

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОНИКНОВЕНИЯ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *SERRATIA GRIMESII* В КЛЕТКИ HeLa

© Е. С. Божокина, Л. В. Кевер, Я. Ю. Комиссарчик, С. Ю. Хайтлина,¹ Т. Н. Ефремова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹электронный адрес: skhspsb@gmail.com

Условно-патогенные бактерии *Serratia grimesii* способны проникать в клетки эукариот, где они обнаруживаются в вакуолях или свободно лежащими в цитоплазме (Efremova et al., 2001; Bozhokina et al., 2011). Однако эффективность инвазии этих бактерий низка, и механизмы инвазии, определяемые начальными стадиями процесса, неизвестны. В настоящей работе эффективность инвазии была повышена введением в культуральную среду N-ацетилцистеина (Bozhokina et al., 2013), 24-часовая инкубация с которым предшествовала инфицированию клеток HeLa M бактериями. В препаратах клеток, обработанных N-ацетилцистеином, обнаружено два варианта проникновения бактерий. В большинстве случаев проникновение бактерий внутрь клетки-хозяина соответствует описанному в литературе механизму «застежка-молния», первым этапом которого является взаимодействие бактериального инвазина с поверхностным рецептором клетки-хозяина. Однако в ряде случаев бактерию захватывают выросты клеточной поверхности, возникающие, по-видимому, в ответ на внедрение в клетку бактериальных эффекторов, как это происходит в «триггерном» механизме инвазии. Для того чтобы подтвердить существование двух механизмов инвазии или выявить преимущественный механизм, необходимо дальнейшее исследование, включающее в себя выявление бактериальных и клеточных факторов, участвующих во взаимодействии.

Ключевые слова: инвазия бактерий, N-ацетилцистеин, *Serratia grimesii*, стадии инвазии.

Патогенность многих бактерий основана на их способности проникать в клетки эукариот и передвигаться из клетки в клетку, используя активные компоненты цитоскелета и сигнальные системы клетки-хозяина (Cossart, Sansonetti, 2004; Haglund, Welch 2011). По современным представлениям, патогенные бактерии попадают в клетку-хозяина с помощью одного из двух механизмов. В механизме «застежка-молния» (zipper mechanism) — это прямая интернализация бактерий в результате взаимодействия бактериального адгезина с поверхностным рецептором клетки-хозяина. Это взаимодействие активирует сигнальные системы клетки-хозяина и приводит к умеренным изменениям цитоскелета (Tiney, Portnoy, 1989; Pizarro-Cerda et al., 2012). В триггерном механизме (trigger mechanism) бактерии захватываются выростами клеточной поверхности, образование которых индуцируется белками, введенными бактериями в клетку-хозяина через аппарат секреции III типа (Sansonetti, 1998; Carayol, Tran Van Nhieu, 2013; Valencia-Gallardo et al., 2015). Эти процессы связаны с морфологическими изменениями клетки-хозяина и значительными перестройками ее цитоскелета.

Несмотря на то что биохимические основы этих процессов за последние годы интенсивно изучались и получен ряд новых важных фактов (Pizarro-Cerdá et al., 2012; Rutherford, Bassler, 2012; Navarro-Garcia et al., 2013; Lee et al., 2014; Valencia-Gallardo et al., 2015), их визуализация как на электронно-микроскопическом, так и на светооптическом уровне несомненно требует дальнейших ис-

следований. Особенно это касается начальных стадий инвазии бактерий. Именно эти стадии определяют механизм вхождения бактерий в эукариотическую клетку. К сожалению, эти стадии трудно обнаружить из-за их быстротечности. Тем не менее иногда удается выявить ямки или вдавливания бактерий в поверхность инфицированной клетки или, напротив, специфические выросты клеточной поверхности. Такого рода картины могут указывать на различные механизмы, используемые бактериями для входа в клетку-хозяина.

Способностью проникать в клетки эукариот обладают не только патогенные, но и условно-патогенные бактерии, однако механизмы их патогенности изучены очень мало. Ранее мы показали, что инкубация трансформированных клеток с бактериями *Serratia grimesii*, продуцентами протеазы ЕСР32/гримелизин (Khaitlina et al., 1991; Bozhokina et al., 2008), приводит к появлению бактерий внутри клетки-хозяина, сначала в вакуолях, а затем свободно лежащих в цитоплазме (Efremova et al., 2001; Gamaley et al., 2006; Bozhokina et al., 2011). При этом инфицированными оказываются только около 10 % клеток, инкубированных с бактериями, что соответствует статусу условной патогенности этих бактерий (Grimont, Grimont, 2006), но затрудняет выявление ранних стадий инвазии.

Повышение чувствительности клеток эукариот к бактериальной инфекции как в организме, так и в экспериментальных условиях может зависеть от физиологического состояния клетки-хозяина: метаболизма эука-

риотической клетки, стадии клеточного цикла, пролиферативной активности и степени иммортализованности клеток (Velge et al., 1995, 1997). Показано также, что антиоксиданты оказывают существенное влияние на культивируемые клетки, вызывая перестройки актинового цитоскелета (Ефремова и др., 2004) и изменяя их чувствительность к бактериям (Гамалей и др., 2006; Gamaley et al., 2006). В частности, обработка клеток N-ацетилцистеином приводит к 2—3-кратному увеличению эффективности инвазии (Bozhokina et al., 2013). В настоящей работе мы использовали этот эффект, чтобы выявить начальные стадии проникновения бактерий *S. grimesii* в клетки HeLa, обработанные и не обработанные N-ацетилцистеином.

Материал и методика

Клетки карциномы шейки матки человека HeLa M, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), культивировали на среде α MEM, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 1 % NEAA (non-essential amino acids), при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ в течение 2 сут до достижения ~70%-ного монослоя. После этого заменяли кондиционированную среду порцией свежей среды и добавляли 10 мМ N-ацетилцистеин (NAC) (Sigma) на 22—24 ч.

Бактерии *S. grimesii* выращивали на питательном бульоне LB, содержащем 1 % пептона, 0,5 % дрожжевого экстракта и 1 % NaCl (pH 7,0), в течение 26 ч при 37 °C с аэрацией. Затем суспензию бактерий в ростовой среде центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде α MEM без сыворотки и добавляли к клеткам HeLa M, предварительно сменив среду, содержащую NAC, на свежую среду. Клетки HeLa M инкубировали с бактериями 0,5—1,5 ч при 37 °C.

Подготовку препаратов для электронной микроскопии осуществляли по стандартной методике (Мионов и др., 1994). Клетки фиксировали на стеклах в 2,5%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (PBS) в течение 60 мин при комнатной температуре. После этого клетки отмывали PBS и проводили постфиксацию 1%-ным раствором осмиевой кислоты на PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Дегидратацию проводили в этиловом спирте возрастающих концентраций (от 30 % до абсолютного) и абсолютном ацетоне. В процессе дегидратации клетки снимали со стекол с помощью скребка и заливали в смесь эпона и аралдита. Из полимеризованных блоков на микротоме LKB III (Швеция) получали ультратонкие срезы, которые контрастировали по 7 мин в цитрате свинца и уранил-ацетате. Ультратонкие срезы просматривали и фотографировали в электронном микроскопе Carl Zeiss Libra 120 (Германия).

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопические картины клеток HeLa M и бактерий *S. grimesii*, полученные в настоящей работе, не отличались от аналогичных картин, многократно описанных в литературе (Erlanson, deHarve, 1971; Boatman et al., 1976; Balczon, 2001; Santos et al., 2008; Bozhokina et al., 2011).

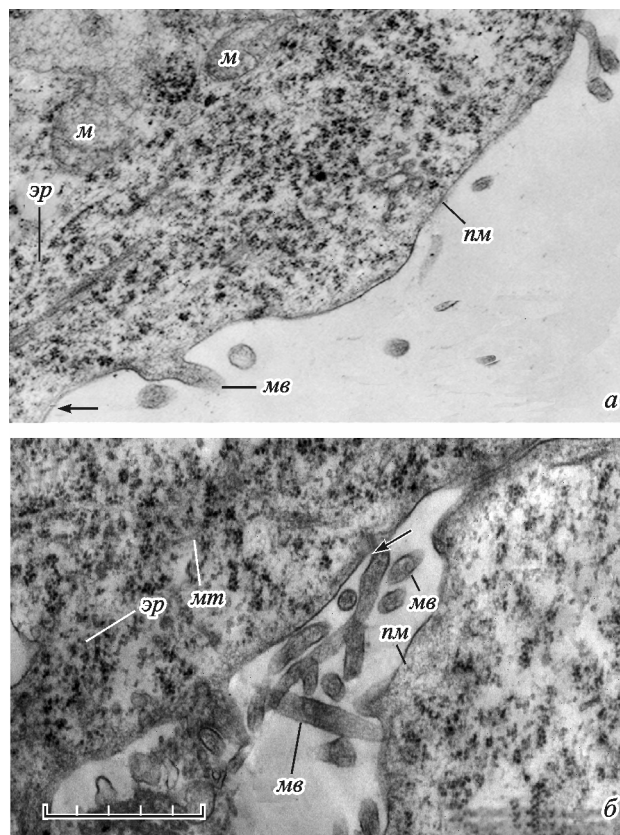


Рис. 1. Ультратонкие срезы контрольных клеток HeLa M, не обработанных (а) и предобработанных (б) N-ацетилцистеином. Обозначения ко всем рисункам: *m* — митохондрии, *mv* — микроворсинки, *mt* — микротрубочки, *пм* — плазматическая мембрана, *эр* — эндоплазматический ретикулум. Стрелками показан кортикальный актин. Масштабный отрезок — 1 мкм.

При анализе электронно-микроскопических фотографий основное внимание уделялось поверхностным структурам клеток, инфицированных бактериями. В апикальной области исследуемых клеток четко выявлялись основные органоиды и структурные элементы: плазматическая мембрана (рис. 1—4), примембранный актиновый слой (рис. 1, 2), митохондрии (рис. 1), эндоплазматический ретикулум (рис. 1, 3) и микротрубочки (рис. 1, 3—6).

Полученные результаты показывают, что добавление NAC в ростовую среду способствует появлению многочисленных выростов (ворсинок) (рис. 1). Многочисленные ворсинки наблюдаются и в присутствии бактерий, еще до стадии первичного контакта (рис. 2). При совместной инкубации бактерий и клеток HeLa M, выращенных в среде без добавления антиоксиданта, поверхность клеток практически лишена ворсинок (рис. 2, а, б). Клетки HeLa M, обработанные NAC, отличаются от контрольных клеток большим количеством выростов (рис. 2, в, г). Возможно, именно это способствует более активному процессу захвата бактерий HeLa M и, таким образом, повышает интенсивность инвазии бактерий, что согласуется с ранее полученными результатами количественной оценки инвазии бактерий *S. grimesii* в клетки, обработанные NAC (Bozhokina et al., 2013).

Взаимодействие бактерий с клетками HeLa M начинается с образования плотного контакта (рис. 3). Затем можно обнаружить два варианта проникновения бакте-

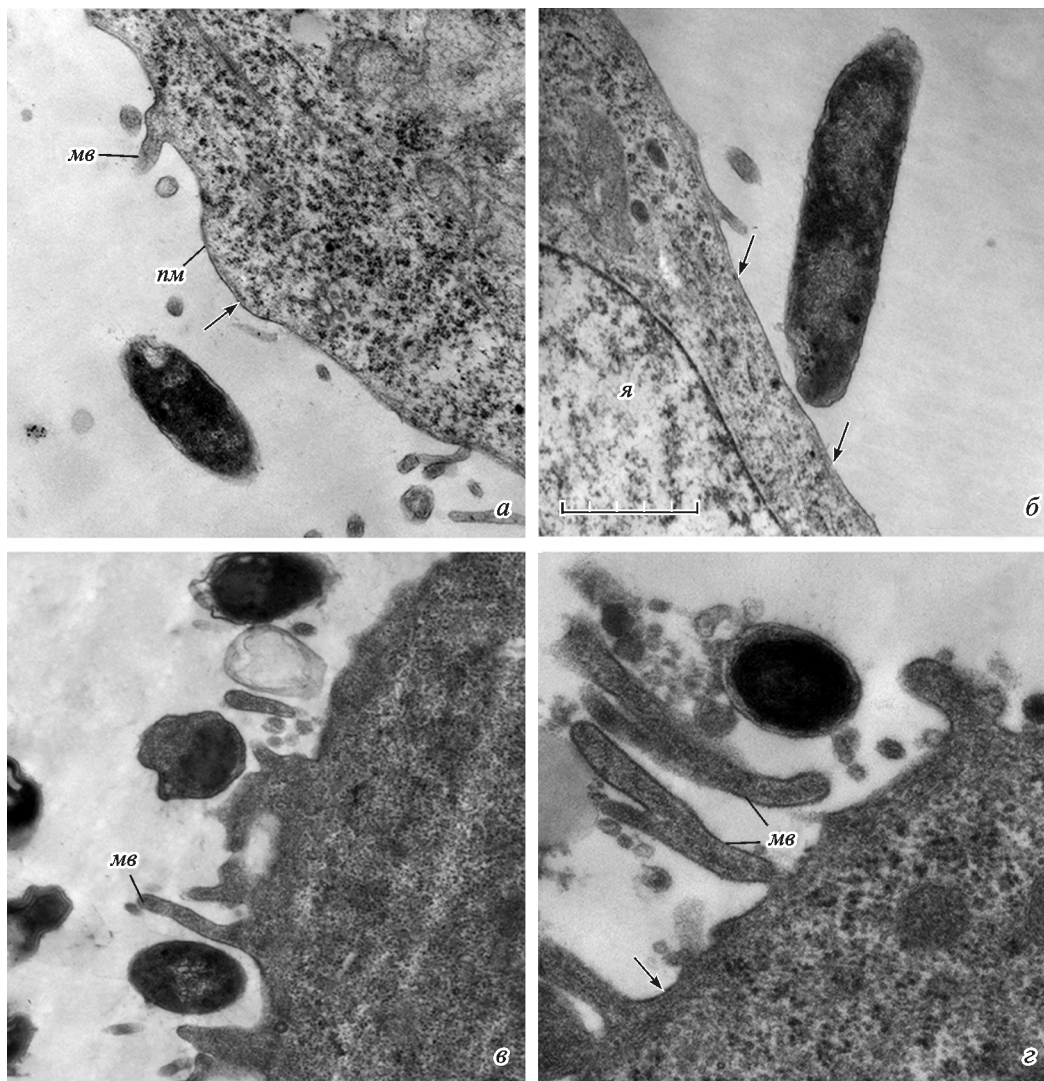


Рис. 2. Начальная стадия совместной инкубации клеток HeLa M с бактериями *Serratia grimesii*. а, б — контрольные клетки; в, г — клетки HeLa M, предобработанные N-ацетилцистеином, я — ядро.

рий в эукариотическую клетку. В большинстве случаев бактерии как бы продавливают поверхность эукариотической клетки, а затем проникают внутрь (рис. 4, а, б), что соответствует механизму «застежка-молния». Триггерный механизм предусматривает реорганизацию примембранного актина клетки-хозяина в ответ на внедрение в нее бактериальных эффекторов. Возникающие при полимеризации актина выросты захватывают бактерию, которая при слиянии выростов оказывается внутри клеточной вакуоли (рис. 5, а, б). Кроме того, полученные в данной работе электронно-микроскопические картины дают основание считать, что ворсинки клетки-хозяина способствуют захвату бактерий (рис. 2, в, г). Следует отметить, что принципиальной разницы между выростами и ворсинками нет. Те и другие представляют собой актиновые фибриллы, окруженные плазматической мембраной. Разница лишь в том, что ворсинки существуют до контакта клетки-хозяина с бактерией, а выросты образуются в результате контакта бактерии с клеткой-хозяином.

Какое-то время бактерии остаются внутри вакуолей, что наблюдается при взаимодействии бактерий с клетками, которые росли в присутствии антиоксиданта или в

среде без антиоксиданта (рис. 5, б; 6, а). В дальнейшем бактерии, как правило, растворяют мембрану вакуоли, в которой они находятся, и выходят в цитоплазму (рис. 6, б), что приводит к постепенной гибели поврежденной клетки (Efremova et al., 2001).

Независимо от механизма проникновения, перемещение бактерий внутри клеток, по данным ряда исследований (Tilney, Portnoy, 1989; Theriot et al., 1992; Theriot, 2000), осуществляется с помощью актинового «хвоста», сформированного из актина инфицированной клетки. Однако актиновые хвосты выявляются достаточно редко (Ефремова и др., 1998). Вместе с тем мы довольно часто наблюдали внутриклеточные бактерии, окруженные большим количеством микротрубочек (рис. 6). Из данных литературы известно, что эти органоиды не только осуществляют транспорт ряда клеточных органоидов (Granger et al., 2014; Hancock, 2014), но и способствуют инвазии некоторых бактерий (Yoshida et al., 2002; Dhakal, Mulvey, 2009; Haglund, Welch, 2011; Croinin, Backert, 2012). Эти наблюдения указывают на возможное участие микротрубочек в инвазии и (или) во внутриклеточном транспорте бактерий *S. grimesii*.

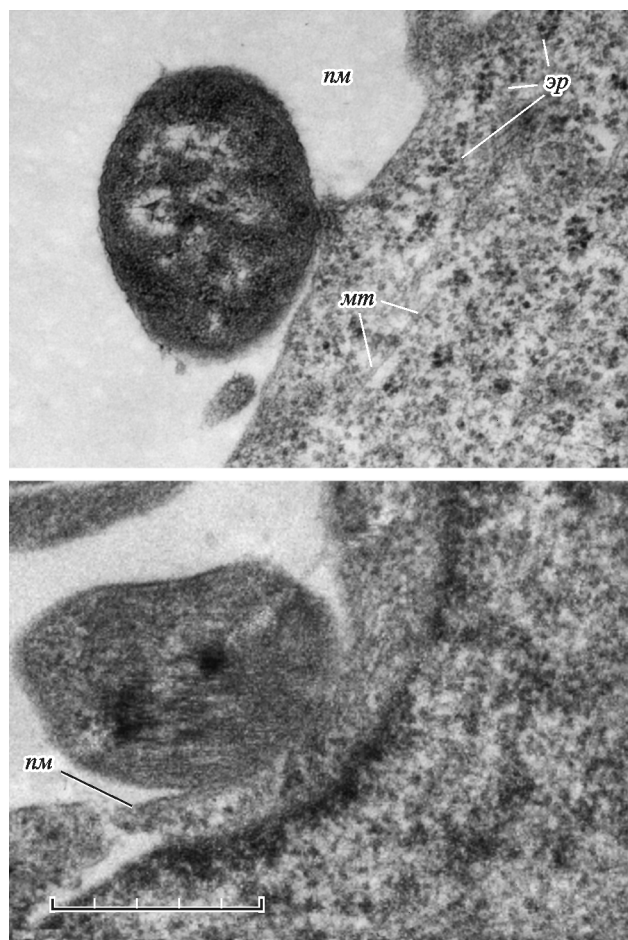


Рис. 3. Первоначальные контакты бактерий *Serratia grimesii* с клетками HeLa M.

Таким образом, предварительная обработка клеток HeLa M N-ацетилцистеином, использованная в настоящей работе для увеличения эффективности инвазии, позволила выявить значительное количество бактерий, находящихся на ранних стадиях проникновения в клетку-хозяина. Аналогичные стадии были выявлены на препаратах клеток, не обработанных N-ацетилцистеином (не представлено). Однако полученные результаты не позволяют однозначно идентифицировать механизм взаимодействия бактерий с эукариотической клеткой, что согласуется с анализом данных, описанных в литературе (Croinin, Backert, 2012). Ситуация осложняется еще и тем, что некоторые бактерии используют для инвазии оба механизма, хотя один из них, по-видимому, является преимущественным (Rosselin et al., 2010; Croinin, Backert, 2012; Grepinet et al., 2012; Velge et al., 2012; Voumart et al., 2014). Поэтому для понимания механизма инвазии необходимо также выявление бактериальных и клеточных факторов, участвующих во взаимодействии.

Известно, что в механизме «застежка-молния» бактериальный адгезин активирует инвазию, взаимодействуя с E-кадгеринами клетки-хозяина (Lecuit et al., 2000; Namon et al., 2006; Pizarro-Cerda et al., 2012), а каскад реакций, приводящих к захвату бактерии, регулируется Src-киназой (Pizarro-Cerda et al., 2012). Ранее мы показали, что чувствительность клеток HeLa M к инвазии бактерий *S. grimesii* коррелирует с усилением экспрессии генов

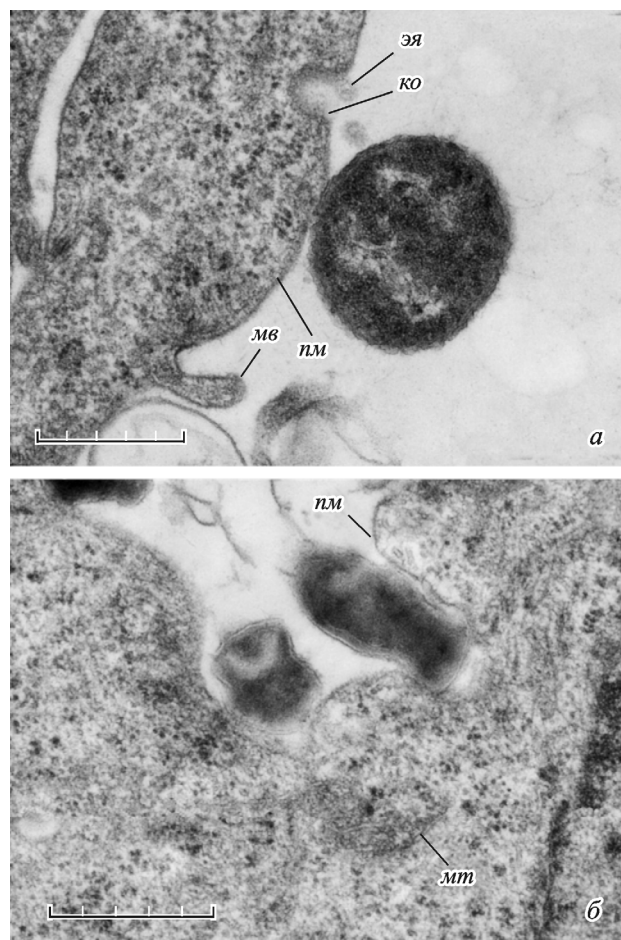


Рис. 4. Проникновение бактерий *Serratia grimesii* в клетки HeLa M по механизму «застежка-молния» через рецепторопосредованный эндоцитоз.

а — начальный этап; б — последующие этапы вхождения бактерий. ко — клатриновое обрамление, эя — эндоцитозная ямка.

E-кадгерина и β -катенина и увеличением количества E-кадгерина в клеточных экстрактах (Bozhokina et al., 2013, 2015). Кроме того, по нашим предварительным данным, ингибирование Src-киназы значительно уменьшает эффективность инвазии *S. grimesii* в клетки HeLa M. Сопоставление результатов, представленных в настоящей работе, с этими данными позволяет предположить, что проникновение бактерий *S. grimesii* в клетки эукариот происходит, по крайней мере частично, с помощью механизма «застежка-молния», включающего в себя E-кадгерин-катениновый путь.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-00316 и 13-04-00101) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 2211).

Список литературы

Гамалей И. А., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Комиссарчик Я. Ю., Кевер, Л. В., Полозов Ю. В., Хайтлина С. Ю. 2006. Уменьшение чувствительности трансформированных клеток 3T3-SV40, обработанных N-ацетилцистеином, к бакте-

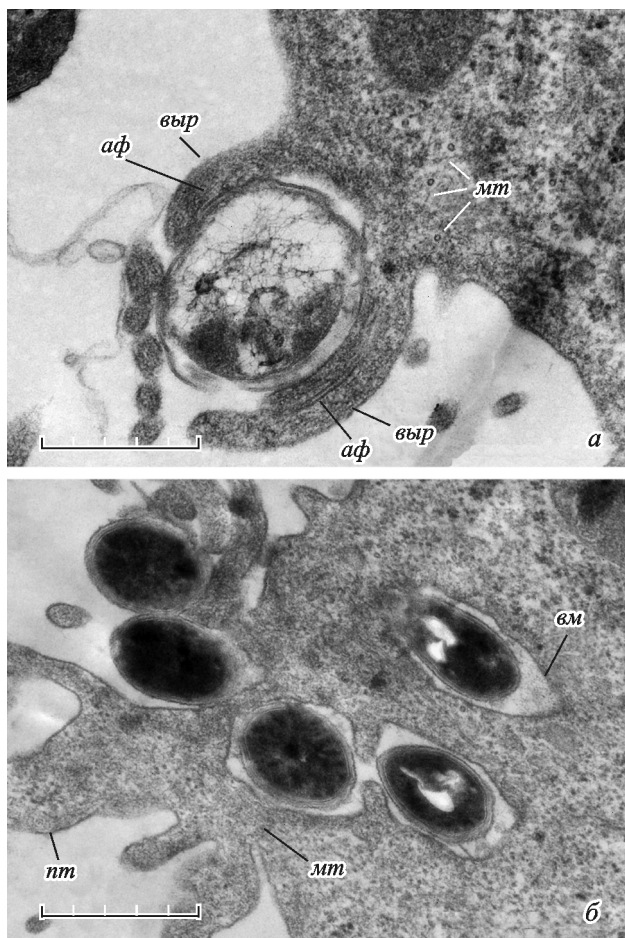


Рис. 5. Проникновение бактерий *Serratia grimesii* в клетки HeLa М по «триггерному» механизму с помощью индуцированных выростов клеточной поверхности, захватывающих бактерию.

а — начальный этап; б — последующие этапы вхождения бактерий. аф — актиновые филаменты, вт — вакуолярная мембрана, выр — выросты (мембраны).

риальной инвазии. Бюл. эксперим. биол. мед. 142 (1) : 101—105. (Gamaley I. A., Efremova T. N., Kirpichnikova K. M., Komissarchik Ya. Yu., Kever L. V., Polozov Yu. V., Khaitlina S. Yu. 2006. Decreased sensitivity of transformed 3T3-SV40 cells treated with N-acetylcysteine to bacterial invasion. Bull. Exp. Biol. Med. 142 (1) : 90—93.)

Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Влияние антиоксидантов на структуру актинового цитоскелета в фибробластах 3Т3 и 3Т3-SV40. Цитология 46 (5) : 395—403. (Efremova T. N., Kirpichnikova K. M., Khaitlina S. Yu., Gamaley I. A. 2004. Antioxidants-induced rearrangements of actin cytoskeleton in 3T3 and 3T3-SV40 fibroblasts. Tsitologiya. 46 (5) : 395—403.)

Ефремова Т. Н., Эндер Н. А., Брудная М. С., Комиссарчик Я. Ю., Хайтлина С. Ю., 1998. Реорганизация актиновых микрофиламентов в клетках НЕР-2 в результате инвазии бактерий *Escherichia coli* А2. Цитология 40 (6) : 524—528. (Efremova T. N., Ender N. A., Brudnaya M. S., Komissarchik Ya. Yu., Khaitlina S. Yu. 1998. (Invasion of *Escherichia coli* А2 induces reorganization of actin microfilaments in Hep-2 cells. Tsitologia. 40 (6) : 524—528.)

Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Спб.: Наука. 400 с. (Mironov A. A., Komissarchik Ya. Yu., Mironov V. A. 1994. Methods of electron microscopy in biology and medicine. Spb.: Nauka. 400 p.)

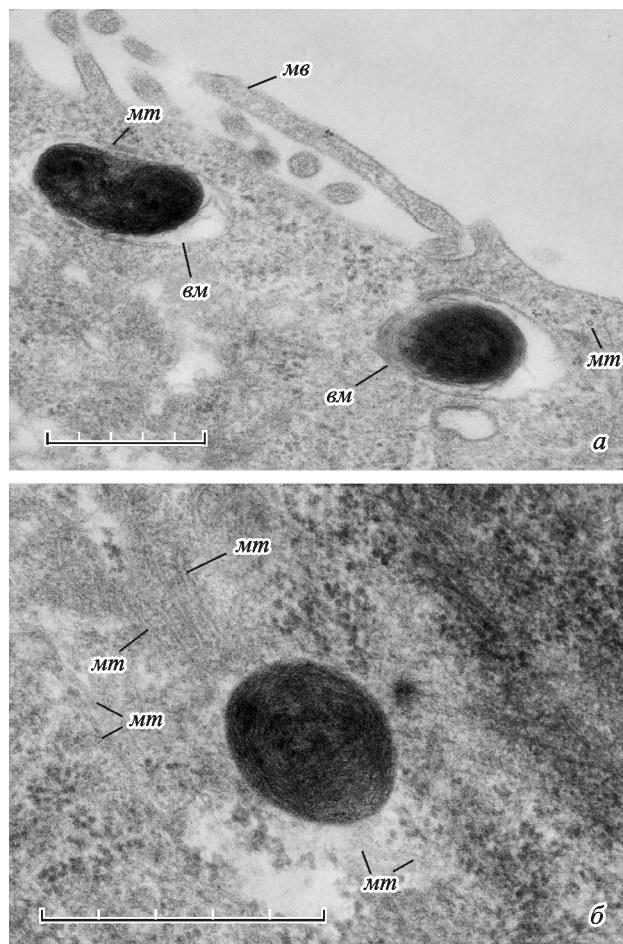


Рис. 6. Внутриклеточная локализация бактерий *Serratia grimesii* в вакуолях (а) и лежащих свободно в цитоплазме (б).

Обозначения те же, что и на рис. 1 и рис. 5.

Balczon R. 2001. Overexpression of cyclin A in human HeLa cells induces detachment of kinetochores and spindle pole/centrosome overproduction. Chromosoma. 110 : 381—392.

Boatman E., Cartwright F., Kenny G. 1976. Morphology, morphometry and electron microscopy of HeLa cells infected with bovine Mycoplasma. Cell Tissue Res. 170 : 1—16.

Boumart Z., Velge P., Wiedemann A. 2014. Multiple invasion mechanisms and different intracellular behaviors: a new vision of Salmonella-host cell interaction FEMS Microbiol. Lett. 2014. doi: 10.1111/1574—6968.12614.

Bozhokina E. S., Khaitlina S. Yu., Adam T. 2008. Grimelysin, a novel metalloprotease from *Serratia grimesii*, is similar to ECP32. Biochem. Biophys. Res. Commun. 367 : 888—892.

Bozhokina E., Khaitlina S., Gamaley I. 2015. Dihydrolipoic but not alpha-lipoic acid affects susceptibility of eukaryotic cells to bacterial invasion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 460 : 697—702.

Bozhokina E. S., Tsaplina O. A., Efremova T. N., Kever L. V., Demidyuk I. V., Kostrov S. V., Adam T., Komissarchik Y. Y., Khaitlina S. Y. 2011. Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolyzing metalloproteases grimelysin and protealyisin. Cell Biol. Intern. 34 : 111—118.

Bozhokina E. S., Vakhromova E. N., Gamaley I. A., Khaitlina S. Yu. 2013. N-acetylcysteine increases susceptibility of HeLa cells to bacterial invasion. J. Cell. Biochem. 114 : 1568—1574.

Carayol N., Tran Van Nhieu G. 2013. Tips and tricks about *Shigella* invasion of epithelial cells. Curr. Opin. Microbiol. 16 : 32—37.

Cossart P., Sansonetti P. J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science. 304 : 242—248.

- Cróinin T. Ó., Backert S. 2012. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? Front Cell Infect Microbiol. 2:25. doi: 10.3389/fcimb.2012.00025. eCollection.
- Dhakal B. K., Mulvey M. A. 2009. Uropathogenic *Escherichia coli* invades host cells via an HDAC6-modulated microtubule-dependent pathway. J. Biol. Chem. 284 : 446—454.
- Efremova T., Ender H., Brudnaja M., Komissarchik Y., Khaitlina S. 2001. Specific invasion of transformed cells by *Escherichia coli* A2 strain. Cell Biol. Intern. 25 : 257—261.
- Erlandson A. R., deHarve E. 1971. The ultrastructure of synchronized HeLa cells. J. Cell Sci. 8: 353—397.
- Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Kever L., Komissarchik Y., Polozov Y., Khaitlina S. 2006. N-acetylcystein-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. Cell Biol. Intern. 30 : 319—325.
- Granger E., McNee G., Allan V., Woodman P. 2014. The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. Semin Cell Dev. Biol. 31 : 20—29.
- Grepinet O., Namdari F., Roche S. M., Rossignol A., Virlogeux-Payant I. 2012. Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis. Microbiol. Open. 1 : 243—258.
- Grimont F., Grimont P. A. D. 2006. The genus *Serratia*. Prokaryotes. 6 : 219—244.
- Haglund C. M., Welch M. D. 2011. Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton J. Cell Biol. 195 : 7—17.
- Hamon M., Bierne H., Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nat. Rev. Microbiol. 4 : 423—434.
- Hancock W. O. 2014. Bidirectional cargo transport: moving beyond tug of war. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15 : 615—628.
- Khaitlina S. Yu., Collins J. H., Kusnetsova I. M., Pershina V. P., Synakevich I. G., Turoverov K. K., Usmanova A. M. 1991. Physico-chemical properties of actin cleaved with bacterial protease from *E. coli* A2 strain. FEBS Lett. 279 : 49—51.
- Lee J. H., Park H. J., Park Y. H. 2014. Molecular mechanisms of host cytoskeletal rearrangements by *Shigella* invasins. Int. J. Mol. Sci. 15 : 18 253—18 266.
- Lecuit M., Hurme R., Pizarro-Cerda J., Ohayon H., Geiger B., Cossart P. 2000. A role for A- and B-catenins in bacterial uptake. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 10 008—10 013.
- Navarro-Garcia F., Serapio-Palacios A., Ugalde-Silva P., Tapia-Pastrana G., Chavez-Dueñas L. 2013. Actin cytoskeleton manipulation by effector proteins secreted by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. BioMed Res. Intern. Vol. 2013. Article ID 374395.
- Pizarro-Cerda J., Kuhbacher A., Cossart P. 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2 : a010009.
- Rosselin M., Virlogeux-Payant I., Roy C., Bottreau E., Siza-aret P.-Y., Mijouin L., Germon P., Caron E., Velge P., Wiedemann A. 2010. Rck of *Salmonella enterica*, subspecies enterica serovar Enteritidis, mediates Zipper-like internalization. Cell Res. 20 : 647—664.
- Rutherford S. T., Bassler B. L. 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2 : a012427.
- Sansonetti P. J. 1998. Molecular and cellular mechanisms of invasion of the intestinal barrier by enteric pathogens. The paradigm of *Shigella*. Folia Microbiol. 43 : 239—246.
- Santos R. I. M., Rodrigues A. H., Silva M. L., Mortara R. A., Rossi M. A., Jamur M. C., Oliver C., Arruda E. 2008. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. Virus Res. 138 : 139—143.
- Theriot J. A. 2000. The polymerization motor. Traffic. 1 : 19—28.
- Theriot J. A., Mitchison T. J., Tilney L. G., Portnoy D. A. 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. Nature. 357 : 257—260.
- Tilney L. G., Portnoy D. A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J. Cell Biol. 109 : 1597—1608.
- Valencia-Gallardo C. M., Carayol N., Tran Van Nhieu G. 2015. Cytoskeletal mechanics during *Shigella* invasion and dissemination in epithelial cells. Cell. Microbiol. 17 : 174—182.
- Velge P., Bottreau E., Van-Langendonck N., Kaeffer B. 1997. Cell proliferation enhances entry of *Listeria monocytogenes* into intestinal epithelial cells by two proliferation-dependent entry pathways. J. Med. Microbiol. 46 : 681—692.
- Velge P., Kaeffer B., Bottreau E., Van Langendonck N. 1995. The loss of contact inhibition and anchorage-dependent growth are key steps in the acquisition of *Listeria monocytogenes* susceptibility phenotype by non-phagocytic cells. Biol. Cell. 85 : 55—66.
- Velge P., Wiedemann A., Rosselin M., Abed N., Boumart Z., Chausse A. M., Grepinet O., Namdari F., Roche S. M., Rossignol A., Virlogeux-Payant I. 2012. Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis. Microbiol. Open. 1 : 243—258.
- Yoshida S., Katayama E., Kuwae A., Mimuro H., Suzuki T., Sakakawa C. 2002. *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. EMBO J. 21 : 2923—2935.

Поступила 6 VII 2015

ENTRY OF FACULTATIVE PATHOGEN *SERRATIA GRIMESII* INTO HELA CELLS. ELECTRON MICROSCOPIC ANALYSISE. S. Bozhokina, L. V. Kever, Ya. Yu. Komissarchik, S. Yu. Khaitlina,¹ T. N. Efremova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: skhspb@gmail.com

Facultative pathogens *Serratia grimesii* are able to invade eukaryotic cells where they have been found in vacuoles and free in the cytoplasm (Efremova et al., 2001; Bozhokina et al., 2011). However, efficiency of this invasion is low, and the mechanisms of the invasion related to the initial steps of the process are not known. In the present study, we have increased the invasion efficiency by incubation of HeLa cells with N-acetylcysteine (NAC) preceding the infection. In the NAC-pretreated cells, two modes of *S. grimesii* to enter HeLa cells were observed. In the most cases, the penetration of *S. grimesii* into the cell was consistent with the «zipper mechanism», involving specific interaction of bacterial invasin with a host cell surface receptor. However, in some cases, bacteria were trapped by membrane ruffling probably produced by injected bacterial proteins that trigger the bacterial uptake process, as described in the «trigger mechanism». Further elucidation of bacterial and cellular factors involved in the bacteria-host cell interaction should clarify whether two different mechanisms or a predominant one operate during *S. grimesii* invasion.

Key words: bacterial invasion, N-acetylcysteine, *Serratia grimesii*, invasion steps.