молекул клетки-хозяина [5, 30] 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, IpaH9.8, 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 системы C3T бактерий *Yersinia* клонировали, например, из *Y. enterocolitica*, они представляют собой гены YopE, YopH, YopM, YopO, YopP/YopJ и YopT [31]. Соответствующие эффекторные гены можно клонировать 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 этих генов доступны специалистам в данной области техники, например, в базе данных Genbank (yopH, yopO, yopE, yopP, yopM, yopT из NC_002120 GI:10955536; эффекторные белки *S. flexneri* из AF386526.1 GI:18462515; эффекторы *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 *F. coli* из NC_011601.1 GI:215485161).

Для целей настоящего изобретения гены обозначены строчными буквами и выделены курсивом, чтобы отличать их от белков. В случае, когда гены (обозначенные строчными буквами и выделенные курсивом) идут за названием вида бактерий (как *E. coli*), они относятся к мутации соответствующего гена в соответствующем виде бактерий. Например, YopE относится к эффекторному белку, кодируемому геном yopE. *Y. enterocolitica* yopE обозначает бактерию *Y. enterocolitica*, имеющую мутацию в гене yopE.

Используемые в настоящей заявке термины "полипептид", "пептид", "белок", "полипептидный" и "пептидный" используются взаимозаменяемо для обозначения серии аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями между α -аминогруппой и карбоксильной группой смежных остатков. Предпочтительными являются белки, которые имеют аминокислотную последовательность, включающую по меньшей мере 10 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот.

Согласно настоящему изобретению термин "гетерологичный белок" включает встречающиеся в природе белки или их части, а также включает искусственно генетически сконструированные белки или их части. Используемый в настоящей заявке термин "гетерологичный белок" относится к белку или его части, кроме эффекторного белка системы C3T или его N-концевого фрагмента, с которым можно осуществить его слияние. В частности, термин "гетерологичный белок", используемый в настоящей заявке,

относится к белку или его части, которая не принадлежит протеому, т.е. целому природному набору белков специфического рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, предложенного и применяемого согласно настоящему изобретению, например, которая не принадлежит протеому, т.е. целому природному набору белков специфического штамма бактерий родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*. Как правило, гетерологичный белок имеет животное происхождение, включая человеческое происхождение. Предпочтительно гетерологичный белок представляет собой белок человека. Более предпочтительно гетерологичный белок выбран из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков клеточной сигнализации, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, GPCR-связанных белков (GPCR - рецептор, связанный с G-белком), конструкций, слитых с нанотелами, и нанотел, эффекторов системы СЗТ бактерий, эффекторов системы секреции 4-го типа (СС4Т) бактерий и вирусных белков. Особенно предпочтительно, чтобы гетерологичный белок выбирали из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, малых ГТФаз, GPCR-связанных белков, конструкций, слитых с нанотелами, эффекторов системы СЗТ бактерий, эффекторов СС4Т бактерий (система секреции 4-го типа) и вирусных белков. Более этого еще предпочтительны гетерологичные белки, выбранные из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла и белков с анкириновыми повторами. Наиболее предпочтительными являются белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, такие как животные, предпочтительно гетерологичные белки человека, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза.

В некоторых вариантах реализации вектор штамма грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению включает две вторые последовательности ДНК, кодирующие идентичные гетерологичные белки или два разных гетерологичных белка, слитых независимо друг от друга в рамках считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК. В некоторых вариантах реализации вектор штамма грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению включает три вторые последовательности ДНК, кодирующие идентичные гетерологичные белки или три разных гетерологичных белка, слитых независимо друг от друга в рамках считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК.

Гетерологичный белок, экспрессируемый рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий, как правило, имеет молекулярную массу от 1 до 150 кДа, предпочтительно от 1 до 120 кДа, более предпочтительно от 1 до 100 кДа, наиболее предпочтительно от 15 до 100 кДа.

Согласно настоящему изобретению "белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза" включают белки Bad, Bcl2, Bak, Bmt, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Araf1, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 10, DFFA (фактор фрагментации ДНК субъединица α), DFFB (фактор фрагментации ДНК субъединица β), ROCK1 (Rho-связанная протеинкиназа 1), APP (белок-предшественник амилоида), CAD (активируемая каспазами ДНКазы), ICAD (ингибитор активируемой каспазами ДНКазы), CAD, EndoG, AIF, HtrA2, Smac/Diablo, Arts, ATM (мутантная при атаксии-телеангиэктазии протеинкиназа), ATR (ATM-родственная киназа), Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), семейство IAP (белок ингибитор апоптоза), LC8 (легкая цепь 1 динеина), PP2B (протеинфосфатаза 2B), белки 14-3-3, PKA (протеинкиназа A), PKC (протеинкиназа C), PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа), Erk1/2, p90RSK, TRAF2 (ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли (TNFRF) фактор 2), TRADD (белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFR1-рецептора), FADD (белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора), Daxx, каспазу 8, каспазу 2, RIP (белок, взаимодействующий с рецепторами), RAIDD (RIP-ассоциированный гомологичный Ich-1/Ced-3 белок, содержащий домен смерти), MKK7 (митоген-активируемая протеинкиназа-киназа 7), JNK (киназа N-концевой части белка c-Jun), FLIP (ингибирующий FLICE (FADD-подобный интерлейкин-1 β -превращающий фермент) белок), FKHR (фактор транскрипции семейства forkhead), GSK3 (киназа 3 гликогенсинтазы), циклинзависимые киназы (CDK) и их ингибиторы, как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), и семейство Cip1/Waf1/Kip1-2 (p21(Cip1/Waf1), p27(Kip1), p57(Kip2)), но не ограничиваются только ими. Предпочтительно применяют белки Bad, Bmt, Bcl2, Bak, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, Smac/Diablo, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), LC8, PP2B, TRADD, Daxx, каспазу 8, каспазу 2, RIP, RAIDD, FKHR, циклинзависимые киназы (CDK) и их ингибиторы, как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), наиболее предпочтительно применяют белки BIM, Bid, укороченный Bid, FADD, каспазу 3 (и ее субъединицы), Bax, Bad, Akt, циклинзависимые киназы (CDK) и их ингибиторы, как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) [32-34]. Дополнительно белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, включают белки DIVA, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bid и tBid, Egl-1, Bcl-Gs, цитохром C, 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, препятствующих апоптозу, и ингибиторов системы сигнализации или путей, способствующих выживанию. Проапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak,

Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома C, FADD, семейства каспаз и циклинзависимых киназ (CDK) и их ингибиторов, как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), или белки, выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома C, FADD и семейства каспаз. Предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и fflid, Bok, Egl-1, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз, циклинзависимые киназы (CDK) и их ингибиторы, как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)). В равной степени предпочтительными являются белки Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и fflid, Bok, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз.

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

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

Ингибиторы системы сигнализации или путей, способствующих выживанию, включают белки, выбранные из группы, состоящей из PTEN (белок-гомолог фосфатазы и тензина, удаленный на хромосоме 10), ROCK, PP2A, PHLPP (протеинфосфатаза с плекстрин-гомологичным доменом с богатыми лейцином повторами), JNK, p38. Предпочтительными являются белки PTEN, ROCK, PP2A и PHLPP.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из белков только с BH3-доменом (белки "BH3-только", BH3-only proteins), каспаз и внутриклеточных сигнальных белков, входящих в систему контроля апоптоза рецепторами смерти.

Белки "BH3-только" 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, Beclin 1, Egl-1 и CED-13. Предпочтительными являются Bad, BIM, Bid и tBid.

Каспазы включают белки, выбранные из группы, состоящей из каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10. Предпочтительными являются каспаза 3, каспаза 8 и каспаза 9.

Внутриклеточные сигнальные белки, входящие в систему контроля апоптоза рецепторами смерти, включают белки, выбранные из группы, состоящей из FADD, TRADD, ASC (апоптоз-ассоциированный подобный пятнышку белок, содержащий CARD-домен), BAP31, GULP1/CED-6, CIDEA (подобный индуцирующему клеточную смерть фактору фрагментации ДНК α эффектор A), MFG-E8, CIDEA (подобный индуцирующему клеточную смерть фактору фрагментации ДНК α эффектор C), RIPK1/RIP1 (RIPK1 - взаимодействующая с рецептором серин-треонин протеинкиназа 1), CRADD (адаптерный белок каспазы и RIP, содержащий домен смерти), RIPK3/RIP3, Crk, SHB, CrkL, DAXX, семейство 14-3-3, FLIP, DFF40 (фактор фрагментации ДНК 40) и 45, PEA-15 (фосфопротеин, повышенный у астроцитов-15), SODD (белок-сайленсер доменов смерти). Предпочтительными являются FADD и TRADD.

В некоторых вариантах реализации два гетерологичных белка, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, включены в вектор штамма грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению, при этом один белок является проапоптотическим белком, а другой белок является ингибитором путей, предотвращающих апоптоз, или при этом один белок является проапоптотическим белком, а другой белок является ингибитором системы сигнализации или путей, способствующих выживанию.

Проапоптотические белки, охватываемые настоящим изобретением, имеют обычно α -спиральную структуру, предпочтительно гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиральями, и, как правило, содержат по меньшей мере один из доменов BH1, BH2, BH3 или BH4, предпочтительно содержат по меньшей мере один BH3-домен. Как правило, проапоптотические белки, охватываемые настоящим изобретением, не обладают ферментативной активностью.

Термин "сайт расщепления протеазой", используемый в настоящей заявке, относится к специфическому аминокислотному мотиву внутри аминокислотной последовательности, например, внутри аминокислотной последовательности белка или слитого белка, который расщепляется специфической протеазой, распознающей данный аминокислотный мотив. См. обзор в [35]. Примеры сайтов расщепления протеазой представляют собой аминокислотные мотивы, которые расщепляются протеазой, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкая цепь), энтеропептидазы, протеазы PreScission (гибридная протеаза на основе протеазы риновируса человека 3С и глутатион-S-трансферазы), протеазы риновируса человека (протеазы 3С риновируса человека (HRV)), протеазы вируса гравировки табака (TEV), протеазы вируса мозаичности вен табака (TVMV), протеазы фактора крови Ха и тромбина.

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 (протеаза 3С

HRV),

Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser и модифицированные мотивы на основе последовательности Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly/Ser (где X - это любая аминокислота), распознаваемые протеазой TEV (вирус гравировки табака) Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln-Ser: протеаза TVMV,

Ile-(Glu или Asp)-Gly-Arg: протеаза фактора крови Ха,

Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser: тромбин.

Используемые в настоящей заявке сайты расщепления протеазой охватывают убиквитин. Тем самым в некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения убиквитин применяют в качестве сайта расщепления протеазой, т.е. третья последовательность ДНК кодирует убиквитин в качестве сайта расщепления протеазой, который может быть расщеплен специфическими убиквитин-процессирующими протеазами на N-концевом сайте, например, который может быть расщеплен специфическими убиквитин-процессирующими протеазами, называемыми деубиквитирующими ферментами, на N-концевом сайте эндогенно в клетке, куда был доставлен слитый белок. Процессинг убиквитина на его С-конце проводит группа эндогенных убиквитин-специфичных С-концевых протеаз (деубиквитирующие ферменты, DUB). Расщепление убиквитина деубиквитирующими ферментами предположительно происходит на самом С-конце убиквитина (после G76).

"Индивидуум", "субъект" или "пациент" представляет собой позвоночное. В определенных вариантах реализации позвоночное представляет собой млекопитающее. Примеры млекопитающих включают приматов (включая человека и остальных приматов) и грызунов (например, мышей и крыс), но не ограничиваются ими. В определенных вариантах реализации млекопитающее представляет собой человека.

Термин "мутация" используется в настоящей заявке как общий термин и включает изменения как единичной пары оснований, так и множества пар оснований. Подобные мутации могут включать замены, мутации со сдвигом рамки считывания, делеции, вставки и усечения.

Термин "молекула-метка или акцепторный сайт для молекулы-метки", используемый в настоящей заявке, относится к связыванию малого химического соединения со специфической аминокислотной последовательностью, что приводит в результате к флуоресценции связанного химического соединения, предпочтительными примерами этого являются акцепторный сайт кумаринлигазы/кумарина (и его производные), акцепторный сайт резорфинлигазы/резорфина (и его производные) и тетрацистеиновый мотив (как Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys и его производные) при использовании с красителем FlAsH/ReAsH (Life technologies) или флуоресцентный белок, такой как усиленный зеленый флуоресцентный белок (УЗФБ).

Термин "сигнал ядерной локализации", используемый в настоящей заявке, относится к аминокислотной последовательности, которая помечает белок для импорта внутрь ядра эукариотической клетки и включает предпочтительно вирусный сигнал ядерной локализации, такой как сигнал ядерной локализации (NSL) большого Т-антигена вируса SV40 (PPKKRKV).

Термин "сайт множественного клонирования", используемый в настоящей заявке, относится к короткой последовательности ДНК, содержащей несколько сайтов рестрикции для расщепления рестрикционными эндонуклеазами, 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, SalI, 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, предпочтительно XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI.

Термин "сайт множественного клонирования", используемый в настоящей заявке, дополнительно относится к короткой последовательности ДНК, используемой для актов рекомбинации как, например, при стратегии клонирования Gateway или для способов, таких как клонирование Gibbson assembly или торо-клонирование.

Термин "штамм *Yersinia* дикого типа", используемый в настоящей заявке, относится к встречающемуся в природе варианту (как штамм *Y. enterocolitica* E40) или встречающемуся в природе варианту, содержащему генетические модификации, позволяющие применять векторы, такие как делеционные мутации в генах рестрикционных эндонуклеаз или генах устойчивости к антибиотикам (как штамм *Y. enterocolitica* MRS40, чувствительное к ампициллину производное штамма *Y. enterocolitica* E40). Данные штаммы содержат хромосомную ДНК, а также немодифицированную плазмиду вирулентности (называемую pYV).

Термин "включать" главным образом используется в значении "содержать", т.е. допускать наличие одного или более признака или компонента.

В одном из вариантов реализации согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, при этом штамм грамотрицательных бактерий выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*. В одном из вариантов реализации согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, при этом штамм грамотрицательных бактерий выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*. Предпочтительно, чтобы штамм грамотрицательных бактерий представлял собой штамм *Yersinia*, более предпочтительно штамм *Yersinia enterocolitica*. Наиболее предпочтительным является штамм *Yersinia enterocolitica* E40 [13] или его чувствительные к ампициллину производные, такие как штамм *Y. enterocolitica* MRS40, как описано в [36]. Также предпочтительно, чтобы штамм грамотрицательных бактерий представлял собой штамм *Salmonella*, более предпочтительно штамм *Salmonella enterica*. Наиболее предпочтительным является штамм *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium SL1344, описанный коллекцией культур Министерства здравоохранения Великобритании (NCTC 13347).

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий включает эффекторный белок системы СЗТ бактерий или его N-концевой фрагмент, при этом эффекторный белок системы СЗТ или его N-концевой фрагмент может включать сайт связывания шаперона. Эффекторный белок системы СЗТ или его N-концевой фрагмент, который включает сайт связывания шаперона, являются особенно полезными в качестве сигнала доставки согласно

настоящему изобретению. Предпочтительные эффекторные белки системы C3T или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из белка

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, XopD, AvrRpt2, HopAO1, HopPtoD2, HopU1, семейства 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, XopD и AvrXv3.

Более предпочтительные эффекторные белки системы C3T или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из

SopE, SptP, YopE, ExoS, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, из чего наиболее предпочтительные эффекторные белки системы C3T или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из IpgB1,

SopE, SopB, SptP, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, конкретнее, YopE или его N-концевой фрагмент.

В равной степени предпочтительные эффекторные белки системы C3T или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из белка

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, семейства 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, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD и AvrXv3.

В равной степени более предпочтительные эффекторные белки системы C3T или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из

SopE,

SptP, SteA, SifB, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopT,

из чего наиболее предпочтительные эффекторные белки системы C3T или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из

IpgB1, SopE, SopB, SptP, SteA, SifB, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE и YopT,

конкретнее 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 реализации сигнал доставки от эффекторного белка системы C3T бактерий, кодируемый первой последовательностью ДНК, включает эффекторный белок системы C3T бактерий или его N-концевой фрагмент, при этом его N-концевой фрагмент включает по меньшей мере первые 10, предпочтительно по меньшей мере первые 20, более предпочтительно по меньшей мере первые 100 аминокислот эффекторного белка системы C3T бактерий.

В некоторых вариантах реализации сигнал доставки от эффекторного белка системы C3T бактерий, кодируемый первой последовательностью ДНК, включает эффекторный белок системы C3T бактерий или его N-концевой фрагмент, при этом эффекторный белок системы C3T бактерий или его N-концевой фрагмент включает сайт связывания шаперона.

Предпочитаемые эффекторные белки системы C3T или их N-концевые фрагменты, которые включают сайт связывания шаперона, включают следующие комбинации сайта связывания шаперона и эффекторного белка системы C3T 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.

Более предпочтительными являются

SycE-YopE, InvB-SopE, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH,

SpcS-ExoS, CesF-EspF.

Наиболее предпочтительными является YopE или его N-концевой фрагмент, включающий сайт связывания шаперона SycE, такой как N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE, обозначенных в настоящей заявке как YopE₁₋₁₃₈ и как показано в последовательности SEQ ID NO: 2, или SopE или его N-концевой фрагмент, включающий сайт связывания шаперона InvB, такой как N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий 81 или 105 N-концевых аминокислот эффекторного белка SopE, обозначенных в настоящей заявке соответственно как SopE₁₋₈₁ или SopE₁₋₁₀₅ и как показано в последовательности SEQ ID NO: 142 или 143.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia* и сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий, кодируемый первой последовательностью ДНК, включает эффекторный белок YopE или его N-концевую часть, предпочтительно эффекторный белок YopE *Y. enterocolitica* или его N-концевую часть. Предпочтительно сайт связывания SycE включен в N-концевую часть эффекторного белка YopE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE может включать 12, 16, 18, 52, 53, 80 или 138 N-концевых аминокислот [10, 37, 38]. Наиболее предпочтительным является N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE, например, как описано в Forsberg and Wolf-Watz [39], обозначенный в настоящей заявке как YopE₁₋₁₃₈, и как показано в последовательности SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella* и сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий, кодируемый первой последовательностью ДНК, включает 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 шаперона включен в N-концевую часть эффекторного белка SopE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE может включать 81 или 105 N-концевых аминокислот. Наиболее предпочтительным является полноразмерный эффекторный белок SteA и N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий 105 N-концевых аминокислот эффекторного белка, например, как описано в последовательности SEQ ID NO: 142 или 143.

Специалист в данной области техники знаком со способами идентификации полипептидных последовательностей эффекторного белка, способных осуществлять доставку белка. Например, один такой способ описан Sory et al. [13]. Вкратце, можно осуществить слияние в рамке считывания полипептидных последовательностей, например, из различных частей белков Yop с репортерным ферментом, таким как кальмодулин-активируемым аденилатциклазным доменом (или Суа) циклозина *Bordetella pertussis*. Доставка гибридного белка Yop-Суа внутрь цитозоля эукариотических клеток демонстрируется появлением циклазной активности в инфицированных эукариотических клетках, что приводит к накоплению цАМФ. Применяя подобный подход, специалист в данной области техники может определить, если требуется, требование к размеру минимальной последовательности, т.е. непрерывной аминокислотной последовательности самой короткой длины, которая способна осуществлять доставку белка, см., например, [13]. Соответственно, предпочтительные сигналы доставки согласно настоящему изобретению состоят по меньшей мере из минимальной последовательности аминокислот эффекторного белка системы СЗТ, которая способна осуществлять доставку белка.

В одном из вариантов реализации согласно настоящему изобретению предложены мутантные рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий, в частности, рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий, которые дефицитны по выработке по меньшей мере одного функционального эффекторного белка системы СЗТ.

Согласно настоящему изобретению подобный мутантный штамм грамотрицательных бактерий, например подобный мутантный штамм *Yersinia*, можно получить путем введения по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в один кодирующий эффектор ген. Предпочтительно подобные кодирующие эффекторы гены включают YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ и YopT в случае, если речь идет о штамме *Yersinia*. Предпочтительно подобные кодирующие эффекторы гены 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

в случае, если речь идет о штамме *Salmonella*. Более предпочтительно, чтобы все кодирующие эффекторы гены были удалены. Специалист может использовать любое количество стандартных техник для получения мутаций в этих генах эффекторов системы СЗТ. Sambrook et al. описывает в общих чертах подобные техники. См. Sambrook et al. [40].

В соответствии с настоящим изобретением мутацию можно получить в промоторной области кодирующего эффектор гена, так что экспрессия подобного гена эффектора прекращается. Мутацию также

можно получить в кодирующей области кодирующего эффектор гена, так что каталитическая активность закодированного эффекторного белка пропадает. Термин "каталитическая активность" эффекторного белка относится, как правило, к функции эффекторного белка, направленной против клетки-мишени, т.е. к токсичности. Подобная активность обусловлена каталитическими мотивами в каталитическом домене эффекторного белка. Подходы к идентификации каталитического домена и/или каталитических мотивов эффекторного белка хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, [41, 42].

Соответственно, одна из предпочитаемых мутаций согласно настоящему изобретению представляет собой делецию целого каталитического домена. Другая предпочитаемая мутация представляет собой мутацию в виде смещения рамки считывания в кодирующем эффектор гена, так что каталитический домен отсутствует в белковом продукте, экспрессируемом с подобного "смещенного" гена. Наиболее предпочитаемая мутация представляет собой мутацию с делецией целой кодирующей области эффекторного белка. Другие мутации также рассматриваются настоящим изобретением, такие как небольшие делеции или замены пар оснований, которые получают в каталитических мотивах эффекторного белка, приводящие к ликвидации каталитической активности данного эффекторного белка.

Мутации, которые получают в генах функциональных эффекторных белков системы СЗТ, могут быть введены в конкретный штамм с помощью ряда способов. Один такой способ включает клонирование мутировавшего гена в "суицидный" вектор, который способен вводить мутировавшую последовательность в штамм посредством аллельного обмена. Пример подобного "суицидного" вектора описан в [43].

Таким образом, мутации, полученные во множестве генов, можно последовательно ввести в штамм грамотрицательных бактерий, приводя к появлению полимутанта, например шестикратного мутантного рекомбинантного штамма. Порядок, в котором вводят эти мутировавшие последовательности, не важен. В некоторых условиях может потребоваться осуществить мутацию только некоторых, но не всех эффекторных генов. Соответственно, настоящее изобретение дополнительно рассматривает полимутантный штамм *Yersinia*, а не шестикратный мутантный штамм *Yersinia*, например, двойные мутантные, тройные мутантные, четырехкратные мутантные и пятикратные мутантные штаммы. Для цели осуществления доставки белков система секреции и транслокации мутантного штамма согласно настоящему изобретению должна быть интактной.

Предпочитаемый рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению представляет собой шестикратный мутантный штамм *Yersinia*, в котором все кодирующие эффекторы гены являются мутировавшими, так что получающийся в результате штамм *Yersinia* больше не вырабатывает никаких функциональных эффекторных белков. Подобный шестикратный мутантный штамм *Yersinia* обозначается как ΔyopH, O, P, E, M, T для *Y. enterocolitica*. Как пример, подобный шестикратный мутант можно получить из штамма *Y. enterocolitica* MRS40, приводя к появлению штамма *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, который является предпочтительным.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к вектору для применения в комбинации с рекомбинантными штаммами грамотрицательных бактерий для доставки требуемого белка внутрь эукариотических клеток, при этом вектор включает в направлении от 5'-конца к 3'-концу: промотор; первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки от эффекторного белка бактерий системы СЗТ, функционально связанную с указанным промотором; вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК; и альтернативно третью последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой, при этом третья последовательность ДНК расположена между 3'-концом указанной первой последовательности ДНК и 5'-концом указанной второй последовательности ДНК.

Промотор, гетерологичный белок и сайт расщепления протеазой, как описано ранее, можно применять для вектора штамма грамотрицательных бактерий.

Векторы, которые можно применять согласно настоящему изобретению, зависят от применяемых штаммов грамотрицательных бактерий, как известно специалисту в данной области техники. Векторы, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают экспрессионные векторы, векторы для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности и фрагменты ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности. Экспрессионные векторы, которые являются пригодными, например, в случае штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas* представляют собой, например, плазмиды pUC, pBad, pACYC, pUCP20 и pET. Векторы для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности, которые являются пригодными, например, в случае штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, представляют собой, например, pKNG101. Фрагменты ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности относятся к способам, применяемым, например, в случае штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, как, например, генетическая инженерия с использованием фага лямбда red. Векторы для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности или фрагменты ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности могут осуществлять вставку первой, второй и/или третьей последовательности ДНК согласно настоящему изобретению, так что первая, вторая и/или третья последовательность ДНК функционально связана с эндогенным промотором рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий. Тем самым, если применяют вектор для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности или фрагмент ДНК для

хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности, эндогенный промотор может быть закодирован на эндогенной ДНК бактерий (хромосомной или плазмидной ДНК) и только первая и вторая последовательность ДНК будет предоставлена генетически сконструированным вектором для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности или фрагментом ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности. Таким образом, необязательно нужно, чтобы промотор был включен в вектор, применяемый для трансформации рекомбинантных штаммов грамотрицательных бактерий, т.е. рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению можно трансформировать вектором, доза которого не включает промотор. Предпочтительно применяют экспрессионный вектор. Вектор согласно настоящему изобретению, как правило, применяют для доставки гетерологичных белков системой СЗТ бактерий внутрь эукариотических клеток *in vitro* и *in vivo*.

Предпочтительный экспрессионный вектор для *Yersinia* выбран из группы, состоящей из pBad_Si1 и pBad_Si_2. Плазмиду pBad_Si2 конструировали путем клонирования фрагмента SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащего эндогенные промоторы для YopE и SycE, из очищенной плазмиды pYV40 на сайт KpnI/HindIII плазмиды pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglIII плазмиды pBad-MycHisA путем ферментативного расщепления, обработки фрагментом Кленова и повторного лигирования. Дополнительно на 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ добавляли следующие сайты расщепления: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII). Плазмида pBad_Si1 эквивалентна плазмиде pBad_Si2, но кодирует УЗФБ (EGFP), амплифицированный из плазмиды pEGFP-C1 (Clontech), на сайте NcoI/BglIII под контролем индуцируемого арабинозой промотора.

Предпочтительный экспрессионный вектор для *Salmonella* выбран 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 SteA₁₋₂₀ (pSi_266), полноразмерную последовательность SteA (pSi_267), фрагмент SopE₁₋₈₁ (pSi_268) или фрагмент SopE₁₋₁₀₅ (pSi_269), амплифицировали из геномной ДНК штамма *S. enterica* SL1344 и клонировали на сайт NcoI/KpnI плазмиды pBad-MycHisA (Invitrogen).

Векторы согласно настоящему изобретению могут включать другие элементы последовательности, такие как 3'-терминирующую последовательность (включая стоп-кодон и поли-А-последовательность) или ген, обеспечивающий устойчивость к лекарственным средствам, которая позволяет осуществлять отбор трансформантов, получивших настоящий вектор. Осуществить трансформацию векторов согласно настоящему изобретению в рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий можно целым рядом известных способов. Для осуществления цели настоящего изобретения способы трансформации для введения вектора включают электропорацию, опосредованную фосфатом кальция трансформацию, конъюгацию или их комбинацию, но не ограничиваются ими. Например, можно осуществить трансформацию вектора в первый штамм бактерий посредством стандартной процедуры электропорации. Впоследствии подобный вектор можно перенести от первого штамма бактерий в нужный штамм посредством конъюгации, процесс, также называемый "мобилизацией". Можно осуществить отбор трансформанта (т.е. штаммов грамотрицательных бактерий, принявших вектор), например, с помощью антибиотиков. Данные техники хорошо известны в данной области техники. См., например, [13].

В соответствии с настоящим изобретением промотор экспрессионного вектора рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению может представлять собой нативный промотор эффекторного белка СЗТ соответствующего штамма или подходящего штамма бактерий или промотор, применяемый в экспрессионных векторах, которые пригодны, например, в случае штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, например плазмиды pUC и pBad. Подобные промоторы представляют собой промотор T7, промотор Plac или промотор Ara-bad.

Если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*, промотор может быть от гена вирулона *Yersinia*. Термин "ген вирулона *Yersinia*" относится к генам на плазмиде pYV *Yersinia*, экспрессия которых контролируется как температурой, так и контактом с клеткой-мишенью. Подобные гены включают гены, кодирующие для элементов аппарата секреции (гены Ysc), гены, кодирующие для транслокаторов (YopB, YopD и LcrV), гены, кодирующие для элементов контроля (YopN, YaeA и LcrG), гены, кодирующие для шаперонов эффекторов системы СЗТ (SycD, SycE, SycH, SycN, SycO и SycT), и гены, кодирующие для эффекторов (YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopT и YopP/YopJ), а также другие закодированные в pYV белки, как VirF и YadA.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор системы СЗТ. Если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*, промотор выбран из любого из промоторов для YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM и YopP/YopJ. Более предпочтительно промотор выбран из промоторов для YopE или SycE.

Если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella*, промотор может быть от острова патогенности SpiI или SpiII или от эффекторного белка, закодированного в другом месте. Подобные гены включают гены, кодирующие для элементов аппарата секреции, гены, кодирующие для транслокаторов, гены, кодирующие для элементов контроля, гены, кодирующие для шаперонов эффекторов системы СЗТ, и гены, кодирующие для эффекторов, а также других белков, ко-

дируемых SPI-1 или SPI-2. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор системы СЗТ. Если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella*, промотор выбран из любого промотора одного из эффекторных белков. Более предпочтительно промотор выбран из промоторов *SopE*, *InvB* или *SteA*.

В предпочтительном варианте реализации экспрессионный вектор включает последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой. Получение функционального и общеприменимого сайта расщепления позволяет отщеплять сигнал доставки после транслокации. Так как сигнал доставки может мешать корректной локализации и/или функционированию транслоцированного белка внутри клеточ-мишеней, введение сайта расщепления протеазой между сигналом доставки и интересующим белком впервые обеспечивает доставку практически нативных белков внутрь эукариотических клеток. Предпочтительно сайт расщепления протеазой представляет собой аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой или ее каталитическими доменами, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкая цепь), энтеропептидазы, протезы PreScission, протеазы 3С риновируса человека, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактора крови Ха и тромбина, более предпочтительно аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой TEV. В равной степени предпочтительно, чтобы сайт расщепления протеазой представлял собой аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой или ее каталитическими доменами, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкая цепь), энтеропептидазы, протезы PreScission, протеазы 3С риновируса человека, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактора крови Ха, убиквитин-процессирующей протеазы, называемой деубиквитирующим ферментом, и тромбина. Наиболее предпочтительным является аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой TEV или убиквитин-процессирующей протеазой. Таким образом, в дополнительном варианте реализации настоящего изобретения гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки, принадлежащего эффекторному белку системы СЗТ бактерий, протеазой. Предпочитаемые способы отщепления представляют собой способы, при которых

а) протеазу транслоцируют в эукариотическую клетку с помощью рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, как описано в настоящей заявке, который экспрессирует слитый белок, который включает сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и протеазу в качестве гетерологичного белка; или

б) протеаза экспрессируется конститутивно или транзистентно в эукариотической клетке.

Как правило, рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, применяемый для доставки требуемого белка внутрь эукариотической клетки, и рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, транслоцирующий протеазу внутрь эукариотической клетки, являются разными.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения вектор включает дополнительную последовательность ДНК, кодирующую молекулу-метку или акцепторный сайт для молекулы-метки. Дополнительная последовательность ДНК, кодирующая молекулу-метку или акцепторный сайт для молекулы-метки, как правило, слит с 5'-концом или с 3'-концом второй последовательности ДНК. Предпочтительно молекула-метка или акцепторный сайт для молекулы-метки выбраны из группы, состоящей из усиленного зеленого флуоресцентного белка (УЗФБ), кумарина, акцепторного сайта кумаринлигазы, резорфина, акцепторного сайта резорфинлигазы, тетрацистеинового мотива при использовании красителя FlAsH/ReAsH (life technologies).

Наиболее предпочтительным является резорфин и акцепторный сайт резорфинлигазы или УЗФБ. Применение молекулы-метки или акцепторного сайта для молекулы-метки будет приводить к присоединению молекулы-метки к гетерологичному белку, представляющему интерес, который затем будет доставлен в таком виде внутрь эукариотической клетки, и это позволяет отслеживать белок посредством, например, микроскопии живой клетки.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения вектор включает дополнительную последовательность ДНК, кодирующую пептидную метку (тэг). Дополнительная последовательность ДНК, кодирующая пептидную метку, как правило, слита с 5'-концом или с 3'-концом второй последовательности ДНК. Предпочитаемая пептидная метка выбрана из группы, состоящей из Мус-метки, His-метки, Flag-метки, HA-метки, Strep-метки или V5-метки или комбинации из двух или более меток из этой группы. Наиболее предпочтительными являются Мус-метка, Flag-метка, His-метка и комбинированные Мус-и His-метки. Применение пептидной метки будет приводить к появлению возможности отслеживать меченый белок, например, с помощью иммуофлуоресценции или вестерн-блоттинга с использованием антител против метки. Дополнительно применение пептидной метки позволяет осуществлять аффинную очистку требуемого белка либо после секреции в культуральный супернатант, либо после транслокации внутрь эукариотических клеток, в обоих случаях применяя способ очистки, подходящий для соответствующей метки (например, металл-хелатная аффинная очистка при применении His-метки или очистка на основе анти-Flag антител при применении Flag-метки).

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения вектор включает дополнительную последовательность ДНК, кодирующую сигнал ядерной локализации (NSL). Дополнительная последовательность ДНК, кодирующая сигнал ядерной локализации, как правило, слита с 5'-концом или 3'-концом

второй последовательности ДНК, при этом указанная дополнительная последовательность ДНК кодирует сигнал ядерной локализации. Предпочтительный сигнал ядерной локализации выбран из группы, состоящей из сигнала ядерной сигнализации (NSL) большого Т-антигена вируса SV40 и его производных [44], а также других вирусных сигналов ядерной локализации. Наиболее предпочтительным является сигнал ядерной сигнализации (NSL) большого Т-антигена вируса SV40 и его производные.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения вектор включает сайт множественного клонирования. Сайт множественного клонирования, как правило, располагается на 3'-конце первой последовательности ДНК и/или на 5'-конце или 3'-конце второй последовательности ДНК. Один или больше одного сайта множественного клонирования можно включить в состав вектора. Предпочтительный сайт множественного клонирования выбран из группы ферментов рестрикции, состоящей из

XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI.

Наиболее предпочтительными являются XbaI, XhoI, BstBI and HindIII.

Белок, экспрессируемый со слитых первой и второй и необязательно третьей последовательностей ДНК вектора, также обозначается термином "слитый белок" или "гибридный белок", т.е. слитый белок или гибрид сигнала доставки и гетерологичного белка. Слитый белок может также включать, например, сигнал доставки и два или более различных гетерологичных белка.

Настоящее изобретение рассматривает способ доставки гетерологичных белков, как описано в настоящей заявке выше, внутрь эукариотических клеток в культуре клеток, а также *in vivo*.

Таким образом, в одном из вариантов реализации способ доставки гетерологичных белков включает:

- i) культивирование штамма грамотрицательных бактерий, как описано в настоящей заявке;
- ii) приведение в контакт эукариотической клетки с штаммом грамотрицательных бактерий пункта i), при этом слитый белок, который содержит сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и гетерологичный белок, экспрессируется штаммом грамотрицательных бактерий и происходит его транслокация внутрь эукариотической клетки; и необязательно
- iii) расщепление слитого белка, так что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки, принадлежащего эффекторному белку системы СЗТ бактерий.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере два слитых белка, которые включают сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и гетерологичный белок, экспрессируются штаммом грамотрицательных бактерий и происходит их транслокация внутрь эукариотической клетки посредством способов согласно настоящему изобретению.

Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий можно культивировать таким образом, чтобы происходила экспрессия слитого белка, который включает сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и гетерологичный белок, в соответствии со способами, известными в данной области техники (например, FDA, Bacteriological Analytical Manual (BAM), chapter 8: *Yersinia enterocolitica*). Предпочтительно, чтобы рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий можно было культивировать в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой, например, при температуре 28°C. Для индуцирования экспрессии ССЗТ и, например, генов, зависящих от промотора YopE/SycE, бактерии можно выращивать при 37°C.

В предпочтительном варианте реализации эукариотическую клетку приводят в контакт с двумя штаммами грамотрицательных бактерий пункта i), при этом первый штамм грамотрицательных бактерий экспрессирует первый слитый белок, который включает сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и первый гетерологичный белок, и второй штамм грамотрицательных бактерий экспрессирует второй слитый белок, который включает сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и второй гетерологичный белок, так что происходит транслокация первого и второго слитого белка внутрь эукариотической клетки. Данный вариант реализации, предложенный для коинфекции, например, эукариотических клеток двумя штаммами бактерий в качестве действенного способа доставки, например, двух различных гибридных белков в отдельные клетки, для выяснения их функционального взаимодействия.

Настоящее изобретение рассматривает широкий спектр эукариотических клеток, которые могут быть мишенями для рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению, например, клетки Hi-5 (BTI-TN-5B1-4; life technologies B855-02), клетки HeLa, например клетки HeLa Ccl2 (такие как ATCC № CCL-2), клетки фибробластов, например клетки фибробластов 3T3 (такие как ATCC № CCL-92) или клетки Mef (такие как ATCC № SCRC-1040), Hek (такие как ATCC № CRL-1573), клетки HUVEC (такие как ATCC № PCS-100-013), CHO (такие как ATCC № CCL-61), Jurkat (такие как ATCC № TIB-152), Sf-9 (такие как ATCC № CRL-1711), HepG2 (такие как ATCC № HB-8065), Vero (такие как ATCC № CCL-81), MDCK (такие как ATCC № CCL-34), THP-1 (такие как ATCC № TIB-202), J774 (такие как ATCC № TIB-67), RAW (такие как ATCC № TIB-71), Saco2 (такие как ATCC № HTB-37), линии клеток NCI (такие как ATCC № HTB-182), DU145 (такие как ATCC № HTB-81), Lncap (такие как ATCC № CRL-1740), MCF-7 (такие как ATCC № HTB-22), линии клеток MDA-MB (такие как ATCC

№ НТВ-128), PC3 (такие как ATCC № CRL-1435), T47D (такие как ATCC № CRL-2865), A549 (такие как ATCC № CCL-185), U87 (такие как ATCC № НТВ-14), SHSY5Y (такие как ATCC № CRL-2266s), Ea.Hy926 (такие как ATCC № CRL-2922), Saos-2 (такие как ATCC № НТВН-85), 4T1 (такие как ATCC № CRL-2539), B16F10 (такие как ATCC № CRL-6475) или первичные гепатоциты человека (такие как life technologies HMCPIs), предпочтительно клетки HeLa, Hek, клетки HUVEC, 3T3, CHO, Jurkat, Sf-9, HepG2 Vero, THP-1, Caco2, Mef, A549, 4T1, B16F10 и первичные гепатоциты человека и наиболее предпочтительно клетки HeLa, Hek, клетки HUVEC, 3T3, CHO, Jurkat, THP-1, A549 и Mef. Под "быть мишенью" подразумевается внеклеточная адгезия рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий к эукариотической клетке.

В соответствии с настоящим изобретением доставку белка можно осуществить путем приведения в контакт эукариотической клетки с рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий в подходящих условиях. Специалистам в данной области техники обычно доступны различные источники литературы и способы, касающиеся условий для индуцирования экспрессии и транслокации генов вирулону, включая требуемую температуру, концентрацию Ca^{++} , добавление индукторов, таких как конго красный, приемы, с использованием которых смешивают рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий и клетки-мишени, и т.п. См., например, [45]. Условия могут варьироваться в зависимости от типа эукариотических клеток, являющихся мишенями, и применяемого рекомбинантного штамма бактерий. Разобраться с подобными вариациями могут специалисты в данной области техники, используя традиционные способы. Специалисты в данной области техники также могут использовать ряд анализов для определения, успешно ли прошла доставка слитого белка. Например, слитый белок можно определить посредством иммунофлуоресценции с использованием антител, распознающих слитую с белком метку (такую как Мус-метку). Определение также может основываться на ферментативной активности доставляемого белка, например, анализ описанный в [13].

В одном из вариантов реализации согласно настоящему изобретению предложен способ очистки гетерологичного белка, включающий культивирование штамма грамотрицательных бактерий, как описано в настоящей заявке, так что слитый белок, который включает сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и гетерологичный белок, экспрессируется и секретируется в супернатант культуры клеток. Экспрессируемый слитый белок может дополнительно включать сайт расщепления протеазой, расположенный между сигналом доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и гетерологичным белком, и/или может дополнительно включать пептидную метку.

Таким образом, в конкретном варианте реализации способ очистки гетерологичного белка включает:

i) культивирование штамма грамотрицательных бактерий, как описано в настоящей заявке, так что слитый белок, который включает сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий, гетерологичный белок и сайт расщепления протеазой между сигналом доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и гетерологичным белком, экспрессируется и секретируется в супернатант культуры клеток;

ii) добавление протеазы к супернатанту культуры, при этом протеаза расщепляет слитый белок, так что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки, принадлежащего эффекторному белку системы СЗТ бактерий;

iii) необязательно выделение гетерологичного белка из супернатанта культуры клеток.

Таким образом, в другом конкретном варианте реализации способ очистки гетерологичного белка включает:

i) культивирование штамма грамотрицательных бактерий, как описано в настоящей заявке, так что слитый белок, который включает сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий, гетерологичный белок и пептидную метку, экспрессируется и секретируется в супернатант культуры;

ii) использование пептидной метки в качестве мишени, например, посредством аффинной очистки супернатанта на колонке.

Таким образом, в другом конкретном варианте реализации способ очистки гетерологичного белка включает:

i) культивирование штамма грамотрицательных бактерий, как описано в настоящей заявке, так что слитый белок, который включает сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий, гетерологичный белок, сайт расщепления протеазой между сигналом доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий и гетерологичным белком, и пептидную метку, экспрессируется и секретируется в супернатант культуры;

ii) добавление протеазы к супернатанту культуры, при этом протеаза расщепляет слитый белок, так что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки, принадлежащего эффекторному белку системы СЗТ бактерий;

iii) использование пептидной метки в качестве мишени, например, посредством аффинной очистки супернатанта на колонке.

В описанных выше конкретных вариантах реализации протеазу можно добавлять к супернатанту культуры в форме, например, очищенного белка протеазы или путем добавления штамма бактерий, экспрессирующего и секретирующего протеазу, к супернатанту культуры. Дополнительные стадии могут

включать удаление протеазы, например, посредством аффинной очистки на колонке.

В одном из вариантов реализации согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, как описано в настоящей заявке, для применения в медицине.

В одном из вариантов реализации согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, как описано в настоящей заявке, для применения при доставке гетерологичного белка в качестве лекарственного средства или вакцины субъекту. Гетерологичный белок можно доставлять субъекту в виде вакцины путем приведения в контакт штамма грамотрицательных бактерий с эукариотическими клетками, например, с живым животным *in vivo*, так что происходит транслокация гетерологичного белка внутрь живого животного, которое затем продуцирует антитела против гетерологичного белка. Выработанные антитела можно применять напрямую или выделять и очищать и применять при диагностике, при исследованиях, а также при терапии. В-клетки, продуцирующие антитела, или содержащуюся в них последовательность ДНК можно применять для дополнительного получения специфических антител для применения при диагностике, при исследованиях, а также при терапии.

В одном из вариантов реализации согласно настоящему изобретению предложен способ осуществления доставки гетерологичного белка, при этом гетерологичный белок доставляют *in vitro* внутрь эукариотических клеток.

В дополнительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен способ осуществления доставки гетерологичного белка, при этом эукариотическая клетка представляет собой живое животное, при этом живое животное приводят в контакт с штаммом грамотрицательных бактерий *in vivo*, так что происходит транслокация слитого белка в живое животное. Предпочитаемое животное представляет собой млекопитающее, более предпочтительно человека.

В дополнительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложено применение рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, как описано раньше, для осуществления высокопроизводительного скрининга ингибиторов клеточного пути или явления, запускаемого транслоцированным гетерологичным белком (белками).

В дополнительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложена библиотека для штаммов грамотрицательных бактерий, при этом гетерологичный белок, кодируемый второй последовательностью ДНК экспрессионного вектора штаммов грамотрицательных бактерий, представляет собой белок человека или мыши, предпочтительно белок человека, и где каждый белок человека или мыши, экспрессируемый штаммом грамотрицательных бактерий, отличается по аминокислотной последовательности. Предполагаемая библиотека может, например, содержать коллекцию открытых рамок считывания (Orf) киназ человека, содержащую 560 белков, организации Addgene (Addgene № 100000014). В качестве клонирующего вектора для экспрессии можно использовать описанные выше экспрессионные вектора.

В дополнительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен набор, включающий вектор, как описано в настоящей заявке, и штамм бактерий, экспрессирующий и секретирующий протеазу, способную расщепить сайт расщепления протеазой, включенный в вектор. Особенно пригодный вектор представляет собой вектор для применения в комбинации со штаммом бактерий для доставки требуемого белка внутрь эукариотических клеток, как описано выше, при этом вектор включает в направлении от 5'-конца к 3'-концу

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки от эффекторного белка системы СЗТ бактерий, функционально связанную с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательностью ДНК; и

альтернативно третью последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой, при этом третья последовательность ДНК расположена между 3'-концом указанной первой последовательности ДНК и 5'-концом указанной второй последовательности ДНК.

Примеры

А) Материалы и методы.

Штаммы бактерий и условия роста культуры.

Штаммы, использованные в данном исследовании, перечислены на фиг. 15А-15М. Штамм *is. coli* Top10, использованный для очистки плазмид и клонирования, и штамм *E. coli* Sm10 λ pir, использованный для конъюгации, а также штамм *E. coli* BW19610 [46], использованный для размножения вектора pKNG101, рутинно выращивали на чашках с агаром LB и в бульоне LB при 37°C. Использовали ампициллин в концентрации 200 мкг/мл (*Yersinia*) или 100 мкг/мл (*E. coli*) для проведения отбора экспрессионных векторов. Использовали стрептомицин в концентрации 100 мкг/мл для отбора суицидных векторов. Штамм *Y. enterocolitica* MRS40 [36], не обладающее устойчивостью к ампициллину производное штамма E40 [13] и штаммы, полученные от него, рутинно выращивали на сердечно-мозговой вытяжке (BHI; Difco) при комнатной температуре (RT). Ко всем штаммам *Y. enterocolitica* добавили налидиксо-

вую кислоту (35 мкг/мл) и ко всем штаммам *Y. enterocolitica* asd дополнительно добавляли 100 мкг/мл мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты (мДАП, Sigma Aldrich).

Штамм *S. enterica* SL1344 рутинно выращивали на чашках с агаром LB и в бульоне LB при температуре 37°C. Использовали ампициллин в концентрации 100 мкг/мл для проведения отбора экспрессионных векторов у *S. enterica*.

Генетические манипуляции с *Y. enterocolitica*.

Генетические манипуляции с *Y. enterocolitica* были описаны в [47, 48]. Вкратце, проводили генетическое конструирование мутаторов для модификации или делеции генов в плаزمиде рYV или на хромосоме путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) с 2 перекрывающимися фрагментами-праймерами с использованием очищенной плазмиды рYV40 или геномной ДНК в качестве матрицы, дающей в результате фланкирующие последовательности размером 200-250 пар оснований (п.о.) на обеих сторонах удаленной или модифицированной части соответствующего гена. Получающиеся в результате фрагменты клонировали в вектор рKNG101 [43] в штамме *E. coli* BW19610 [46]. Проводили трансформацию плазмид с подтвержденной последовательностью в штамм *E. coli* Sm10 λ pir, откуда плазмиды мобилизовали в соответствующий штамм *Y. enterocolitica*. Проводили размножение мутантов, несущих интегрированный вектор, в течение нескольких поколений без давления отбора. Использовали затем сахарозу для проведения отбора клонов, которые потеряли вектор. Наконец, идентифицировали мутанты методом молекулярных колоний.

Конструирование плазмид.

Плазмиду рBad_Si2 или рBad_Si1 (фиг. 10) использовали для клонирования слитых белков с 138 N-концевыми аминокислотами YopE (SEQ ID NO: 2). Плазмиду рBad_Si2 конструировали путем клонирования фрагмента SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащего эндогенные промоторы для YopE и SycE, из очищенной плазмиды рYV40 на сайт KpnI/HindIII плазмиды рBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglIII плазмиды рBad-MycHisA путем расщепления, обработки фрагментом Кленова и повторной лигации. Двухнаправленный терминатор транскрипции (BBa_B1006; iGEM foundation) клонировали на расщепленный и обработанный фрагментом Кленова сайт KpnI (рBad_Si2) или на расщепленный сайт BglIII (рBad_Si1). Дополнительно на 3'-конце последовательности YopE₁₋₁₃₈ добавляли следующие сайты расщепления: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII) (фиг. 10B). Плазмида рBad_Si1 эквивалентна плазмиде рBad_Si2, но кодирует УЗФБ (EGFP), амплифицированный из плазмиды рEGFP-C1 (Clontech), на сайте NcoI/BglIII под контролем индуцируемого арабинозой промотора. Плазмиды рSi_266, рSi_267, рSi_268 и рSi_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор, и фрагмент SteA₁₋₂₀ (рSi_266), полноразмерную последовательность SteA (рSi_267), фрагмент SopE₁₋₈₁ (рSi_268) или фрагмент SopE₁₋₁₀₅ (рSi_269), амплифицировали из геномной ДНК штамма *S. enterica* SL1344 и клонировали на сайт NcoI/KpnI плазмиды рBad-MycHisA (Invitrogen).

Полноразмерные гены или их фрагменты амплифицировали со специфическими праймерами, перечисленными ниже в табл. I, и клонировали в виде слитых конструкций с YopE₁₋₁₃₈ в плазмиду рBad_Si2 или в случае белка z-BIM (SEQ ID NO: 21), в плазмиду рBad_Si1 (см. табл. II ниже). Для слияния с SteA или SopE искусственные конструкции ДНК расщепляли протеазами KpnI/HindIII и клонировали, соответственно, в рSi_266, рSi_267, рSi_268 или рSi_269. В случае генов видов бактерий использовали в качестве матрицы очищенную геномную ДНК (*S. flexneri* M90T, *Salmonella enterica* подвид *enterica* serovar, *Typhimurium* SL1344, *Bartonella henselae* ATCC 49882). Для генов человека использовали универсальную библиотеку кодирующих ДНК (кДНК) (Clontech), если не указано иначе (фиг. 15A-15M), гены данио амплифицировали из библиотеки кДНК (любезный подарок от М. Аффолтер). Лигированные плазмиды клонировали в штамм *E. coli* Top10. Проводили электропорацию плазмид с подтвержденной последовательностью в требуемый штамм *Y. enterocolitica* или *S. enterica* с использованием параметров, как для стандартной электропорации *E. coli*.

Таблица I (Праймер № Si_ : последовательность)

285: CATACCATGGGAGTGAGCAAGGGCGAG
 286: GGAAGATCTtACTTGTACAGCTCGTCCAT
 287: CGGGGTACCTCAACTAAATGACCGTGGTG
 288: GTTAAAGCTTttcgaatctagactcgagCGTGGCGAACTGGTC
 292: CAGTctcgagCAAATTCTAAACAAAATACTTCCAC
 293: cagtTTCGAATTAATTTGTATTGCTTTGACGG
 296: CAGTctcgagACTAACATAACACTATCCACCCAG
 297: GTTAAAGCTTTCAGGAGGCATTCTGAAG
 299: CAGTctcgagCAGGCCATCAAGTGTGTG
 300: cagtTTCGAATCATTTTCTCTTCCTCTTCTTCA
 301: CAGTctcgagGCTGCCATCCGGAA
 302: cagtTTCGAATCACAAGACAAGGCACCC
 306: GTTAAAGCTTGGAGGCATTCTGAAGGatacttatt
 307: CAGTctcgagCAAATACAGAGCTTCTATCACTCAG
 308: GTTAAAGCTTTCAGATGTGATTAATGAAGAAATG
 317: cagtTTCGAACCCATAAAAAAGCCCTGTC
 318: GTTAAAGCTTCTACTCTATCATCAAACGATAAAATGg
 324: CAGTctcgagTTCACCTCAAGAAACGCAAA
 339: cagtTTCGAATTTTCTCTTCCTCTTCTTCAcg

341: cgtaTCTAGAAAAATGATGAAAATGGAGACTG
 342: GTTAAAGCTTttaGCTGGAGACGGTGAC
 346: CAGTctcgagTTCCAGATCCCAGAGTTTG
 347: GTTAAAGCTTTCAGTGGGAGGGGG
 351: CAGTctcgagctcgagTTATCTACTCATAGAACTACTTTTGCAG
 352: cgcGGATCCtcagtgctctcgcgacatta
 353: CATTTATTCCCTCCTAGTTAGTCAcagcaactgctgctcttc
 354: gaaaggagcagcagttgctgTGAATACTAGGAGGAATAAATG
 355: cgattcacgattgctttctCATTATTCCCTCCAGGTACTA
 356: TAGTACCTGGAGGGAATAATGagaaagcaatccgtgaatcg
 357: cgtaTCTAGAcggctttaagtgcgacattc
 364: cgtaTCTAGACTAAAGTATGAGGAGAGAAAAATTGAA
 365: GTTAAAGCTTTCAGCTTGCCGTCGT
 367: CGTAtctagaGACCCGTTCTGCTGCTGC
 369: cgtaTCTAGAcccccaagaagaagc
 373: GTTAAAGCTTGCTGGAGACGGTGACC
 386: CGTAtctagaTCAGGACGCTTCGGAGGTAG
 387: CGTAtctagaATGGACTGTGAGGTCAACAA
 389: CGTAtctagaGGCAACCGCAGCA
 391: GTTAAAGCTTTCAGTCCATCCCATTCTg
 403: CGTAtctagatctggaatatccctggaca
 406: GTTAAAGCTTgtctgtctcaatgccacagt
 410: CAGTctcgagATGTCCGGGGTGGTg
 413: cagtTTCGAATCACTGCAGCATGATGTC
 417: CAGTctcgagAGTGGTGTGATGATGACATG
 420: cagtTTCGAATTAGTGATAAAAATAGAGTTCTTTTGTGAG
 423: CAGTctcgagATGCACATAACTAATTTGGGATT
 424: cagtTTCGAATTATACAAATGACGAATACCCTTT
 425: GTTAAAGCTTttacaccttgctctctcttggcgGCTGGAGACGGTGAC
 428: CGTAtctagaATGGACTTCAACAGGAACCTTT
 429: CGTAtctagaGGACATAGTCCACCAGCG
 430: GTTAAAGCTTTCAGTTGGATCCGAAAAAC
 433: CGTAtctagaGAATTAAAAAAAACACTCATCCCA
 434: CGTAtctagaCCAAAGGCAAAAGCAAAAA
 435: GTTAAAGCTTTTAGCTAGCCATGGCAAGC

436: CGTAtctagaATGCCCCGCCCC
 437: GTTAAAGCTTCTACCCACCGTACTCGTCAAT
 438: CGTAtctagaATGTCTGACACGTCCAGAGAG
 439: GTTAAAGCTTTCATCTTCTTCGCAGGAAAAAG
 445: cgcGGATCCttatgggtctcacagcaaaa
 446: CATTATTCCTCCTAGTTAGTCAaggcaacagccaatcaagag
 447: ctcttgattggctgttgccTGACTAACTAGGAGGAATAAATG
 448: ttgattgcagtgacatgggCATTATTCCTCCAGGTACTA
 449: TAGTACCTGGAGGGAATAATGcaccatgtcactgcaatcaa
 450: cgtTCTAGAtagccgcagatgttggtatg
 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: GTTAAAGCTTtaTTGAAGATTTGTGGCTCC
 504:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTATGCC
 CCGCCCC
 505: GTTAAAGCTTCCCACCGTACTCGTCAATtc
 508:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTATGGC
 CGAGCCTTG
 509: GTTAAAGCTTTTGAAGATTTGTGGCTCCc
 511:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTGTGAG
 CAAGGGCGAG
 512:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTCCGCC
 GAAAAAAAACGTAAAGTTGTGAGCAAGGGCGAG

513: GTTAAAGCTTtAAACTTTACGTTTTTTTTTCGGCGGCTTGTACAGCTCGTCCAT
 515: CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGATTA
 TAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG
 558: CGTATCTAGAATGACCAGTTTTGAAGATGC
 559: GTTAAAGCTTTCATGACTCATTTTCATCCAT
 561: CGTATCTAGAATGAGTCTCTTAAACTGTGAGAACAG
 562: GTTAAAGCTTCTACACCCCGCATCA
 580: catgccatggATTTATGGTCATAGATATGACCTC
 585: CAGTctcgagATGCAGATCTTCGTCAAGAC
 586: GTTAAAGCTTgctagcttcgaaACCACCACGTAGACGTAAGAC
 588: cagtTTCGAAGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG
 612: CGGGGTACCatgaggtagcttattctgataaag
 613: CGGGGTACCataattgtccaatagttatgtagc
 614: catgccatggCGGCAAGGCTCCTC
 615: cggggtaccTTTATTTGTCAACACTGCCC
 616: cggggtaccTGCGGGGTCTTTACTCG
 677: TTA CTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCCGCCATCTGGCCCAAATTGGTG
 ATGAAATGGATCATTAAAGCTTGGAGTA
 678: TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTCATCACCAATTTGGGCCAGATGGCGGGCAA
 TATTATGAATAATTTCTTCGAATAGTAA
 682: TTA CTACTCGAGAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCGCCGCATTGGTGATGAACTG
 GATAGCTAAGCTTGGAGTA
 683: TACTCCAAGCTTAGCTATCCAGTTCATCACCAATGCGGCGCAGACATTCGCTCA
 GTTTTTTCTCGAGTAGTAA

Таблица II. Клонированные слитые белки

Доставляе- мый ССЗТ белок	Номер ID последо- вательно- сти белка	Фоновая плазмида	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Номер ID последова- тельности праймеров
YopE1-138- MycHis	3	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (УЗФБ), 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 субъединица 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- нанотело VhH4, распознающее УЗФБ	31	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	108/78
YopE1-138- протеаза TEV вариант S219V	42	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	109/110
YopE1-138- УЗФБ	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-(2 сайта расщепления протеазой TEV) - ET1	41	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	123/124
YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV) - УЗФБ - NLS	39	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	127/129
YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV) - NLS - УЗФБ	38	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	128/111
YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV) - INK4C	40	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	125/126

YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV) - Flag - INK4C	43	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	130/126
YopE1-138-Traf6 мыши	12	pBad_Si_2	pSi_166	561/562	133/134
YopE1-138-(кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica tBid мыши, ВНЗ-часть)	138	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	148/149
YopE1-138-(кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica Вах мыши, 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-кодон-оптимизированный для S. enterica tBid мыши	144	pSi_266	pSi_270	искусственная конструкция	/
SteA-кодон-оптимизированный для S. enterica tBid мыши	145	pSi_267	pSi_271	искусственная конструкция	/
SopE1-81-кодон-оптимизированный для S. enterica tBid мыши	146	pSi_268	pSi_272	искусственная конструкция	/
SopE1-105-	147	pSi_269	pSi_273	искусственная	/

кодон- оптимизиро- ванный для S. enterica tBid мышь				конструкция	
YopE1-138- (кодон- оптимизиро- ванные для Y. enterocolitica Ink4A, остатки 84-103)	158	pBad_Si_2	pSi_362	745/746	172/173
YopE1-138- (кодон- оптимизиро- ванные для Y. enterocolitica p107/RBL1, остатки 657- 662) (AAA02489.1)	159	pBad_Si_2	pSi_363	747/748	174/175
YopE1-138- (кодон- оптимизиро- ванные для Y. enterocolitica p21, остатки 141-160) (AAH13967.1)	160	pBad_Si_2	pSi_364	749/750	176/177
YopE1-138- (кодон- оптимизиро- ванные для Y. enterocolitica p21, остатки 145-160) (AAH13967.1)	161	pBad_Si_2	pSi_366	753/754	178/179
YopE1-138- (кодон- оптимизиро- ванные для Y. enterocolitica p21, остатки 17-33) (AAH13967.1)	162	pBad_Si_2	pSi_367	755/756	180/181
YopE1-138- (кодон- оптимизиро- ванные для Y. enterocolitica циклин D2, остатки 139-	163	pBad_Si_2	pSi_368	757/758	182/183

147) (CAA48493.1)					
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	ПЦР1: 705/706; ПЦР2: 707/708; ПЦР с перекрывающимися праймерами: 705/708	186/187, 188/189
SopE1-105-Ink4c-MycHis	167	pSi_269	pSi_336	ПЦР1: 705/706; ПЦР2: 707/708; ПЦР с перекрывающимися 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-кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica tBid мыши	194	pBad_Si_2	pSi_315	искусственная 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

Секреция белка Yop.

Индукцию регулона уор осуществляли путем перевода культуры на температуру 37°C в среде ВНИ-Ох (пермиссивные условия для секреции) [49]. В качестве источника углевода добавляли глюкозу (4 мг/мл).

Фракцию тотальных клеток и фракцию супернатанта разделяли центрифугированием при 20800 g в течение 10 мин при 4°C. Клеточную массу принимали за фракцию тотальных клеток. Белки в супернатанте преципитировали трихлоруксусной кислотой с конечной концентрацией 10% (мас./об.) в течение 1 ч при 4°C. После центрифугирования (20800 g в течение 15 мин) и удаления супернатанта получившуюся клеточную массу промывали в ледяном ацетоне в течение ночи. Образцы снова центрифугировали, отбрасывали супернатант и клеточную массу сушили на воздухе и ресуспендировали в 1× загрузочном красителе с додецилсульфатом натрия (ДСН).

Секретированные белки анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ДСН-ПААГ-электрофорез); в каждом случае белки, секретированные 3×10^8 бактериями, загружали на дорожку. Проводили определение специфических секретируемых белков иммуноблоттингом с использованием 12,5% гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза. Для определения белков в тотальных клетках загружали на дорожку 2×10^8 бактерий, если не указано иначе, и белки отделяли на 12,5% геле для ДСН-ПААГ-электрофореза перед детекцией с помощью иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг проводили с использованием моноклональных антител крысы против YopE (MIRA193 - 13A9; 1:1000, [50]). Антисыворотку истожили два раза в течение ночи против штамма Y. enterocolitica ДНОРЕМТ asd, чтобы снизить фоновое окрашивание. Определение проводили с вторичными антителами, направленными против антител крысы и конъюгированными с пероксидазой хрена (1:5000; Southern biotech), перед проявлением с помощью хемилюминесцентного субстрата ECL (LumiGlo, KPM).

Культивирование клеток и процессы инфицирования.

Клетки HeLa Ccl2, клетки фибробластов swiss 3T3, 4T1, B16F10 и D2A1 культивировали на среде

Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 2 мМ L-глутамина (среда cDMEM). Клетки HUVEC выделяли и культивировали, как описано в [51]. Клетки Jurkat и 4T1 культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% ЭТС и 2 мМ L-глутамина. Бактерии *Y. enterocolitica* выращивали на сердечно-мозговой вытяжке с добавками в течение ночи при комнатной температуре, разбавляли в свежей сердечно-мозговой вытяжке до оптической плотности при 600 нм (OD_{600}), равной 0,2, и выращивали 2 ч при комнатной температуре перед осуществлением температурного сдвига на водяной бане-шейкере с температурой 37°C в течение дополнительных 30 мин или 1 ч в случае доставки УЗФБ. Наконец, бактерии собирали с помощью центрифугирования (относительное центробежное ускорение (ОЦУ) 6000, 30 с) и промывали один раз средой DMEM, в которую добавлены 10 мМ ГЭПЭС (HEPES) и 2 мМ L-глутамина. *S. enterica* выращивали на среде LB с добавками в течение ночи при 37°C и либо разводили 1:40 в свежей среде LB и выращивали в течение 2,5 ч при 37°C (индуцирующие условия для *SpiI* системы C3T), либо оставленную на ночь культуру дополнительно инкубировали при температуре 37°C (индуцирующие условия для *SpiII* системы C3T). Наконец, бактерии собирали с помощью центрифугирования (ОЦУ 6000, 30 с) и промывали один раз средой DMEM, в которую добавлены 10 мМ ГЭПЭС и 2 мМ L-глутамина. Клетки, посеянные в 96-луночные (для иммунофлуоресценции) или 6-луночные (для вестерн-блоттинга) планшеты, инфицировали бактериями при указанных значениях MOI в среде DMEM, в которую добавлены 10 мМ ГЭПЭС и 2 мМ L-глутамина. После добавления бактерий планшеты центрифугировали в течение 1 мин при ОЦУ 1750 и оставляли при температуре 37°C в течение указанных периодов времени. Убивали внеклеточные бактерии гентамицином (100 мг/мл), если указано. В случае иммунофлуоресцентного анализа оценку инфицирования останавливали фиксацией 4% параформальдегидом (ПФА). Для вестерн-блоттинга клетки промывали два раза ледяным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и добавляли лизирующий буфер Phospho-safe (Novagen) для лизиса клеток. После инкубации на льду клетки центрифугировали (ОЦУ 16000, 25 мин, 4°C). Супернатанты собирали и анализировали на содержание общего белка методом Бредфорд или методом с бичинхониновой кислотой (БХК) (Pierce) перед ДСН-ПААГ-электрофорезом и вестерн-блоттингом с использованием анти-фосфо-Akt (фосфолированные остатки Ser473 и T308, оба производства Cell Signaling), анти-актин (Millipore), анти-Bid (Cell Signaling), анти-Myc (Santa Cruz), анти-p38 (Cell Signaling), анти-фосфо-p38 (фосфолированные остатки Thr180/Tyr182; Cell Signaling), анти-(каспаза-3, субъединица p17) (Cell Signaling) и анти-Ink4C (Cell Signaling) антитела.

Анализ секреции с *S. enterica*.

Для индукции секреции белков бактериями *S. enterica* культивировали *S. enterica* в течение ночи в среде LB, содержащей 0,3М NaCl, на орбитальном шейкере (установленном на 150 об/мин). Затем *S. enterica* разбавляли 1:50 в свежей среде LB, содержащей 0,3М NaCl, и выращивали 4 ч при температуре 37°C без встряхивания.

Фракцию тотальных клеток и фракцию супернатанта разделяли центрифугированием при 20800 g в течение 20 мин при 4°C. Клеточную массу принимали за фракцию тотальных клеток. Белки в супернатанте преципитировали трихлоруксусной кислотой с конечной концентрацией 10% (мас./об) в течение 1 ч при 4°C. После центрифугирования (20800 g в течение 15 мин) и удаления супернатанта получившуюся клеточную массу промывали в ледяном ацетоне в течение ночи. Образцы снова центрифугировали, отбрасывали супернатант и клеточную массу сушили на воздухе и ресуспендировали в 1× загрузочном красителе с ДСН.

Секретированные белки анализировали ДСН-ПААГ-электрофорезом; в каждом случае белки, секретированные 3×10^8 бактериями, загружали на дорожку. Проводили определение специфических секретированных белков иммуноблоттингом с использованием 12,5% гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза. Для определения белков в тотальных клетках 2×10^8 бактерий загружали на дорожку, если не указано иначе, и разделяли белки на 12,5% гелях для ДСН-ПААГ-электрофореза перед детекцией с помощью иммуноблоттинга. Иммуноблоттинг проводили с использованием анти-Myc (Santa Cruz) антитела.

Вестерн-блоттинг транспонированных ССЗТ белков из инфицированных клеток.

Клетки HeLa в 6-луночных планшетах инфицировали при MOI 100, как описано выше. В случае коинфекции со штаммом *Y. enterocolitica*, транслоцирующим протеазу TEV, устанавливали OD_{600} штаммов и смешивали две суспензии бактерий в пробирке с соотношением 1:1 (если не указано иначе) перед добавлением к клеткам. В конце процесса инфицирования клетки два раза промывали ледяным ФСБ и собирали соскабливанием в малые объемы ледяного ФСБ. После центрифугирования (ОЦУ 16000, 5 мин, 4°C) клеточную массу растворяли в 0,002% дигитонине, в который добавляли коктейль ингибиторов протеазы (Roche complete, Roche). Растворенные клеточные массы инкубировали 5 мин на льду, а затем центрифугировали (ОЦУ 16000, 25 мин, 4°C). Собирали супернатанты и анализировали на содержание общего белка методом Бредфорд или методом с БЦК (Pierce) перед ДСН-ПААГ-электрофорезом и вестерн-блоттингом с использованием анти-Myc (Santa Cruz, 9E11) или анти-Ink4C (Cell Signaling) антитела.

Иммунофлуоресценция.

Клетки, посеянные в 96-луночные планшеты (Corning), инфицировали, как описано выше, и после фиксации 4% ПФА клетки промывали три раза ФСБ. Лунки блокировали с использованием 5% сыворот-

ки козла в ФСБ с 0,3% Тритоном X-100 в течение 1 ч при комнатной температуре. Первичное антитело (анти-Мус, Santa Cruz, 1:100) разбавляли в ФСБ с 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) и 0,3% Тритоном X-100 и клетки инкубировали в течение ночи при 4°C. Клетки промывали 4 раза ФСБ перед добавлением второго антитела (антимышиное антитело с AF 488, life technologies, 1:250), разбавленным в ФСБ с 1% БСА и 0,3% Тритоном X-100. При необходимости включали стадию окрашивания ДНК красителем Хехст (life technologies, 1:2500) и/или окрашивание актина (Ду647-фаллоидин, DyeOmics). В некоторых случаях применяли только окрашивание ДНК и/или актина сразу после отмывания от ПФА. Клетки инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали три раза ФСБ и анализировали с помощью автоматизированного анализа изображений, как описано ниже.

Автоматизированная микроскопия и анализ изображений.

Изображения получали автоматически с помощью системы ImageXpress Micro (Molecular devices, Саннивейл, США). Количественное определение интенсивностей анти-Мус-окрашивания проводили с использованием программного обеспечения MetaXpress (Molecular devices, Саннивейл, США). Области внутри клеток, за исключением ядерных областей и областей, содержащих бактерии, выбирали вручную (около площади 40 пикселей) и регистрировали среднюю интенсивность.

Стимуляция фактором некроза опухолей альфа (ФНО- α) и вестерн-блоттинг фосфо-p38.

Клетки HeLa, посеянные на 6-луночные планшеты, инфицировали при MOI 100, как описано выше. Спустя 30 мин после инфицирования добавляли гентамицин и спустя 45 мин после инфицирования добавляли ФНО- α (10 нг/мл). Спустя 1 ч 15 мин после инфицирования клетки промывали два раза ледяным ФСБ и добавляли лизирующий буфер Phospho-safe (Novagen) для лизиса клеток. После инкубации на льду клетки центрифугировали (ОЦУ 16000, 25 мин, 4°C). Собирали супернатанты и анализировали на содержание общего белка методом Бредфорд или методом с БЦК (Pierce) перед ДСН-ПААГ-электрофорезом и вестерн-блоттингом с использованием анти-фосфо-p38 антител, антител к общему p38 (Cell Signaling) и анти-актин антитела (Millipore).

Определение уровня цАМФ у инфицированных клеток HeLa. Клетки HeLa, посеянные на 96-луночные планшеты, инфицировали, как описано выше. За 30 мин перед инфицированием среду cDMEM меняли на среду DMEM с добавлением 10 mM ГЭПЭС и 2 mM L-глутамин и 100 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (ИБМК, Sigma Aldrich). Спустя 60 мин после инфицирования добавляли гентамицин и дополнительно инкубировали клетки при 37°C еще 90 мин. Определение цАМФ проводили с использованием конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в соответствии с инструкциями производителя (Amersham, cAMP Biotrak, RPN225). В качестве положительного контроля добавляли указанное количество холерного токсина (C8052, Sigma Aldrich) к клеткам на 1 ч в среде DMEM, в которую добавлены 10 mM ГЭПЭС и 2 mM L-глутамин и 100 мкМ ИБМК.

Процессы инфицирования эмбрионов дарио, получение изображений и автоматизированный количественный анализ изображения. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с принятыми руководствами. Дарио содержали в стандартных условиях [52]. Эмбрионы делили на стадии по часам после оплодотворения при 28,5°C [53]. Следующие линии дарио использовали при исследовании: рыба дикого типа (линии АВ/ЕК и ЕК/ТЛ). Протокол инфицирования соответствовал руководствам, представленным в [54]. Эмбрионы на стадии 12 ч после оплодотворения содержали в среде Е3, содержащей 0,2 mM N-фенилтиомочевину (ФТМ) для предотвращения образования пигмента. Эмбрионы на стадии 2 дня после оплодотворения анестезировали 0,2 мг/мл трикаина и выравнивали на 1% агаровых чашках в среде Е3 с использованием волосистой петли [54]. *Y. enterocolitica* выращивали на сердечно-мозговой вытяжке с добавлением 0,4% арабинозы и антибиотиков и мДАП в течение ночи при комнатной температуре, разбавляли в свежей сердечно-мозговой вытяжке с 0,5% арабинозой и другими добавками до OD₆₀₀, равной 0,2, и выращивали 2 ч при комнатной температуре перед осуществлением температурного сдвига на водяной бане-шейкере с температурой 37°C в течение дополнительных 45 мин. Наконец, бактерии собирали центрифугированием (ОЦУ 6000, 30 с) и промывали один раз ФСБ. OD₆₀₀ устанавливали равным 2 в ФСБ, содержащем мДАП. Проводили инъекцию 1-2 нл этой суспензии в задний мозг выровненных эмбрионов дарио с использованием микроинъектора Femtojet Microinjector (Eppendorf) с капиллярами Femtotips II (Eppendorf), где конец иглы обламывали тонкими щипцами. Время инъекции устанавливали 0,2 с и компенсационное давление 15 гПа (Eppendorf, Femtojet), а давление инъекции настраивали от 600 до 800 гПа. Размер капли и, таким образом, инокулят проверяли с помощью микроскопии и контрольным посевом на чашки Петри. После микроинъекции рыбу собирали на среду Е3, содержащую трикаин и ФТМ, и инкубировали 30 мин при 37°C и дополнительно инкубировали в течение 5 ч при 28°C. Использовали флуоресцентный бинокуляр (Leica) для наблюдения за флуоресценцией бактерий УЗФБ спустя 1 ч после инфицирования в заднем мозге дарио, и эмбрионы, которые не были должным образом инъецированы, отбрасывали. В конце процесса инфицирования рыбу фиксировали 2% ледяным ПФА в течение 1 ч на льду и дополнительно свежим ледяным ПФА в течение ночи при 4°C. Окрашивание антителами проводили, как описано ранее [55, 56]. Кратко, эмбрионы промывали 4 раза ФСБ с 0,1% Твином (ФСБ-Т) по 5 мин каждую промывку и пермеабелизировали с помощью ФСБ-Т+0,5% Тритон X-100 в течение 30 мин при комнатной температуре. Эмбрионы блокировали в блоки-

рующем растворе (ФСБ, 0,1% Твин, 0,1% Тритон X-100, 5% сыворотка козла и 1% БСА) при 4°C в течение ночи. Антитело (Cleaved Caspase-3 (Asp175), Cell Signaling) разводили 1:100 в блокирующем растворе и инкубировали со встряхиванием при 4°C в темноте. Рыбу промывали 7 раз ФСБ с 0,1% Твином в течение 30 мин перед тем, как добавляли второе антитело (антитело козла против кролика с AF647, Invitrogen, 1:500), разведенное в блокирующем растворе, и инкубировали при 4°C в течение ночи. Личинки промывали ФСБ с 0,1% Твином четыре раза в течение 30 мин при 4°C и один раз ночью и дополнительно промывали 3-4 раза. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 с использованием 40× водноиммерсионного объектива.

Изображения анализировали с использованием программного обеспечения Imaris (Bitplane) и Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Анализ изображений (n=14 для pBad_Si2 или n=19 для z-BIM) проводили посредством CellProfiler [57] по максимальной интенсивности проекций по оси z зарегистрированных изображений z-стеков. Вкратце, бактерии определяли через GFP-канал. Около каждой области пятна бактерий создавали круг с радиусом 10 пикселей. Перекрывающиеся области разделяли поровну между контактирующими членами. В этих областях, плотно окружающих бактерии, измеряли интенсивность окрашивания субъединицы p17 каспазы 3.

Приготовление образцов для фосфопротеомики.

Для каждого случая на двух 6-луночных планшетах выращивали клетки HeLa CCL-2 до достижения состояния конfluence. Клетки инфицировали в течение 30 мин, как описано выше. В обозначенные моменты времени планшеты помещали на лед и промывали два раза ледяным ФСБ. Образцы затем собирали в раствор мочевины [8М мочевины (AppliChem), 0,1М бикарбонат аммония (Sigma), 0,1% детергент RapiGest (Waters), 1× набор ингибиторов PhosSTOP (Roche)]. Образцы непродолжительное время перемешивали на вортексе, обрабатывали ультразвуком при 4°C (Hielscher), встряхивали в течение 5 мин на термомиксере (Eppendorf) и центрифугировали 20 мин при 4°C и 16000 g. Супернатанты собирали и хранили при -80°C для дополнительной обработки. Метод анализа белков с БХК (Pierce) применяли для измерения концентрации белка.

Обогащение фосфопептидов.

Восстанавливали дисульфидные связи трис-(2-карбокситетил)фосфином с конечной концентрацией 10 мМ при 37°C в течение 1 ч. Свободные тиоловые группы алкилировали 20 мМ иодоацетидами (Sigma) при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. Избыток иодоацетида нейтрализовывали N-ацетилцистеином с конечной концентрацией 25 мМ в течение 10 мин при комнатной температуре. Добавляли эндопептидазу Lys-C (Wako) до конечного соотношения фермент/белок 1:200 (об./об.) и инкубировали 4 ч при 37°C. Раствор последовательно разводили 0,1М бикарбонатом аммония (Sigma) до конечной концентрации ниже 2М мочевины и подвергали ферментативному расщеплению в течение ночи при 37°C модифицированным трипсином для секвенирования (Promega) при соотношении белка к ферменту 50:1. Пептиды обессаливали на картридже C18 Sep-Pak (Waters) и сушили под вакуумом. Фосфопептиды выделяли из 2 мг общей пептидной массы с помощью TiO_2 , как описано ранее [58]. Вкратце, высушенные пептиды растворяли в растворе 80% ацетонитрил (АЦН) - 2,5% трифторуксусная кислота (ТФК), насыщенном фталовой кислотой. Пептиды добавляли к такому же объему уравновешенного TiO_2 (размер гранул 5 мкм, GL Sciences) в блокированной спин-колонке Mobicol (MoBiTec), которую инкубировали 30 мин с ротацией сверху вниз и снизу вверх. Колонку промывали два раза насыщенным раствором фталовой кислоты, два раза раствором 80% ацетонитрила и 0,1% ТФК и, наконец, два раза 0,1% ТФК. Пептиды элюировали 0,3М раствором NH_4OH . Подводили pH элюатов 5% раствором ТФК и 2М HCl до pH ниже 2,5. Снова обессаливали фосфопептиды на микроспин-картриджах C18 (Harvard Apparatus).

Анализ жидкостной хроматографией с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС).

Хроматографическое разделение пептидов выполняли с использованием системы EASY nano-LC (Thermo Fisher Scientific), оборудованной нагреваемой колонкой для обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) (75 мкм × 45 см), предзаполненной 1,9 мкм смолы C18 (Reprosil-AQ Pur, Dr. Maisch). Аликвоты 1 мкг образца общих фосфопептидов анализировали за цикл ЖХ-МС/МС с использованием линейного градиента в диапазоне от 98% растворителя А (0,15% муравьиная кислота) и 2% растворителя В (98% ацетонитрила, 2% воды, 0,15% муравьиной кислоты) до 30% растворителя В за 120 мин с линейной скоростью потока 200 нл/мин. Масс-спектрометрию проводили на масс-спектрометре LTQ-Orbitrap масс-спектрометре с двойным давлением, оборудованным источником ионизации наноэлектрораспылением (оба производства Thermo Fisher Scientific). После каждого скана первой масс-спектрометрии (MS1) (полученным в Orbitrap) следовала индуцируемая столкновениями диссоциация (CID, получаемая в LTQ) 20 наиболее распространенных ионов-предшественников с динамическим исключением на 30 с. Для анализа фосфопептидов 10 наиболее распространенных ионов-предшественников подвергали индуцируемой столкновениями диссоциации с разрешенной многостадийной активацией. Общее время цикла составляло приблизительно 2 с. Для MS1 в камере Orbitrap накапливали 10^6 ионов за максимальное время 300 мс и сканировали с разрешением 60000 FWHM (полная ширина на половине высоты) (при 400 m/z). Сканы масс-спектрометрии 2 (MS2) получали с использова-

нием нормального режима сканирования, настройкой цели в 10^4 ионов и временем накопления 25 мс. Однозарядные ионы и ионы с неопределенным заряженным состоянием исключались из запускающих MS2 событий. Нормализованную энергию столкновения устанавливали на 32% и для каждого спектра получали один микроскан.

Безмаркерное количественное определение и поиск по базам данных.

Полученные файлы формата raw импортировали в инструментальное программное средство Progenesis (Nonlinear Dynamics, версия 4.0) для безмаркерного количественного определения, используя параметры по умолчанию. Спектры MS2 напрямую экспортировали из Progenesis в формат mgf и осуществляли поиск с использованием алгоритма MASCOT (Matrix Science, версия 2.4) против базы данных ложных белков [59], содержащей нормальные и обратные последовательности предсказанных записей данных SwissProt по Homo sapiens (www.ebi.ac.uk, дата выпуска 16/05/2012) и традиционно встречающиеся контаминанты (в общем 41250 последовательностей), созданных с использованием инструмента SequenceReverser из программного обеспечения MaxQuant (версия 1.0.13.13). Чтобы идентифицировать белки, происходящие из *Y. enterocolitica*, образцы, не обогащенные фосфопептидами, искали против той же самой упомянутой выше базы данных, включая предсказанные записи данных SwissProt по *Y. enterocolitica* (www.ebi.ac.uk, дата выпуска 15/08/2013). Допуск на ион-предшественник установили на 10 млн долей (ppm) и допуск на фрагментарный ион установили на 0,6 Да. Критерий поиска установили следующий: требовалась полная специфичность для трипсина (расщепление после остатков лизина или аргинина, если следующим остатком был не пролин), допускалось 2 пропущенных расщепления, карбамидо-метилирование (C) установили как фиксированную модификацию и фосфорилирование (S, T, Y,) или окисление (M) в качестве переменной модификации для обогащенных TiO_2 или необогащенных образцов соответственно. Наконец, результаты поиска по базам данных экспортировали как файлы формата xml и импортировали назад в программное обеспечение Progenesis для назначения признаков у MS1. Для количественного определения фосфопептидов файл формата csv, содержащий интенсивности пиков MS1 всех определенных признаков, экспортировали, а для необогащенных образцов создавали файл csv, содержащий измерения белка на основе суммированных интенсивностей пиков всех идентифицированных пептидов на белок. Важно, чтобы программное обеспечение Progenesis было настроено так, что белки, идентифицируемые схожими наборами пептидов, группируются вместе и что используются только не конфликтующие пептиды со специфическими последовательностями для одиночных белков в базе данных для количественного определения белка. Оба файла дополнительно обрабатывались с использованием собственного разработанного на языке R скрипта SafeQuant v1.0 (неопубликованные данные, доступны на <https://github.com/eahrne/SafeQuant/>). Вкратце, программное обеспечение устанавливает процент ложноположительных результатов при идентификации в 1% (на основе числа совпадений в базе данных последовательностей ложных белков) и нормализует идентифицированные интенсивности пиков MS1 (экстрагированная ионная хроматограмма, ХИС) среди всех образцов, т.е. суммированная ХИС всех уверенно идентифицированных пептидных признаков приведена к такому масштабу, чтобы быть эквивалентной всем циклам ЖХ-МС. Далее всем определенным количественно фосфопептидам/белкам присваивается отношение интенсивности в каждый момент времени на основе средней ХИС за единицу времени. Статическая значимость каждого отношения представлена его q-значению (p-значения, скорректированные по проценту ложноположительных результатов), полученным путем расчета модифицированных t-статистических p-значений [60], и корректировки для множественных сравнений [61]. Локализация фосфорилированных остатков автоматически присваивалась алгоритмом MASCOT (значение >10). Все аннотированные спектры вместе с файлами формата raw масс-спектрометрии и использованными параметрами поиска будут размещены на ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) через партнерское хранилище PRIDE [62].

Выравнивание последовательности выполняли с использованием принадлежащей Европейской молекулярно-биологической лаборатории и Европейскому институту биоинформатики (EMBL-EBI) веб-версии инструмента выравнивания множества последовательностей ClustalW2 на сайте <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

В) Результаты.

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

Тогда как самый N-конец эффектора YopE (SEQ ID NO: 1) системы C3T *Y. enterocolitica* содержит сигнал секреции, достаточный для транслокации гетерогенных белков [10], сайт связывания с шапероном (CBS) для его шаперона (SycE) в него не включен [63]. Авторы настоящего изобретения выбрали 138 N-концевых аминокислот YopE (SEQ ID NO: 2) для слияния с доставляемыми белками, так как было показано, что это дает самые лучшие результаты в отношении транслокации других гетерологичных C3T-субстратов [38]. Поскольку эти 138 N-концевых аминокислот YopE содержат сайт связывания с шапероном, авторы настоящего изобретения решили осуществить коэкспрессию SycE. Фрагмент SycE-YopE₁₋₁₃₈, клонированный из очищенной плазмиды вирулентности *Y. enterocolitica* pYV40, содержит эндогенные промоторы YopE и его шаперона SycE (фиг. 10). Таким образом, SycE и любой слитый с YopE₁₋₁₃₈ белок индуцируются быстрым температурным сдвигом от роста при комнатной температуре до температуры 37°C. Время культивирования при 37°C будет влиять на количество слитого белка, присут-

ствующего в бактериях. Сайт множественного клонирования (MCS) добавляли к 3'-концу YopE₁₋₁₃₈ (фиг. 10 В), за ним следовали Мус-метка и метка из 6 Нус (6xHis-метка) и стоп-кодон.

Тщательно выбирали фоновый штамм. Во-первых, чтобы ограничить транслокацию эндогенных эффекторов, авторы настоящего изобретения применяли штамм *Y. enterocolitica*, у которого удалили все известные эффекторы, Yop H, O, P, E, M и T (называется ΔНОРЕМТ) [64]. Дополнительно авторы применяли ауксотрофный мутант, который не может расти при отсутствии экзогенной мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты [65]. У этого штамма удаляли ген аспарат-β-семиальдегиддегидрогеназы (Asd) и классифицировали как уровень 1 биологической безопасности согласно Швейцарском агентству безопасности (поправка к A010088/2). Дополнительно авторы настоящего изобретения удаляли белки адгезии YadA и/или InvA, чтобы предложить более широкий выбор фоновых штаммов. Тогда как применение штаммов yadA или yadA/invA снижает индуцированную фоновую передачу сигналов [66], это также влияет на количество доставляемого белка [67].

Характеризация доставки слитого белка YopE внутрь эукариотических клеток.

При анализе секреции *in vitro* (см. фиг. 1А) секреция белка в окружающую жидкость индуцируют искусственно. После преципитации белка с помощью ТХК применяли вестерн-блоттинг с анти-YopE антителом для определения количеств секретируемого белка (фиг. 1В). Тогда как штамм дикого типа (wt) секретирует полноразмерный YopE, штаммы ΔНОРЕМТ asd этого не делали. В результате наличия YopE₁₋₁₃₈-Мус-His (далее обозначаемом YopE₁₋₁₃₈-Мус; SEQ ID NO: 3) стала видна малая полоса YopE (фиг. 1В). Следовательно, фрагмент YopE₁₋₁₃₈ хорошо секретируется в условиях, описанных в настоящей заявке. Для анализа гомогенности транслокации белка внутри эукариотических клеток авторы настоящего изобретения инфицировали клетки HeLa штаммом, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-Мус, и окрашивали Мус-метку с помощью иммунофлуоресценции (IF) (фиг. 2А и В). Тогда как в начале окрашивались только бактерии, спустя 30 мин после инфицирования становятся видны очертания клеток, которые становятся интенсивнее при увеличенном времени инфицирования (фиг. 2В). Эта тенденция хорошо отражена интенсивностью окрашивания Мус-метки внутри клеток HeLa (фиг. 2А и В). YopE₁₋₁₃₈-Мус можно определить повсюду в клетках (фиг. 2А), кроме ядер [68]. Примечательно, что большинство, если не все клетки в сравнительной степени были затронуты этим подходом. Так как известно, что *Y. enterocolitica* инфицирует множество разных типов клеток [69], авторы настоящего изобретения следили за доставкой YopE₁₋₁₃₈-Мус в различные линии клеток. Наблюдали такое же гомогенное иммунофлуоресцентное анти-Мус-окрашивание у инфицированных фибробластов мыши, клеток Jurkat и клеток HUVEC (фиг. 11). Более того, снижение или увеличение MOI позволяет модулировать количество доставляемого белка (фиг. 2С), тогда как большинство клеток всё также остаются мишенями. Низкое число бактерий не приведет к появлению нескольких клеток со множеством доставляемого белка, но скорее к большинству клеток, содержащих низкое количество доставляемого белка (фиг. 2С).

Перенаправление доставляемых ССЗТ белков в ядро.

Так как сам белок YopE локализуется в цитоплазме (фиг. 2А), особенно интересно проверить, затрудняет ли фрагмент YopE₁₋₁₃₈ локализацию ядерных слитых белков. Таким образом, авторы настоящего изобретения добавляли сигнал ядерной локализации (NSL) вируса SV40 к С-концу (и N-концу, схожие результаты) YopE₁₋₁₃₈-УЗФБ (соответственно, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 38). Тогда как YopE₁₋₁₃₈-УЗФБ (SEQ ID NO: 37) приводил к слабому цитоплазматическому окрашиванию, YopE₁₋₁₃₈-УЗФБ-NLS вызывал более сильный ядерный сигнал УЗФБ в инфицированных клетках HeLa (фиг. 3). Это указывает, что фрагмент YopE₁₋₁₃₈ совместим с применением сигнала ядерной локализации (NLS). Тогда как mCherry уже применяли у патогенов растений [70], это демонстрирует успешную доставку ЗФР-подобного белка посредством патогенных бактерий человека или животных, кодирующих ССЗТ. Это подтверждает, что стратегия на основе SycE и YopE₁₋₁₃₈ является очень многообещающей для доставки множества выбранных белков.

Удаление остатка YopE₁₋₁₃₈ после транслокации слитого белка внутрь эукариотической клетки.

Хотя бактериальная доставка фрагмента YopE₁₋₁₃₈ дает множество преимуществ, она может мешать функционированию слитых белков и/или их локализации. Таким образом, удаление этого фрагмента после доставки белка было бы оптимальным. С этой целью, авторы настоящего изобретения ввели два сайта расщепления протеазой TEV (ENLYFQS) [71-73] между YopE₁₋₁₃₈ и слитым партнером (регулятор транскрипции ET1-Мус (SEQ ID NO: 36 и 41) [74] и INK4С человека (SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 43)). Для сохранения преимуществ настоящего способа авторы дополнительно осуществили слияние протеазы TEV (вариант S219V; [75]) с YopE₁₋₁₃₈ (SEQ ID NO: 42) в другом штамме *Y. enterocolitica*. Клетки HeLa инфицировали обоими штаммами сразу. Чтобы была возможность провести анализ только транслоцированных фракций белков, инфицированные клетки HeLa лизировали спустя 2 ч после инфицирования (фиг. 4) дигитонином, который, как известно, не лизирует бактерии ([76]; см. фиг. 12, контроль). Вестерн-блоттинг показал наличие только YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-ET1-Мус или только YopE₁₋₁₃₈-(2 сайта расщепления протеазой TEV)-Flag-INK4С-Мус, когда клетки инфицировали соответствующим штаммом (фиг. 4А и С). В результате расщепления в течение ночи эти клеточных лизатов очищенной протеазой TEV можно было наблюдать сдвинутую полосу (фиг. 4А и С). Эта полоса

отвечает ET1-Мус (фиг. 4С) или Flag-INK4С (фиг. 4А) с N-концевыми остатками сайта расщепления протеазой TEV, вероятней всего представленными только одним серином. В результате коинфицирования клеток штаммом, доставляющим протеазу TEV, становятся видимыми одинаковые расщепленные фрагменты ET1-Мус или Flag-INK4С, указывая на то, что протеаза TEV, доставленная посредством ССЗТ, является функциональной и что отдельные клетки были инфицированы обоими штаммами бактерий (фиг. 4А и С). Хотя расщепление не закончено, большая часть транслоцированного белка оказывается расщепленной уже спустя 2 ч после инфицирования и даже расщепление очищенной протеазой TEV в течение ночи не достигало лучших скоростей расщепления (фиг. 4В). Как отмечалось, расщепление на основе протеазы TEV может потребовать оптимизации в зависимости от слитого белка [77, 78]. Зависимое от протеазы TEV удаление остатка YopE₁₋₁₃₈ после транслокации, следовательно, впервые обеспечивает доставку белков системой СЗТ в отношении практически нативных гетерологичных белков, изменяя аминокислотную композицию только на одну N-концевую аминокислоту.

Альтернативный подход к расщеплению на основе протеазы TEV фрагмента YopE состоит во включении убиквитина в слитый белок, представляющий интерес. Действительно убиквитин подвергается процессированию по своему С-концу группой эндогенных специфичных к убиквитину С-концевых протеаз (деубиквитирующие ферменты, DUB). Так как расщепление предполагается происходит на самом С-конце убиквитина (после G76), интересующий белок не должен содержать дополнительной аминокислотной последовательности. Этот способ проверили на слитом белке YopE₁₋₁₃₈-убиквитин-Flag-INK4С-МусHis. В контрольных клетках, инфицированных бактериями, экспрессирующими YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4С-МусHis, обнаруживали полосу, соответствующую YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4С-МусHis, указывающую на эффективную транслокацию слитого белка (фиг. 24). Когда клетки инфицировали в течение 1 ч бактериями, экспрессирующими YopE₁₋₁₃₈-убиквитин-Flag-INK4С-МусHis, была видна дополнительная полоса, соответствующая размеру Flag-INK4С-МусHis, указывающая на то, что часть слитого белка была расщеплена. Данный результат показывает, что введение убиквитина в слитый белок позволяет отщеплять фрагмент YopE₁₋₁₃₈ без необходимости применять экзогенную протеазу.

Транслокация эффекторов бактерий III типа и IV типа.

Белок SopE из *Salmonella enterica* является хорошо охарактеризованным фактором обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), который взаимодействует с Cdc42, стимулируя ремоделирование актинового цитоскелета [79]. В то время как транслокация YopE₁₋₁₃₈-Мус внутрь клеток HeLa не оказывает эффекта, транспонированный YopE₁₋₁₃₈-SopE (SEQ ID NO: 5 и 135) индуцирует значительные изменения в актиновой сети (фиг. 5А). Похожие результаты получали с другим эффекторным белком, представляющим фактор обмена гуаниновых нуклеотидов, IpgB1 из *Shigella flexneri* (SEQ ID NO: 4). Примечательно, что первые изменения в актиновом цитоскелете наблюдали уже так скоро, как спустя 2 мин после инфицирования (фиг. 5А). Таким образом, можно прийти к выводу, что ССЗТ-зависимая доставка белков происходит сразу после инициирования инфекции центрифугированием. Для доказательства строгого ССЗТ-зависимого транспорта один из белков системы СЗТ, образующий транслоцирующую пору внутрь эукариотической клетки, удаляли (YopB, см. [80]) (фиг. 12).

В ходе инфицирования *Salmonella* после транслокации SopE происходила транслокация SptP, который функционирует как активирующий ГТФазу белок (GAP) для Cdc42 [81]. Несмотря на то, что транслокация YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус (SEQ ID NO: 135) сама по себе запускает массивные перестройки F-актина, коинфицирование бактериями, экспрессирующими YopE₁₋₁₃₈-SptP (SEQ ID NO: 8), устраняла данный эффект дозозависимым способом (фиг. 5В). Анти-Мус-окрашивание показало, что причиной этого ингибирования был не сниженный уровень транслокации YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус (фиг. 5В). Вместе эти результаты показали, что коинфицирование клеток двумя штаммами бактерий является надежным способом доставки двух различных эффекторов в отдельные клетки с целью выяснить их функциональное взаимодействие.

Эффектор III типа OspF *S. flexneri* функционирует как фосфотреонинлиаза, которая дефосфорилирует MAP-киназы p38 и ERK [82]. Для проверки функциональных свойств транслоцированного белка YopE₁₋₁₃₈-OspF (SEQ ID NO: 7) авторы настоящего изобретения осуществляли мониторинг фосфорилирования p38 после стимуляции с помощью ФНО-α. В неинфицированных клетках или в клетках, инфицированных бактериями, экспрессирующими YopE₁₋₁₃₈-Мус, ФНО-α индуцировал фосфорилирование p38. Напротив, после транслокации YopE₁₋₁₃₈-OspF индуцируемое ФНО-α фосфорилирование прекратилось, показывая, что доставленный OspF является активным по отношению к p38 (фиг. 6А).

В ходе инфекции *Salmonella* эффектор III типа SopB защищает эпителиальные клетки от апоптоза путем поддерживаемой активации белка Akt [83]. Несмотря на то, что транслокация YopE₁₋₁₃₈-Мус или YopE₁₋₁₃₈-SopE не влияет на Akt, транслокация YopE₁₋₁₃₈-SopB (SEQ ID NO: 6) индуцировала значительное фосфорилирование Akt в положениях T308 и S473, отражающее активную форму (фиг. 6В). Схожие результаты получали с гомологом SopB из *S. flexneri* (IpgD, SEQ ID NO: 9). В совокупности результаты авторов настоящего изобретения показывают, что система доставки на основе YopE₁₋₁₃₈ функционирует для всех эффекторов СЗТ-системы, проверенных до настоящего времени, и это позволяет изучать белки, участвующие в контроле центральных клеточных функций, включая цитоскелет, процесс воспаления и

выживание клетки.

Ряд бактерий, включая *Agrobacterium tumefaciens*, *Legionella pneumophila* и *Bartonella henselae*, используют секрецию IV типа для инъекции эффекторов в клетки. Авторы настоящего изобретения проверили, можно ли транслоцировать эффектор IV типа *VerA* из *B. henselae* внутрь клеток HeLa, применяя наш инструмент. Полноразмерный белок *VerA* (SEQ ID NO: 10) и *VerA*_{E305-end} (SEQ ID NO: 11), содержащий С-концевой домен *Bid*, клонировали и клетки инфицировали соответствующими штаммами. Поскольку было показано, что *VerA* индуцирует выработку циклического АМФ (цАМФ) [84], после инфицирования измеряли уровень цАМФ в клетках HeLa. В то время как транслокация домена *Bid* эффектора *VerG* *B. henselae* (SEQ ID NO: 136) не смогла индуцировать выработку цАМФ, полноразмерный *VerA* и *VerA*_{E305-end} запускали выработку цАМФ в ожидаемых количествах [84] (фиг. 6С). Эти результаты показывают, что эффекторы IV типа также можно эффективно доставлять системой доставки на основе *YopE*₁₋₁₃₈ в клетки-мишени и что они являются функциональными белками.

Транслокация эукариотических белков внутрь эпителиальных клеток.

С целью показать, что белки человека можно транслоцировать посредством секреции III типа авторы настоящего изобретения осуществили слияние индукторов апоптоза человека в случае доставки *Y. enterocolitica* с *YopE*₁₋₁₃₈ или в случае доставки *S. enterica* с *SteA*₁₋₂₀, *SteA*, *SopE*₁₋₈₁ или *SopE*₁₋₁₀₅. Затем авторы осуществляли мониторинг транслокации человеческого взаимодействующего с ВНЗ агониста домена смерти (*BID*, SEQ ID NO: 24), который является проапоптотическим членом семейства белков *Bcl-2*. Он является посредником повреждения митохондрий, индуцируемого каспазой-8 (*CASP8*). *CASP8* расщепляет *BID*, и происходит транслокация усеченного *BID* (*tBID*, SEQ ID NO: 25) в митохондрии, где он запускает высвобождение цитохрома с. Последнее приводит к внутреннему режиму активации каспазы 3 (*CASP3*), в ходе которой она расщепляется на субъединицы размером 17 и 12 кДа [85]. Несмотря на то, что инфицирование в течение 1 ч *Y. enterocolitica*, экспрессирующей *YopE*₁₋₁₃₈-Мус или *YopE*₁₋₁₃₈-*BID*, не смогло индуцировать апоптоз, транслокация *tBID* человека запускает клеточную смерть в большем масштабе, чем хорошо охарактеризованный индуктор апоптоза стауроспорин (фиг. 7А и С). Как ожидалось, транслокация *tBID* ведет к продуцированию субъединицы p17 *CASP3* даже в еще больших количествах, чем со стауроспорином (фиг. 7А). Для того чтобы можно было провести сравнение количеств транслоцированного белка с количеством эндогенного *Bid*, клетки HeLa лизировали дигитонином и анализировали вестерн-блоттингом с использованием анти-*Bid* антитела (фиг. 7В). Доставленный ССЗТ белок *YopE*₁₋₁₃₈-*tBID* достиг приблизительно уровней эндогенного *Bid* в клетках HeLa, тогда как доставленный *YopE*₁₋₁₃₈-*BID* присутствовал в еще больших количествах (2,5 раза) (фиг. 7В). Глубокое протеомное и транскриптомное картирование клеток HeLa дало по расчетам результат $4,4 \times 10^5$ копий *BID* на клетку [86]. Таким образом, можно сделать вывод, что ССЗТ-зависимая доставка белка человека достигает значений 10^5 - 10^6 белков на клетку. Эти числа соответствуют количеству копий на клетку у наночастиц, транслоцированных посредством ССЗТ *E. coli* [19]. Предполагая установку фактора 10 для МОИ и для длительности инфицирования, фактора 3,2 для момента времени добавления антибиотика и для времени культивирования при 37°C перед инфицированием, количество копий доставляемого белка на клетку можно задать от нескольких 1000 копий/клетка до нескольких 10^6 копий/клетка. В совокупности эти результаты указывают, что транслоцированный *tBID* функционировал и его доставка была на соответствующем уровне. Это подтвердило пригодность инструмента для транслокации для изучения роли белков в регуляции апоптоза, центрального аспекта клеточной биологии.

Авторы настоящего изобретения дополнительно осуществили слияние *tBID* мыши (кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO: 194) или ВНЗ-доменов *tBID* мыши или ВАХ мыши (в обоих случаях кодон-оптимизированных для *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO: 138 и 139) с *YopE*₁₋₁₃₈ для доставки *Y. enterocolitica*. В то время как инфицирование в течение 2,5 ч штаммом *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ *asd*, не доставляющим белок или доставляющим *YopE*₁₋₁₃₈-Мус, не смогло запустить апоптоз, транслокация *tBID* мыши (кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica*, SEQ ID NO: 194) запускало клеточную смерть в клетках В16F10 (фиг. 16), D2A1 (фиг. 17), HeLa (фиг. 18) и 4T1 (фиг. 19). Транслокация ВНЗ-домена *BID* мыши, кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica* (SEQ ID NO: 138), или ВАХ мыши, кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica* (SEQ ID NO: 139), также было найдено, что индуцируют массовую клеточную смерть в клетках В16F10 (фиг. 16), D2A1 (фиг. 17), HeLa (фиг. 18) и 4T1 (фиг. 19).

В то время как инфицирование в течение 4 ч бактериями *S. enterica* *aroA* не смогло индуцировать апоптоз, транслокация *tBID* мыши запускало апоптоз, так как транслокация *t* мыши приводила к выработке субъединицы p17 *CASP3* (фиг. 20 и 21). Масштаб индукции апоптоза для слитых с *SopE* белков был больше при применении условий, индуцирующих *Spil* ССЗТ (фиг. 20), что отражает транспорт *SopE* исключительно *Spil* ССЗТ. *tBid* мыши, слитый с *SteA*₁₋₂₀, не смог индуцировать апоптоз, вполне вероятно потому что сигнал секреции в пределах 20 N-концевых аминокислот *SteA* не является достаточным, чтобы осуществлять доставку слитого белка (фиг. 20 и 21). *tBid* мыши, слитый с полноразмерным *SteA*, приводил к индукции апоптоза в клетках HeLa (фиг. 20 и 21), в условиях, индуцирующих оба *Spil* и *SpilII* ССЗТ, отражая способность *SteA* транспортироваться обоими ССЗТ. Следует отметить, что даже в усло-

виях, индуцирующих SpiII CC3T, ожидается частичная активность SpiI CC3T, как наблюдали по активности слитых с SopE белков в условиях, индуцирующих SpiII CC3T (фиг. 21).

Кроме тщательно функционально разобранных в настоящей заявке транслоцируемых эукариотических белков, несколько других эукариотических белков секретируют с использованием описанного в настоящей заявке инструмента. Это включает в случае доставки *Y. enterocolitica* (фиг. 13, 14 и 23) белки 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, остатки 84-103 (SEQ ID NO: 158), p107, остатки 657-662 (SEQ ID NO: 159), p21, остатки 141-160 (SEQ ID NO: 160), p21, остатки 145-160 (SEQ ID NO: 161), p21, остатки 17-33 (SEQ ID NO: 162) и циклин D2, остатки 139-147 (SEQ ID NO: 163)), связанные с апоптозом белки (Bad (SEQ ID NO: 29), FADD (SEQ ID NO: 28), и субъединицы p17 (SEQ ID NO: 22) и p12 (SEQ ID NO: 23) каспазы 3, Bid (SEQ ID NO: 19) и t-Bid (SEQ ID NO: 20)) дарио, а также их части (tBid, BH3-домен (SEQ ID NO: 138), Bax, BH3-домен (SEQ ID NO: 139)), сигнальные белки (TRAF6 мыши (SEQ ID NO: 12), TIFA (SEQ ID NO: 13)), GPCR субъединица Gα (GNA12, самая короткая изоформа, (SEQ ID NO: 30)), нанотело (vhhGFP4, (SEQ ID NO: 31)) и конструкции, слитые с нанотелами, для направленной деградации белка (Slmb-vhhGFP4; (SEQ ID NO: 32, 33, 34) [87]) (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 белка Akt человека (SEQ ID NO: 35). Кроме тщательно функционально разобранных связанных с апоптозом белков (tBid мыши, SEQ ID NO: 144-147), это дополнительно включает в случае доставки *S. enterica* (фиг. 22) белки 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)). Несмотря на то, что данные белки не были функционально подтверждены, возможность CC3T-зависимой секреции различных эукариотических белков в сочетании с возможным удалением остатка YopE открывает новые перспективы для широкого применения CC3T в клеточной биологии.

Транслокация *in vivo* усеченного Bid в эмбрионах дарио индуцирует апоптоз.

Интересное свойство данного бактериального инструмента состоит в потенциальном применении у живых животных. Дарио в своем эмбриональном состоянии можно сохранять прозрачными, позволяя осуществлять флуоресцентное окрашивание и микроскопию [54, 88, 89]. Несколько индукторов апоптоза дарио подробно описаны, из которых z-BIM является наиболее активным [90]. Таким образом, авторы настоящего изобретения решили клонировать z-BIM в свою систему. Несмотря на то, что он является слабо гомологичным BIM человека, авторы оценивали активность индукции апоптоза YopE₁₋₁₃₈-z-BIM (SEQ ID NO: 21) в эпителиальных клетках человека. Клетки HeLa, инфицированные в течение 1 ч штаммом, транслоцирующим YopE₁₋₁₃₈-z-BIM, показали явные признаки клеточной смерти. Затем авторы провели эксперименты *in vivo* с эмбрионами дарио на стадии 2 дней после оплодотворения с использованием модели локализованной инфекции путем микроинъекции бактерий в задний мозг [54]. После инфицирования в течение 5,5 ч фиксировали дарио, пермеабилizировали и окрашивали для определения наличия субъединицы p17 CASP3. В результате инфицирования штаммом, экспрессирующим YopE₁₋₁₃₈-Myc, были видны бактерии в области заднего мозга (окрашивание "b", фиг. 8A I), но не было обнаружено индукции апоптоза вокруг бактерий (окрашивание "c", фиг. 8A I). Напротив, в результате инфицирования штаммом, доставляющим YopE₁₋₁₃₈-z-BIM, наблюдали значительное увеличение уровня расщепленной CASP3 в областях, окружающих бактерии (фиг. 8A II). Автоматизированный анализ изображений максимальной интенсивности проекций на оси z подтверждает, что бактерии, транслоцирующие YopE₁₋₁₃₈-z-BIM, индуцируют апоптоз в соседних клетках намного чаще, чем это делают контрольные бактерии (фиг. 8B). Это указывает на то, что z-BIM является функциональным в результате бактериальной транслокации. Эти результаты дополнительно подтверждают применение CC3T для доставки эукариотических белков у живых животных.

Фосфопротеомика показывает глобальное воздействие транслоцированных белков на фосфорилирование белков.

Фосфорилирование является широко распространенной посттрансляционной модификацией, которая может как активировать, так и инактивировать биологические процессы, и, таким образом, является подходящей мишенью для изучения явлений передачи сигнала [91, 92]. Несмотря на это, в настоящее время не существует анализа фосфорилирования при апоптозе на системном уровне. Для проведения анализа воздействия белка tBid человека, доставленного внутрь клеток HeLa, авторы настоящего изобретения применяли безмаркерный фосфопротеомный подход с использованием ЖХ-МС/МС. В трех независимых экспериментах клетки либо оставляли необработанными, инфицировали штаммом с ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-Myc, либо инфицировали штаммом с ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-tBid в течение 30 мин. Клетки лизировали с последующим ферментативным расщеплением, обогащением фосфопептидов и количественным определением и идентификацией отдельных фосфопептидов. Авторы настоящего изобретения сравнивали клетки, инфицированные штаммом ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-Myc с клетками, инфицированными штаммом ΔНОРЕМТ asd + YopE₁₋₁₃₈-tBid, что позволило идентифицировать 363 tBid-зависимых явлений фосфорилирования. 286 фосфопептидов показали увеличение степени фосфорилирования, тогда как 77 были менее фосфорилированы в результате доставки tBid, соответствуя 243 различ-

ным белкам, которые мы определили как фосфопротеомы белка tBid. Применяли базу данных STRING для создания сети белок-белковых взаимодействий фосфопротеомы tBid [93] (фиг. 9А). Дополнительно 27 белков, которые, как известно, связаны с митохондриальным апоптозом, добавили в сеть, формируя центральный кластер. Интересно, что только несколько белков из фосфопротеомы tBid связаны с этим центральным кластером, указывая на то, что многие белки претерпевают изменение в степени фосфорилирования, которые до настоящего времени не были связаны напрямую с белками апоптоза. Для характеристики биологических функций, охватываемых фосфопротеомой tBid, авторы настоящего изобретения провели анализ генной онтологии с использованием инструмента для аннотации Базы данных для аннотации, визуализации и интегрального открытия (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [94, 95]. Идентифицированные биологические функции показывают, что tBid влияет на различные клеточные процессы. Многие белки, участвующие в перегруппировке хроматина и регуляции транскрипции, претерпевают изменение в степени фосфорилирования (т.е. CBX3, CBX5, TRIM28, HDAC1). HDAC1, например, представляет собой деацетилазу гистонов, играющую роль в регуляции транскрипции. Было показано, что HDAC1 может модулировать транскрипционную активность NF- κ B, белка, тоже участвующего в апоптозе. Авторы дополнительно идентифицировали кластер белков, участвующих в процессинге РНК, который, как ранее было показано, играет важную роль в регуляции апоптоза [96]. HNRPK, например, опосредует ответ p53/TP53 на повреждение ДНК и необходим для индукции апоптоза [97]. Кроме того, фосфорилирование белков, участвующих в трансляции белков, также затронуто. Несколько эукариотических факторов инициации (т.е. EIF4E2, EIF4B, EIF3A, EIF4G2) претерпевают изменение в степени фосфорилирования, что согласуется с наблюдением, что общий синтез белков снижается в апоптотических клетках. Интересно, что фосфорилирование множества белков, участвующих в перестройке цитоскелета (например, PXN, MAP1B9), изменяется в результате доставки tBid. Это находится в соответствии с наблюдением, что морфология клеток значительно изменяется в результате доставки tBid (фиг. 9В). Сжатие клеток и потеря контакта отражены тем фактом, что авторы наблюдают фосфорилирование связанных с адгезией белков, таких как ZO2 и паксиллин. Схожим образом, сжатие ядер сопровождается фосфорилированием ламинарных белков, таких как ламин А/С и ламин В1. В совокупности доставка tBid индуцирует быстрый апоптотический ответ, также демонстрируемый нарушением митохондриальной целостности (фиг. 9В). Авторы настоящего изобретения показали, что индуцируемый tBid апоптоз влияет на сотни явлений фосфорилирования, принимающих участие в разнообразных клеточных процессах. Тогда как многие идентифицированные белки были связаны с апоптозом, было известно только несколько белков, которые фосфорилируются в результате индукции апоптоза. Таким образом, фосфопротеомный подход обеспечивает полезный источник для дальнейших исследований апоптоза.

Перечень ссылочных документов

1. Gibson, T.J., M. Seiler, and R.A. Veitia (2013) The transience of transient overexpression. *Nat Methods*. 10: 715-21.
2. Inoue, T., W.D. Heo, J.S. Grimley, T.J. Wandless, and T. Meyer (2005) An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat Methods*. 2: 415-8.
3. Pust, S., H. Hochmann, E. Kaiser, G. von Figura, K. Heine, et al. (2007) A cell-permeable fusion toxin as a tool to study the consequences of actin-ADP-ribosylation caused by the *Salmonella enterica* virulence factor SpvB in intact cells. *J Biol Chem*. 282: 10272-82.
4. Hayes, C.S., S.K. Aoki, and D.A. Low (2010) Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet*. 44: 71-90.
5. Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*. 4: 811-25.
6. Michiels, T., P. Wattiau, R. Brasseur, J.M. Ruyschaert, and G. Cornelis (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun*. 58: 2840-9.
7. Letzelter, M., I. Sorg, L.J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, et al. (2006) The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J*. 25: 3223-33.
8. Gauthier, A., and B.B. Finlay (2003) Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 185: 6747-55.
9. Wattiau, P., and G.R. Cornelis (1993) SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol Microbiol*. 8: 123-31.
10. Feldman, M.F., S. Muller, E. Wuest, and G.R. Cornelis (2002) SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol*. 46: 1183-97.
11. Akeda, Y., and J.E. Galan (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*. 437: 911-5.
12. Pais, S.V., C. Milho, F. Almeida, and L.J. Mota (2013) Identification of novel type III secretion chaperone-substrate complexes of *Chlamydia trachomatis*. *PLoS One*. 8: e56292.
13. Sory, M.P., and G.R. Cornelis (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol*. 14: 583-94.
14. Garcia, J.T., F. Ferracci, M.W. Jackson, S.S. Joseph, I. Pattis, et al. (2006) Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun*. 74: 5645-57.

15. Chen, L.M., G. Briones, R.O. Donis, and J.E. Galan (2006) Optimization of the delivery of heterologous proteins by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion system for vaccine development. *Infect Immun.* 74: 5826-33.
16. Russmann, H., H. Shams, F. Poblete, Y. Fu, J.E. Galan, et al. (1998) Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science.* 281: 565-8.
17. Russmann, H., U. Gerdemann, E.I. Igwe, K. Panthel, J. Heesemann, et al. (2003) Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect Immun.* 71: 3463-72.
18. Chaux, P., R. Luiten, N. Demotte, V. Vantomme, V. Stroobant, et al. (1999) Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *J Immunol.* 163: 2928-36.
19. Blanco-Toribio, A., S. Muyldermans, G. Frankel, and L.A. Fernandez (2010) Direct injection of functional single-domain antibodies from *E. coli* into human cells. *PLoS One.* 5: e15227.
20. Bichsel, C., D. Neeld, T. Hamazaki, L.J. Chang, L.J. Yang, et al. (2013) Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell Reprogram.* 15: 117-25.
21. Bichsel, C., D.K. Neeld, T. Hamazaki, D. Wu, L.J. Chang, et al. (2011) Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells. *PLoS One.* 6: e16465.
22. Chamekh, M., A. Phalipon, R. Quertainmont, I. Salmon, P. Sansonetti, et al. (2008) Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus. *J Immunol.* 180: 4292-8.
23. Hoffman, R.M. (2011) Tumor-seeking *Salmonella* amino acid auxotrophs. *Curr Opin Biotechnol.* 22: 917-23.
24. Hoang, T.T., S. Williams, H.P. Schweizer, and J.S. Lam (1997) Molecular genetic analysis of the region containing the essential *Pseudomonas aeruginosa* *asd* gene encoding aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase. *Microbiology.* 143 (Pt 3): 899-907.
25. Skurnik, M., and H. Wolf-Watz (1989) Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol.* 3: 517-29.
26. Terti, R., M. Skurnik, T. Vartio, and P. Kuusela (1992) Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun.* 60: 3021-4.
27. Isberg, R.R., and J.M. Leong (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 60: 861-71.
28. Isberg, R.R., D.L. Voorhis, and S. Falkow (1987) Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell.* 50: 769-78.

29. Leong, J.M., R.S. Fournier, and R.R. Isberg (1990) Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J.* 9: 1979-89.
30. Mota, L.J., and G.R. Cornelis (2005) The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med.* 37: 234-49.
31. Trosky, J.E., A.D. Liverman, and K. Orth (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol.* 10: 557-65.
32. Brenner, D., and T.W. Mak (2009) Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol.* 21: 871-7.
33. Chalah, A., and R. Khosravi-Far (2008) The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol.* 615: 25-45.
34. Fuchs, Y., and H. Steller (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 147: 742-58.
35. Waugh, D.S. (2011) An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif.* 80: 283-93.
36. Sarker, M.R., C. Neyt, I. Stainier, and G.R. Cornelis (1998) The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol.* 180: 1207-14.
37. Ramamurthi, K.S., and O. Schneewind (2005) A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J Bacteriol.* 187: 707-15.
38. Wolke, S., N. Ackermann, and J. Heesemann (2011) 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: 1339-57.
39. Forsberg, A., and H. Wolf-Watz (1990) Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *J Bacteriol.* 172: 1547-55.
40. Sambrook, J. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. D.W. Russell, editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. .
41. Alto, N.M., and J.E. Dixon (2008) Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol.* 439: 131-43.
42. Alto, N.M., F. Shao, C.S. Lazar, R.L. Brost, G. Chua, et al. (2006) Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell.* 124: 133-45.
43. Kaniga, K., I. Delor, and G.R. Cornelis (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* 109: 137-41.

44. Yoneda, Y., T. Semba, Y. Kaneda, R.L. Noble, Y. Matsuoka, et al. (1992) 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: 313-20.
45. Cornelis, G.R. 1997. Cross talk between *Yersinia* and eukaryotic cells. In *Molecular aspects of host-pathogen interactions*. S. McCRACKEN, SMYTH, STOW, editor. Cambridge University Press.
46. Metcalf, W.W., W. Jiang, and B.L. Wanner (1994) 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.
47. Diepold, A., M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal, et al. (2010) Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J.* 29: 1928-40.
48. Iriarte, M., I. Stainier, and G.R. Cornelis (1995) The *rpoS* gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun.* 63: 1840-7.
49. Cornelis, G., J.C. Vanootegem, and C. Sluiter (1987) Transcription of the *yop* regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog.* 2: 367-79.
50. Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M.P. Sory, and G.R. Cornelis (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun.* 70: 4165-76.
51. Dehio, C., M. Meyer, J. Berger, H. Schwarz, and C. Lanz (1997) 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): 2141-54.
52. Westerfield, M. (2000) *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio rerio* University of Oregon Press, Eugene, OR.
53. Kimmel, C.B., W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, and T.F. Schilling (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 203: 253-310.
54. Benard, E.L., A.M. van der Sar, F. Ellett, G.J. Lieschke, H.P. Späink, et al. (2012) Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *J Vis Exp.*
55. Blum, Y., H.G. Belting, E. Ellertsdottir, L. Herwig, F. Luders, et al. (2008) Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol.* 316: 312-22.
56. Herwig, L., Y. Blum, A. Krudewig, E. Ellertsdottir, A. Lenard, et al. (2011) Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo. *Curr Biol.* 21: 1942-8.

57. Carpenter, A.E., T.R. Jones, M.R. Lamprecht, C. Clarke, I.H. Kang, et al. (2006) CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 7: R100.
58. Bensimon, A., A. Schmidt, Y. Ziv, R. Elkon, S.Y. Wang, et al. (2010) ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage. *Sci Signal.* 3: rs3.
59. Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy, and J.S. Cottrell (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 20: 3551-67.
60. Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3: Article3.
61. Ting, L., M.J. Cowley, S.L. Hoon, M. Guilhaus, M.J. Raftery, et al. (2009) Normalization and statistical analysis of quantitative proteomics data generated by metabolic labeling. *Mol Cell Proteomics.* 8: 2227-42.
62. Vizcaino, J.A., R.G. Cote, A. Csordas, J.A. Dianes, A. Fabregat, et al. (2013) The PRoteomics IDentifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41: D1063-9.
63. Boyd, A.P., I. Lambermont, and G.R. Cornelis (2000) Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol.* 182: 4811-21.
64. Iriarte, M., and G.R. Cornelis (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol.* 29: 915-29.
65. Kudryashev, M., M. Stenta, S. Schmelz, M. Amstutz, U. Wiesand, et al. (2013) In situ structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome. *Elife.* 2: e00792.
66. Schulte, R., G.A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C.A. Jacobi, et al. (2000) *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* 14: 1471-84.
67. Mota, L.J., L. Journet, I. Sorg, C. Agrain, and G.R. Cornelis (2005) Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science.* 307: 1278.
68. Isaksson, E.L., M. Aili, A. Fahlgren, S.E. Carlsson, R. Rosqvist, et al. (2009) The membrane localization domain is required for intracellular localization and autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun.* 77: 4740-9.
69. Denecker, G., S. Totemeyer, L.J. Mota, P. Troisfontaines, I. Lambermont, et al. (2002) Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun.* 70: 3510-20.

70. Sharma, S., A. Hirabuchi, K. Yoshida, K. Fujisaki, A. Ito, et al. (2013) Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells. *Plant J.* 74: 701-12.
71. Carrington, J.C., and W.G. Dougherty (1988) 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: 3391-5.
72. Kapust, R.B., J. Tozser, T.D. Copeland, and D.S. Waugh (2002) The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun.* 294: 949-55.
73. Liang, H., H. Gao, C.A. Maynard, and W.A. Powell (2005) Expression of a self-processing, pathogen resistance-enhancing gene construct in *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett.* 27: 435-42.
74. Weber, W., C. Fux, M. Daoud-el Baba, B. Keller, C.C. Weber, et al. (2002) Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol.* 20: 901-7.
75. Kapust, R.B., J. Tozser, J.D. Fox, D.E. Anderson, S. Cherry, et al. (2001) Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* 14: 993-1000.
76. Lee, V.T., D.M. Anderson, and O. Schneewind (1998) 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.
77. Gray, D.C., S. Mahrus, and J.A. Wells (2010) Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell.* 142: 637-46.
78. Henrichs, T., N. Mikhaleva, C. Conz, E. Deuerling, D. Boyd, et al. (2005) Target-directed proteolysis at the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 4246-51.
79. Hardt, W.D., L.M. Chen, K.E. Schuebel, X.R. Bustelo, and J.E. Galan (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell.* 93: 815-26.
80. Hakansson, S., K. Schesser, C. Persson, E.E. Galyov, R. Rosqvist, et al. (1996) 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: 5812-23.
81. Stebbins, C.E., and J.E. Galan (2001) Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature.* 412: 701-5.
82. Li, H., H. Xu, Y. Zhou, J. Zhang, C. Long, et al. (2007) The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science.* 315: 1000-3.

83. Norris, F.A., M.P. Wilson, T.S. Wallis, E.E. Galyov, and P.W. Majerus (1998) SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 14057-9.
84. Pulliainen, A.T., K. Pielkes, C.S. Brand, B. Hauert, A. Bohm, et al. (2012) Bacterial effector binds host cell adenylyl cyclase to potentiate Galphas-dependent cAMP production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: 9581-6.
85. Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94: 491-501.
86. Nagaraj, N., J.R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, et al. (2011) Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*. 7: 548.
87. Caussin, E., O. Kanca, and M. Affolter (2011) Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol*. 19: 117-21.
88. Cosma, C.L., L.E. Swaim, H. Volkman, L. Ramakrishnan, and J.M. Davis (2006) Zebrafish and frog models of *Mycobacterium marinum* infection. *Curr Protoc Microbiol*. Chapter 10: Unit 10B 2.
89. Mathias, J.R., M.E. Dodd, K.B. Walters, S.K. Yoo, E.A. Ranheim, et al. (2009) Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Dev Comp Immunol*. 33: 1212-7.
90. Jette, C.A., A.M. Flanagan, J. Ryan, U.J. Pyati, S. Carbonneau, et al. (2008) BIM and other BCL-2 family proteins exhibit cross-species conservation of function between zebrafish and mammals. *Cell Death Differ*. 15: 1063-72.
91. Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, et al. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 127: 635-48.
92. Schmutz, C., E. Ahrne, C.A. Kasper, T. Tschon, I. Sorg, et al. (2013) Systems-Level Overview of Host Protein Phosphorylation During *Shigella flexneri* Infection Revealed by Phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*. 12: 2952-68.
93. Szklarczyk, D., A. Franceschini, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, et al. (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res*. 39: D561-8.
94. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 37: 1-13.
95. Huang da, W., B.T. Sherman, R. Stephens, M.W. Baseler, H.C. Lane, et al. (2008) DAVID gene ID conversion tool. *Bioinformatics*. 2: 428-30.
96. Schwerk, C., and K. Schulze-Osthoff (2005) Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. 19: 1-13.
97. Papagiannakopoulos, T., A. Shapiro, and K.S. Kosik (2008) MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res*. 68: 8164-72.
98. Hoiseth, S.K., B.A. Stocker (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291:238-239.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, способный доставлять гетерологичный белок в эукариотическую клетку, при этом указанный штамм грамотрицательных бактерий трансформирован вектором, который содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу

промотор;

первую последовательность ДНК, функционально связанную с указанным промотором, кодирующую сигнал доставки из эффекторного белка системы секреции 3 типа (ССТ) бактерий; и

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК по той же рамке считывания, при этом указанный гетерологичный белок представляет собой внутриклеточно активный гетерологичный белок, который выбран из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, GPCR-связанных белков, нанотел, эффекторов системы С3Т бактерий, эффекторов системы С4Т бактерий и белков вируса, причём указанные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из проапоптотических белков, антиапоптотических белков, ингибиторов путей, предотвращающих апоптоз, ингибиторов путей или сигнальной системы, способствующих выживанию, и при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*, и указанный сигнал доставки из эффекторного белка системы С3Т бактерий, кодируемый указанной первой последовательностью ДНК, содержит эффекторный белок YopE или его N-концевой фрагмент, при этом указанный N-концевой фрагмент включает по меньшей мере первые 20 аминокислот указанного эффекторного белка системы С3Т бактерий и содержит сайт связывания шаперона.

2. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по п.1, отличающийся тем, что указанный вектор содержит третью последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой, при этом указанная третья последовательность ДНК расположена между 3'-концом указанной первой последовательности ДНК и 5'-концом указанной второй последовательности ДНК.

3. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что указанный штамм *Yersinia* представляет собой штамм дикого типа или штамм, дефицитный по выработке по меньшей мере одного эффекторного белка системы С3Т, и при этом указанный сигнал доставки из эффекторного белка системы С3Т бактерий содержит 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE *Y. enterocolitica*.

4. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный штамм грамотрицательных бактерий является дефицитным по выработке белков адгезии, связывающихся с поверхностью эукариотической клетки или внеклеточным матриксом.

5. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из белков только с ВНЗ-доменом, каспаз и внутриклеточных сигнальных белков, входящих в систему контроля апоптоза рецепторами смерти.

6. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанный вектор содержит две вторые последовательности ДНК, кодирующие идентичные гетерологичные белки или два разных гетерологичных белка, которые слиты независимо друг от друга по той же рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, при этом оба гетерологичных белка представляют собой белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, и при этом один белок представляет собой проапоптотический белок, и другой белок представляет собой ингибитор путей, предотвращающих апоптоз, или при этом один белок представляет собой проапоптотический белок, и другой белок представляет собой ингибитор путей или сигнальной системы, способствующих выживанию.

7. Вектор, способный доставлять гетерологичный белок в эукариотическую клетку, который содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу

промотор;

первую последовательность ДНК, функционально связанную с указанным промотором, кодирующую сигнал доставки из эффекторного белка YopE или его N-концевой фрагмент, при этом указанный N-концевой фрагмент включает по меньшей мере первые 20 аминокислот указанного эффекторного белка системы С3Т бактерий и содержит сайт связывания шаперона;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, слитую с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК по той же рамке считывания, при этом указанный гетерологичный белок представляет собой внутриклеточно активный гетерологичный белок, который выбран из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, GPCR-связанных белков, нанотел, эффекторов системы С3Т бактерий, эффекторов системы С4Т бактерий и белков вируса, причём указанные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из проапоптотических белков, антиапоптотических белков, ингибиторов путей, предотвращающих апоптоз,

ингибиторов путей или сигнальной системы, способствующих выживанию.

8. Вектор по п.7, отличающийся тем, что указанный вектор дополнительно содержит третью последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой, при этом указанная третья последовательность ДНК расположена между 3'-концом указанной первой последовательности ДНК и 5'-концом указанной второй последовательности ДНК.

9. Вектор по п.7, отличающийся тем, что указанные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из белков только с ВНЗ-доменом, каспаз и внутриклеточных сигнальных белков, входящих в систему контроля апоптоза рецепторами смерти.

10. Вектор по п.7, отличающийся тем, что указанный вектор содержит две вторые последовательности ДНК, кодирующие идентичные гетерологичные белки или два разных гетерологичных белка, которые слиты независимо друг от друга по той же рамке считывания с 3'-концом указанной первой последовательности ДНК, при этом оба гетерологичных белка представляют собой белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, и при этом один белок представляет собой проапоптотический белок, и другой белок представляет собой ингибитор путей, предотвращающих апоптоз, или при этом один белок представляет собой проапоптотический белок, и другой белок представляет собой ингибитор путей или сигнальной системы, способствующих выживанию.

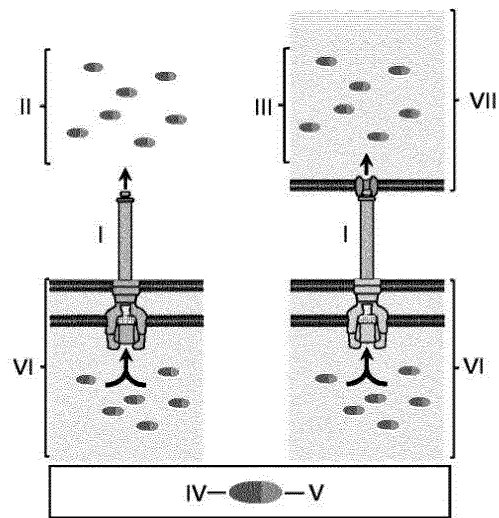
11. Способ доставки гетерологичного белка в эукариотическую клетку, включающий следующие этапы:

- i) культивирование штамма грамотрицательных бактерий по любому из пп.1-6; и
- ii) приведение в контакт эукариотической клетки со штаммом грамотрицательных бактерий, культивированных на этапе i), при этом слитый белок, который содержит сигнал доставки из эффекторного белка системы СЗТ бактерий и гетерологичный белок, экспрессируется указанным штаммом грамотрицательных бактерий и транслоцируется внутрь указанной эукариотической клетки.

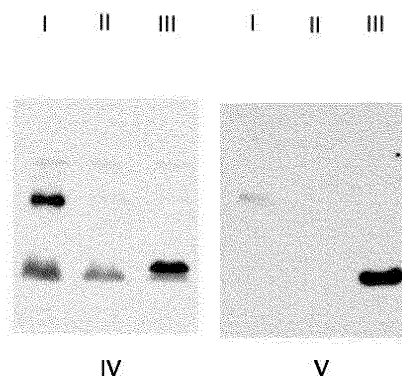
12. Применение рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий по любому из пп.1-6 при доставке гетерологичного белка в качестве лекарственного средства или вакцины субъекту.

13. Применение рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий по любому из пп.1-6 для осуществления высокопроизводительного скрининга ингибиторов клеточного пути.

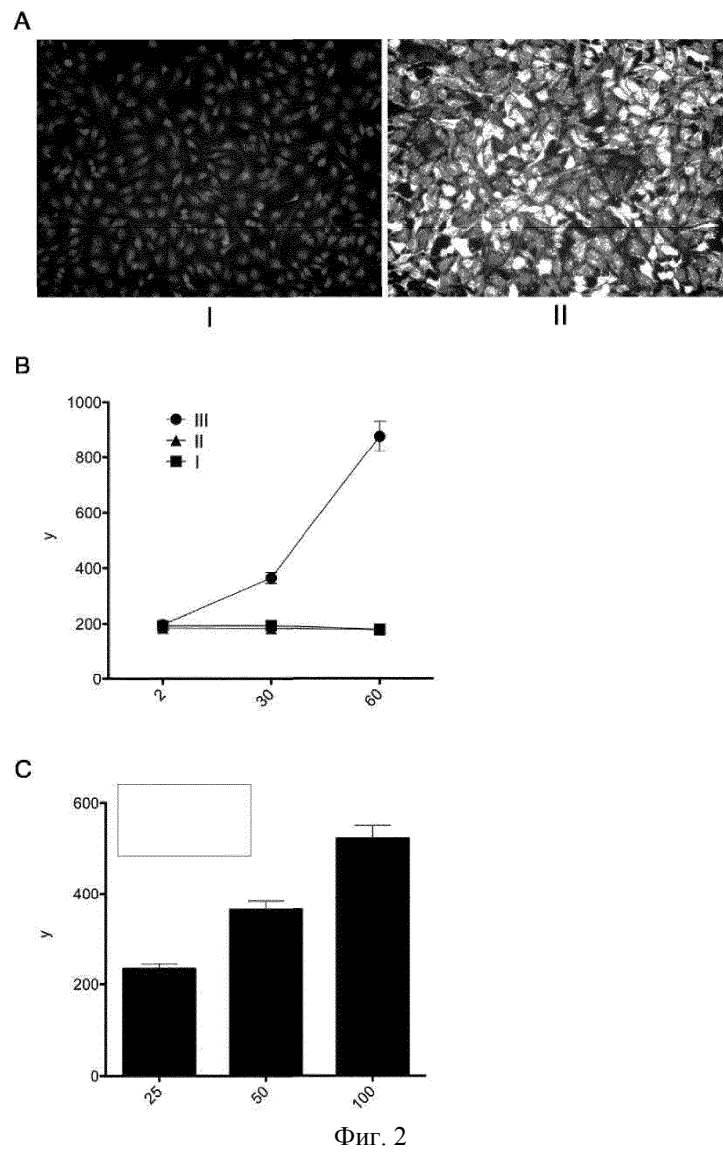
A

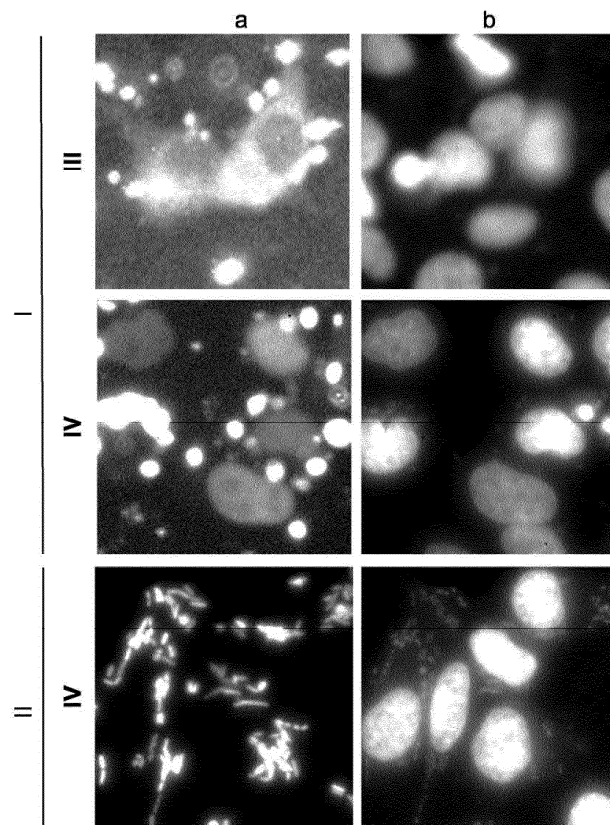


B

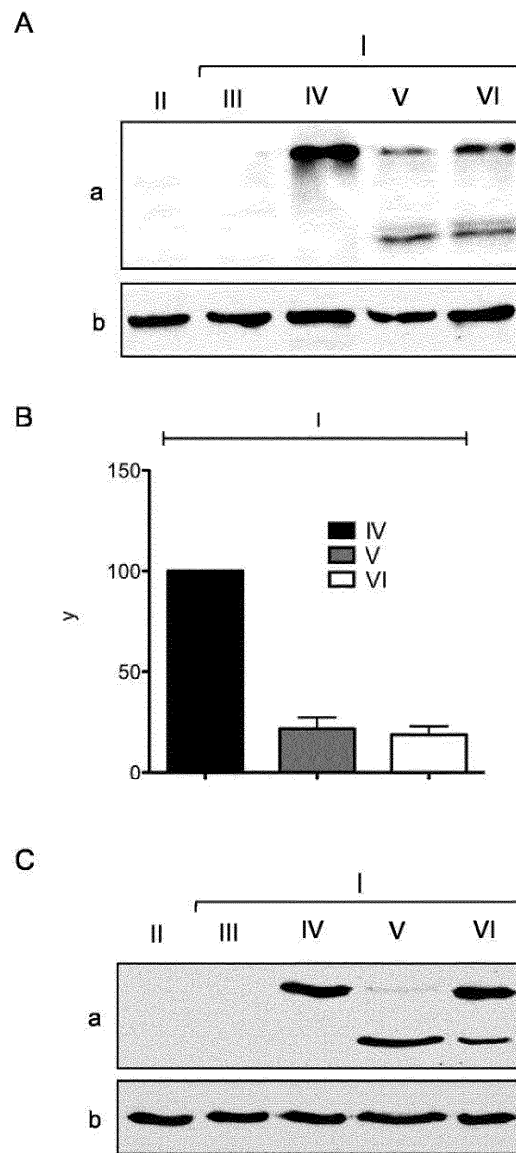


Фиг. 1

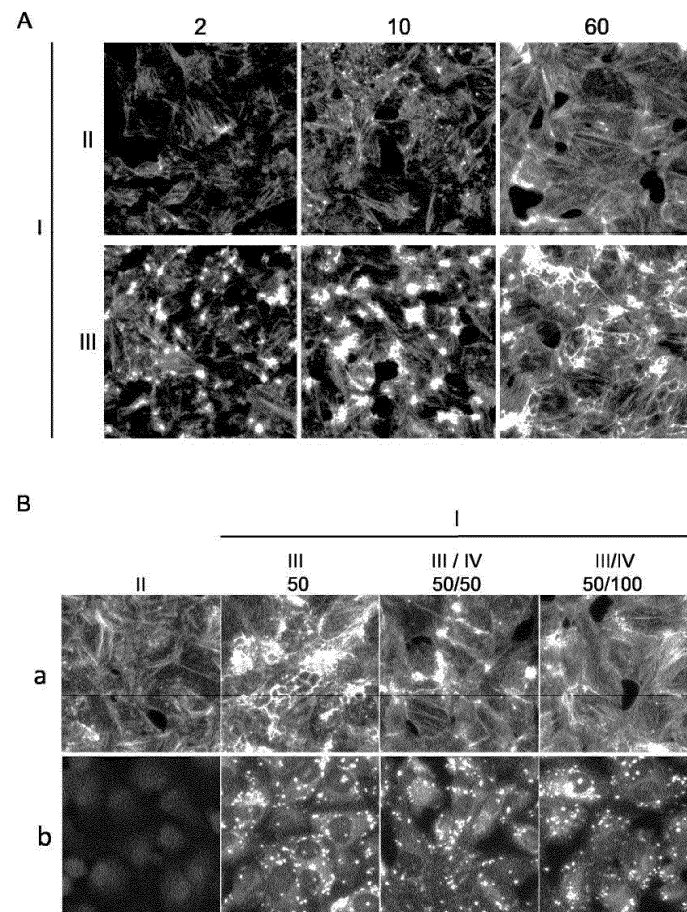




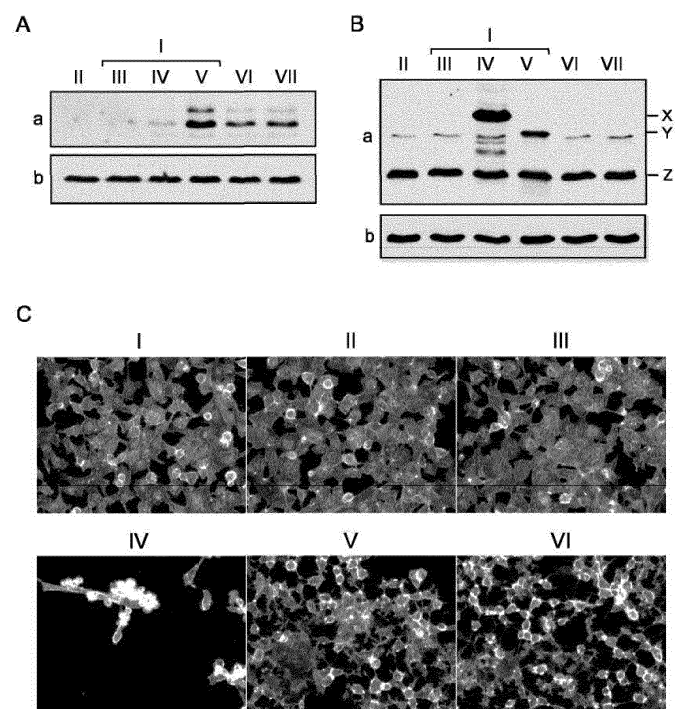
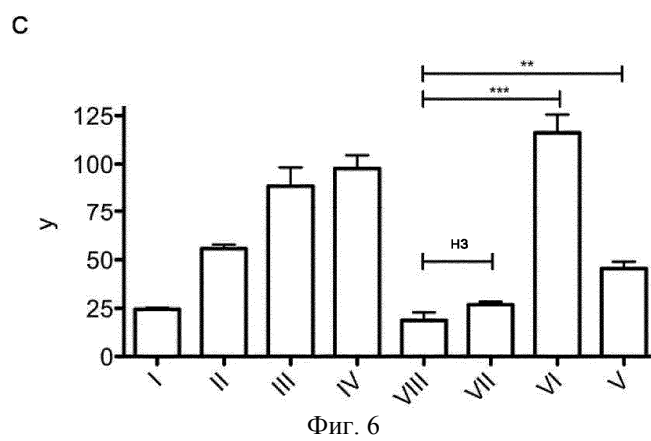
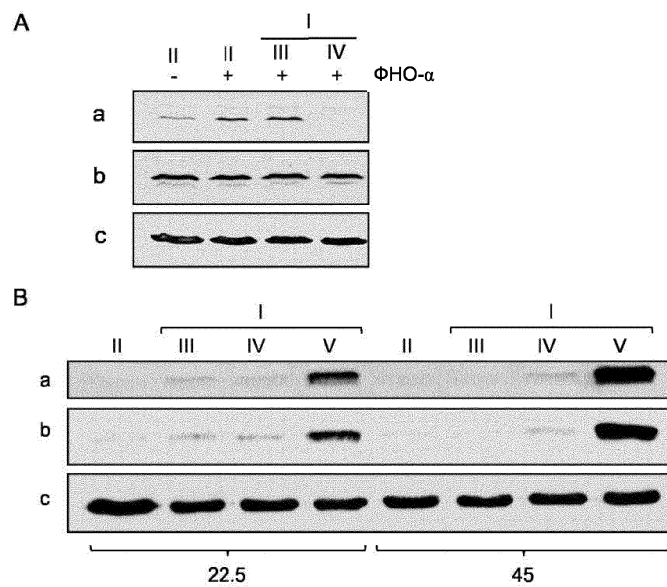
Фиг. 3



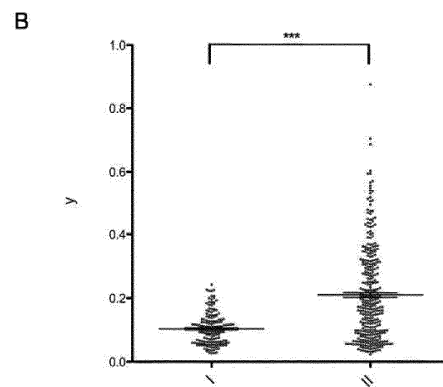
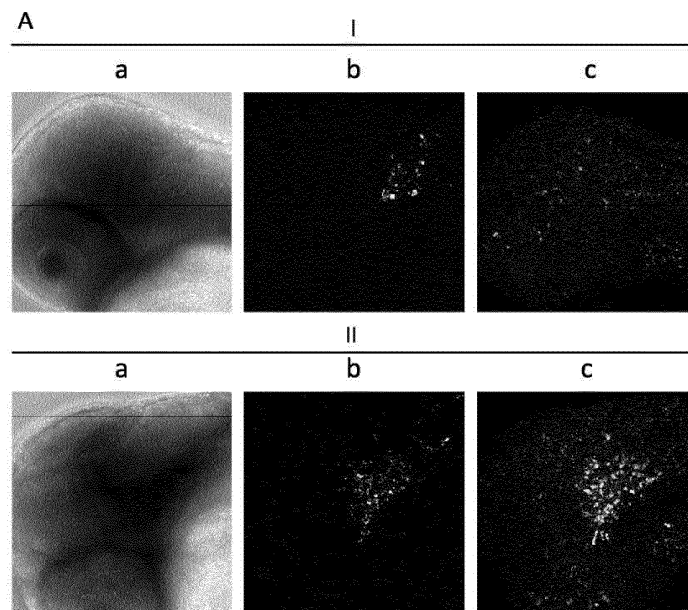
Фиг. 4

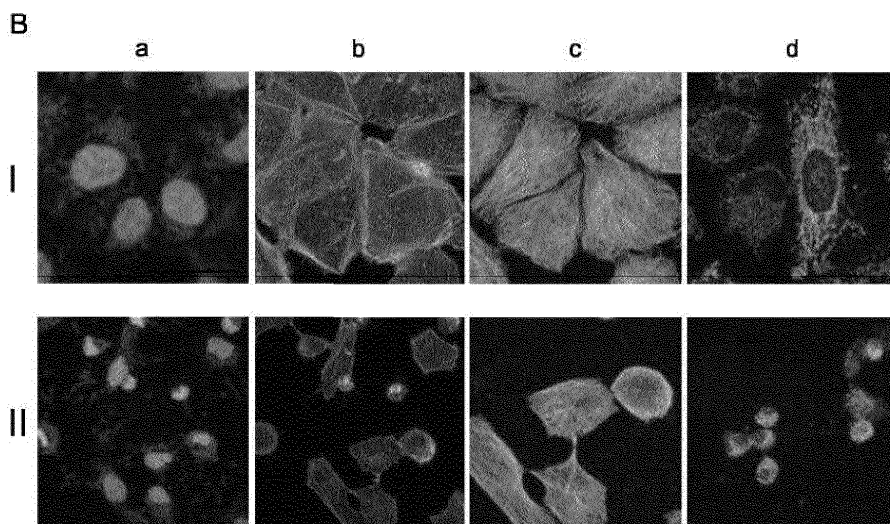


Фиг. 5

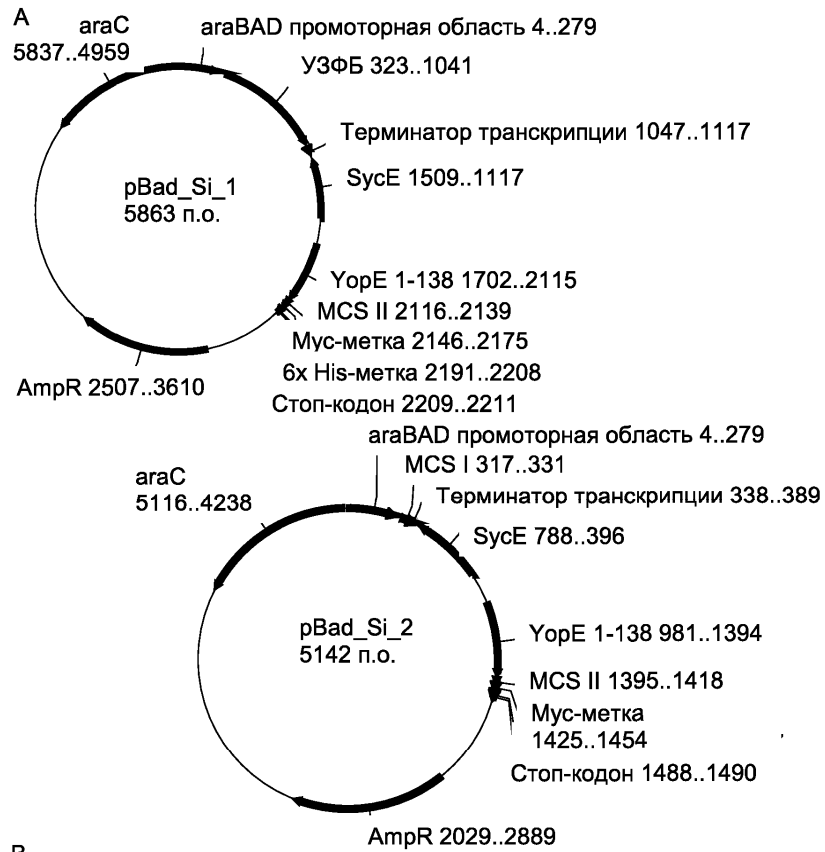


Фиг. 7





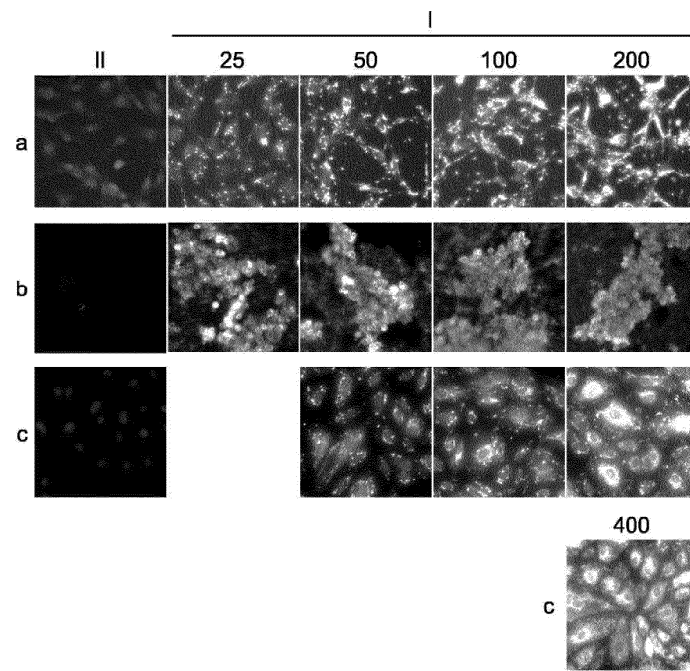
ФИГ. 9



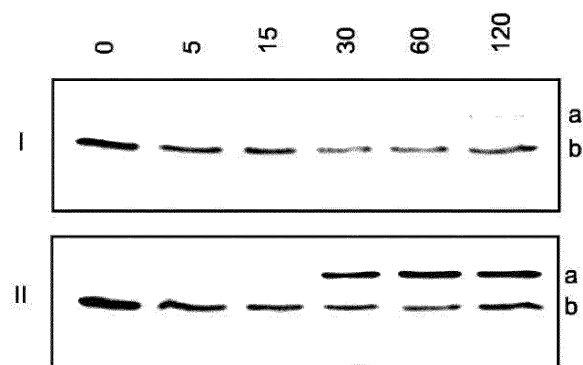
B

YopE1-	XhoI	XbaI	BstBI
GTTCCGCCACG CTCGAGTCTA GATTCGAA			
HindIII	эпитоп <i>mus</i>		
AAGCTTGGGC CCGAACAAAA АСТСАТСТСА			
GAAGAGGATCTGAATAGCGC CGTCGACCAT			
6x His - метка ***			
CATCATCATC ATCATTGAGT ТТАААСGGTC			
TCCAGCTTGG CTGTTTTGG C			

Фиг. 10

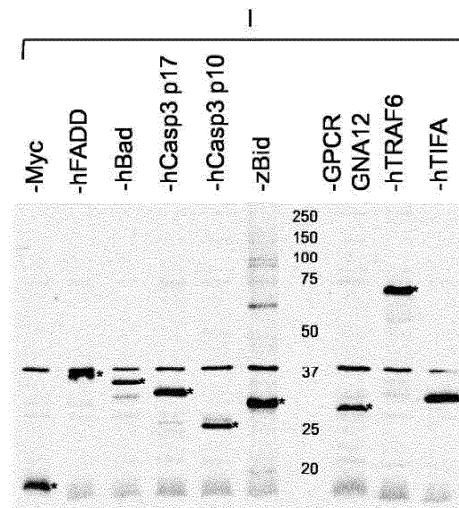


Фиг. 11

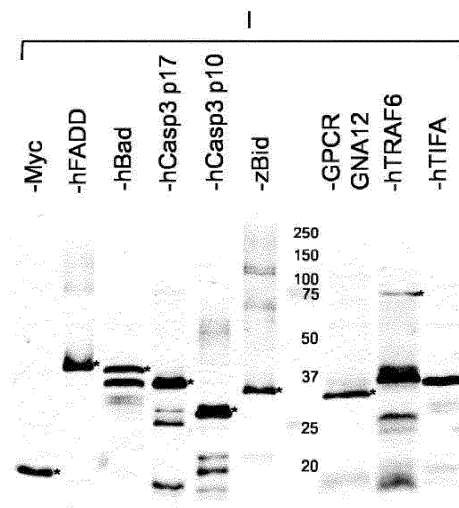


Фиг. 12

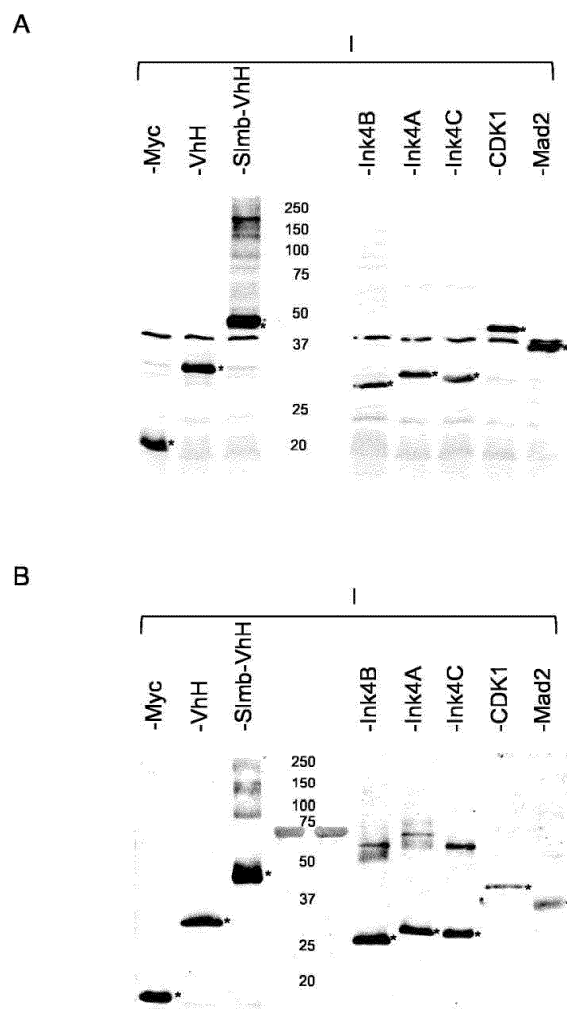
A



B



Фиг. 13



Фиг. 14

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	Ссылка
ΔHOPEMT	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Iriarte and Cornelis, 1998
ΔHOPEMT asd yopB	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T ΔyopB	MRS40 pIML421 [yopBΔ89-217, yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal Kan	
ΔHOPEMT asd	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	MRS40 asdΔ292-610 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Kudryashev et al., 2013
ΔHOPEMT asd inv	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔinvA	MRS40 asdΔ292-610 invAΔ352-2225::aphA-3 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				445/446, 447/448, 449/450	Nal Kan	
ΔHOPEMT asd inv yadA	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔinvA ΔyadA	MRS40 asdΔ292-610 invAΔ587-836 (коинтеграция вектора) yadAΔ89-354::aphA3 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				352/353, 354/355, 356/357	Nal Kan Tet	

Фиг. 15A

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pBad_Si1	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	УЗФБ (индуцируемый арабинозой), фрагмент SycE-YopE1-138-MycHis		pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (УЗФБ), 287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pBad_Si2	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	Фрагмент SycE-YopE1-138-MycHis	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-lpgB1	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. 15B

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	Ссылка
ΔНОРЕМТ 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 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 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 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 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 asd pSi_43	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-BepG 715-end	pBad_Si_2	pSi_43	324/351	Nal Amp	

Фиг. 15C

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	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	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	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-каспаза 3 субъединица 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-каспаза 3 субъединица 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-lpgD	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. 15Е

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	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-нанотело VhH4, распознающее УЗФБ	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	Nal Amp	

Фиг. 15F

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_132	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-протеаза TEV вариант 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-УЗФБ	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	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмиды-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_153	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-TIFA	pBad_Si_2	pSi_153	558/559	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_156	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV)- ET1	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_159	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV)- УЗФБ - NLS	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_160	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV)- NLS - УЗФБ	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_161	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV)- INK4C	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_164	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(2 сайта расщепления протеазой TEV)- Flag - INK4C	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_166	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138- Traf6 мыши	pBad_Si_2	pSi_166	561/562	Nal Amp	

Фиг. 15H

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмиды-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_318	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-кодированный оптимизированный для Y. enterocolitica tBid мыши ВНЗ-часть	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_322	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-кодированный оптимизированный для Y. enterocolitica Вах мыши ВНЗ-часть	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	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмиды-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	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-кодированный оптимизированный для S. enterica tBid мыши	pSi_266	pSi_270	искусственная конструкция	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_271	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-кодированный оптимизированный для S. enterica tBid мыши	pSi_267	pSi_271	искусственная конструкция	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_272	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-80-кодированный оптимизированный для S. enterica tBid мыши	pSi_268	pSi_272	искусственная конструкция	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_273	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-кодированный оптимизированный для S. enterica tBid мыши	pSi_269	pSi_273	искусственная конструкция	Amp	

Фиг. 15J

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_362	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica Ink4A остатки 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-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica Cdk2/циклин-ингибирующий пептид 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-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica p21 пептид 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-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica p21 коровый пептид 10 и 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-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica p21 пептид 17-33	pBad_Si_2	pSi_367	755/756	Nal Amp	

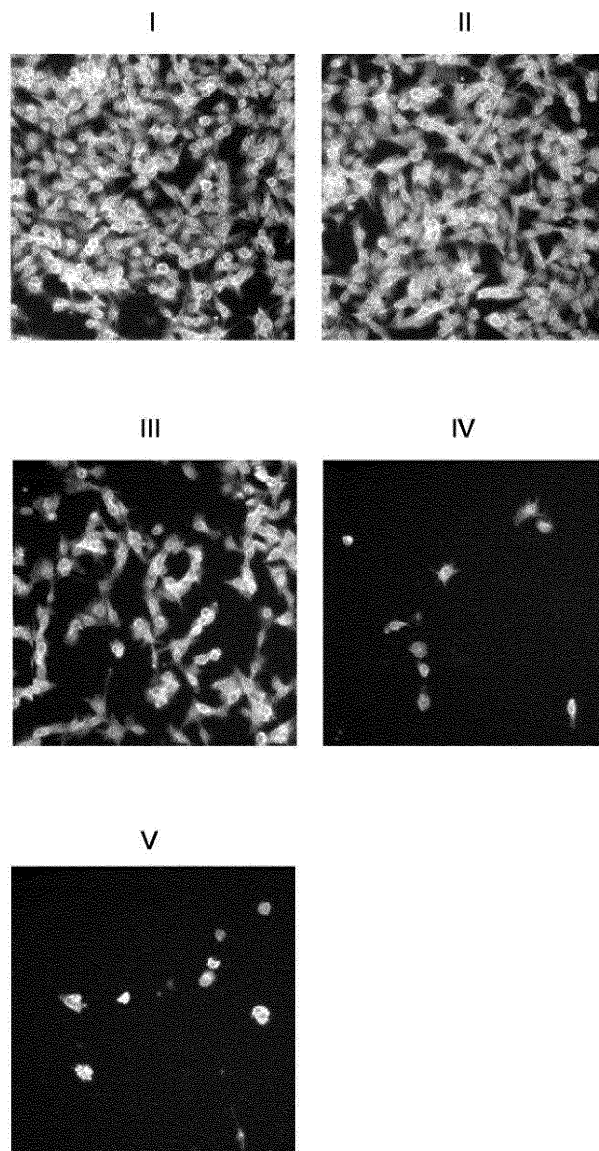
Фиг. 15K

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_368	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica per5 из G1/S циклина 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	

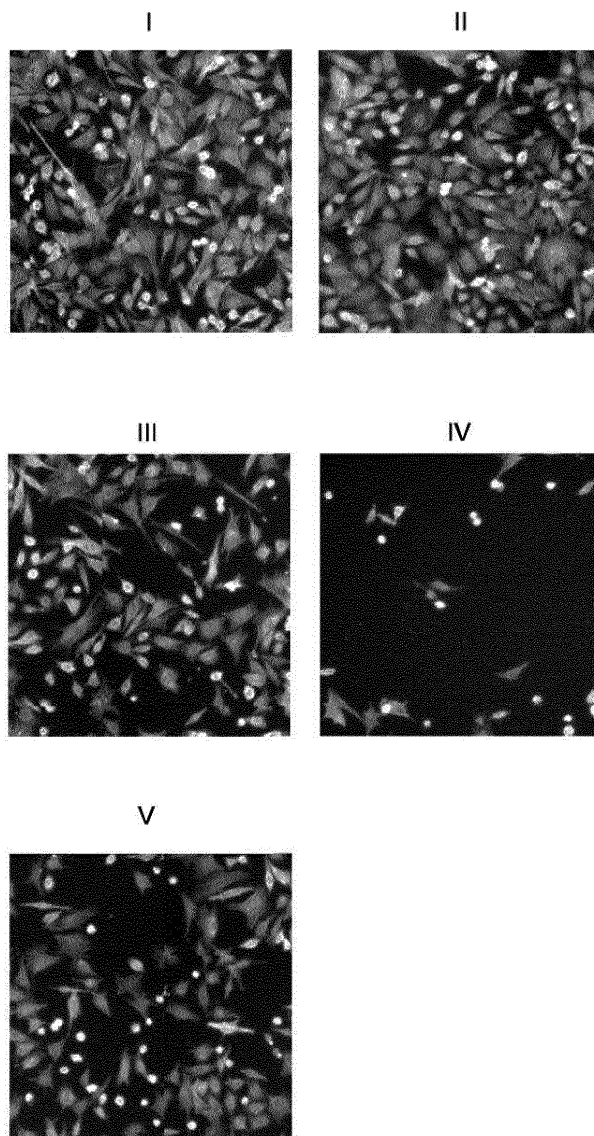
Фиг. 15L

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/значимые характеристики	Доставляемый системой СЗТ белок	Плазмида-основа	Конечное название плазмиды	Праймеры Si_номер:	Устойчивости	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-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica tBid мыши	pBad_Si_2	pSi_315	искусственная конструкция	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_236	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-убиквитин	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-убиквитин-Flag-INK4C-MycHis	pSi_236	pSi_237_II	588/509	Nal Amp	

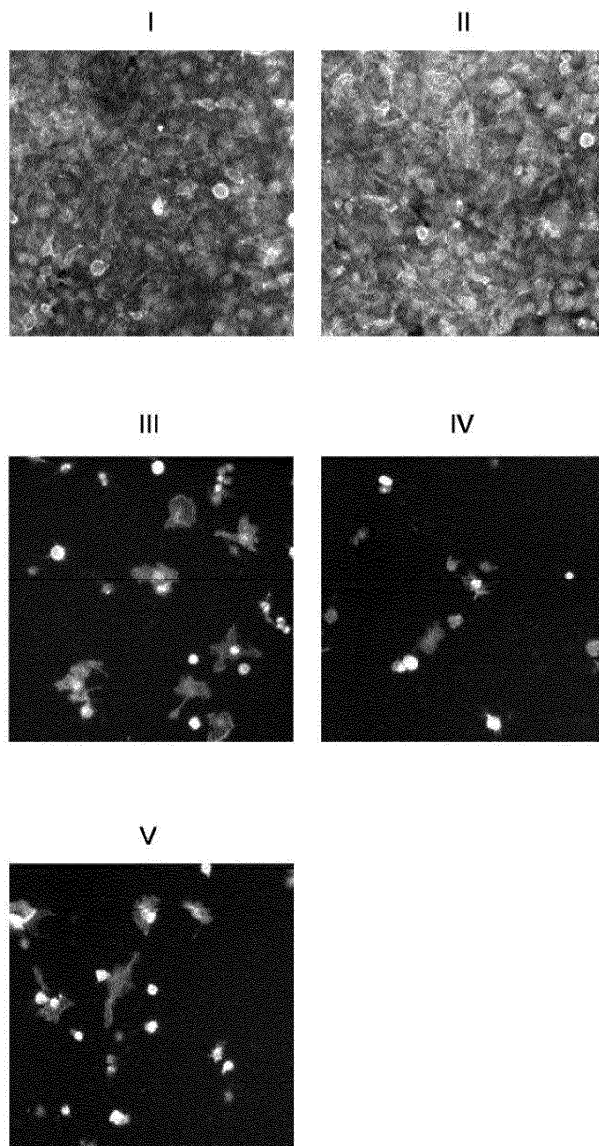
Фиг. 15M



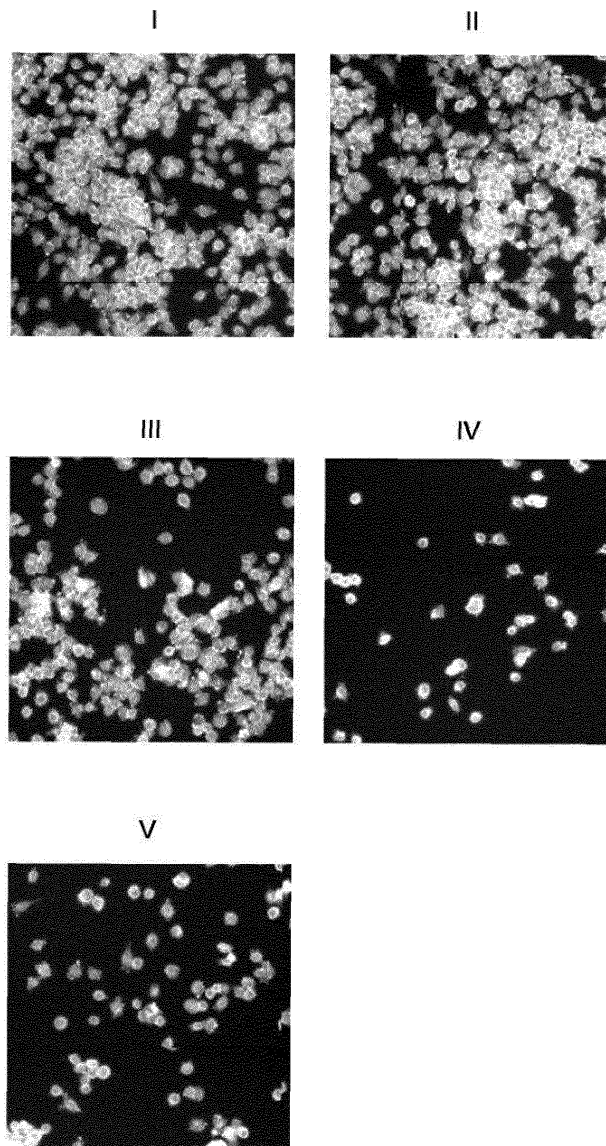
Фиг. 16



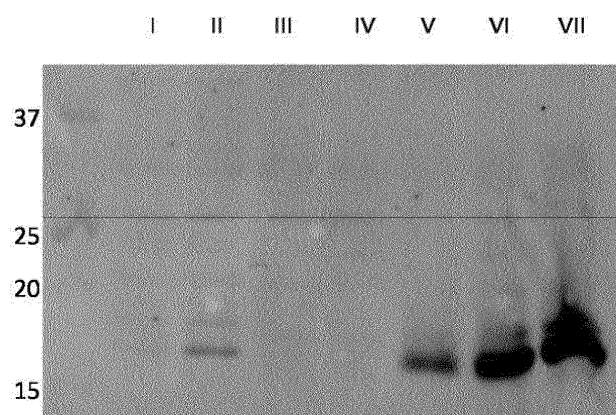
Фиг. 17



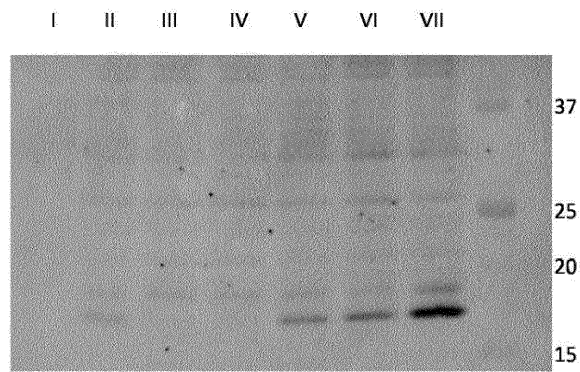
Фиг. 18



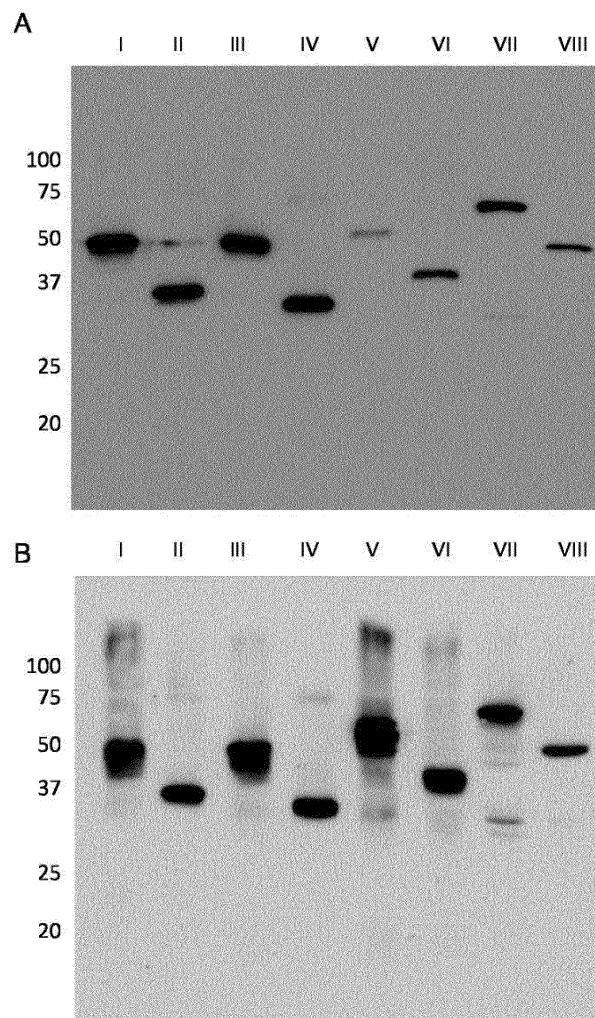
Фиг. 19



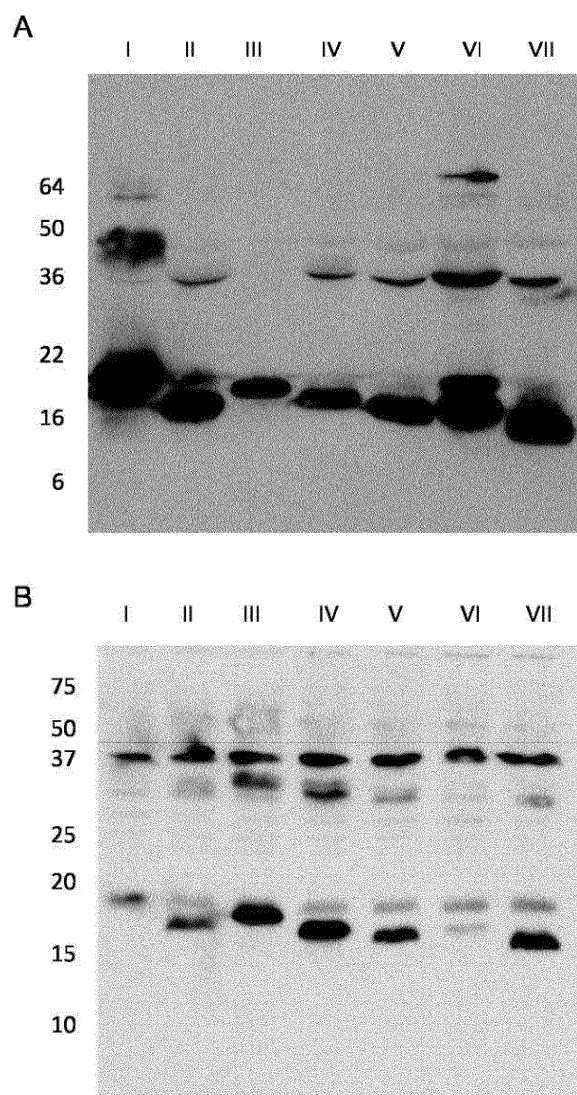
Фиг. 20



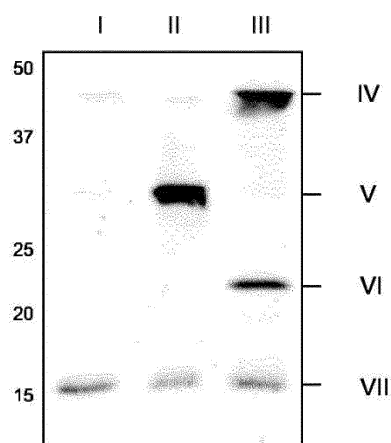
Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24

