

РАЗЛИЧИЯ В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ЗТЗ И ЗТЗ-SV40 К ИНВАЗИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ *SERRATIA GRIMESII*

© А. П. Ивлев,^{1,2} Т. Н. Ефремова,² С. Ю. Хайтлина,² Е. С. Божоккина². *

¹ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, 195251, и

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: bozhokina@yahoo.com

Клетки, выделенные из организма, устойчивы к бактериальной инвазии, но теряют эту устойчивость при иммортализации и трансформации. В настоящей работе исследовано взаимодействие иммортализованных фибробластов ЗТЗ и их аналогов ЗТЗ-SV40, трансформированных *in vitro*, с условно-патогенными бактериями *Serratia grimesii* в стандартной среде и после культивирования клеток с антиоксидантом N-ацетилцистеином (НАС). Показано, что клетки ЗТЗ примерно в 2 раза менее чувствительны к инвазии бактериями *S. grimesii*, чем аналогичные, но трансформированные вирусом клетки ЗТЗ-SV40. Культивирование клеток ЗТЗ с 10 или 20 мМ НАС увеличивало инвазию бактерий *S. grimesii* в 1.6 и 2.5 раза соответственно. Инвазия бактерий в клетки ЗТЗ-SV40 увеличивалась в этих условиях в 2.1 и 2.4 раза. Эти результаты показывают, что клетки ЗТЗ более устойчивы к инвазии бактериями *S. grimesii*, чем клетки ЗТЗ-SV40, и после воздействия на клетки НАС это различие сохраняется. Известно, что среди генов, экспрессию которых увеличивает НАС, особое место занимает E-кадгерин, который взаимодействует с поверхностным белком (инвазином) бактерий. Культивирование клеток ЗТЗ и ЗТЗ-SV40 с НАС приводило к повышению экспрессии E-кадгерина, что коррелирует с увеличением чувствительности этих клеток к инвазии. С помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии впервые выявлена колокализация бактерий *S. grimesii* с E-кадгерином клеток ЗТЗ и ЗТЗ-SV40, что указывает на участие E-кадгерина в процессе проникновения бактерий *S. grimesii* в клетки эукариот.

Ключевые слова: иммортализованные клетки, инвазия бактерий, N-ацетилцистеин, *Serratia grimesii*.

Инвазия бактерий в клетки эукариот является уникальным процессом, включающим в себя взаимодействие бактериальной и эукариотической клетки, активацию сигнальной системы клетки и специфический вид биологической подвижности, основанный на полимеризации актина (Finlay, Cossart, 1997; Sansonetti, 2001; Haglund, Welch, 2011; Valencia-Gallardo et al., 2015). Патогенные бактерии прикрепляются к эукариотической клетке с помощью фибриллярных структур, содержащих адгезины (Pizarro-Cerda, Cossart, 2006). Затем бактерии проникают в клетку либо в результате взаимодействия поверхностных белков (инвазинов) с рецепторами клетки-хозяина, либо с помощью специфического аппарата секреции, через который бактерии инжецируют собственные эффекторы непосредственно в цитоплазму эукариотической клетки. Оба пути связаны с активацией сигнальных каскадов, реорганизацией цитоскелета и полимеризацией актина (Cossart, Sansonetti, 2004; Carabeo, 2011; Pizarro-Cerda et al., 2012; Mattock, Blocker, 2017).

Способностью проникать в клетки эукариот обладают не только патогенные, но и условно-патогенные бактерии. Ранее мы показали, что инкубация трансформированных клеток Hep-2, ЗТЗ-SV40 или HeLa с бактериями *Serratia grimesii*, продуцентами протеазы ЕСР32/триме-

лизин (Khaitlina et al., 1991; Bozhokkina 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; Bozhokkina et al., 2011, 2015). При этом инфицированными оказываются только около 10 % клеток, инкубированных с бактериями, что соответствует статусу условной патогенности этих бактерий (Grimont, Grimont, 2006) и затрудняет их выявление. Проникновение бактерий в трансформированные клетки сопровождается значительными перестройками их цитоскелета, выявляемыми с помощью окраски родамин-фаллоидином, что наряду с анализом препаратов с помощью электронной микроскопии служило маркером инвазии (Ефремова и др., 1998; Efremova et al., 2001). Однако инкубация бактерий с иммортализованными фибробластами ЗТЗ, которые широко используются в экспериментах *in vitro* в качестве «нормальных» нетрансформированных клеток (Rubin et al., 1996; Rubin, 2001), не приводила ни к изменениям цитоскелета, ни к выявлению бактерий внутри клетки на электронно-микроскопических препаратах (Ефремова и др., 1998; Efremova et al., 2001). Хотя эти результаты указывали на устойчивость иммортализованных клеток к инвазии, это предположение требовало проверки в условиях, способ-

ствующих повышению эффективности инвазии, и с использованием дополнительной оценки процесса методом количественного микробиологического анализа.

Известно, что чувствительность эукариотических клеток к бактериальной инвазии может зависеть от физиологического состояния клеток (Velge et al., 1995, 1997). Показано, в частности, что обработка трансформированных клеток HeLa и CaCo антиоксидантами в 2—3 раза увеличивает их чувствительность к инвазии бактериями (Bozhokina et al., 2013, 2015). Поэтому в настоящей работе мы сравнили эффективность инвазии бактерий *S. grimesii* в нетрансформированные иммортализованные фибробласты 3Т3 и трансформированные фибробласты 3Т3-SV40 не только в стандартных условиях культивирования, но и после действия на клетки N-ацетилцистеина (NAC).

Материал и методика

Культуры клеток и условия роста. Клетки Balb 3Т3, эмбриональные фибробласты мыши (3Т3) и эмбриональные фибробласты мыши, трансформированные вирусом SV40 (3Т3-SV40), были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в 6-луночных платах в среде DMEM (Биолот, Россия) без антибиотика, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific Inc.) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 2 сут до достижения ~70%-ного монослоя. После этого заменяли кондиционированную среду порцией свежей среды и культивировали еще 12 ч без добавления или в присутствии 10 или 20 мМ NAC (Sigma).

Количественная оценка эффективности инвазии и адгезии. Эффективность инвазии оценивали с помощью количественного микробиологического теста (Prouty, Gunn, 2000) с незначительными модификациями (Bozhokina et al., 2013). Бактерии *S. grimesii* выращивали на питательном бульоне LB, содержащем 1 % пептона, 0,5 % дрожжевого экстракта и 1 % NaCl (рН 7,0), при 37 °С с аэрацией до появления активной активности (Bozhokina et al., 2011). Затем суспензию бактерий в ростовой среде центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 5 мин. Осадок промывали 1 раз средой LB, ресуспендировали в среде DMEM без сыворотки и добавляли к клеткам 3Т3 и 3Т3-SV40 в количестве не менее 100 бактерий на клетку (множественность инфекции составляла 100). Количество бактерий определяли по поглощению при 600 нм. Клетки с бактериями центрифугировали на платах при 2000 об/мин в течение 5 мин, чтобы ускорить взаимодействие бактерий с клетками, после чего инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С в течение 30 мин для определения адгезии и в течение 2 ч для определения инвазии бактерий.

Для подсчета количества адгезировавших бактерий клетки промывали 3 раза PBS для удаления всех неприкрепившихся бактерий. Затем клетки инкубировали в PBS в присутствии 1%-ного Тритона X-100 в течение 15 мин при 37 °С для снятия прикрепившихся бактерий с поверхности клеток. Суспензию быстро разводили до нужной концентрации и высевали на чашки с LB-агаром для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ).

Для определения количества внутриклеточных бактерий (инвазии) прикрепившиеся к субстрату клетки 3Т3 и 3Т3-SV40 промывали 1 мл раствора Трипсин—ЭДТА

(Sigma), добавляли среду DMEM, содержащую гентамицин (50 мкг/мл), и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С с качанием, чтобы уничтожить внеклеточные бактерии. Далее клетки лизировали дезоксихолатом, для чего к 400 мкл суспензии клеток добавляли 200 мкл 4,5%-ного раствора дезоксихолата натрия (Sigma). Лизат объемом 100 мкл быстро титровали холодной средой LB до нужной концентрации и высевали по 100 мкл на чашки с LB-агаром для подсчета КОЕ. Результаты представляют собой среднее значение КОЕ из экспериментов, повторенных не менее 3 раз.

Флуоресцентная микроскопия. Для флуоресцентной микроскопии клетки фиксировали 3,7%-ным формальдегидом в течение 10 мин, отмывали PBS не менее 3 раз и обрабатывали 0,1%-ным раствором Тритона X-100 (Sigma) 10 мин с последующей отмывкой PBS. Для визуализации F-актина клетки окрашивали родамин-фаллоидином 15 мин при 37 °С в темноте и отмывали PBS, затем для визуализации бактерий обрабатывали красителем DAPI 5 мин, отмывали и заключали в монтирующую среду.

Для иммунофлуоресценции клетки фиксировали в холодном метаноле 5 мин, выдерживали в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в течение ночи и инкубировали с антителами против E-кадгерина (Santa Cruz Biotechnology, США) 2 ч. Детекцию проводили с помощью вторых антител, конъюгированных с Alexa 488 (Santa Cruz Biotechnology, США). Препараты анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Leica SP5 TCS. Изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ (version 1.42i).

Анализ экспрессии E-кадгерина проводили методом полуколичественного ПЦР-ОТ. Тотальную РНК из клеточных лизатов получали с помощью набора Qiagen RNA extraction Kit согласно инструкции фирмы-производителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV Reverse Transcriptase (Promega) и полученную кДНК разводили до 20 нг/мл. Последовательности ген-специфических праймеров получали с использованием программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Праймеры для GAPDH: прямой 5'-CTGGGACGACATGGAGAAA-3' и обратный 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'. Праймеры для E-кадгерина: прямой 5'-CCCTGGCTTTGACGCCGAGA-3' и обратный 5'-CTCGGTCCAGCCAGTGGTG-3'.

Условия ПЦР составляли: первичная денатурация при 94 °С 3 мин, 33 цикла амплификации (94 °С 1 мин, отжиг при 60 °С для β-актина и 64 °С для E-кадгерина в течение 1 мин, 72 °С 1 мин) и финальная элонгация 10 мин при 72 °С. Продукты амплификации визуализировали в 1%-ной агарозе с последующим окрашиванием бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали стандартный маркер DNA-ladder 100 bp (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Результаты

Инвазия клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 бактериями *S. grimesii*. Для выявления инвазии бактерий в клетки 3Т3 и 3Т3-SV40 мы использовали количественный микробиологический тест и конфокальную микроскопию. На рис. 1—3 представлены данные микробиологического теста, который позволяет оценить количество

бактерий, проникших в эукариотические клетки (инвазия) или прикрепившихся к клеткам снаружи (адгезия). Клетки 3Т3 и 3Т3-SV40 растили в 6-луночных платах, как описано в разделе «Материал и методика», дополнительно культивировали в течение 12 ч в отсутствие и в присутствии 10 или 20 мМ NAC и заражали бактериями после удаления NAC. Как показано на рис. 1, бактерии *S. grimesii* проникают в клетки 3Т3. Однако эффективность инвазии бактерий в эти клетки (89.5 ± 21.0 КОЕ) оказалась примерно в 1.8 раза ниже, чем эффективность проникновения бактерий в трансформированные клетки 3Т3-SV40 (160.9 ± 18.6 КОЕ) (рис. 1).

Ранее мы показали, что культивирование клеток карциномы гортани М-HeLa в присутствии 10 мМ NAC приводит к двукратному увеличению чувствительности этих клеток к бактериальной инвазии (Bozhokina et al., 2013, 2015). Похожие результаты были получены при инвазии бактерий *S. grimesii* в клетки 3Т3 и 3Т3-SV40, обработанные NAC (рис. 1). Действие на клетки 3Т3 10 или 20 мМ NAC увеличивало инвазию бактерий в 1.6 и 2.5 раза соответственно. Инвазия бактерий в клетки 3Т3-SV40 увеличивалась в этих условиях в 2.1 и 2.4 раза. При этом различие между клетками сохранялось. Эти результаты подтверждают, что клетки 3Т3 более устойчивы к инвазии бактериями *S. grimesii*, чем клетки 3Т3-SV40.

Значительное влияние NAC на чувствительность клеток 3Т3 к инвазии проявилось также при 10-кратном увеличении количества бактерий на клетку. Если при соотношении клеток и бактерий 1 : 100 присутствие NAC увеличивало инвазию примерно в 2 раза, то при соотношении 1 : 1000 инвазия увеличивалась четырехкратно и достигала максимума уже при 10 мМ NAC (рис. 2), превышая уровень проникновения бактерий в клетки 3Т3-SV40 при соотношении клеток и бактерий 1 : 100.

Аналогичные эксперименты были проведены для выявления адгезии бактерий к клеткам 3Т3 и 3Т3-SV40 до и после обработки клеток 10 и 20 мМ NAC. Эффективность адгезии бактерий *S. grimesii* к поверхности этих клеток оказалась примерно одинаковой: 130 ± 42 и 125 ± 34 КОЕ для клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 соответственно (рис. 3). Предварительная обработка клеток 3Т3 10 и 20 мМ NAC увеличивала адгезию бактерий к поверхности клеток в 1.7 и 1.9 раза соответственно (рис. 3). Адгезия бактерий к клеткам 3Т3-SV40 в этих условиях увеличивалась значительно слабее — в 1.2 и 1.7 раза после действия 10 и 20 мМ NAC соответственно (рис. 3). Таким образом, адгезия *S. grimesii* к клеткам 3Т3 и 3Т3-SV40 практически одинакова.

Для выявления инвазии бактерий с помощью конфокальной микроскопии клетки 3Т3 и 3Т3-SV40 культивировали 12 ч в отсутствие или в присутствии 20 мМ NAC, а затем инкубировали с бактериями в течение 2 ч. Цитоскелет окрашивали родамин-фаллоидином, бактерии и ядра клеток — реактивом DAPI. Результаты, приведенные на рис. 4, свидетельствуют о проникновении бактерий в клетки 3Т3 и 3Т3-SV40 как до, так и после действия 20 мМ NAC на клетки. При этом в препаратах клеток 3Т3 наблюдали значительное количество бактерий в межклеточном пространстве, что может быть связано с более интенсивной продукцией этими клетками фибронектина.

Участие E-кадгерина в инвазии клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 бактериями *S. grimesii*. Известно, что ряд патогенных бактерий проникает в клетки эукариот в результате взаимодействия инвазинов с поверхностными рецепторами клетки-хозяина (Pizzagno-Cer-

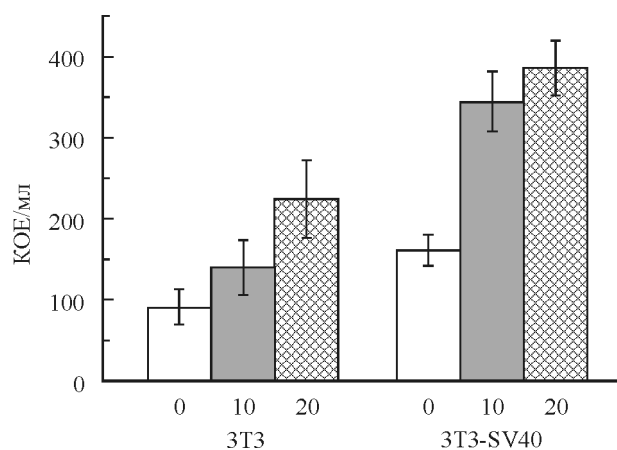


Рис. 1. Инвазия клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 бактериями *Serratia grimesii* по данным микробиологического теста.

КОЕ — колониеобразующая единица. Цифры показывают концентрацию N-ацетилцистеина (NAC) в инкубационной среде.

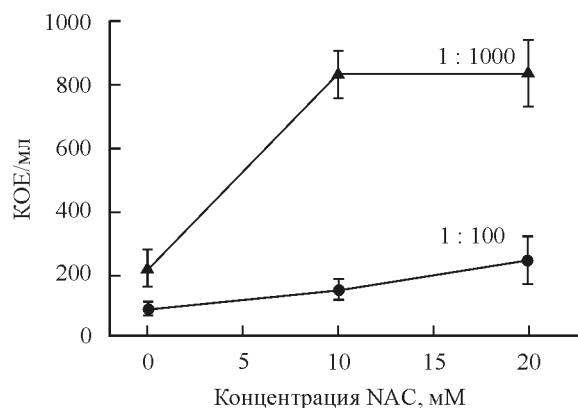


Рис. 2. Инвазия бактерий *Serratia grimesii* в клетки 3Т3 при множественности инфекции 100 и 1000 бактерий на клетку.

КОЕ — колониеобразующая единица, NAC — N-ацетилцистеин.

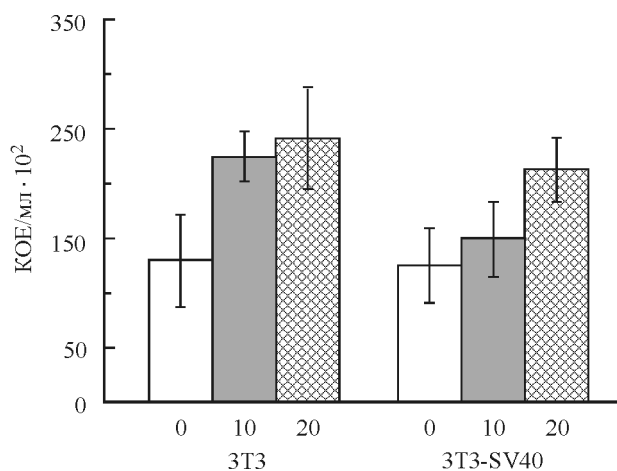


Рис. 3. Адгезия бактерий *Serratia grimesii* к клеткам 3Т3 и 3Т3-SV40.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

А, клетки 3Т3

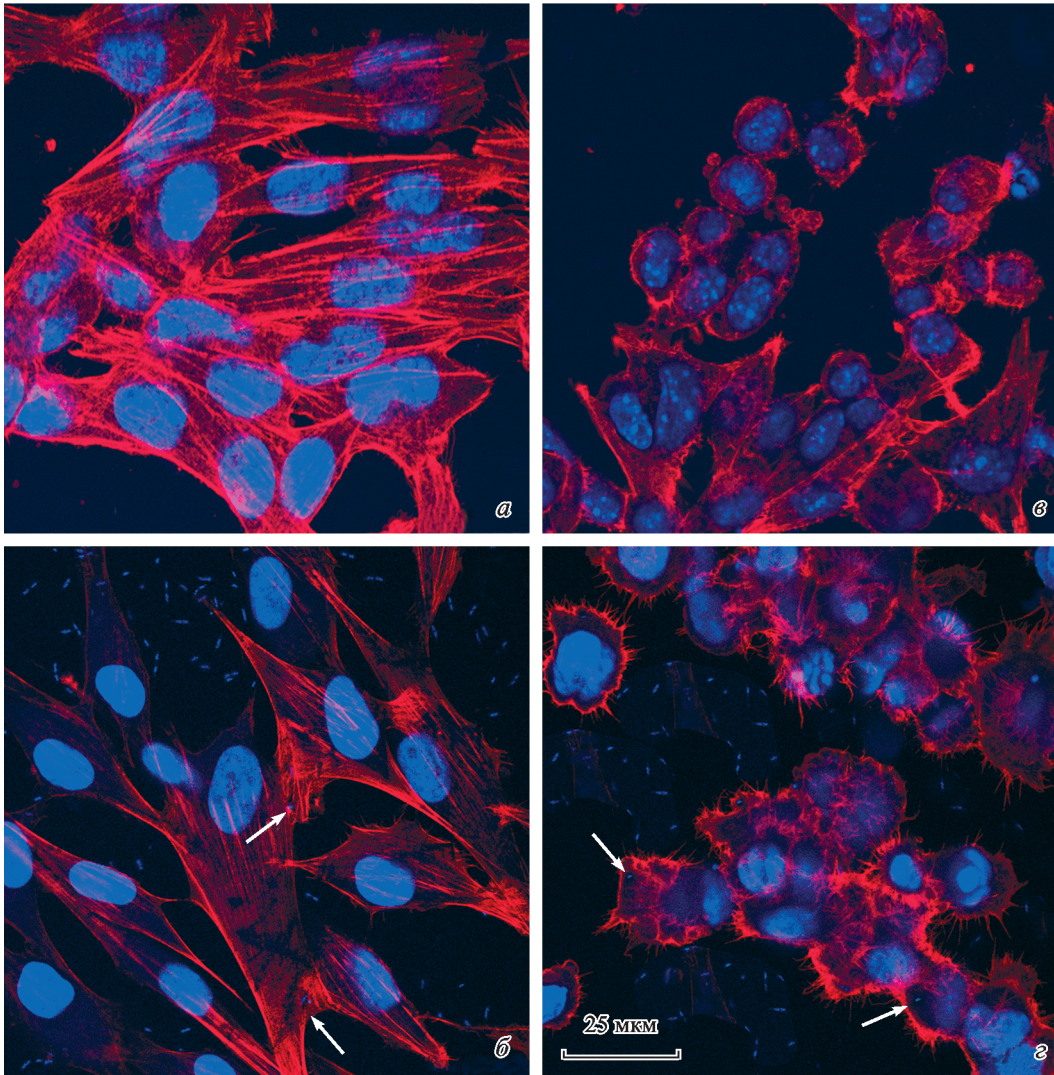


Рис. 4. Инвазия клеток 3Т3 (А) и 3Т3-SV40 (Б) бактериями *Serratia grimesii* по данным флуоресцентной микроскопии.

а — контрольные клетки; б — клетки после инкубации с бактериями *S. grimesii*; в — клетки после культивирования в среде с 20 мМ НАС в течение 12 ч; г — обработанные НАС клетки после инкубации с бактериями *S. grimesii*. Стрелками показаны внутриклеточные бактерии. Цитоскелет окрашен родамин-фаллоидином, ядра клеток и бактерии окрашены DAPI.

da, Cossart, 2006). Одним из таких рецепторов является Е-кадгерин (Bonazzi et al., 2009). Ранее мы показали, что вызываемое НАС увеличение чувствительности трансформированных клеток к бактериальной инвазии коррелирует с усилением экспрессии Е-кадгерина (Bozhokina et al., 2013, 2015). Поэтому мы сравнили экспрессию Е-кадгерина в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 до и после действия на клетки этого антиоксиданта. Оказалось, что в исходных клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 уровень экспрессии Е-кадгерина одинаков (рис. 5). Действие 20 мМ НАС в течение 12 ч привело к усилению экспрессии Е-кадгерина, которое в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 также было практически одинаковым (рис. 5). Эти данные указывают на то, что инвазия клеток 3Т3, так же как и инвазия трансформированных клеток 3Т3-SV40, опосредована участием Е-кадгерина.

Чтобы выявить участие Е-кадгерина в инвазии клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 бактериями *S. grimesii*, клетки культивировали в присутствии 20 мМ НАС, как описано выше,

инкубировали с бактериями в течение 2 ч и окрашивали моноклональными антителами против Е-кадгерина, конъюгированными с FITC. По данным конфокальной микроскопии использованные антитела выявляли Е-кадгерин на поверхности клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 (рис. 6). При заражении тех и других клеток бактериями наблюдали колоколлизацию бактерий с Е-кадгерином (рис. 6).

Обсуждение

Чувствительность клеток эукариот к бактериальной инфекции как в организме, так и в экспериментальных условиях зависит от физиологического состояния клетки-хозяина, в том числе от статуса эукариотической клетки и пролиферативной активности. Известно, что нормальные клетки, выделенные из организма, устойчивы к проникновению патогенных бактерий, но теряют эту устойчивость при спонтанной импортизации, вирусной

Б, клетки 3Т3-SV40

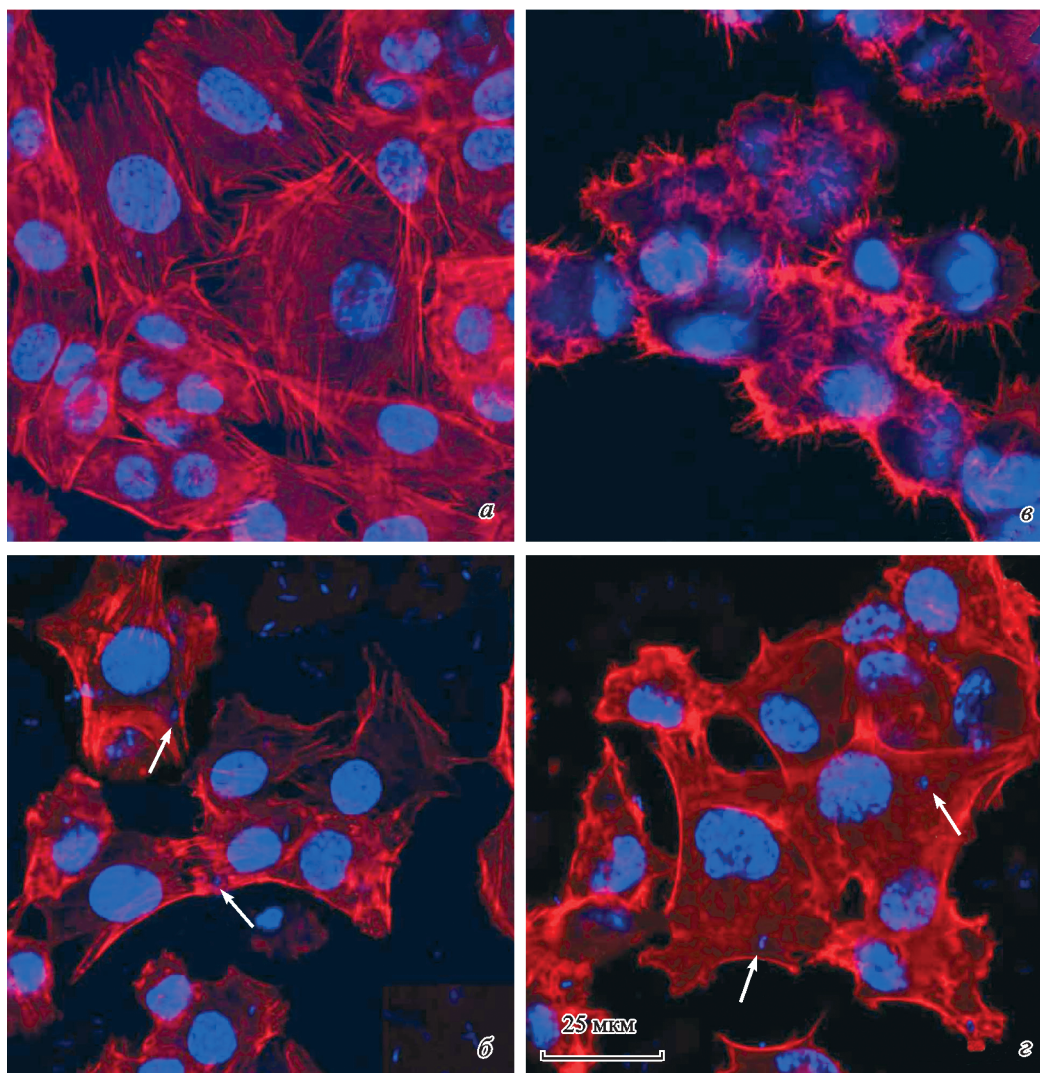


Рис. 4 (продолжение).

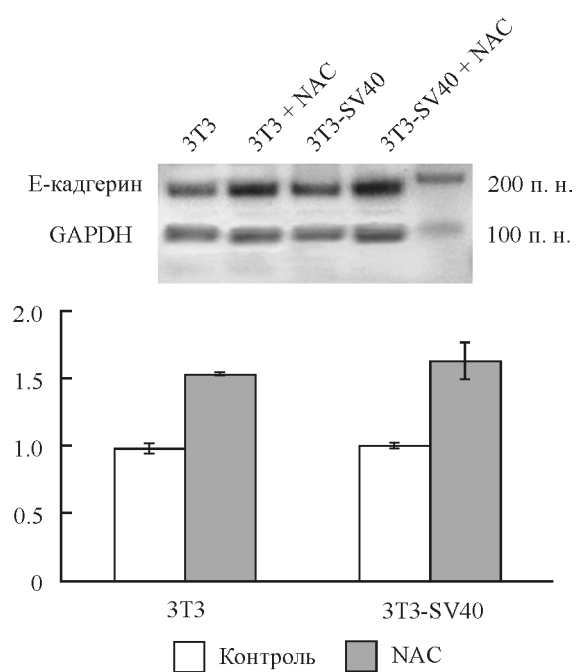


Рис. 5. Влияние NAC на экспрессию E-кадгерина в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40.

Показаны контрольные клетки и клетки, выдержанные 12 ч в среде, содержащей 20 мМ NAC (+NAC). п. н. — пары нуклеотидов.

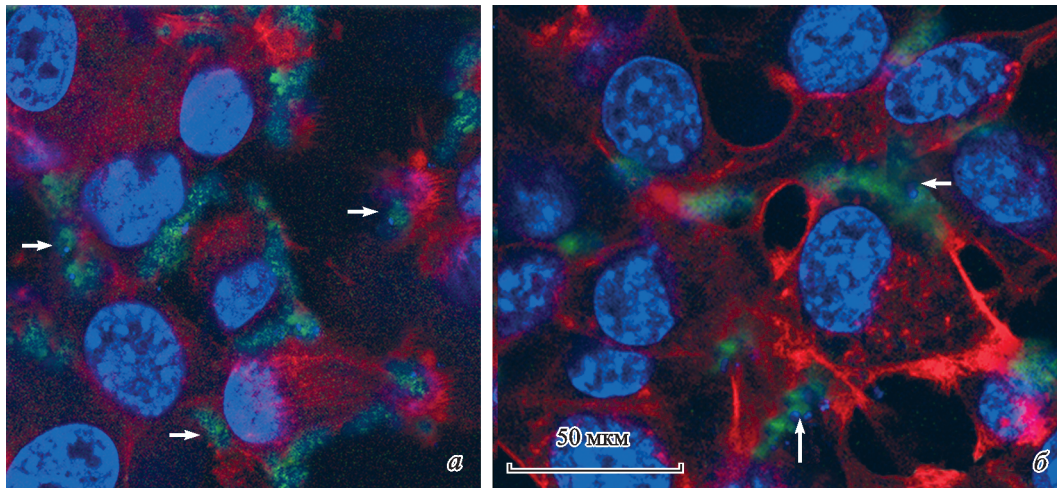


Рис. 6. Локализация Е-кадгерина при инвазии клеток 3Т3 (а) и 3Т3-SV40 (б) бактериями *Serratia grimesii*.

Клетки обрабатывали 20 мМ NAC в течение 12 ч, затем проводили инвазию. Бактерии колокализованы с Е-кадгеринном клеток 3Т3 (а) и 3Т3-SV40 (б). Стрелками показаны бактерии. Цитоскелет окрашен родамин-фаллоидином, ядра клеток и бактерии окрашены DAPI, антитела к Е-кадгерину конъюгированы с FITC.

и неопластической трансформации, причем чувствительность к инвазии в этом ряду увеличивается (Velge et al., 1994, 1997). Результаты нашей работы показывают, что эта закономерность относится также к взаимодействию эукариотических клеток с условно-патогенными бактериями: иммортализованные фибробласты 3Т3 примерно в 2 раза менее чувствительны к инвазии бактериями *S. grimesii*, чем трансформированные вирусом клетки 3Т3-SV40.

Так же как и клетки карцином М-HeLa и CaCo-2 (Bozhokina et al., 2013, 2015), клетки 3Т3 и 3Т3-SV40 становились более чувствительными к инвазии бактериями, а различия между клетками сохранялись при воздействии 20 мМ NAC. Известно, что NAC вызывает значительные изменения в экспрессии генов, которые проявляются на морфологическом, биохимическом и физиологическом уровнях и в целом направлены на ингибирование пролиферации и переход к дифференцировке (Gustavsson et al., 2005; Parasassi et al., 2005, 2010). В частности, происходит усиление экспрессии гена Е-кадгерина и снижение экспрессии гена тирозинкиназы Src (Parasassi et al., 2005). В соответствии с этими данными и результатами, полученными нами ранее на клетках карцином М-HeLa и CaCo-2 (Bozhokina et al., 2013, 2015), действие NAC на клетки 3Т3 и 3Т3-SV40 приводило к повышению экспрессии Е-кадгерина, что коррелирует с увеличением чувствительности этих клеток к инвазии. По-видимому, более эффективная интернализация бактерий является результатом активации Е-кадгерин-катенинового пути (Bozhokina et al., 2015). Более того, в настоящей работе впервые выявлена колокализация *S. grimesii* с Е-кадгеринном клеток 3Т3 и 3Т3-SV40.

Однако уровень экспрессии Е-кадгерина в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 как до, так и после воздействия NAC практически одинаков, что не соответствует меньшей чувствительности клеток 3Т3 к инвазии в этих условиях. Это может быть связано с тем, что, с одной стороны, в клетках 3Т3 сохраняются механизмы устойчивости к бактериям, характерные для клеток организма, а с другой стороны, трансформация вирусом изменяет фундаментальные свойства клеток. Многие патогенные бактерии используют белки внеклеточного матрикса, в том числе

ламинин, коллаген и фибронектин, для адгезии и инвазии в клетки эукариот (Schwarz-Linek et al., 2004; Hoffmann et al., 2011; Hauck et al., 2012; Singh et al., 2012). Показано, например, что клетки 3Т3, трансформированные вирусом SV40, начинали значительно интенсивнее синтезировать коллаген (Todaro et al., 1964), а клетки, лишённые ламинина, устойчивы к инвазии (Van Wijk et al., 2017). Разная чувствительность клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 к бактериальной инвазии может также быть связана с особенностями регуляции сигнальных путей, в том числе тех, активность которых связана с Src-киназой (Tran Van Nhieu et al., 2005).

Таким образом, результаты нашей работы показывают, что иммортализованные клетки 3Т3 более устойчивы к инвазии условно-патогенными бактериями *S. grimesii*, чем их аналоги, трансформированные вирусом клетки 3Т3-SV40. Различие между клетками сохраняется после культивирования клеток с 10–20 мМ NAC, которое способствует увеличению экспрессии Е-кадгерина. На поверхности клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 впервые выявлена колокализация бактерий с Е-кадгеринном, что указывает на участие Е-кадгерина в процессе проникновения *S. grimesii* в клетки эукариот.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-316 и 17-04-00558).

Список литературы

- 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* A2. Цитология 40 (6) : 524–528. (Efremova T. N., Ender N. A., Brudnaya M. S., Komissarchik Ya. Yu., Khaitylina S. Yu. 1998. Invasion of *Escherichia coli* A2 induces reorganization of actin microfilaments in Hep-2 cells. Tsitologiya. 40 (6) : 524–528.)
- Bonazzi M., Lecuit M., Cossart P. 2009. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from bench to bedside. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1(4) : a003087. Doi: 10.1101/cshperspect.a003087.

- 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. Dihydroliipoic 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 protealysin. *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.
- Carabeo R. 2011. Bacterial subversion of host actin dynamics at the plasma membrane. *Cell Microbiol.* 13 : 1460—1469. Doi: 10.3389/fcimb.2017.00064. eCollection 2017.
- Cossart P., Sansonetti P. J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science.* 304 : 242—248.
- Efremova T., Ender I., Brudnaja M., Komissarchik Y., Khaitlina S. 2001. Specific invasion of transformed cells by *Escherichia coli* A2 strain. *Cell Biol. Intern.* 25 : 257—261.
- Finlay B. B., Cossart P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 276 : 718—725.
- 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.
- Grimont F., Grimont P. A. D. 2006. The genus *Serratia*. *Prokaryotes.* 6 : 219—244.
- Gustafsson A. C., Kupersmidt I., Edlundh-Rose E., Greco G., Serafino A., Krasnowska E. K., Lundeberg T., Bracci-Laudiero L., Romano M. C., Parasassi T., Lundeberg J. 2005. Global gene expression analysis in time series following N-acetyl-L-cysteine induced epithelial differentiation of human normal and cancer cells *in vitro*. *BMC Cancer.* 5 : 75. Doi: 10.1186/1471-2407-5-75.
- Haglund C. M., Welch M. D. 2011. Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 195 : 7—17.
- Hauck C. R., Borisova M., Muenzner P. 2012. Exploitation of integrin function by pathogenic microbes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24 : 637—644.
- Hoffmann C., Ohlsen K., Hauck C. R. 2011. Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *Eur. J. Cell Biol.* 90 : 891—896.
- Khaitlina S. Yu., Collins J. H., Kuznetsova I. M., Pershina V. P., Synakevich I. G., Turoverov K. K., Usmanova A. M. 1991. Physicochemical properties of actin cleaved with bacterial protease from *E. coli* A2 strain. *FEBS Lett.* 279 : 49—51.
- Mattock E., Blocker A. J. 2017. How do the virulence factors of *Shigella* work together to cause disease? *Front. Cell Infect. Microbiol.* 64. Doi: 10.3389/fcimb.2017.00064. eCollection.
- Parasassi T., Brunelli R., Bracci-Laudiero L., Greco G., Gustafsson A. C., Krasnowska E. K., Lundeberg J., Lundeberg T., Pittaluga E., Romano M. C., Serafino A. 2005. Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms. *Cell Death Differ.* 12 : 1285—1296.
- Parasassi T., Brunelli R., Costa G., De Spirito M., Krasnowska E., Lundeberg T., Pittaluga E., Ursini F. 2010. Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *Scientific World J.* 10 : 1192—2002. Doi: 10.1100/tsw.2010.104.
- Pizarro-Cerda J., Cossart P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 124 : 715—727.
- 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.
- Prouty A. M., Gunn J. S. 2000. Salmonella enterica serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect. Immun.* 68 : 6763—6769.
- Rubin H. 2001. Multistage carcinogenesis in cell culture. *Develop. Biol.* 106 : 61—66.
- Rubin H., Chow M., Yao A. 1996. Cellular aging, destabilization, and cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 1825—1830.
- Sansonetti P. 2001. Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. *Semin Immunol.* 6 : 381—390.
- Schwarz-Linek U., Höök M., Potts J. R. 2004. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol. Microbiol.* 52 : 631—641. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04027.
- Singh B., Fleury C., Jalalyvand F., Riesbeck K. 2012. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host FEMS. *Microbiol. Rev.* 36 : 1122—1180.
- Todaro G. J., Green H., Goldberg B. D. 1964. Transformation of properties of an established cell line by SV40 and polyoma virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 51 : 66—73.
- Tran Van Nhieu G., Enninga J., Sansonetti P., Grompone G. 2005. Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating *Shigella* invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 8 : 16—22.
- 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.
- Van Wijk X. M., Dohrmann S., Hallstrom B. M., Li S., Voldborg B. G., Meng B. X., McKee K. K., van Kuppevelt T. H., Yurchenco P. D., Palsson B. O., Lewis N. E., Nizet V., Esko J. D. 2017. Whole-genome sequencing of invasion-resistant cells identifies laminin-2 as a host factor for bacterial invasion. *mBio.* 1 : e02128—16.
- Velge P., Bottreau E., Kaeffer B., Pardon P. 1994. Cell immortalization enhances *Listeria monocytogenes* invasion. *Med. Microbiol. Immunol.* 183 : 145—158.
- 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.

Поступила 6 VI 2017

DIFFERENCE IN SUSCEPTIBILITY OF 3T3 AND 3T3-SV40 CELLS TO INVASION BY OPPORTUNISTIC PATHOGENS *SERRATIA GRIMESII*A. P. Ivlev,^{1,2} T. N. Efremova,² S. Yu. Khaitlina,² E. S. Bozhokina^{2,*}¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, S.-Petersburg, 195251, and² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: bozhokina@yahoo.com

Cells isolated from the body are resistant to bacterial invasion but lose the resistance upon immortalization and transformation. In this work, interaction of immortalized 3T3 fibroblasts and their *in vitro* transformed analog 3T3-SV40 cells with opportunistic bacteria *Serratia grimesii* was studied in a standard medium and after in-

cubating the cells with an antioxidant N-acetylcysteine (NAC). The 3T3 cells were shown to be approximately twice less sensitive to *S. grimesii* infection than similar but virus-transformed 3T3-SV40 cells. Incubation of 3T3 cells with 10 and 20 mM NAC enhanced the invasion 1.6 and 2.5-fold, respectively. Under the same conditions, the invasion of 3T3-SV40 cells by the bacteria was enhanced 2.1 and 2.4-fold. These results show that 3T3 cells are more resistant to invasion by *S. grimesii* than 3T3-SV40 cells, and the difference is preserved after the cells are exposed to 10 and 20 mM NAC. Among the genes which expression is known to be increased by NAC, a special role plays E-cadherin shown to interact with surface proteins (invasins) of pathogenic bacteria. Incubation of 3T3 and 3T3-SV40 cells with NAC resulted in an increased expression of E-cadherin, which correlates with the increased sensitivity of these cells to invasion. Confocal fluorescence microscopy revealed, for the first time, colocalization of *S. grimesii* with E-cadherin of 3T3 and 3T3-SV40 cells indicating that E-cadherin can be involved in the penetration of *S. grimesii* into eukaryotic cells.

Key words: immortalized cells, bacterial invasion, N-acetylcystein, *Serratia grimesii*.
