

Joanna Kwiecińska-Piróg<sup>1\*</sup>, Małgorzata Prażyńska<sup>1</sup>, Adrian Reśliński<sup>1, 2</sup>,  
Eugenia Gospodarek<sup>1</sup>, Wojciech Szczęsny<sup>2</sup>, Stanisław Dąbrowiecki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w lipcu 2008 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka zakażenia *Shigella* sp. 3. Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na śmierć komórki. 3.1. Działanie apoptotyczne. 3.2. Hamowanie apoptozy przez pałeczki *Shigella* sp. 3.3. Wpływ *Shigella* sp. na autofagię. 3.4. Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na nieprogramowaną śmierć komórki. 3.4.1 Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na onkozę. 3.4.2. Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na nekrozę. 4. Podsumowanie

### The effect of *Shigella* sp. rods on eukaryotic cell death

**Abstract:** Cell death plays an important role in the development and homeostasis of multicellular organisms. The identified mechanisms of cell death can be divided into two types: programmed and non-programmed. Programmed cell death includes apoptosis and autophagy. The second type is represented by necrosis and oncosis.

Apoptosis is a form of cell death under genetic control. Membrane blebbing, nuclear condensation and DNA fragmentation are characteristic features of apoptosis. During apoptosis there is an activation of caspases such as caspase-3. Autophagy is a normal physiological process involved in routine turnover of cell constituents. It is characterized by formation of many large autophagic vacuoles. Primary proteases are cathepsins or proteosomal proteins. Necrosis is a form of uncontrolled cell death. It is accompanied by loss of ATP and swelling of cell membrane and organelles. In contrast to apoptosis and autophagy, necrosis causes an inflammatory response. Oncosis can be defined as cell death accompanied by cellular swelling, organelle swelling, blebbing and increased membrane permeability. The mechanism of oncosis is based on disfunction of the ionic pumps of the plasma membrane. It is usually caused by ischemia and toxic agents that interfere with ATP generation.

There is much evidence that bacterial pathogens modulate host cell death pathways. One group of bacteria that can induce or inhibit cell death are *Shigella* sp. rods. These bacteria are etiological agents of bacterial dysentery. Research has demonstrated that modulation of the host cell death pathways is an integral part of pathogenesis of this disease.

The effect of *Shigella* sp. rods on the death of the of infected cells is not fully understood. Further studies are necessary to help prevent and treat bacterial dysentery.

1. Introduction. 2. Characteristics of *Shigella* sp. infection 3. Impact of *Shigella* sp. rods on cell death 3.1. Apoptotic action. 3.2. Inhibition of apoptosis by *Shigella* sp. rods. 3.3. Effect of *Shigella* sp. on autophagy. 3.4. Effect of *Shigella* sp. rods on non-programmed cell death. 3.4.1. Impact of *Shigella* sp. rods on oncosis. 3.4.2. Effect of *Shigella* sp. rods on necrosis. 4. Summary.

**Słowa kluczowe:** śmierć komórki, apoptoza, pałeczki *Shigella* sp.

**Key words:** cell death, apoptosis, *Shigella* sp. rods

## 1. Wstęp

Śmierć komórkowa jest procesem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania każdej komórki eukariotycznej. Może przebiegać w sposób programowany, na drodze apoptozy lub autofagii, lub w sposób niezależny od czynników regulujących, jako nekroza, onkoza lub katastrofa mitotyczna [24, 47].

Apoptoza, zwana inaczej programowaną śmiercią komórki (*programmed cell death*, PCD) to, w przeciwieństwie do nekrozy i onkozy, aktywny, precyzyjnie regulowany proces fizjologicznej śmierci. Pełni kluczową funkcję w ontogenezie, utrzymywaniu home-

ostazy tkankowej i narządowej oraz eliminacji komórek nieprawidłowych. Zmiany morfologiczne i biochemiczne powstające w apoptotycznych komórkach ssaków to przede wszystkim: pofałdowanie błony komórkowej, eksternalizacja fosfatydyloseryny (*phosphatidyloserine*, PS), kondensacja i marginacja chromatyny, fragmentacja DNA na odcinki 180–200 pz, tworzenie ciałek apoptotycznych [23, 34].

W procesie apoptozy wyróżnia się dwa główne etapy: indukcji oraz egzekucji. W pierwszym z nich dochodzi do zapoczątkowania PCD na jednym z dwóch głównych szlaków, zewnątrzpo pochodnym, inaczej receptorowym, lub wewnątrzpo pochodnym – mitochondrialnym

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; tel. (48 22) 585 44 80; e-mail: kizmikrob@cm.umk.pl

[1, 17]. Niezależnie od drogi inicjacji apoptozy, jej głównymi wykonawcami są proteazy cysteinowe, zwane kaspazami, występujące w cytoplazmie komórek jako nieaktywne prokaspazy [20, 51].

Autofagia, będąc alternatywną w stosunku do apoptozy drogą prowadzącą do śmierci komórkowej, została nazwana programowaną śmiercią komórki typu II (PCD typu II). Jest ewolucyjnie konserwatywnym procesem, występującym we wszystkich komórkach eukariotycznych. Znana jest przede wszystkim jako wewnątrzkomórkowy system degradacji wielko-cząsteczkowych składników cytoplazmy, szczególnie białek o długim okresie półtrwania.

Wykazano, że autofagia odgrywa istotną rolę w: utrzymaniu homeostazy wewnątrzkomórkowej [22, 32], adaptacji do warunków stresowych, np. głodu komórkowego, hipoksji [3], fizjologicznych procesach rozwojowych (sporulacja u drożdży, rozwój poczwarki *Drosophila melanogaster*) [57], obronie przeciwdrobnoustrojowej [38].

Wyróżnia się trzy główne rodzaje autofagii: makroautofagię, mikroautofagię i autofagię z udziałem chaperonów, czyli białek opiekuńczych. W przebiegu makroautofagii składniki cytoplazmy przeznaczone do degradacji zostają otoczone podwójną błoną izolującą w kształcie litery „C”, która ulega wydłużaniu i zamknięciu tworząc autofagosom. Autofagosomy łączą się z lizosomami tworząc autofagolizosomy, gdzie zachodzi degradacja ich zawartości pod wpływem hydrolaz lizosomalnych. Podczas mikroautofagii składniki cytoplazmy ulegają bezpośrednio inkorporacji w wyniku inwaginacji błony lizosomalnej. Trzeci rodzaj autofagii polega na selektywnym rozpoznawaniu białek przez cytosolowy chaperon [22, 26].

W procesie makroautofagii mogą być degradowane całe organella komórkowe, takie jak: mitochondria, rybosomy, peroksosomy czy fragmenty siateczki śródplazmatycznej [2, 57].

Mechanizmem nieprogramowanej śmierci komórki niepodlegającym kontroli genetycznej jest nekroza [24]. Badacze sugerują jednak, że w proces nekrozy zaangażowane są liczne czynniki, wpływające na jej przebieg [36]. Według niektórych definicji zmiany o charakterze nekrozy zachodzą w komórce już uśmierconej [23], więc nekroza stanowi kontynuację apoptozy lub onkozy, w wyniku których komórka nie uległa całkowitemu zniszczeniu. Stanowi w tym przypadku proces wtórny do apoptozy lub onkozy, kończący się wywołaniem reakcji zapalnej [45].

Inne definicje sugerują, że nekroza, obok apoptozy i śmierci lizosomalnej, jest trzecim typem śmierci komórki [22, 58, 59], do której dochodzi w wyniku zadziałania czynników termicznych czy toksycznych dla komórki, przekraczających próg wrażliwości danej komórki [59].

Nekroza występuje fizjologicznie w komórkach wielu organizmów, np. w trakcie embriogenezy czy oogenezy. Stwierdzono jej ogromne znaczenie w przebiegu wielu procesów patologicznych, między innymi w cukrzycy, reakcjach zapalnych, chorobach układu nerwowego [36].

Innym rodzajem nieprogramowanej śmierci komórki eukariotycznej jest onkoza, w inicjacji której zasadniczą rolę odgrywają mitochondria [23]. Odróżnienie onkozy od nekrozy budzi pewne kontrowersje. W piśmiennictwie oba terminy często są używane zamiennie.

Istnieją liczne dowody świadczące o wpływie bakterii na mechanizmy śmierci zakażonych komórek gospodarza. Dzięki tej strategii działania są w stanie uzyskać korzystne warunki dla swego rozwoju. Jednym z takich drobnoustrojów jest *Shigella* sp., czynnik etiologiczny czerwonki bakteryjnej [39, 41].

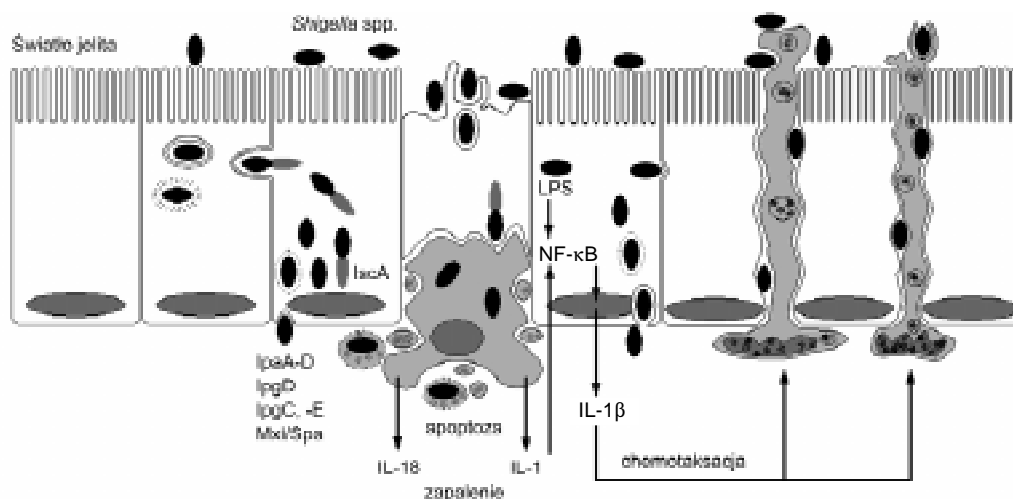
## 2. Charakterystyka zakażenia *Shigella* sp.

Wysoce zakaźne pałeczki *Shigella* sp. wywołują swoiste zakażenie jelit, określane mianem czerwonki bakteryjnej (gr. *dysenteria*). Rodzaj obejmuje cztery gatunki: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* i *S. sonnei*, stanowiące jednocześnie grupy serologiczne, odpowiednio A, B, C i D.

Czerwonka bakteryjna może dotyczyć ludzi w każdym wieku, lecz najczęściej jej ofiarami są dzieci poniżej 5-go roku życia. Zakażenie szerzy się z człowieka na człowieka drogą fekalno-oralną. Objawami dysenterii są: gorączka, skurcze jelit oraz śluzowopropne, krwawe stolce [39, 41].

Podstawą patogenności pałeczek *Shigella* sp. jest zdolność do kolonizacji i inwazji komórek nabłonka jelitowego. Zakażenie jest procesem wieloetapowym, rozpoczynającym się adhezją bakterii do komórek docelowych gospodarza. W dalszych etapach dochodzi do inwazji enterocytów i rozwoju procesu zapalnego [41].

Większość genów, kodujących czynniki wirulencji warunkujących kolonizację i inwazję, zlokalizowanych jest na dużym plazmidzie (220 kpz), zwanym plazmidem wirulencji [41, 55]. Geny wirulencji zgrupowane są w funkcjonalne zespoły. Na fragmencie plazmidowego DNA (30 kpz), zwanym regionem wejścia, znajdują się geny kodujące białka odpowiedzialne za adhezję i inwazję (*invasion plasmid antigens/genes*, Ipa, Ipg) – IpaA-D i IpgD, białka opiekuńcze IpgC i IpgE, wiążące i pilotujące odpowiednio IpaB i IpaC oraz IpgD, a także geny *mxi* i *spa*, kodujące aparat sekrecji typu III, wydzielający wyżej wymienione białka do komórek docelowych gospodarza. Na sąsiednim fragmencie plazmidu zlokalizowane są



Rys. 1. Inwazja nabłonka jelitowego przez *Shigella* sp. Objasnienia w tekście

geny kodujące czynniki odpowiedzialne za międzykomórkowe rozprzestrzenianie się bakterii (*intra/intercellular spread*, IcsA/VirG, IcsB).

Pałeczki *Shigella* sp. nie dokonują bezpośrednio inwazji enterocytów. Pokonują śluzówkę jelita poprzez komórki M (*Microfolds cells*) [43]. Bakterie przylegają najpierw do komórek M, a następnie indukują własną fagocytozę (rys. 1). Czynniki kluczowe dla wniknięcia patogenu do komórki gospodarza są transportowane do komórki docelowej przez system sekrecji typu III (*type three secretion system*, TTSS) [40]. Białka IpaB i IpaC wprowadzone do eukariotycznej błony komórkowej gospodarza pełnią dwie funkcje. Tworzą kanał, przez który przechodzą białka bakteryjne do cytozolu komórki eukariotycznej oraz indukują w komórce kaskadę sygnałów prowadzących do rearanżacji jej cytoszkieletu. Dochodzi do formowania dynamicznych wypustek cytoplazmatycznych zamykających się wokół fagocytywanego patogenu. Pochłonięta komórka bakteryjna zostaje zamknięta w fagosomie połączonym z błoną komórkową. Pałeczki *Shigella* sp. szybko prowadzą do lizy błony fagosomalnej. Po uwolnieniu do cytoplazmy namnażają się i uruchamiają mechanizm polegający na wykorzystaniu polimeryzacji aktyny do przemieszczania się w cytozolu komórki gospodarza. Komórki bakteryjne zostają otoczone filamentami aktynowymi, tworzącymi na jednym z biegunów komórki strukturę przypominającą ogon komety. Komórka jest popychana przez przyrastające filanty. Elementami koniecznymi do polimeryzacji aktyny jest białko błony zewnętrznej IcsA oraz białko gospodarza, między innymi winkulina, białko neuronalne związane z zespołem Wiskotta-Aldricha (N-WASP) oraz kompleks Arp2/3 [4, 40]. Bakteria wyposażona w ogon aktynowy przemieszcza się w cytozolu, a gdy napotka błonę komórkową tworzy uwypuklenie penetrujące do sąsiedniej komórki

i ostatecznie opłaszczające patogen. Po lizie podwójnej błony fagosomalnej dochodzi do kolejnego cyklu namnażania. Mechanizm ten umożliwia bakteriom przemieszczanie się bezpośrednio z zakażonej komórki do sąsiedniej, bez fazy pozakomórkowej, unikając tym samym działania reakcji obronnych gospodarza [41].

W następstwie międzykomórkowego rozprzestrzeniania się bakterii, w kolejnych etapach zakażenia dochodzi do zapalenia blaszki właściwej i degeneracji tkanki nabłonkowej.

Pod komórkami M zlokalizowane są liczne limfocyty i makrofagi. Pałeczki *Shigella* sp. sfagocytywane przez makrofagi wywołują ich apoptozę. Z ulegających apoptotycznej śmierci makrofagów uwalniane są chemokiny takie, jak IL-18 i IL-1 $\beta$ . Śmierć makrofagów, nie tylko umożliwia patogenom przeżycie, ale także zapoczątkowuje proces zapalny, którego efektem jest zniszczenie bariery jelitowej, co z kolei ułatwia szerzenie się zakażenia [41, 63].

W enterocytach, zajmowanych kolejno przez inwazyjne *Shigella* sp., pod wpływem lipopolisacharydu (LPS) i IL-1 $\beta$ , dochodzi do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego  $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B indukuje wytwarzanie cytokin i chemokin przez enterocyty, z przewagą IL-8, o wybitnych właściwościach prozapalnych. IL-8 powoduje masywny napływ neutrofilii do miejsca zakażenia, które przechodząc na drugą stronę nabłonka jelitowego, prowadzą do zniszczenia jego zwartej struktury. Efektem działania IL-8 jest zahamowanie zakażenia na poziomie nabłonka jelitowego, lecz kosztem znacznej degeneracji tkanki gospodarza. Prowadzi to do powstawania owrzodzeń jelita grubego, a w próbkach kału chorych zakażonych stwierdza się obecność krwi i leukocytów [41, 42].

Pozajelitowa lokalizacja zakażenia o etiologii *Shigella* sp. należy do niezwykle rzadkich. W wyniku

absorpcji z jelita do krwiobieg LPS *Shigella* sp. lub toksyny Shiga (Stx), zakażenie może przybierać postać uogólnioną. Tylko szczepy *S. dysenteriae* serotyp 1 wytwarzają białkową egzotoksynę Stx, która hamuje w komórkach eukariotycznych biosyntezę białek, co prowadzi do ich śmierci. Stx jest odpowiedzialna za poważne powikłania w postaci zespołu hemolityczno-mocznicowego (*haemolytic-uraemic syndrome*, HUS), którego objawami są trombocytopenia, niedokrwistość hemolityczna i ostra niewydolność nerek [31, 52].

### 3. Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na śmierć komórki

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że pałeczki *Shigella* sp. interferują z szlakami prowadzącymi do śmierci komórki. Wykazano, że czynnik etiologiczny czerwonki bakteryjnej może wpływać zarówno na programowaną, jak i nieprogramowaną śmierć komórki (Tab. I). Zdziwiający jest także fakt, że w zależności od typu komórki zakażonej komórki bakterie z rodzaju *Shigella* indukują lub hamują śmierć komórek organizmu gospodarza.

#### 3.1. Działanie apoptotyczne

Drobnoustroje posiadają zdolność regulacji apoptozy komórek gospodarza. Apoptotyczna śmierć komórek eukariotycznych może być inicjowana czynnikami zewnątrz- lub wewnątrzpochodnymi.

Aktywacja drogi zewnątrzpochodnej polega na związaniu się ligandu zewnątrzkomórkowego z błonowymi receptorami śmierci, należącymi do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor receptor*, TNFR) [1, 23]. Cechą charakterystyczną tych receptorów jest wewnątrzkomórkowa sekwencja, zwana domeną śmierci (*death domains*, DD), do której przyłączają się białka adaptorowe TRADD (*TNFRSF1A-associated death domain*) oraz FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*). Z kolei do nich, poprzez sekwencję DED (*death effector domain*), przyłącza się prokaspaza-8, która po autokatalitycznej aktywacji wyzwala kaskadę kaspaz wykonawczych -3, -6, -7, prowadzącą do

śmierci komórki [17]. Szlak wewnątrzpochodny zostaje zainicjowany przez czynniki pochodzące z wnętrza komórki takie, jak uszkodzenia DNA, stres oksydacyjny, wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$  podwyższony poziom reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species*, ROS), zaburzenia metabolizmu komórkowego. Droga ta pozostaje pod kontrolą szeregu czynników. Należą do nich: rodzina białek Bcl-2, wśród nich proapoptotyczne (BH-3, Bax, Bak), jak i antyapoptotyczne czynniki (Bcl-2, Mcl-1), oraz białka szoku cieplnego (*heat shock proteins*, HSP), regulujące aktywność kaspaz. Kluczową rolę odgrywa białko p53, będące czynnikiem transkrypcyjnym szeregu genów uczestniczących w szlaku mitochondrialnym. Stąd szlak wewnątrzpochodny bywa nazywany szlakiem p53-zależnym [16, 17].

W wyniku zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej dochodzi do wypływu cytochromu c (cyt c). Uwolniony cyt c wraz z cytosolowym białkiem Apaf-1, ATP i prokaspazą-9 tworzą, tzw. apoptosom, w którym dochodzi do autokatalitycznej aktywacji prokaspazy-9 [5]. Z kolei kaspaza-9 aktywuje efektorowe kaspazy-3 i -7. Ponadto oprócz cyt c z mitochondrium może zostać uwolnionych szereg innych czynników regulatorowych, m.in.: AIF (*apoptosis inducing factor*), Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, endonukleaza G, oraz IAP (*inhibitor-apoptosis protein*) [16, 17].

Bakterie rodzaju *Shigella* indukują apoptozę makrofagów zarówno w warunkach *in vitro* [6, 61], jak i *in vivo* [37, 63]. Zaprogramowana śmierć komórek jest inicjowana przez białko IpaB [6, 14] dostarczane do cytoplazmy zakażonej komórki przez TTSS [27]. Proteina IpaB wiąże się z kaspazą-1, zwaną także enzymem konwertującym interleukinę-1 $\beta$  (*inter-leukin-1 $\beta$  converting enzyme*, ICE), powodując jej aktywację [6, 13, 14]. W aktywacji tej kinazy pośredniczy białko IpaF (*ICE-protease-activating factor*), należące do rodziny receptorów NLR (*nucleotide-binding oligomerization domain(NOD)-like receptor*) oraz białko adaptorowe ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain*), ale tylko IpaF jest związany z indukcją apoptozy [48]. Prawdopodobnie w aktywacji kaspazy-1 bierze także udział cytoplazmatyczna proteaza serynowa TPPII

Tabela I

Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na śmierć komórki eukariotycznej

|                                 |           | Rodzaj śmierci komórki            |                         |                                |               |
|---------------------------------|-----------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------|
|                                 |           | Programowana śmierć komórki       |                         | Nieprogramowana śmierć komórki |               |
|                                 |           | Apoptoza                          | Autofagia               | Nekroza                        | Onkoza        |
| Sposób wpływu na śmierć komórki | Indukcja  | Makrofagi [6, 14, 15, 37, 61, 63] | Makrofagi [48]          | Makrofagi [19, 28, 49]         | Makrofagi [8] |
|                                 |           | Komórki nabłonkowe [50]           | Neutrofile [10]         |                                |               |
|                                 | Inhibicja | Komórki nabłonkowe [7, 33]        | Komórki nabłonkowe [30] | –                              | –             |

(tripeptidyl peptidase II) [15]. Zdaniem Hilbi i wsp. [15] enzym TPPII może tworzyć z białkiem IpaB i kaspazą-1 kompleks i bezpośrednio promować aktywację kaspazy-1 lub powodować degradację inhibitora, umożliwiając zapoczątkowanie zaprogramowanej śmierci komórki przez kompleks IpaB-kaspaza-1. Aktywna kaspaza-1 przekształca nieaktywne prekursorzy IL-1 $\beta$  [13, 14, 44] oraz IL-18 [44] do form aktywnych biologicznie. Proces aktywacji kaspazy-1 przez białko IpaB może mieć miejsce zarówno w cytoplazmie, jak i na błonach zakażonych makrofagów. Wykazano, że w indukcji zaprogramowanej śmierci komórki odgrywa istotną rolę cholesterol [46], z którym wiąże się białko IpaB [12]. Pozbawienie błon tego składnika skutkuje zahamowaniem aktywacji kaspazy-1 i indukcji apoptozy [46].

Makrofagi pozbawione kaspazy-1 są niewrażliwe na apoptotyczne działanie pałeczek *S. flexneri* mimo, że są podatne na działanie innych bodźców indukujących apoptozę. Jak wynika z badań Hilbi i wsp. [14] zaprogramowana śmierć makrofagów przebiega niezależnie od białka p53, a antyapoptyczne białka Bcl-2 i Bcl-x<sub>1</sub> nie wywierają hamującego wpływu na przebieg tego procesu.

Zaprogramowana śmierć komórek przebiegająca z aktywacją kaspazy-1 i konwersją nieaktywnych postaci prozapalnych cytokin IL-1 $\beta$  i IL-18 to aktywnych form jest nazywana także pyroptozą [9].

Bakterie z gatunku *S. flexneri* powodują także apoptozę komórek nabłonkowych. Proces nazwany apoptozą pośredniczoną przez wewnątrzkomórkową lizę bakterii (IBAD, *intracellular bacteriolysis-mediated apoptotic death*) przebiega z udziałem kaspazy-3, -6 i -9 oraz mitochondriom. Wykazano, iż IBAD podlega regulacji przez białka z rodziny Bcl-2 oraz szlak NF- $\kappa$ B [50].

### 3.2. Hamowanie apoptozy przez pałeczki *Shigella* sp.

Wykazano, że pałeczki *S. flexneri* hamują zaprogramowaną śmierć komórek nabłonkowych. Bakterie blokują aktywację kaspazy-3, ale nie zapobiegają uwolnieniu cyt c z mitochondrium oraz aktywacji kaspazy-9. Nie wykluczone, że antyapoptyczne działanie *S. flexneri* jest związane z inhibitorem apoptozy IAP-1 (*inhibitor of apoptosis protein-1*) [7]. Pedron i wsp. [33] wykazali, że w zakażonych komórkach nabłonkowych następuje wzrost transkrypcji genu kodującego to antyapoptyczne białko. Proteina IAP-1 hamuje bezpośrednio aktywację kaspazy-3. Prawdopodobne jest także hamowanie przez pałeczki *S. flexneri* zewnątrzpo pochodnego szlaku apoptozy przebiegającego niezależnie od uwalniania cyt c. Zdaniem Clark i wsp. [7] czynnikami odgrywającymi istotną rolę w zapobieganiu zaprogramowanej

śmierci komórek nabłonkowych są białka efektorowe kodowane przez geny kontrolowane przez transkrypcyjny regulator MxiE. Białka efektorowe są wydzielane do cytozolu zakażonych komórek nabłonkowych przez TTSS.

### 3.3. Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na autofagię

Autofagia może być indukowana czynnikami pochodzenia wewnątrzkomórkowego, np. nagromadzenie nieprawidłowo połażowanych białek, inwazyjne drobnoustroje, lub zewnątrzkomórkowego – głód komórkowy, hormony, środki lecznicze [3, 57].

Do kluczowych genów kontrolujących proces autofagii należą geny z rodziny ATG (*AuTophagy-related Genes*) [18].

Główną rolę w regulacji indukcji autofagii odgrywa kinaza TOR, w komórkach ssaków – mTOR, ssaczy cel rapamycyny (*mammalian target for rapamycin*, mTOR). Enzym mTOR jest białkową kinazą serynowo-treoniową, kontrolującą wzrost, proliferację i ruch komórki, a także procesy transkrypcji i translacji. W prawidłowych warunkach mTOR działa jako inhibitor autofagii. Inaktywacja mTOR przez rapamycynę lub deficyt aminokwasów prowadzi do aktywacji autofagii [57].

W rozwoju autofagosomów uczestniczą dwa ko-niugacyjne systemy białek [26, 57]. Do pierwszego z nich należą białka Atg5, 7, 10 i 12, z końcowym produktem Atg12-Atg5, do którego przyłącza się białko Atg16, ulegające samoistnej oligomeryzacji. Nowo powstały kompleks Atg12-Atg5  $\times$  (Atg16)<sub>n</sub> wiąże się z błoną izolującą i uczestniczy w jej wydłużaniu. Drugi system angażuje białka Atg3, 4, 7 i 8. W końcowym etapie białko Atg8 tworzy odwracalny kompleks z fosfolipidem błon komórkowych, fosfatydyloetanolaminą (*phosphatidylethanolamine*, PE) – Atg8-PE. Kompleks ten odpowiada za dynamikę błony autofagosomalnej i jest obecny w błonie izolującej, błonie autofagosomów oraz ciałek autofagicznych. Z tego powodu jest jednym z najbardziej wiarygodnych markerów autofagii. Ssaczym ortologiem Atg8 jest białko LC3 [57].

W tworzenie autofagosomów zaangażowana jest również kinaza 3-fosfatydyloinozytolu klasy III (PI3K-III), która odgrywa kluczową rolę w sekwestracji materiału cytoplazmatycznego do autofagosomów [35].

Autofagia, jako mechanizm kierujący do lizosomalnego trawienia struktury tak duże jak mitochondria, służy również do obrony komórek eukariotycznych przed inwazyjnymi drobnoustrojami. W konsekwencji drobnoustroje wykształciły różne mechanizmy pozwalające im na uniknięcie śmierci w fagosomach komórek eukariotycznych [38, 63].

*S. flexneri* może indukować autofagię w zakażonych makrofagach zależną od TTSS. Brak kaspazy-1

promuje dojrzewanie autofagosomów powstających w czasie zakażenia pałeczkami *S. flexneri*. Aktywacja kaspazy-1 hamuje aktywację autofagii. Zdaniem badaczy [48] autofagia chroni zakażone makrofagi przed pyroptozą. Być może aktywna kaspaza-1 uczestniczy w degradacji czynników biorących udział w indukcji autofagii, a zahamowanie tego procesu i w konsekwencji wystąpienie pyroptozy odgrywa istotną rolę w generowaniu odpowiedzi zapalnej gospodarza. Jak wynika z badań Su z u k i i wsp. [48], indukcja autofagii w zakażonych makrofagach, w przeciwieństwie do komórek nabłonkowych, przebiega niezależnie od białka VirG. W komórkach nabłonkowych białko VirG, będące bakteryjnym białkiem zewnątrzłonowym wiąże się z białkiem Atg5, biorącym udział w formowaniu autofagosomów [30]. Pałeczki *S. flexneri* wykształciły mechanizm chroniący te bakterie przed autofagią. Za pomocą sekrecji trzeciego typu wydzielają białko efektorowe IcsB [29], które łączy się z VirG i konkurencyjnie hamuje wiązanie Atg5 z VirG [30].

### 3.4. Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na nieprogramowaną śmierć komórki

Udowodniono wpływ pałeczek *Shigella* sp. na apoptozę [6, 11, 13, 33, 37, 61, 63], autofagię [29, 30, 48], ale mogą one również regulować inne, nieprogramowalne rodzaje śmierci komórkowej, takie jak onkoza i nekroza.

#### 3.4.1. Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na onkozę

Onkoza jest indukowana czynnikami destabilizującymi błony komórkowe, wywołującymi zmiany w polaryzacji błon mitochondrialnych. Prowadzi to bezpośrednio do zahamowania syntezy ATP. Mills i wsp. [25] zaobserwowali, że w komórkach linii HeLa, które ulegały onkozie dochodzi do wzrostu stężenia UCP-2 (*uncoupling protein 2*). Już minimalny wzrost poziomu tego białka wywoływał zmiany w przepuszczalności błon mitochondrialnych, spadek NADH i wewnątrzkomórkowego stężenia ATP.

W przebiegu onkozy występują charakterystyczne zmiany w obrębie komórki. Struktury wewnątrzkomórkowe i cytoplazma ulegają wakuolizacji, a następnie przemieszczeniu do pęcherzyków egzosomalnych. Kanały jonowe błony komórkowej zmieniają swoją przepuszczalność. W komórce wzrasta poziom głównie jonów sodu, chloru, a wraz z nimi – wody [53]. Komórka pęcznieje [23]. DNA łamie się w niespecyficznych miejscach i dochodzi do kariolizy. Charakterystyczny jest wzrost poziomu wapnia, który aktywuje proteazy cysteinowe z rodziny kalpain, trawiące białka błon i cytoszkieletu [21]. Wapń zapoczątkowu-

je również przemieszczenie fosfolipazy A<sub>2</sub> do błony komórkowej, gdzie poprzez hydrolizę fosfolipidów, pogłębia jej dezintegrację [9].

Badania Fernandez - Prada i wsp. [8] wskazują, że ludzkie makrofagi pochodzące z monocytów zakażone wirulentnymi szczepami *S. flexneri* ulegają onkozie. Zakażeniu towarzyszą zmiany charakterystyczne dla onkozy, m.in. rozciągnięcie i dezintegracja błony komórkowej, obrzmienie całej komórki oraz karioliza.

#### 3.4.2. Wpływ pałeczek *Shigella* sp. na nekrozę

Nekroza może być wynikiem działania czynników termicznych lub toksycznych, przekraczających próg wrażliwości danej komórki [59]. Ważnym czynnikiem indukującym nekrozę są ROS [60]. Czynniki te uszkadzają błony komórki i wpływają przede wszystkim na spadek poziomu ATP w mitochondrium, co może być wynikiem spadku jego syntezy lub nasilonego zapotrzebowania.

Na przepuszczalność błon mitochondrialnych wpływają liczne kinazy. Uważa się, że kinazy p38, ERK-MAPK i JNK mają znaczenie w regulacji nekrozy [36, 56]. Yaglom i wsp. [56] dowiedli, że inhibicja p38 i JNK w komórkach miogennych H9c2 hamuje ich nekrozę.

W wyniku nekrozy dochodzi w komórce do specyficznych zmian, które obejmują każdy z jej elementów. W jądrze komórkowym zachodzi dezintegracja materiału genetycznego. DNA ulega fragmentacji, za którą odpowiedzialne są endonukleazy aktywowane wzrastającym stężeniem jonów wapnia [47]. Wzrost stężenia wapnia aktywuje również  $\mu$ - i m-kapłaniiny, które trawią białka cytoszkieletu, błon komórkowych, cząsteczek adhezyjnych czy kanałów jonowych. Z uszkodzonych lizosomów uwalniane są katepsyny [60]. Cytoplazma komórki staje się eozynofilna. Traci swoją budowę strukturalną i ulega fragmentacji [23]. Błony mitochondrialne ulegają depolaryzacji, czego konsekwencją jest zaburzenie transportu elektronów w poprzek błony i drastyczny spadek poziomu ATP [47]. Znamienne jest otwarcie tzw. kanałów śmierci obecnych w błonie komórkowej, które są wybiórczo przepuszczalne dla anionów a hamowane glicyną. W przypadku ich otwarcia dochodzi do napływu do komórki dużej ilości jonów dodatnich i zwiększenia ciśnienia osmotycznego wewnątrz komórki [60]. W wyniku tych zmian komórka ulega rozpadowi, jej zawartość zostaje uwolniona do przestrzeni międzykomórkowych [54]. Zostają aktywowane fagocyty i leukocyty uczestniczące w reakcji zapalnej [36].

Koterski i wsp. [19] udowodnili, że zakażone *S. flexneri* komórki ludzkich makrofagów ulegają nekrozie. W trakcie zakażenia makrofagów błona ko-

mórkowa zwiększa przepuszczalność. Następuje również zmiana potencjału błon mitochondrialnych, czego konsekwencją jest niemal 50% spadek poziomu ATP. Znamienne jest brak aktywacji kaskady kaspaz, czego dowodem jest śmierć makrofagów pomimo zastosowania inhibitorów kaspaz. Wskazuje to na nieapoptotyczny mechanizm śmierci komórki. Zastosowanie tych samych inhibitorów kaspaz w przypadku monocytów skutecznie hamuje ich śmierć, sugerując apoptozę.

Badania Suzuki i wsp. [49] potwierdzają, że pałeczki *S. flexneri* wywołują śmierć makrofagów niezależnie od aktywacji kaspazy-1 i receptorów Toll-like 4 (*toll-like receptors 4*, TLR4). Obserwowane w komórce zmiany sugerują nekrozę, która jest aktywowana prawdopodobnie przez przemieszczany do cytoplazmy komórki lipid A. Nie zaobserwowano natomiast związku pomiędzy obecnością IpaB a wystąpieniem nekrozy.

Nekrozę neutrofilii zakażonych wirulentnymi szczepami *S. flexneri* wykazali François i wsp. [10]. Jest ona uwarunkowana obecnością białek sekrecyjnych IpaB i IpaC wydzielanych przez TTSS. IpaB i IpaC działają w kompleksie, tworząc pory w błonach komórek eukariotycznych i destabilizując je.

Nona i wsp. [28] badając makrofagi linii U937 oraz komórki J774 zaobserwowali, że mogą one ulegać nekrozie. Badane komórki zakażone wirulentnymi szczepami *S. flexneri* wykazywały cechy charakterystyczne dla nekrozy, do których należał przede wszystkim wzrost stężenia dehydrogenazy mleczanowej (*lactate dehydrogenase*, LDH), wyeksponowanie fosfatydyloseryny oraz utworzenie w błonie komórkowej porów. Zjawisko to jest prawdopodobnie kontrolowane przez geny *IpaBCDA*, kodujące białka sekrecyjne.

#### 4. Podsumowanie

Zagadnienie śmierci komórkowej jest znane od wielu lat. Mimo tego do dziś nie ma jednorodnych definicji opisujących poszczególne jej typy i kryteriów jasno je klasyfikujących. Najprostsza klasyfikacja obejmuje podział na zaprogramowaną śmierć komórki, do której należy apoptoza i autofagia, oraz bierną: nekrozę, onkozę oraz katastrofę mitotyczną [47].

Wiele jest informacji na temat wpływu drobnoustrojów na przebieg cyklu komórkowego ich gospodarzy. Bakterie mogą działać zarówno pro- i antyapoptotyczne. Mogą wpływać także na zapoczątkowanie autofagii, jak i nieprogramowalnych typów śmierci komórkowej: nekrozy czy onkozy. Są zdolne do oddziaływania za pomocą receptorów zewnątrzkomórkowych oraz wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania.

Przykładem drobnoustrojów o udowodnionym działaniu ingerującym w śmierć komórki gospodarza są Gram-ujemne pałeczki z rodzaju *Shigella*. Są one od-

powiedzialne za rozwój czerwonki bakteryjnej [39, 41]. W patogenezie choroby niezwykle istotne jest oddziaływanie na cykl życiowy komórek gospodarza. Komórki pierwszej linii obrony immunologicznej organizmu – makrofagi są zabijane przez namnażające się pałeczki *Shigella* sp. na drodze apoptozy [37, 61] onkozy [8] lub nekrozy [10, 19, 28, 49], co wywołuje stan zapalny i umożliwia bakteriom przemieszczenie się przez zniszczoną barierę jelitową [41, 63]. Ważne jest również oddziaływanie antyapoptotyczne bakterii na komórki nabłonka jelitowego, co pozwala im na namnażanie się w ich wnętrzu [33, 43].

Pomimo licznych badań nad ingerencją pałeczek *Shigella* sp. w cykl życiowy komórek eukariotycznych, konieczne jest prowadzenie dalszych badań, które wyjaśniałyby w pełni patomechanizm czerwonki bakteryjnej oraz pomogłyby w leczeniu tej choroby.

#### Piśmiennictwo

1. Abastado J.P.: Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res. Immunol.* **147**, 443–456 (1996)
2. Bauvy C., Gane P., Arico S., Codogno P., Ogier-Denis E.: Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Exp. Cell Res.* **268**, 139–149 (2001)
3. Bergamini E., Cavallini G., Donati A., Gori Z.: The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macro-autophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 203–208 (2003)
4. Bernardini M.L., Mounier J., d’Hauteville H., Coquis-Rondon M., Sansonetti P.J.: Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3867–3871 (1989)
5. Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M.: The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochemie*, **84**, 203–214 (2002)
6. Chen Y., Smith M.R., Thirumalai K., Zychlinsky A.: A bacterial invasion induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J.* **15**, 3853–3860 (1996)
7. Clark C.S., Maurelli A.T.: *Shigella flexneri* inhibits staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* **75**, 2531–2539 (2007)
8. Fernandez-Prada C.M., Hoover D.L., Tall B.D., Venkatesan M.M.: Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri* in vitro undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis. *Infect. Immun.* **65**, 1486–1496 (1997)
9. Fink S.L., Cookson B.T.: Apoptosis, pyroptosis and necrosis. Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907–1916 (2005)
10. François M., Le Cabec V., Dupont M.-A., Sansonetti P.J., Maridonneau-Parini I.: Induction of necrosis in human neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasions, and actin polymerization. *Infect. Immun.* **68**, 1289–1296 (2000)

11. Grassmé H., Jendrossek V., Gulbins E.: Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. *Apoptosis*, **6**, 441–445 (2001)
12. Hayward R.D., Cain R.J., McGhie E.J., Philips N., Garner M.J., Koronakis V.: Cholesterol binding by bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol. Microbiol.* **56**, 590–603 (2005)
13. Hilbi H., Chen Y., Thirumalai K., Zychlinsky A.: The interleukin-1 $\alpha$  converting enzyme, caspase-1 is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **65**, 5165–5170 (1997)
14. Hilbi H., Moss J.E., Hersh D., Chen Y., Arondel J., Banerjee S., Flavell R.A., Yuan J., Sansonetti P.J., Zychlinsky A.: *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J. Biol. Chem.* **273**, 32895–32900 (1998)
15. Hilbi H., Puro R.J., Zychlinsky A.: Tripeptidyl peptidase II promotes maturation of caspase-1 in *Shigella flexneri*-induced macrophage apoptosis. *Infect. Immun.* **68**, 5502–5508 (2000)
16. Jeong S.Y., Seol D.W.: The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* **41**, 11–22 (2008)
17. Khosravi-Far R., Esposti M.D.: Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 1051–1057 (2004)
18. Kliensky D.J., Cregg J.M., Dunn W.A. Jr., Emr S.D., Sakai Y., Sandoval I.V., Sibirny A., Subramani S., Thumm M., Veenhuis M., Ohsumi Y.: A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* **5**, 539–545 (2003)
19. Koterski J.F., Nahvi M., Venkatesan M.M., Haimovich B.: Virulent *Shigella flexneri* causes damage to mitochondria and triggers necrosis in infected human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **73**, 504–513 (2005)
20. Kumar S.: Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **14**, 32–43, (2007)
21. Liu X., Van Vleet T., Schnellmann R.G.: The role of calpain in oncotic cell death. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 349–70 (2004)
22. Lockshin R.A., Zakeri Z.: Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2405–2419 (2004)
23. Majno G., Joris I.: Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *AJP*, **146**, 3–15 (1995)
24. Melino G., Knight R.A., Nicotera P.: How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ.* **12**, 1457–1462 (2005)
25. Mills E.M. Xu D., Fergusson M.M. Combs Ch.A., Xu Y., Finkel T.: Regulation of cellular oncosis by uncoupling protein 2. *J. Biol. Chem.* **277**, 27385–27392 (2002)
26. Mizushima N., Ohsumi Y., Yoshimori T.: Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* **27**, 421–429 (2002)
27. Navarre W.W., Zychlinsky A.: Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end of different pathogenic strategies. *Cell. Microbiol.* **2**, 265–273 (2000)
28. Nonaka T., Kuwabara T., Mimuro H., Kuwae A., Imajoh-Ohmi S.: *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiol.* **149**, 2513–2527 (2003)
29. Ogawa M., Suzuki T, Tatsuno I., Abe H., Sasakawa C.: IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **48**, 913–931 (2003)
30. Ogawa M., Yoshimori T., Suzuki T, Sagara H., Mizushima N., Sasakawa C.: Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science*, **397**, 727–731 (2005)
31. O’Loughlin E.V., Robins-Browne R.M.: Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* **3**, 493–507 (2001)
32. Onodera J., Ohsumi Y.J.: Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 16071–16076 (2004)
33. Pedron T., Thibault C., Sansonetti P.J.: The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J. Biol. Chem.* **278**, 33878–33886 (2003)
34. Peter M.E., Heufelder A.E., Hengartner M.O.: Advances in apoptosis research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12736–12737 (1997)
35. Petiot A., Ogier-Denis E., Blommaert E.F., Meijer A.J., Codogno P.: Distinct classes of phosphatidylinositol 3’-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 992–998 (2000)
36. Proskuryakov S.Ya., Gabli V.L., Konoplyannikov A.G.: Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 387–408 (2002)
37. Raqib R., Ekberg C., Sharkar P., Bardhan P.K., Zychlinsky A., Sansonetti P.J., Andresson J.: Apoptosis in acute shigellosis is associated with increased production of Fas/Fas Ligand, perforin, caspase-1 and caspase-3 but reduced production of Bcl-2 and interleukin-2. *Infect. Immun.* **70**, 3199–3207 (2002)
38. Rich K.A., Burkett C., Webster P.: Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell. Microbiol.* **5**, 455–468 (2003)
39. Ryan, K.J., Falkow S.: *Enterobacteriaceae* (w) Medical Microbiology. An introduction to infectious diseases, red. Ryan, K.J., Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1994, s. 328–332
40. Sansonetti P.J.: Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G319–G323 (2001)
41. Sansonetti, P.J.: Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 3–14 (2001)
42. Sansonetti P.J., Arondel J., Huerre M., Harada A., Matsu-shima K.: Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect Immun.* **67**, 1471–1480 (1999)
43. Sansonetti P.J., Phalipon A.: M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.* **11**, 193–203 (1999)
44. Sansonetti P.J., Phalipon A., Arondel J., Thirumalai K., Banerjee S., Akira S., Takeda K., Zychlinsky A. Caspase-1 activation of IL-1 $\beta$  and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity* **12**, 581–590 (2000)
45. Saraste A., Pulki K.: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Res.* **45**, 528–537 (2000)
46. Schroeder G.N., Hilbi H.: Cholesterol is required to trigger caspase-1 activation and macrophage apoptosis after phagosomal escape of *Shigella*. *Cell. Microbiol.* **9**, 265–278 (2007)
47. Stepien A., Izdebska M. Grzanka A.: Rodzaje śmierci komórki. *Post. Hig. Med. Dośw.* **61**, 420–428 (2007)
48. Suzuki T., Franchi L., Toma C., Ashida H., Ogawa M., Yoshikawa Y., Mimuro H., Inohara N., Sasakawa C., Nunez G.:



- Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathol.* **3**, 1082–1091 (2007)
49. Suzuki T., Nakanishi K., Tsutsui H., Iwai H., Akira S., Inohara N., Chamaillard M., Nuñez G., Sasakawa Ch.: A novel caspase-1/toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. *J. Biol. Chem.* **280**, 14042–14050 (2005)
50. Tattoli I., Bernardini M.L. i wsp.: Intracellular bacteriolysis triggers a massive apoptotic cell death in *Shigella*-infected epithelial cell. *Microbes Infect.* **10**, 1114–1123 (2008)
51. Timmer J.C., Salvesen G.S.: Caspase substrates. *Cell Death Differ.* **14**, 66–72 (2007)
52. Torres A.G.: Current aspects of *Shigella* pathogenesis. *Rev. Latinoam Microbiol.* **46**, 89–97 (2004)
53. Trump B.F., Berezesky I.K.: The role of altered  $[Ca^{2+}]_i$  regulation in apoptosis, oncosis and necrosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1313**, 173–178 (1996)
54. van Cruchten S., van den Broeck W.: Morphological and biological aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* **31**, 214–223 (2002)
55. Venkatesan M.M., Goldberg M.B., Rose D.J., Grotbeck E.J., Burland V., Blattner F.R.: Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **69**, 3271–3285 (2001)
56. Yaglom J.A., Ekhterae D., Gabai V.L., Sherman M.Y.: Regulation of necrosis of H9c2 myogenic cells upon transient energy deprivation. *J. Biol. Chem.* **278**, 50483–50496 (2003)
57. Yang Y.P., Liang Z.Q., Gu Z.L., Qin Z.H.: Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 1421–1434 (2005)
58. Zakeri Z., Lockshin R.A.: Cell death during development. *J. Immunol. Methods*, **265**, 3–20 (2002)
59. Ziegler U., Groscurth P.: Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.* **19**, 124–128 (2004)
60. Zong W.-X., Thompson C.B.: Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* **20**, 1–5 (2006)
61. Zychlinsky A., Prevost M.C., Sansonetti P.J.: *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, **358**, 167–168 (1992)
62. Zychlinsky A., Sansonetti P.J.: Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? *Trends Microbiol.* **5**, 201–204 (1997)
63. Zychlinsky A., Thirumalai K., Arondel J., Cantey J.R., Aliprantis A.O., Sansonetti P.J.: *In vivo* apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect. Immun.* **64**, 5357–5365 (1996)