

УДК 577.22

ПРОТИВОПОЛОЖНЫЙ ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ ROCK И Src КИНАЗЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ К ИНВАЗИИ БАКТЕРИЙ *Serratia grimesii*

© 2019 Е.С. Божокина, О.А. Цаплина, С.Ю. Хайтлина*

Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: skhspb@gmail.com

Поступила в редакцию 20.09.2018

После доработки 22.11.2018

Принята к публикации 22.11.2018

Проникновение бактерий в клетки эукариот определяется сложным взаимодействием бактериальных и клеточных факторов. Являясь частью окружающей среды, условно-патогенные бактерии разработали различные механизмы взаимодействия с рецепторами клеточной поверхности, такими как E-кадгерин, интегрин или рецептор эпидермального фактора роста, что позволяет бактериям активировать компоненты сигнальных путей эукариотических клеток и способствует проникновению бактерий в клетки, их выживанию и внутриклеточному размножению. Исследуя механизмы проникновения условно-патогенных бактерий *Serratia grimesii* в культивируемые эукариотические клетки, мы ранее установили, что обработка клеток N-ацетилцистеином (NAC) увеличивает инвазию *S. grimesii*, и этот эффект коррелирует с увеличением экспрессии E-кадгерина. Так как NAC регулирует экспрессию ROCK киназы и Src киназы, целью данной работы было выявление участия этих компонентов сигналинга в инвазии *S. grimesii*. Результаты ингибиторного анализа показали, что чувствительность культивируемых клеток разного происхождения к инвазии бактериями *S. grimesii* значительно увеличивается после обработки клеток специфическим ингибитором протеинкиназы ROCK Y-27632. С другой стороны, введение в клетки Rho-ингибирующей siRNA или ингибитора Src киназы Src-11 уменьшало инвазию. Изменения чувствительности клеток к бактериям, вызванные ингибиторами, коррелируют с соответствующими изменениями в экспрессии E-кадгерина, увеличивающейся при ингибировании ROCK киназы и уменьшающейся при ингибировании Src киназы. Эти результаты демонстрируют участие протеинкиназ ROCK и Src в инвазии бактерий *S. grimesii* в эукариотические клетки и позволяют предположить, что в инвазию *S. grimesii* вовлечены компоненты других сигнальных путей, активность которых, по-видимому, увеличивается при Y-27632-зависимом ингибировании ROCK киназы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инвазия бактерий, *Serratia grimesii*, протеинкиназа ROCK, протеинкиназа Src, RhoA.

DOI: 10.1134/S0320972519060101

Система передачи сигнала эукариотических клеток состоит из многочисленных сигнальных путей, которые позволяют клеткам распознавать изменения в окружающей среде, передавать внеклеточные сигналы в клетку и регулировать поведение и взаимодействия клеток. Будучи частью клеточного микроокружения, патогенные и условно-патогенные внутриклеточные бактерии разработали различные механизмы для использования сигнальных путей эукариотических клеток для проникновения в клетку-хозяина, выживания и размножения в клетке [1–5]. Для проникновения в эукариотические клетки многие патогенные бактерии обладают

системами секреции, которые позволяют доставлять факторы вирулентности непосредственно в цитоплазму клетки-хозяина, чтобы управлять внутриклеточными процессами [6–9]. Напротив, условно-патогенные бактерии используют специфические поверхностные белки, которые взаимодействуют с рецепторами клетки-хозяина, такими как кадгерин [10, 11], интегрин [12–14] или рецептор эпидермального фактора роста [15, 16], что приводит к активации рецептор-опосредованных сигнальных каскадов и проникновению бактерий в клетки. Подобные механизмы могут быть использованы бактериями, инвазивная активность которых скрыта до тех пор, пока они не контактируют с поврежденными клетками или клетками пациента с ослабленным иммунитетом. Однако эти механизмы еще недостаточно изучены.

Принятые сокращения: NAC – N-ацетилцистеин, КОЕ – колониеобразующие единицы.

* Адресат для корреспонденции.

Грамотрицательные бактерии *Serratia* являются условно-патогенными бактериями, способными вызывать внутрибольничные инфекции или инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом [17, 18]. Ранее мы обнаружили, что бактерии *S. grimesii*, синтезирующие термолизоноподобную металлопротеиназу гримелизин, специфически расщепляющую актин, могут проникать в эукариотические клетки. Оказалось, также, что после трансформации плазмидой, несущей ген гримелизина, неинвазивные *E. coli* приобретают инвазивную активность [19, 20]. Мы также показали, что чувствительность клеток HeLa к инвазии *S. grimesii* и рекомбинантными *E. coli*, трансформированными плазмидой, несущей ген гримелизина, усиливалась при обработке клеток антиоксидантом N-ацетилцистеин (NAC) [20]. Этот эффект коррелировал с повышением экспрессии E-кадгерина [20, 21], трансмембранного белка, синтез которого увеличивается под воздействием N-ацетилцистеина [22]. С другой стороны, известно, что E-кадгерин участвует в интернализации бактерий *Listeria monocytogenes* [10]. Такая корреляция указывает на то, что повышенная чувствительность клеток к *S. grimesii* может быть вызвана непосредственным влиянием NAC на экспрессию гена E-кадгерина. Однако известно, что NAC также регулирует экспрессию других компонентов сигнальных путей, включая Rho/ROCK протеинкиназу [23] и Src протеинкиназу [22, 24], что, в свою очередь, может влиять на экспрессию E-кадгерина. Поэтому в настоящей работе мы использовали специфические ингибиторы ROCK и Src протеинкиназы, чтобы выяснить, участвуют ли эти протеинкиназы в проникновении *S. grimesii* в клетки эукариот и сопровождается ли этот процесс регуляцией экспрессии E-кадгерина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры клеток, штаммы бактерий и условия культивирования. Клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека M-HeLa клон 11, клетки колоректальной аденокарциномы человека CaCo-2, эмбриональные фибробласты мыши, трансформированные вирусом SV40 (3T3-SV40) и мезенхимные стволовые клетки человека SC5-MSC были получены из «Коллекции культур клеток позвоночных» (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Клетки линии HeLa-RhoA, экспрессирующие RhoA, были любезно предоставлена доктором Т. Адамом (Charite, Берлин, Германия). Клетки M-HeLa и HeLa-RhoA культивировали на среде α MEM («Биолот», Россия), содержащей 10% (v/v) эм-

бриональной бычьей сыворотки («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) и 1% (v/v) NEAA (non-essential amino acids) («Sigma-Aldrich», Германия) без антибиотика при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ до достижения 70–80% монослоя. Клетки CaCo-2 и 3T3-SV40 культивировали в среде DMEM («Биолот», Россия), а клетки SC5-MSC – в среде α MEM («Биолот», Россия), содержащих 10% эмбриональной бычьей сыворотки без антибиотика, при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ до достижения 70–80% монослоя.

Бактерии *Serratia grimesii* 30063 были получены из «Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур» (DSMZ). Рекомбинантные *E. coli* SCS1, экспрессирующие гримелизин, были получены, как описано ранее [25]. Бактерии выращивали на питательном бульоне LB («Sigma-Aldrich», Германия), содержащем 1%-ный пептон, 0,5% дрожжевого экстракта и 1% NaCl (pH 7,0) при 37 °C с аэрацией в течение времени, необходимого для появления в их экстрактах актин-гидролизующей активности. Затем суспензию бактерий в ростовой среде осаждали на центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия) при 13 000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM («Биолот», Россия) без сыворотки.

Ингибиторный анализ. Чтобы ингибировать сигнальный путь Rho/ROCK, исследуемые клетки в стандартной среде предварительно обрабатывали Y-27632 («Sigma-Aldrich», Германия) в течение 30 мин при указанных концентрациях, используя в качестве исходного раствора 10 мМ раствор Y-27632 в диметисульфиде (DMCO) («Sigma-Aldrich», Германия). Для ингибирования Src киназы клетки предварительно обрабатывали в течение 30 мин 10 мкМ Src-11 (ингибитор киназы Src-1), («Sigma-Aldrich», Германия), из расчета 1 мкл 10 мМ раствора Src-11 в DMCO на 1 мл культуральной среды. Чтобы исключить влияние DMCO, содержащегося в растворах ингибиторов, к контрольным клеткам добавляли эквивалентное количество DMCO. Затем клеточную среду заменяли средой DMEM без сыворотки и проводили эксперименты по иммунофлуоресценции и количественный анализ инвазии.

Количественный анализ инвазии. Эффективность инвазии *S. grimesii* и *E. coli* SCS1 оценивали с помощью гентамицинового метода (gentamicin protection assay) [26] с небольшими изменениями [20]. Бактерии *S. grimesii* в среде DMEM без сыворотки добавляли к клеткам в количестве не менее 100 бактерий на клетку. Общее количество бактерий определяли по интенсивности поглощения суспензии при длине волны 600 нм. Клетки с бактериями инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C в течение 2 ч. Для

определения количества внутриклеточных бактерий (инвазии) клетки промывали 1 мл раствора трипсин-ЭДТА («Sigma-Aldrich», Германия), добавляли среду DMEM, содержащую гентамицин (50 мкг/мл), и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С с качанием, чтобы уничтожить внеклеточные бактерии. Затем клетки лизировали дезоксихолатом натрия («Sigma-Aldrich», Германия), для чего к 400 мкл суспензии клеток добавляли 200 мкл 4,5%-ного раствора дезоксихолата натрия. Лизат, объемом 100 мкл, быстро титровали холодной средой LB до нужной концентрации и высевали по 100 мкл на чашки с LB-агаром для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Результаты представляют собой среднее значение КОЕ из трех независимых экспериментов. Значения выражены как среднее \pm S.D. Различия считались значительными на уровне $p < 0,05$.

Флуоресцентная микроскопия. Контрольные и инфицированные клетки в PBS фиксировали 3,7%-ным параформальдегидом («Sigma-Aldrich», Германия) в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, три раза промывали PBS, обрабатывали 0,1%-ным раствором Тритона X-100 в PBS в течение 5 мин и промывали PBS. Для визуализации Ф-актина клетки окрашивали родамин-фаллоидином («Sigma-Aldrich», Германия) в течение 15 мин при 37 °С в темноте и промывали PBS. Затем клетки окрашивали DAPI («Sigma-Aldrich», Германия), 1 : 2000, в течение 5 мин для визуализации клеточных ядер и бактерий, промывали PBS и заключали в монтажную среду. Образцы анализировали с использованием конфокального инвертированного микроскопа Leica SP5 TCS («Leica», Германия).

ПЦР-анализ. Экспрессию гена E-кадгерина анализировали с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР. Общую РНК экстрагировали из клеточных лизатов с использованием набора PowerLyzer RNA Isolation («MO BIO», США). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра. кДНК получали с помощью обратной транскрипции, выполненной с использованием набора First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Реакцию проводили согласно инструкциям производителя с добавлением oligo(dT) праймеров («Евроген», Россия). Ген-специфические пары праймеров были созданы с использованием программного обеспечения BLAST-primer. Праймеры для E-кадгерина: прямой 5'-CTGAGAACGAGGANAACG-3' и обратный 5'-TTCACATCCAGCACATCC-3'. Праймеры для GAPDH: прямой 5'-TGCACCA-CCAACCTGCTTAGC-3', и обратный 5'-GGCAT-GGACTGTGGTCATGAG-3'.

ПЦР реакции были оптимизированы следующим образом: первичное плавление при 94 °С

3 мин, 45 циклов амплификации (денатурация 1 мин при 94 °С, отжиг 1 мин при 60 °С для GAPDH и 64 °С для E-кадгерина, элонгация 1 мин при 72 °С), и финальная достройка цепи 10 мин при 72 °С. Продукты амплификации разделяли в 1,5%-ном геле и визуализировали с помощью окраски бромистым этидием («Sigma-Aldrich», Германия). Для определения молекулярного веса продуктов, полученных с помощью ПЦР, использовали стандартный маркер молекулярного веса DNA-Ladder 100 bp («Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

Трансфекция клеток препаратами siRNA. siRNA, направленная против RhoA человека, и контрольная siRNA, содержащая случайную нуклеотидную последовательность, были получены из фирмы Santa Cruz (США). Трансфекцию клеток M-HeLa этими siRNA проводили с использованием реагента трансфекции siRNA («Santa Cruz», США), в соответствии с инструкциями производителя. Эффективность РНК-интерференции (RNAi) была проверена Вестерн-блотт анализом. Клетки собирали и лизировали детергент-содержащим буфером для лизиса клеток RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS) («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Концентрацию белка в лизате определяли с помощью реактива Брэдфорда («Bio-Rad», США). 10 мкг белка наносили на дорожку SDS-электрофореза и после окончания электрофореза переносили на PVDF-мембрану для выявления E-кадгерина Вестерн-блоттингом. Контролем нагрузки служил β -актин и GAPDH.

Вестерн-блоттинг. Клеточные экстракты фракционировали с помощью SDS-электрофореза и переносили на мембрану из поливинилидендифторида (PVDF) в соответствии с протоколами производителя («Bio-Rad», США). После инкубации с 5%-ным обезжиренным молоком в TBST-буфере (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Твин 20) в течение 60 мин мембрану промывали один раз TBST-буфером и инкубировали с антителами против RhoA («Santa Cruz», США), (1 : 1000) или E-кадгерина («Santa Cruz», США), (1 : 1000) и β -актина («Abcam», США), (1 : 5000) или GAPDH («Abcam», США), (1 : 5000) при 4 °С в течение 12 ч. Затем мембраны промывали 3 раза по 10 мин и инкубировали 2 ч со вторыми антителами, специфичными к IgG мыши или IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 : 3000). Мембраны трижды промывали TBST-буфером и проявляли с помощью системы реагентов для выявления результатов Вестерн-блоттинга Pierce™ ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) в соответствии с протоколами производителя.

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с пакетом анализа данных Excel. Различия считались достоверными на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ингибирование активности ROCK киназы увеличивает инвазию *S. grimesii*. Чтобы выяснить, участвует ли Rho/ROCK киназа в проникновении *S. grimesii* в эукариотические клетки, мы сначала использовали конфокальную флуоресцентную микроскопию для визуализации внутриклеточных бактерий в клетках М-HeLa, предварительно обработанных специфическим ингибитором ROCK киназы Y-27632. Контрольные клетки М-HeLa (рис. 1, а) и клетки, обработанные 10 мкМ Y-27632 (рис. 1, б) в течение 30 мин, инфицировали бактериями *S. grimesii*, как описано в разделе «Методы исследования». Сравнение контрольных клеток (рис. 1, а) и клеток, обработанных Y-27632 (рис. 1, б) показывает, что ингибитор вызывал значительную раз-

борку актинового цитоскелета с небольшими островками Ф-актина, оставшимися в цитоплазме, и остроконечными актин-содержащими филоподии-подобными протрузиями, образовавшимися на периферии клетки. Многочисленные бактерии были расположены вдоль протрузий и между протрузиями, а также интернализированы в клетках, что указывает на то, что инкубация клеток с Y-27632, предшествующая заражению клеток бактериями, существенно повышает чувствительность клеток М-HeLa к инвазии. Чтобы оценить этот эффект количественно, инвазия бактерий в клетки М-HeLa, обработанные ингибитором ROCK киназы Y-27632 в диапазоне 1–20 мкМ, была определена с помощью гентамицинового метода [26].

Как показано на рис. 2, а, 5–20 мкМ Y-27632 увеличивали восприимчивость клеток М-HeLa к проникновению *S. grimesii* дозо-зависимым образом, с максимальным увеличением инвазии после инкубации клеток с 10 мкМ Y-27632. Дальнейшее увеличение концентрации ингибитора приводило к уменьшению чувствительности клеток к бактериям, что может быть связано с дозо-зависимым влиянием Y-27632 на форми-

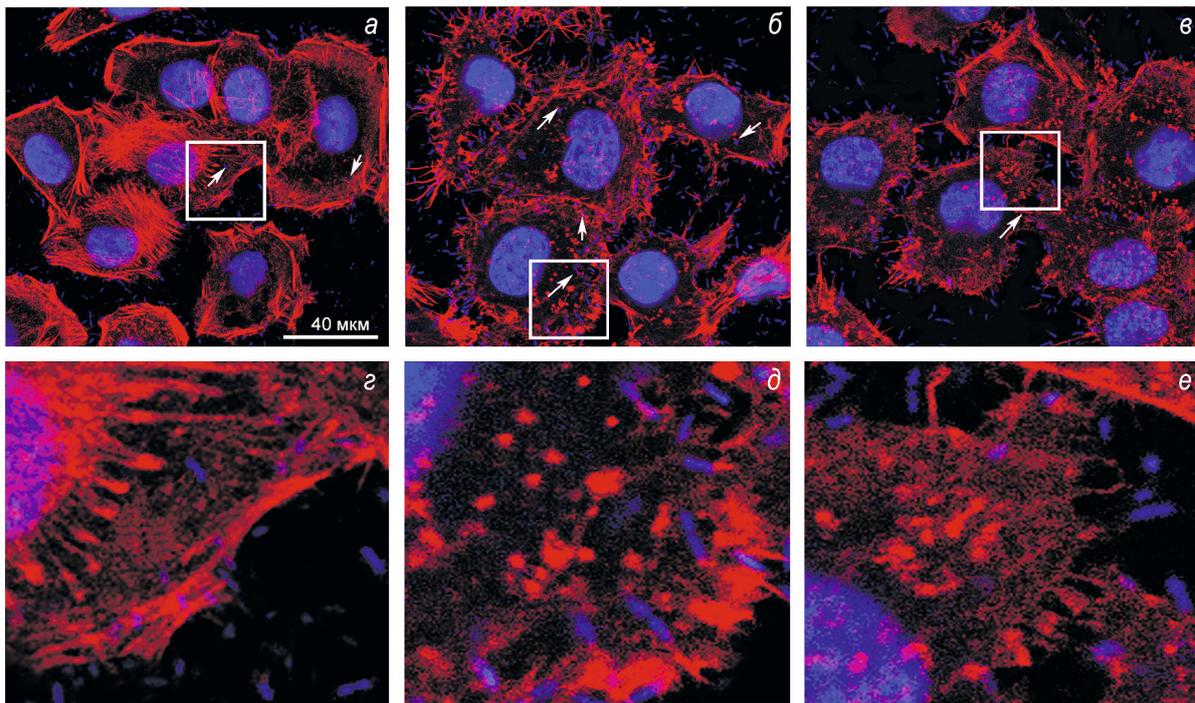


Рис. 1. Влияние ингибирования ROCK киназы и Src киназы на чувствительность клеток М-HeLa к инвазии бактериями *S. grimesii*, по данным флуоресцентной конфокальной микроскопии. Клетки М-HeLa, выращенные на покровных стеклах (а), предварительно инкубировали с 10 мкМ Y-27632 (б) или 10 мкМ Src-11 (в) и инфицировали бактериями *S. grimesii*, как описано в Материалах и Методах. Ф-актин окрашивали родамин-фаллоидином (красный); ядра и бактерии окрашивали DAPI (синий). Внутриклеточные бактерии отмечены стрелами. В нижнем ряду рисунка (z, d, e) показаны увеличенные изображения, соответствующие выделенным участкам изображений верхнего ряда рисунка (а, б, в). С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

рование клеточных выростов и перестройки цитоскелета [27, 28], которые играют существенную роль в бактериальной инвазии. В частности, было показано, что повышение концентрации Y-27632 над оптимальной приводит к разборке кортикального цитоскелета [27]. Когда клетки вступают в контакт с бактериями, этот процесс может уменьшить инвазию бактерий.

Инкубация клеток с 10 мкМ Y-27632 приводила также к 2–3-кратному увеличению инвазии в клетки CaCo-2 и 3T3-SV40, а также в клетки линии HeLa-RhoA, содержащей ~20% RhoA-трансфицированных клеток HeLa (рис. 2, б). Кроме того, подобный эффект наблюдался, когда эти клетки были инфицированы рекомбинантными *E. coli* SCS1, трансформированными

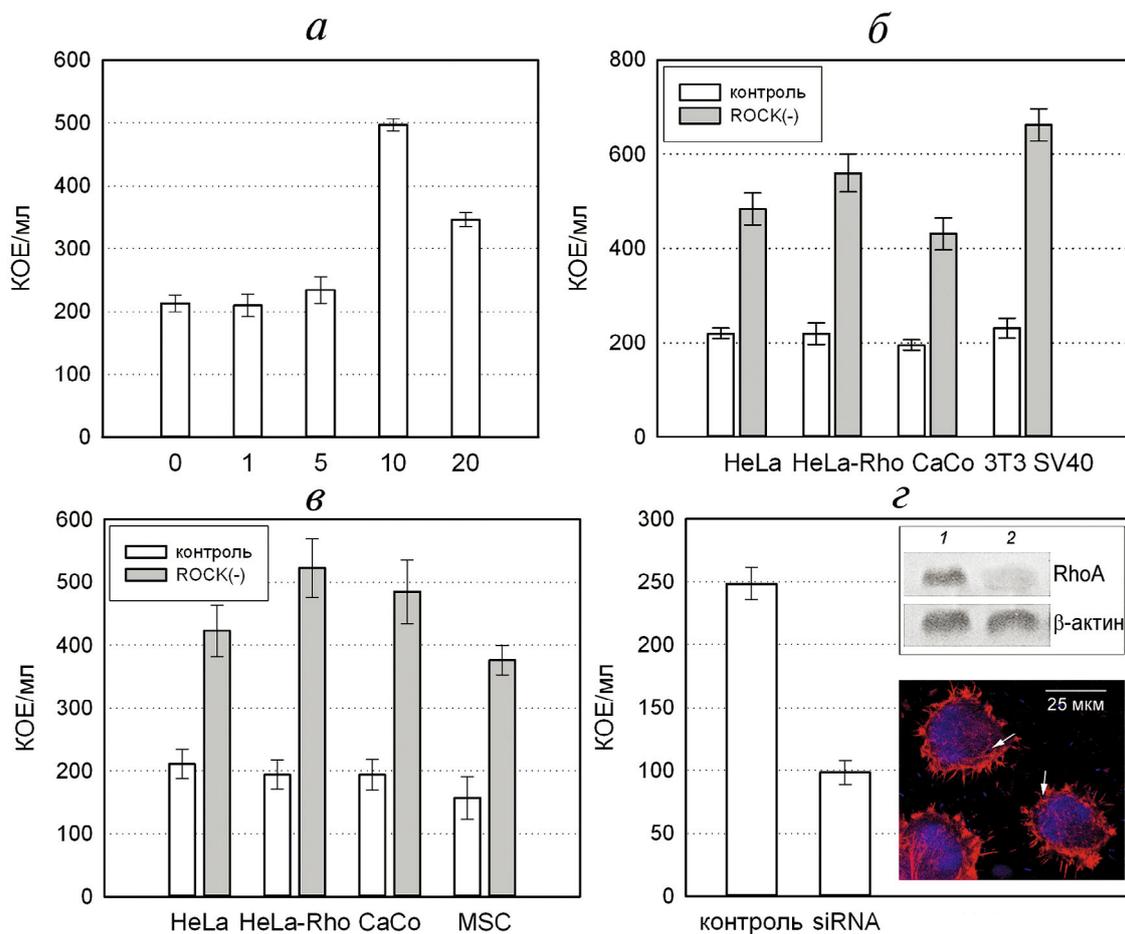


Рис. 2. Количественная оценка влияния ингибирования ROCK киназы на чувствительность клеток к инвазии бактериями *S. grimesii*. *а* – Влияние концентрации ингибитора Y-27632 на инвазию бактерий *S. grimesii* в клетки M-HeLa. *б* – Влияние 10 мкМ Y-27632 на инвазию *S. grimesii* в клетки M-HeLa, HeLa-RhoA, CaCo-2 и 3T3-SV40. *в* – Влияние 10 мкМ Y-27632 на инвазию бактерий *E. coli* SCS1, трансформированных геном гримелизина, в клетки M-HeLa, HeLa-RhoA, CaCo-2 и SC5-MSC. Контроль – необработанные клетки, ROCK(-) – клетки, предварительно инкубированные с 10 мкМ Y-27632, как описано в «Методах исследования». Результаты представляют собой среднее значение КОЕ из трех независимых экспериментов. Значения выражены как среднее \pm S.D. Различия считались значительными на уровне $p < 0,05$. *г* – Влияние ингибирования RhoA на чувствительность клеток M-HeLa к инвазии бактериями *S. grimesii*. Клетки M-HeLa, выращенные на покровных стеклах, инкубировали с siRNA, направленной против RhoA, до того, как они были инфицированы *S. grimesii*. Контроль – клетки трансфицированы siRNA, содержащей случайную нуклеотидную последовательность. Представлены результаты количественной оценки влияния ингибирования siRNA на чувствительность клеток M-HeLa к бактериальной инвазии. Значения выражены как среднее \pm S.D. Различия считались значительными на уровне $p < 0,05$. На врезках показаны результаты ингибирования RhoA по данным Вестерн-блот анализа и иммунофлуоресценции. Вестерн-блот анализ (верхняя врезка) – клетки M-HeLa, необработанные (дорожка 1) или трансфицированные siRNA, направленной против RhoA (дорожка 2). β -актин служил контролем нагрузки. Иммунофлуоресцентный анализ (нижняя врезка) – клетки M-HeLa, выращенные на покровных стеклах, инкубировали с siRNA, направленной против RhoA, и инфицировали бактериями *S. grimesii*. Внутриклеточные бактерии *S. grimesii* показаны стрелками. Ф-актин окрашивали родамин-фаллоидином (красный); ядра и бактерии окрашивали DAPI (синий). С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

плазмидой, несущей ген гримелизина, фактора вирулентности *S. grimesii* [25] (рис. 2, в). Так как влияние ингибитора Y-27632 на инвазию бактерий во все исследованные клетки оказалось одинаковым, в дальнейших экспериментах были использованы только клетки линии M-HeLa.

Поскольку активность ROCK киназы зависит от RhoA [29], другим способом ингибирования ROCK киназы может быть ингибирование активности RhoA. Чтобы проверить это предположение, мы ингибировали RhoA путем предварительной инкубации клеток M-HeLa с siRNA, направленной против RhoA. Контролем служили клетки M-HeLa, трансфицированные контрольной siRNA, содержащей случайную нуклеотидную последовательность. По данным флуоресцентной микроскопии, изменения морфологии клеток M-HeLa и цитоскелета, вызванные введением siRNA, ингибирующей экспрессию RhoA, были сходны с изменениями, вызванными действием специфического ингибитора ROCK киназы Y-27632. Введение siRNA приводило к округлению клеток, разборке актинового цитоскелета в цитоплазме и образованию протрузий на периферии клеток (рис. 2, г). Однако в отличие от результатов действия Y-27632, в клетках, обработанных anti-RhoA-siRNA, количество внутриклеточных бактерий было низким (рис. 2, г). Количественная оценка этого эффекта показала, что ингибирование RhoA уменьшило инвазию бактерий *S. grimesii* в клетки M-HeLa в 2 раза (рис. 2, г), что указывает на независимое от RhoA влияние ROCK киназы на чувствительность клеток к инвазии бактериями.

Ингибирование активности Src киназы уменьшает инвазию *S. grimesii*. Аналогично эффекту, полученному в результате действия Y-27632, обработка клеток HeLa ингибитором Src киназы Src-11 (рис. 1, в) вызывала разборку актинового цитоскелета в центральной части клеток и перестройку актиновых структур на периферии. Кроме того, наблюдалась локализация бактерий на поверхности протрузий. Однако, в отличие от эффекта, вызываемого Y-27632, предварительная обработка клеток ингибитором Src-11 приводила к значительному уменьшению количества внутриклеточных бактерий (рис. 1, в). Как видно на рис. 3, а, инкубация клеток с ингибитором Src-11 уменьшала эффективность инвазии бактерий *S. grimesii* в клетки M-HeLa, HeLa-RhoA и CaCo-2 в 5–6 раз, а в клетки 3T3-SV40 – примерно в 2 раза.

Ингибирование инвазии наблюдалось и тогда, когда клетки предварительно инкубировали со смесью ингибиторов Y-27632 и Src-11, а затем инфицировали бактериями (рис. 3, б). Совместное действие двух ингибиторов было лишь не-

сколько меньше, чем действие Src-11. Эти результаты указывают на то, что при ингибировании Src киназы Y-27632-зависимое ингибирование ROCK практически не увеличивает уровень инвазии. Эти данные могут быть полезны в экспериментах, направленных на понимание механизма активации инвазии бактерий *S. grimesii* ингибитором Y-27632.

Ингибирование активности ROCK и Src по-разному влияет на экспрессию и накопление E-кадгерина. Увеличение инвазии *S. grimesii* в клетки

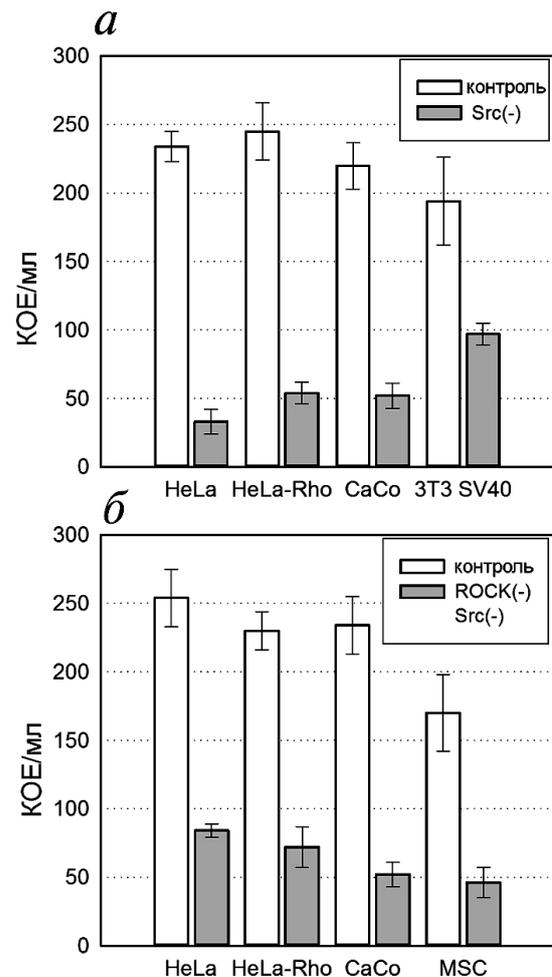


Рис. 3. Количественная оценка влияния ингибирования Src киназы и Src/ROCK киназ на чувствительность клеток к инвазии бактериями *S. grimesii*. а – Клетки инкубировали с 10 мкМ Src-11 до того, как они были инфицированы *S. grimesii*. Контроль – необработанные клетки, Src(-) – клетки, инкубированные с 10 мкМ Src-11 перед заражением. б – Клетки инкубировали с Y-27632 и Src(-) ингибитором до того, как они были инфицированы *S. grimesii*. Контроль – необработанные клетки, ROCK(-), Src(-) – клетки, инкубированные со смесью 10 мкМ Src-11 и 10 мкМ Y-27632 до заражения. Результаты представляют собой среднее значение КОЕ из трех независимых экспериментов. Значения выражены как среднее \pm S.D. Различия считались значительными на уровне $p < 0,05$

HeLa и CaCo-2 коррелирует с повышенной экспрессией E-кадгерина [21, 22]. С другой стороны, недавние исследования показали, что как активация ROCK [30, 31], так и ее ингибирование [32] могут вызывать значительные изменения в экспрессии генов. Показано также, что повышенная экспрессия и/или повышенная активность Src [33], а также ингибирование Src [34] вызывают изменения в экспрессии многочисленных генов. Поэтому мы использовали полуколичественный ОТ-ПЦР и Вестерн-блоттинг, чтобы выяснить, может ли обработка клеток M-HeLa ингибиторами Y-27632 или Src-11 влиять на экспрессию E-кадгерина. Изменение экспрессии E-кадгерина наблюдали через 4 ч после обработки клеток ингибиторами. На рис. 4, а показано, что инкубация клеток M-HeLa с 10 мкМ Y-27632 в течение 30 мин приводила к ~5-кратному увеличению экспрессии гена E-кадгерина. Напротив, аналогичная инкубация клеток M-HeLa с 10 мкМ Src-11 уменьшала экспрессию гена E-кадгерина примерно в 5 раз (рис. 4, а). В соответствии с этими результатами, вестерн-блоттинг показал увеличение и уменьшение количества E-кадгерина, вызванное ингибиторами Y-27632 и Src-11 соответственно (рис. 4, б). Эти результаты хорошо коррелируют с приведенными выше данными о влиянии ингибирования Y-27632 и Src-11 на инвазию *S. grimesii*. Для того, чтобы определить влияние введения анти-RhoA-siRNA на уровень экспрессии и количество E-кадгерина, необходимы дополнительные эксперименты, так

как известно, что это влияние зависит от множества клеточных факторов, в том числе, типа клеток и состояния цитоскелета [35–37].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Инвазия эукариотических клеток условно-патогенными бактериями активируется контактом поверхностных белков бактерий с рецепторами клетки-хозяина, такими как E-кадгерин, интегрин или рецептор эпидермального фактора роста [10, 12, 13, 16]. Изучая инвазию условно-патогенных бактерий *S. grimesii* в эукариотические клетки, мы показали, что индуцированное N-ацетилцистеином увеличение чувствительности этих клеток к инвазии коррелирует с увеличением экспрессии E-кадгерина [20, 21]. Кроме того, была обнаружена колокализация *S. grimesii* с E-кадгерином клеток 3T3 и 3T3-SV40, что указывает на возможное участие E-кадгерина в инвазии *S. grimesii* в эукариотические клетки [38]. Результаты настоящей работы подтверждают это предположение, показывая, что ингибирование ROCK- или Src-ассоциированных сигнальных путей сильно влияет на чувствительность клетки-хозяина к проникновению *S. grimesii*, и эти эффекты коррелируют с соответствующими изменениями экспрессии E-кадгерина. При этом ингибирование Src подавляло как инвазию, так и экспрессию E-кадгерина, тогда как ингибирование ROCK усиливало как инвазию, так и

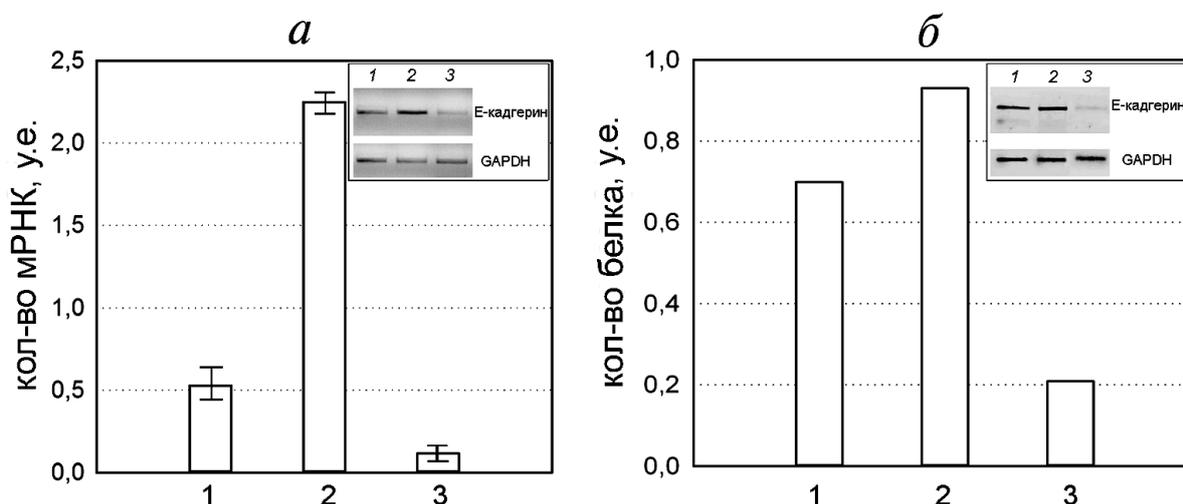


Рис. 4. Влияние ингибирования ROCK киназы и Src киназы на экспрессию и накопление E-кадгерина. Уровень экспрессии E-кадгерина определяли полуколичественной ОТ-ПЦР (а) и тестировали с помощью Вестерн-блот анализа (б). 1 – Контроль (необработанные клетки M-HeLa), 2 – клетки M-HeLa обрабатывали 10 мкМ Y-27632, 3 – клетки M-HeLa обрабатывали 10 мкМ Src-11. Изменение экспрессии E-кадгерина наблюдали через 4 ч, после обработки клеток ингибиторами. Результаты ПЦР-анализа представляют собой среднее значение из трех независимых экспериментов. Значения выражены как среднее \pm S.D. Различия считались значительными на уровне $p < 0,05$. На врезках представлены данные ОТ-ПЦР электрофореза (а) и Вестерн-блот анализа (б), GAPDH служил в качестве внутреннего контроля

экспрессию E-кадгерина. Эти изменения были одинаковыми для всех исследованных клеток, а также для двух видов бактерий, *S. grimesii* и рекомбинантных *E. coli* SCS1, использованных в наших экспериментах.

Контакт бактерий с рецептором клеточной поверхности инициирует процесс интернализации бактерий, включающий активацию сигнальных каскадов и перестройки цитоскелета. Src-киназа является одним из ключевых регуляторов этого процесса. Показано, что при интернализации *Listeria monocytogenes*, индуцированной взаимодействием интерналина InlA с E-кадгеринем, Src киназа фосфорилирует кортактин, который необходим для активации комплекса Arp2/3 и полимеризации актина [39]. Интернализация листерии включает также Src-опосредованное фосфорилирование тирозиновых остатков E-кадгерина [40]. Показано также, что протеинкиназы Src семейства участвуют в опосредованной интегрином интернализации *Staphylococcus aureus* [12], *Yersinia pseudotuberculosis* [13] и уропатогенной *Escherichia coli* [41]. Активация Src протеинкиназы была также выявлена при инвазии *Escherichia coli* K1 в клетки микрососудистого эндотелия мозга человека, которая сопровождалась перестройками цитоскелета. Как инвазия *E. coli*, так и индуцированная *E. coli* перестройка актиновых филаментов блокировались ингибиторами Src [42]. Исходя из этих данных, мы предполагаем, что Src киназа не только влияет на экспрессию гена E-кадгерина, но и участвует в регуляции перестроек цитоскелета, необходимых для интернализации *S. grimesii*. Таким же образом ингибирование инвазии *S. grimesii*, вызванное введением в клетки анти-RhoA-siRNA, может быть связано с отсутствием RhoA-зависимых перестроек цитоскелета. Поскольку RhoA является активатором ROCK киназы [29], уменьшение инвазии бактерий *S. grimesii* после введения в клетки анти-RhoA-siRNA, можно также объяснить тем, что при ингибировании синтеза RhoA ROCK киназа не активируется.

С другой стороны, увеличение инвазии *S. grimesii* в результате обработки клеток ингибитором ROCK Y27632 оказалось весьма неожиданным. ROCK играет важную роль в регуляции перестроек актомиозинового цитоскелета, активированных RhoA, таких как образование стресс-фибрилл, подвижность клеток, сокращение и адгезия [43, 44], и ингибирование ROCK часто приводит к ингибированию бактериальной инвазии [45, 46]. Вместе с тем, показано, что инги-

бирование активности ROCK с помощью Y-27632 увеличивало вирулентность *Listeria monocytogenes* при инвазии этих бактерий в мышинные фибробласты и гепатоциты [23] и усиление инвазии *Yersinia enterocolitica* в клетки HeLa [47]. При этом Y-27632-зависимое ингибирование ROCK увеличивало никотин-зависимую инвазию *E. coli* K1 в клетки микрососудистого эндотелия мозга человека, по-видимому, в результате перестроек актинового цитоскелета и морфологических изменений, индуцированных никотин-зависимым активированием PI3 киназы [45]. Предполагается, что ингибирование ROCK увеличивало интернализацию *Yersinia*, способствуя повышению активности Rac1 [47]. Было также показано влияние ингибирования ROCK на увеличение экспрессии кадгерина и некоторых специфических компонентов адгезии и подвижности нормальных и раковых клеток [31, 48, 49]. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, участвуют ли эти или другие компоненты сигнальных путей в увеличении эффективности инвазии *S. grimesii* в ответ на ингибирование ROCK киназы с помощью Y-27632.

Таким образом, проведенный нами ингибиторный анализ выявил участие протеинкиназы Src и ROCK в проникновении условно-патогенных бактерий *Serratia grimesii* в эукариотические клетки. Результаты нашей работы показали, что ингибирование Src киназы с помощью Src-I1 приводит к уменьшению инвазии бактерий и экспрессии E-кадгерина. Инвазия бактерий уменьшалась также при ингибировании синтеза RhoA, активатора ROCK киназы, с помощью анти-RhoA-siRNA. Напротив, ингибирование ROCK киназы с помощью Y-27632 усиливало инвазию и экспрессию E-кадгерина. Полученные результаты указывают на то, что в инвазии *S. grimesii* наряду с Src- и ROCK-опосредованными сигнальными путями участвуют компоненты других сигнальных путей, активность которых, по-видимому, увеличивается при Y-27632-зависимом ингибировании ROCK киназы.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-00558).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием животных или участием людей в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ham, H., Sreelatha, A., and Orth, K. (2011) Manipulation of host membranes by bacterial effectors, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 635–646, doi: 10.1038/nrmicro2602.
2. Bhavsar, P.A., Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2007) Manipulation of host–cell pathways by bacterial pathogens, *Nature*, **449**, 827–834, doi: 10.1038/nature06247.
3. Carabeo, R. (2011) Bacterial subversion of host actin dynamics at the plasma membrane, *Cell. Microbiol.*, **13**, 1460–1469, doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01651.x.
4. Personic, N., Barlocher, K., Finsel, I., and Hilbi, H. (2016) Subversion of retrograde trafficking by translocated pathogen effectors, *Trends Microbiol.*, **24**, 450–462, doi: 10.1016/j.tim.2016.02.003.
5. Weber, M.M., and Faris, R. (2018) Subversion of the endocytic and secretory pathways by bacterial effector proteins, *Front. Cell Dev. Biol.*, **6**, 1–17, doi: 10.3389/fcell.2018.00001.
6. Rosenshine, I., and Finlay, B.B. (1993) Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria, *BioEssays*, **15**, 17–24, doi: 10.1002/bies.950150104.
7. Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens, *Science*, **304**, 242–248, doi: 10.1126/science.1090124.
8. Boumart, Z., Velge, P., and Wiedemann, A. (2014) Multiple invasion mechanisms and different intracellular behaviors: a new vision of *Salmonella*–host cell interaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, **361**, 1–7, doi: 10.1111/1574-6968.12614.
9. Mattock, E., and 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.
10. Bonazzi, M., Lecuit, M., and Cossart, P. (2009) *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis, *Cell. Microbiol.*, **11**, 693–702, doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01293.x.
11. Ribet, D., and Cossart, P. (2015) How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues, *Microb. Infect.*, **17**, 173–183, doi: 10.1016/j.micinf.2015.01.004.
12. Agerer, F., Antje, M., Ohlsen, K., and Hauck, C.R. (2003) Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases, *J. Biol. Chem.*, **278**, 42524–42531, doi: 10.1074/jbc.M302096200.
13. Eitel, J., Heise, T., Thiesen, U., and Dersch, P. (2005) Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YdaA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors, *Cell. Microbiol.*, **7**, 63–77, doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00434.x.
14. Scibelli, A., Roperto, S., Manna, L., Pavone, L.M., Tafuri, S., Della Morte, R., and Staiano, N. (2007) Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens, *Veter. J.*, **173**, 482–491, doi: 10.1016/j.tvjl.2006.01.010.
15. Wiedemann, A., Mijouin, L., Ayoub, M.A., Barilleau, E., Canepa, S., Teixeira-Gomes, A.P., Le Vern, Y., Rosselin, M., Reiter, E., and Velge, P. (2016) Identification of the epidermal growth factor receptor as the receptor for *Salmonella* Rck-dependent invasion, *FASEB J.*, **304**, 4180–4191, doi: 10.1096/fj.201600701R.
16. Mambu, J., Virlogeux-Payant, I., Holbert, S., Grepinet, O., Velge, P., and Wiedemann, A. (2017) An updated view on the Rck invasion of *Salmonella*: still much to discover, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 500, doi: 10.3389/fcimb.2017.00500.
17. Grimont, F., and Grimont, P.A.D. (2006) The genus *Serratia*, *Prokaryotes*, **6**, 219–244, doi: 10.1007/0-387-30746-x_11.
18. Mahlen, S.D. (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice, *Clin. Microbiol. Rev.*, **24**, 755–791, doi: 10.1128/CMR.00017-11.
19. Bozhokina, E.S., Tsaplina, O.A., Efremova, T.N., Kever, L.V., Demidyuk, I.V., Kostrov, S.V., Adam, T., Komissarchik, Y.Y., and Khaitlina, S.Y. (2011) Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimeysin and protealysin, *Cell Biol. Int.*, **35**, 111–118, doi: 10.1042/CBI20100314.
20. Bozhokina, E., Vakhromova, E., Gamaley, I., and Khaitlina, S. (2013) N-acetylcysteine increases susceptibility of HeLa cells to bacterial invasion, *J. Cell. Biochem.*, **114**, 1568–1574, doi: 10.1002/jcb.24498.
21. Bozhokina, E., Khaitlina, S., and Gamaley, I. (2015) Dihydroliipoic but not alpha-lipoic acid affects susceptibility of eukaryotic cells to bacterial invasion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **460**, 697–702, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.092.
22. Parasassi, T., Brunelli, R., Bracci-Laudiero, L., Greco, G., Gustafsson, A.C., Krasnowska, E.K., Lundeberg, J., Lundeberg, T., Pittaluga, E., Romano, M.C., and Serafino, A. (2005) Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms, *Cell Death Differ.*, **12**, 1285–1296, doi: 10.1038/sj.cdd.4401663.
23. Kirchner, M., and Higgins, D.E. (2008) Inhibition of ROCK activity allows InlF-mediated invasion and increased virulence of *Listeria monocytogenes*, *Mol. Microbiol.*, **68**, 749–767, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06188.x.
24. Krasnowska, E.K., Pittaluga, E., Brunati, A.M., Brunelli, R., Costa, G., De Spirito, M., Serafino, A., Ursini, F., and Parasassi, T. (2008) N-acetyl-L-cysteine fosters inactivation and transfer to endolysosomes of c-Src, *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 1566–1572, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.012.
25. Bozhokina, E., Khaitlina, S., and Adam, T. (2008) Grimelysin, a novel metalloprotease from *Serratia grimesii*, is similar to ECP32, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 888–892, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.003.
26. Prouty, A.M., and Gunn, J.S. (2000) *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile, *Infect. Immun.*, **68**, 6763–6769.
27. Svoboda, K.K.H., Moessner, P., Field, T., and Acevedo, J. (2004) ROCK inhibitor (Y27632) increases apoptosis and disrupts the actin cortical mat in embryonic avian corneal epithelium, *Dev. Dyn.*, **229**, 579–590, doi: 10.1002/dvdy.20008.
28. Heng, B.C. (2009) Effect of Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 on the post-thaw viability of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Tissue Cell*, **41**, 376–380, doi: 10.1016/j.tice.2009.01.004.
29. Riento, K., and Ridley, A.J. (2003) ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 446–456, doi: 10.1038/nrm1128.
30. Rajakyla, E.K., and Vartiainen, M.K. (2014) Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression, *Small GTPases*, **5**, e27539, doi: 10.4161/sgtp.27539.
31. Rath, N., Morton, J.P., Julian, L., Helbig, L., Kadir, S., McGhee, E.J., Anderson, K.I., Kalna, G., Mullin, M., Pinho, A.V., Rooman, I., Samuel, M.S., and Olson, M.F. (2017) ROCK signaling promotes collagen remodeling to facilitate invasive pancreatic ductal adenocarcinoma tumor cell growth, *EMBO Mol. Med.*, **9**, 198–218, doi: 10.15252/emmm.201606743.
32. Piltti, J., Bygdell, J., Fernandez-Echevarria, C., and Marcellino, D. (2017) Rho-kinase inhibitor Y-27632 and hypoxia synergistically enhance chondrocytic phenotype and modify S100 protein profiles in human chondrosarcoma cells, *Sci. Rep.*, **7**, 3708, doi: 10.1038/s41598-017-03958-5.

33. Yeatman, T.J. (2010) A renaissance for Src, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 470–480, doi: 10.1038/nrc1366.
34. Kruewel, T., Schenone, S., Radi, M., Maga, G., Rohrbach, A., Botta, M., and Borlak, J. (2010) Molecular characterization of c-Abl/c-Src kinase inhibitors targeted against murine tumour progenitor cells that express stem cell markers, *PLoS One*, **5**, e14143, doi: 10.1371/journal.pone.0014143.
35. Chang, Y.W., Marlin, J.W., Chance, T.W., and Jakobi R. (2006) RhoA mediates cyclooxygenase-2 signaling to disrupt the formation of adherens junctions and increase cell motility, *Cancer Res.*, **66**, 11700–11708, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1818.
36. Shankar, J., and Nabi, I.R. (2015) Actin cytoskeleton regulation of epithelial mesenchymal transition in metastatic cancer cells, *PLoS One*, **10**, e0119954, doi: 10.1371/journal.pone.0119954.
37. Lee, G., Kim H.J., and Kim, H.-M. (2016) RhoA-JNK regulates the E-cadherin junctions of human gingival epithelial cells, *J. Dent. Res.*, **95**, 284–291, doi: 10.1177/0022034515619375.
38. Ivlev, A.P., Efremova, T.N., Khaitlina, S.Yu., and Bozhokina, E.S. (2018) Difference in susceptibility of 3T3 and 3T3-SV40 cells to invasion by opportunistic pathogens *Serratia grimesii*, *Cell Tissue Biol.*, **12**, 33–40.
39. Sousa, S., Cabanes, D., Bougneres, L., Lecuit, M., Sansonetti, P., Tran-Van-Nhieu, G., and Cossart, P. (2007) Src, cortactin and Arp2/3 complex are required for E-cadherin-mediated internalization of *Listeria* into cells, *Cell. Microbiol.*, **9**, 2629–2643, doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00984.x.
40. Bonazzi, M., Veiga, E., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2008) Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*, *Cell. Microbiol.*, **10**, 2208–2222, doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01200.x.
41. Eto, D.S., Jones, T.A., Sundsbak, J.L., and Mulvey, M.A. (2007) Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*, *PLoS Pathog.*, **3**, e100, doi: 10.1371/journal.ppat.0030100.
42. Liu, W., Zhao, W.D., Yan, J.C., Ren, Z.Y., Fang, W.G., Zhu, L., Shang, D.S., and Chen, Y.H. (2010) Involvement of Src tyrosine kinase in *Escherichia coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells, *FEBS Lett.*, **584**, 27–32, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.090.
43. Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K. (2010) Rho-Kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity, *Cytoskeleton*, **67**, 545–554, doi: 10.1002/cm.20472.
44. Julian, L., and Olson, M.F. (2014) Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK), *Small GTPases*, **5**, e29846, doi: 10.4161/sgtp.29846.
45. Chen, Y.H., Chen, S.H., Jong, A., Zhou, Z.Y., Li, W., Suzuki, K., and Huang, S.H. (2002) Enhanced *Escherichia coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells is associated with alternations in cytoskeleton induced by nicotine, *Cell. Microbiol.*, **4**, 503–514, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.090.
46. Soong, G., Martin, F.J., Chun, J., Cohen, T., Ahn, D.S., and Prince, A. (2011) *Staphylococcus aureus* protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity, *J. Biol. Chem.*, **286**, 35891–35898, doi: 10.1074/jbc.M111.295386.
47. Wolke, S., Ackermann, N., and Heesemann, J. (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**, 1339–1357, doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01623.x.
48. Wang, L., Xue, L., Yan, H., Li, J., and Lu, Y. (2010) Effects of ROCK inhibitor, Y-27632, on adhesion and mobility in esophageal squamous cell cancer cells, *Mol. Biol. Rep.*, **37**, 1971–1977, doi: 10.1007/s11033-009-9645-9.
49. Fu, P., Tang, R., Yu, Z., Li, C., Chen, X., Xie, M., Wang, W., and Luo, X. (2016) Rho-associated kinase inhibitors promote microglial uptake via the ERK signaling pathway, *Neurosci. Bull.*, **32**, 83–91, doi: 10.1007/s12264-016-0013-1.

THE OPPOSITE EFFECTS OF ROCK AND Src KINASE INHIBITORS ON SUSCEPTIBILITY OF EUKARYOTIC CELLS TO INVASION BY BACTERIA *Serratia grimesii*

E. S. Bozhokina, O. A. Tsaplina, and S. Yu. Khaitlina*

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St. Petersburg, Russia;
E-mail: skhspb@gmail.com*

Received September 20, 2018
Revised November 22, 2018
Accepted November 22, 2018

Internalization of bacteria into eukaryotic cells is determined by a sophisticated interaction of bacterial and host cell factors. Being a part of cell environment, opportunistic intracellular bacteria developed various mechanisms to interact with cell surface receptors such as E-cadherin, integrins or the epidermal growth factor receptor, to activate components of signaling pathways of eukaryotic cells and promote their own uptake, survival, and intracellular replication. Studying the mechanisms that promote penetration of opportunistic bacteria *Serratia grimesii* into cultured eukaryotic cells, we have previously shown that pre-treatment of cells with N-acetylcysteine (NAC) increases *Serratia* invasion, and this effect correlates with an increased E-cadherin expression. As NAC is known to regulate both ROCK kinase and Src kinase expression, the aim of our work was to reveal participation of these signaling components in *S. grimesii* invasion. Here we demonstrate that Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated protein kinase (ROCK), significantly enhanced invasion of cultured eukaryotic cells by opportunistic bacteria *S. grimesii*. On the other hand, invasion of the same cells by *S. grimesii* was inhibited with siRNA directed against RhoA or with the Src kinase inhibitor Src-11. The inhibitor effects correlated with the corresponding changes in expression of E-cadherin gene, up-regulated by the ROCK inhibition and down-regulated by the Src inhibition. These results demonstrate participation of Src and ROCK protein kinases in invasion of eukaryotic cells by opportunistic pathogen *S. grimesii* and suggest that additional signaling pathways are involved in the *S. grimesii* uptake. Activity of these pathways appears to be increasing with the Y-27632-dependent inhibition of ROCK kinase.

Keywords: bacterial invasion, ROCK kinase, Src kinase, RhoA, *Serratia grimesii*