

Anna Maria Stachowicz¹ i Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego,
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w lutym 2010 r.

1. Wstęp. 2. Interakcje *Bartonella* spp. z komórkami eukariotycznymi. 3. Patogeneza, czynniki wirulencji. 4. Inhibicja apoptozy. 5. NFκB – główny regulator reakcji zapalnej. 6. Parakrynną pętla proliferacji komórek śródbłonna naczyń. 7. Podsumowanie

***Bartonella* sp.– mechanism of bacteria-induced angiogenesis**

Abstract: The alpha-proteobacterial genus *Bartonella* comprises numerous pathogens causing characteristic intraerythrocytic bacteremia in their reservoir hosts. Since 1993 the genus *Bartonella* expanded from one species to currently 24 species, more than ten of which are associated with human diseases. Some members of *Bartonella* genus are recognized as zoonotic pathogens. Transmission between mammalian host occurs via blood sucking arthropods or via direct contact. Three species (*B. bacilliformis*, *B. quintana* and *B. henselae*) are the most important human pathogens that cause a wide spectrum of clinical manifestations such as: cat-scratch disease (CSD), trench fever, Carrion's disease, bacillary angiomatosis (BA) and peliosis (BP). In humans *Bartonellae* infect erythrocytes and vascular endothelial cells (EC). Invasion of EC can lead to vasoproliferative tumour lesions in the skin and inner organs. This review paper provides an overview of *Bartonella* – host cell interaction concentrating on vascular tumor proliferation.

1. Introduction. 2. *Bartonella* – host cell interactions. 3. Pathogenesis ; virulence factors 4. inhibition of apoptosis. 5. NFκB – main factor of proinflammatory reaction. 6. Paracrine loop of endothelial cell proliferation. 7. Summary

Słowa kluczowe: *Bartonella* spp.; proliferacja komórek śródbłonna, wewnątrzerytrocytarna bakteriemia, VEGF, T4SS (czwarty typ sekrecji)

Key words: *Bartonella* spp.; vascular proliferation, intraerythrocytic bacteremia, VEGF, T4SS (type four secretion system)

1. Wstęp

Pierwsze doniesienia dotyczące objawów infekcji bakteriami rodzaju *Bartonella* pochodzą z czasów I wojny światowej, kiedy to pojawiły się określenia: „gorączka okopowa” (trench fever) czy też „gorączka wołyńska” (Wolhynian fever). Choroba obserwowana wśród żołnierzy charakteryzowała się nawracającą 5-dniową gorączką i silnymi bólami, uniemożliwiającymi udział w walce. Kolejne epidemie na skalę europejską pojawiły się podczas II wojny światowej. Korelacja między niskim standardem bytowania ludności, „okopowymi” warunkami życia a pojawianiem się infekcji wydaje się być zatem bardzo wyraźna. Czynniki etiologiczne gorączki okopowej izolowany z krwi chorych i przenoszony przez wszy, ze względu na podobieństwo do *Rickettsia prowazekii*, został zaliczony do tego samego rodzaju jako *Rickettsia quintana*, następnie nastąpiła zmiana nazwy rodzajowej na *Rochalimaea quintana* a ostatecznie na *Bartonella quintana* [30]. Po szczegółowych badaniach już na poziomie DNA – analizie sekwencji 16S rRNA, testach hybrydacyjnych oraz porównawczych analizach sekwencji nukleotydowych genów – do rodzaju *Bartonella*

zaklasyfikowano 24 gatunki i podgatunki, z czego przynajmniej połowa jest patogennych dla człowieka [62]. Głównie trzy gatunki stymulują proliferacyjne zmiany naczyń krwionośnych: *B. quintana*, *B. henselae* i *B. bacilliformis*. Rodzaj *Bartonella* należy do α -*Proteobacteria*, najbliższym spokrewnionym jest *Brucella abortus* oraz, co ciekawe, *Agrobacterium tumefaciens*, bakterią indukującą powstawanie guzów nowotworowych roślin [65]. Są to Gram-ujemne, często zakrzywione, tlenowe oksydazo- i katalazo-ujemne pałeczki o skomplikowanych wymaganiach pokarmowych (m.in. wymagają do wzrostu heminy) [30].

Aktualnie bakterie rodzaju *Bartonella* klasyfikowane są jako tzw „emerging pathogens”. Infekcje mikroorganizmami tego rodzaju wywołują różnorodne objawy chorobowe, od zakażeń bezobjawowych po bardzo ciężkie, często śmiertelne choroby. Konsekwencje infekcji zależne są od gatunku/szczepu patogenu oraz statusu immunologicznego gospodarza. Do schorzeń związanych z zakażeniem zalicza się bakteryjną naczyńniakowatość (BA – bacillary angiomatosis) objawiającą się zmianami angioproliferacyjnymi śródbłonna naczyń krwionośnych skóry, głównie u osób o obniżonej odporności, ustępującymi po zastosowaniu

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

antybiotyków: tetracykliny, chloramfenikolu i aminoglikozydów [15, 30]. Skutkiem infekcji *B. quintana* jest dodatkowo schorzenie płamica wątrobowa (podobne zmiany wątrobowe) (PH – peliosis hepatitis), przy czym w obu przypadkach występuje zwiększona proliferacja komórek eukariotycznych [37]. Infekcje *B. quintana*, oprócz gorączki okopowej, BA i PH, mogą być także przyczyną zapalenia wsierdza [58]. Najgroźniejsze dla ludzi są skutki infekcji *B. bacilliformis*. Choroba nosi nazwę choroby Carriona i występuje endemicznie w Andach (choć znana jest już z czasów prekolumbijskich z terenów dzisiejszego Ekwadoru i Peru). Pierwsze jej objawy to gorączkowa anemia („Oroya fever”), która doprowadza do hemolitycznej anemii i nieleczona charakteryzuje się 85% śmiertelnością. Chroniczna faza infekcji nosząca nazwę „verruca peruana” charakteryzuje się zmianami angioproliferacyjnymi skóry wynikającymi z proliferacji kolonizowanych komórek śródbłonna. W ostrej fazie choroby wywoływanej zakażeniem *B. bacilliformis* dochodzi często do infekcji oportunistycznymi patogenami, co może sugerować, że podobnie jak podczas infekcji wirusem HIV mamy do czynienia ze zjawiskami immunosupresji [61].

Objawem infekcji *B. henselae* jest choroba określana jako choroba kociego pazura (CSD – cat scratch disease), samozanikający lokalny stan zapalny i powiększenie węzłów chłonnych, BA u osób z obniżoną odpornością, BP (bacillary peliosis – zmiany w wątrobie, śledzionie), bakteriemia i neuroretinitis (zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego). Charakterystyczne dla powstających grudek naczyniowych są obfite krwawienia już przy najmniejszych zranieniach. Powstające zmiany są często morfologicznie nieodróżnialne od typowych zmian nowotworowych, takich jak haemangioma (naczyniak krwionośny) czy mięsak Kaposi’ego. Charakterystyczne dla zmian chorobowych jest występowanie skupisk naczyń krwionośnych, których nabłonek bardzo szybko proliferuje i pozostaje w ścisłym kontakcie z agregatami bakteryjnymi. Podobne zmiany histopatologiczne występują w wypadku PH w wątrobie – a także „verruca peruana”. Guzy w BA mają łagodny, naczyniowy charakter, często naciekają makrofagami i PMN (neutrofilami) [15, 30].

Wspólny dla bakterii rodzaju *Bartonella* jest hemotropowy tryb życia związany z pasożytnictwem wewnątrzerytrocytowym, silne powinowactwo do komórek endotelialnych (EC) i „wykorzystanie” stawonogów – wszy, pcheł, prawdopodobnie także kleszczy – jako wektorów [5, 6, 12, 15, 39]. Bakterie rodzaju *Bartonella* charakteryzuje silnie zaznaczony tropizm gatunkowy. Wiele gatunków ssaków, zarówno dzikich jak i udomowionych, jest naturalnym rezerwuarem bakterii, ale tylko dla dwu gatunków (*B. quintana* i *B. bacilliformis*) rezerwuarem jest człowiek [15].

Infekcje *Bartonella* zaobserwowano u wszystkich badanych ssaków, przy czym poszczególne gatunki rodzaju *Bartonella* są zdolne do kolonizacji ograniczonej liczby gatunków ssaków [62]. Rezerwuarem *B. henselae* są koty, które to wydają się być ważnym ogniwem w rozwojowym cyklu bakterii, dlatego zarówno CSD, jak i BA oraz PH traktuje się jako zoonozy. Ostatnie dane epidemiologiczne wskazują, że także bartonellozy wywoływane przez inne gatunki tego rodzaju należy traktować jako potencjalne choroby odzwierzęce [11, 23].

W Polsce wypadki bartonelloz są stosunkowo rzadkie. Analiza epidemiologiczna zachorowań na bartonellozy w Polsce w latach 1998–2001 wykazała niską zapadalność na CSD. Przeciwciała swoiste dla *B. henselae* zidentyfikowano w 168 próbach surowic pobranych od 265 osób ze wstępnym rozpoznaniem klinicznym bartonellozy [40].

Znamy sekwencję nukleotydową genomów przedstawicieli pięciu gatunków rodzaju *Bartonella*, między innymi: dwu specyficznych dla ludzi patogenów *B. bacilliformis* i *B. quintana*, gatunku specyficznego dla kotów i infekującego ludzi *B. henselae* oraz gatunku specyficznego dla szczurów *B. tribocorum*, często stosowanego jako modelowy mikroorganizm w badaniach interakcji patogenu z komórkami eukariotycznymi [1]. Wielkość zsekwencjonowanych genomów waha się od 1.44 Mbp (1283 genów) do 2.62 Mbp (2136 genów). Geny obecne we wszystkich genomach to 959 genów charakteryzujących się wysokim poziomem syntenii. Przeprowadzona analiza porównawcza genomów wskazuje na stale zachodzące w nich zmiany, zarówno nabywanie nowych genów na drodze horyzontalnego transferu jak i utratę genów [19, 46].

Celem prezentowanej pracy przeglądowej jest przedstawienie mechanizmów oddziaływania bakterii rodzaju *Bartonella* z komórkami eukariotycznymi ze szczególnym uwzględnieniem szlaków prowadzących do zmian angioproliferacyjnych.

2. Interakcje *Bartonella* spp. z komórkami eukariotycznymi

Komórki śródbłonna naczyń krwionośnych są pierwotną niszą ekologiczną kolonizowaną przez mikroorganizmy rodzaju *Bartonella*. Pierwsze badania interakcji bakterii z komórkami eukariotycznymi wykazały, że hodowla *B. henselae* czy też *B. quintana* z ludzkimi komórkami nabłonkowymi żył pępowinowych (HUVEC – human umbilical vein endothelial cells) prowadzi do zwiększenia poziomu ich proliferacji [16]. Wzrost komórek był szybszy, osiągały one większe rozmiary i zmieniały kształt na wrzecionowaty. Kolonizacja śródbłonna naczyń krwionośnych roz-

poczyna się od kontaktu agregatu bakteryjnego z powierzchnią komórek eukariotycznych. Adhezję bakterii do komórek śródbłonna umożliwiają białka OM oraz połączone w pęczki pili typu IV (bundle-forming pili) [4, 15, 17]. Pięć z dziewięciu białek OMP, szczególnie Omp43 *B. henselae*, wiąże receptory na powierzchni endotelium (gł. ICAM-1). Następnie skupisko bakterii zostaje otoczone przez koliście wokół niego wyrastające z komórki nabłonkowej wypustki cytoplazmatyczne, co wiąże się z przebudową cytoszkieletu i gromadzeniem F-aktyny pod błoną komórkową. Kiedy wypustka otoczy z wszystkich stron agregat bakterii, dochodzi do zamknięcia nad nim jej brzegów (brzezi wypustki dotykające do siebie szczytowymi swymi powierzchniami ulegają fuzji) i utworzenia inwazomu. Błona otaczająca agregat bogata jest w ICAM-1 (cząstki adhezyjne oddziałujące normalnie z LFA-1 na limfocytach i umożliwiające ich przyleganie), które lokują się licznie w szczytowej części wypustki i bezpośrednio oddziałują z bakteriami, F – aktynę i inne białka bogate w fosfotyrozynę [66]. Włókna aktynowe są „okręcone” wokół podstawowej części formującego się inwazomu i kotwiczą go tym samym w płytках adhezyjnych. Inwazom w obrazie mikroskopowym stanowi litą, globularną strukturę o średnicy od 5 do 15 mikrometrów, lokującą się w komórce gospodarza dystalnie w stosunku do jądra komórkowego. Sam proces internalizacji (wnikania/pobierania bakterii przez komórkę eukariotyczną) *via* inwazom trwa ok. 24 godzin [17]. Obecność w komórce tak dużego i silnie osadzonego w komórce inwazomu znacznie ogranicza jej mobilność. Po około pięciu dniach od infekcji bakterie uwalniane są do krwiobiegu, wnikają do nowych komórek śródbłonna oraz dokonują inwazji erytrocytów. Obserwowano także inny przebieg internalizacji, także zależny od rearanżacji cytoszkieletu aktynowego, przebiegający z udziałem małych GTPaz (Rho, CDC42 i Rac) i przypominający proces indukowanej przez wiele innych wewnątrzkomórkowych patogenów endocytozy. W wypadku *B. bacilliformis* jest to jedyny mechanizm internalizacji [15].

Bakterie *Bartonella* sp. zdolne są do wewnątrzerytrocytowego pasożytnictwa, nie prowadzącego do rozpadu krwinek. Hemoliza jest raczej wyjątkiem wśród rodzaju *Bartonella*, występującym tylko w przypadku *B. bacilliformis* [28, 53]. Erytrocyty pełnią raczej pasywną rolę w procesie adhezji [64], „niosą” po prostu rozpoznawane przez patogen receptory: integryny i glikoforyny A/B [7]. Wniknięcie do erytrocytu zapoczątkowane jest formowaniem charakterystycznych rowków w błonie krwinki, z udziałem bakteryjnej deforminy. Jest to mała (ok. 1.4 kDa) hydrofobowa cząstka, oporna na wysoką temperaturę i proteazy, o dużym powinowactwie do albuminy. Do osiągnięcia pełnej aktywności wymaga obecności grupy innych białek

(o wielkości ok. 36 kDa), podobnie jak deformina obecnych w supernatancie hodowlanym, czyli wydzielanych przez bakterie do środowiska. Są one albo bezpośrednio odpowiedzialne za deformację błon ludzkich erytrocytów, przypuszczalnie stanowiąc elementy białkowego kompleksu deformującego, albo też są niezbędne do sekrecji innych białek odgrywających rolę w tym procesie. Po wniknięciu do krwinki dochodzi do namnażania bakterii otoczonych błoną wakuolarną wewnątrz erytrocytu. Proces ten trwa do kilku (średnio 5) dni, po czym liczba bakterii w erytrocycie pozostaje już stała (do 15 bakterii na erytrocyt, średnio 8) do końca życia erytrocytu, którego długość nie ulega zmianie pod wpływem infekcji. Wewnątrzerytrocytowe pasożytnictwo pozwala przetrwać *B. tribocorum* w szczurzych krwinkach nawet do kilku tygodni. Ta cecha jest przystosowaniem bakterii do charakterystycznej drogi transmisji między organizmami gospodarzy, za pośrednictwem stawonogów odżywiających się ssaczą krwią [22, 45, 53].

3. Patogeneza, czynniki wirulencji

W patogenezie *Bartonella* sp. biorą udział erytrocyty, komórki śródbłonkowe jako główne nisze zasiedlana przez te bakterie, a także prawdopodobnie krążące we krwi progenitorowe komórki szpiku kostnego. Fizjologiczne zmiany w zainfekowanych komórkach śródbłonna obejmują: inwazję zachodzącą dzięki zaindukowanej przez mikroorganizm rearanżacji cytoszkieletu aktynowego i utworzenie inwazomu, aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB, stymulację odpowiedzi prozapalnej, zahamowanie procesu apoptozy komórek endotelium i bezpośrednią indukcję ich proliferacji oraz pośrednią promocję angioproliferacji (tzw. parakrynną pętlą produkcji VEGF – vascular endothelial growth factor) przez zainfekowane makrofagi [14, 27]. Aktywacja NFκB prowadzi do zwiększonej ekspresji genów kodujących cząstki adhezyjne i cytokiny prozapalne, co skutkuje pojawieniem się ostrej reakcji zapalnej, krytycznej dla rekrutacji monocytów/makrofagów, które potem podtrzymują produkcję VEGF [24].

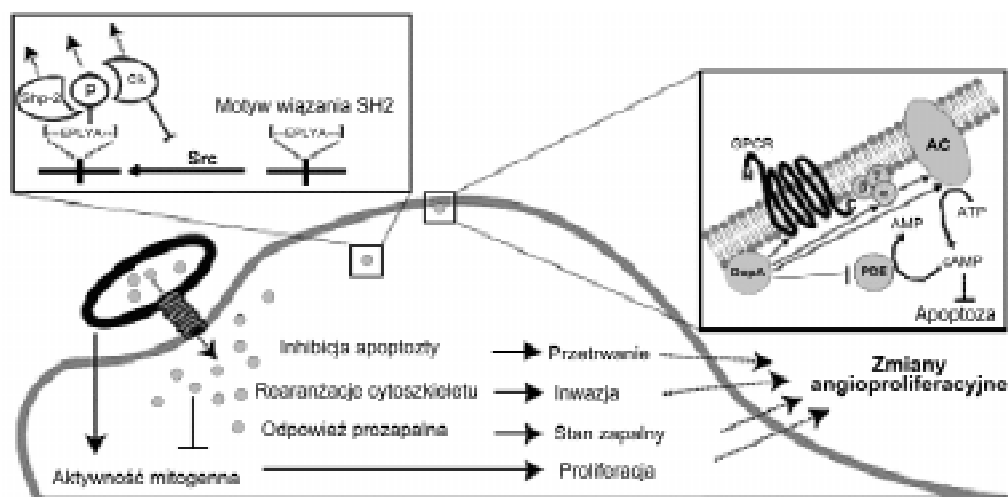
Istotnymi czynnikami wirulencji bakterii rodzaju *Bartonella* są układy sekrecyjne typu IV. Jak dotąd opisano trzy tego typu systemy VirB/VirD4, Vbh (virB – homologous) i Trw [46]. Odgrywają rolę w procesach adaptacji patogenu do środowiska. Ciekawe, że w genomie najstarszego ewolucyjnie gatunku *B. bacilliformis* brak jest genów kodujących te systemy sekrecji, choć przebieg procesów patogenezy jest podobny, lecz nie identyczny, jak w wypadku innych gatunków rodzaju *Bartonella*. Bakterie wszystkie innych gatunków, co najmniej ich przedstawiciele o zsekwencjonowanych

genomach, kodują białka co najmniej jednego T4SS. Prawdopodobnie geny kodujące białka układów sekrecyjnych nabyte drogą poziomego transferu zastąpiły funkcjonalnie inne geny wirulencji i ich aktywność zadecydowała o sukcesie ewolucyjnym „młodszych” gatunków *Bartonella*. Jak dotąd najdokładniej przebadany został system VirB/VirD4 *B. henselae* pośredniczący w dezorganizacji funkcji komórek śródbłonna naczyń kodowany przez geny zlokalizowanego chromosomowo operonu. Układ ten jest blisko „spokrewniony” z koniugacyjnym systemem AvhB/TraG plazmidu pTiC58 *Agrobacterium tumefaciens* [14]. Rola tego systemu badana była *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych w odniesieniu do *B. henselae* oraz na modelu szczurzym na przykładzie bliskiego „krewniaka” *B. henselae* – *B. tribocorum* [18, 41]. Produkty genów operonu tworzą w osłonach komórki aparat sekrecyjny, zdolny do wydzielania efektorów: od pojedynczych monomerycznych białek po ich złożone kompleksy. Po wnikięciu do organizmu gospodarza bakterie zasiedlają pierwotną niszę, którą stanowią komórki endotelium i z której okresowo (w przedziałach czasowych ok. 5 dni) uwalniane są do krwiobiegu, gdzie dochodzi do inwazji erytrocytów i ustanowienia bakteriemii [53]. Mutanty w genach składników T4SS (type four secretion system) nie są zdolne do wnikania do komórek endotelium. Aktywność układu sekrecyjnego T4SS jest również konieczna do wywoływania inwazji erytrocytów [50].

Region DNA zawierający geny *virB/virD4* oraz geny kodujące efekторы tego układu sekrecyjnego stanowi wyspę patogenności PAI. Organizacja genetyczna genów kodujących białka budujące aparat sekrecyjny oraz ich sekwencje nukleotydowe są silnie konserwowane, podczas gdy nukleotydowe sekwencje kodujące efekторы systemu podlegają wielu zmianom. Częstość mutacji w obrębie genów kodujących białka Bep ((*Bartonella*-translocated effector proteins) znacząco przewyższa częstość zmian w obrębie genów metabolizmu podstawowego [46]. Na *locus* T4SS u *B. tribocorum*, składa się 10 genów *virB* (*virB2-virB11*) i poniżej nich położone *fic-1* oraz *virD4*. Organizacja operonu i sekwencja aminokwasowa homologów 10 białek VirB2-11 w proteomach *B. henselae* i modelowej *B. tribocorum* jest bardzo podobna [18], większość z tych genów tworzy jedną jednostkę transkrypcyjną oraz wykazuje sprzężenie translacyjne. Pomiędzy *virB6* a *virB7* w genomach obu gatunków występuje fragment DNA zdolny do tworzenia struktury szpilki do włosów, przypominający terminator transkrypcji co wskazuje, że mogą one być transkrybowane oddzielnie. Transkrypcja genu poprzedzającego *virB2* ukierunkowana jest już przeciwnie do pozostałych genów operonu. U *Bartonella* sp. w przeciwieństwie do homologicznego regionu u *A. tumefaciens*

operon nie zawiera genu *virB1* [51]. Kluczowymi czynnikami w patogenezie są białka VirB4 oraz VirD4 [14, 18]. Produkty 10 genów *virB* i białko VirD4 budują pilus oraz kompleks poru (białka VirB: 3, 6, 8, 9, 10), który przenika przez obie błony bakterii Gramujemnych oraz membranę komórek docelowych. Silnie immunogenne białko VirB5 wchodzi w skład końcowej części pilusa i funkcjonuje jako adhezyna; VirB2 jest głównym białkiem budującym pilus-piliną. Białko VirD4 (T4CP – type 4 secretion coupling protein) zlokalizowane w błonie wewnętrznej komórki bakteryjnej rozpoznaje transportowany substrat. Wykazuje też, podobnie jak VirB4 i VirB11, aktywność ATPazy, co dostarcza energii niezbędnej do translokacji efektorów [14]. Poniżej operonu kodującego białka T4SS zlokalizowane są geny kodujące białka efektorowe BepA-G) translokowane do komórek docelowych. Białka Bep wykazują modułową budowę, a ich sekwencje aminokwasowe charakteryzują się wysokim poziomem plastyczności. Są to proteiny o konserwowanej części karboksylowej i N-końcu o zmiennej sekwencji aminokwasowej [54]. Wszystkie siedem białek Bep zawiera w C-terminalnym fragmencie konserwowany region BID (Bep intracellular delivery domain), który wraz z dodatkowym ładunkiem tej domeny stanowi podwójny sygnał rozpoznawany przez aparat sekrecyjny T4SS. BepA, B i C są homologiczne i w części N-terminalnej posiadają domenę FIC (filamentation induced by cAMP) o niewyjaśnionej funkcji [14]. Udokumentowano, że właściwym substratem T4SS jest domena karboksylowa BepA, to ona jest translokowana do komórek docelowych [49]. N-końcowe domeny białek Bep D, E, F zawierają także charakterystyczne dla białek *Eukaryota* sekwencje aminokwasowe, których tyrozyna podlega fosforylacji w trakcie translokacji do komórek docelowych, co pozwala na indukcję zmian w procesach przekazywania sygnału komórek gospodarza. Dla białka BepD zajęcie tej modyfikacji zostało udowodnione [3, 41, 54].

Funkcja białek Bep nie jest dokładnie poznana. Najdokładniej scharakteryzowano białko BepA, które odpowiedzialne jest za blokowanie procesu apoptozy (to zjawisko opisano niżej). Ciekawy jest fakt, że taką samą funkcję wykazuje jego 15 kDa domena BID. Schindlger i wsp. stosując pomiar procesów bakteryjnej angiogenezy *in vitro* udokumentowali, że podczas infekcji komórek HUVEC dzikim szczepem *B. henselae* dochodzi do tworzenia charakterystycznych wypustek a proces ten jest zahamowany gdy w teście stosowane są mutanty z *bepA-D*. Dostarczenie *in trans* (na plazmidzie) do komórek mutantów genów *bep* pozwoliło ustalić rolę ich produktów. Mutacja komplementowana była przez gen *bepA* ale nie *bepG* [48]. Wyniki te zgodne są z danymi



Rys. 1. Model działania białek efektorowych *B. henselae* na komórki endotelium.

BepA – lokalizacja błonowa: wzrost koncentracji cAMP dzięki wpływowi na poziom heterotrimericznych białek G: GPCR (G-protein coupled receptors), cyklaz adenylanowych: AC (cAMP producing adenylate cyclases), fosfodiesteraz degradujących cAMP: PDE (cAMP-degrading phosphodiesterases). Niektóre efekторы zawierają motywy fosforylacji tyrozynowej, charakterystyczne dla *Eukaryota* (SH2: Src homology 2); fosforylacja przez Src umożliwia ingerencję w komórkowe szlaki sygnalizacyjne. Hamowanie apoptozy i rekrutacja białych krwinek skutkuje stanem zapalnym, sprzyjającym angioproliferacji. Przemiany cytoszkieletu niezbędne są dla pobrania agregatu bakteryjnego na drodze inwazji, pośrednio mają zatem również wpływ na długotrwałą kolonizację, promującą proliferację endotelium. Mitogenność *B. henselae* jest niezależna od VirB/VirD4 T4SS (działanie przeciwstawne) [wg 41].

przedstawionymi przez R h o m b e r g i wsp., którzy wykazali, że białka BepA i BepG działają antagoniście. BepG blokuje aktywność układu sekrecyjnego VirB/VirD4 i proces endocytozy a jednocześnie promuje pobranie inwazji bakteryjnego [43].

Wiele bakterii rodzaju *Bartonella* koduje także drugi system tego typu, mianowicie Trw T4SS. Białka *B. tribocorum* budujące ten system wykazują około 80% identyczności sekwencji aminokwasowych w stosunku do białek maszyny koniugacyjnej plazmidu opornościowego R388, a kodujące go geny stanowią wyspę patogenności [56]. Na stosunkowo niedawne uzyskanie tego fragmentu DNA przez *B. tribocorum* drogą horyzontalnego transferu genów wskazuje dodatkowo obecność w dystalnej pozycji *locus* genu kodującego нефункциональную fagową integrację. Organizacja genetyczna i regulacja *loci trw* przez represję (KorA/KorB), są konserwowane wśród przedstawicieli poszczególnych gatunków. Białka KorA/KorB kodowane są w obrębie *locus trw* i w sposób negatywny kontrolują ekspresję genów kodujących wszystkie składniki T4SS. W homologicznym systemie plazmidu pKM101 (także R388) heterodimer białek KorA/KorB wiąże się do specyficznej powtórzonej nukleotydowej sekwencji odwróconej (inverted repeats) – tzw. *kor-box* – i tym samym blokuje transkrypcję z promotora, na który ta nukleotydowa sekwencja zachodzi [36]. Sekwencja *kor-box* jest obecna we wszystkich promotorach *locus trw* [56]. Mutanty w *locus trw*, szczególnie w genie *trwE* (odpowiednik *virB10*) zdolne są tylko do kolonizacji niszy pierwotnej (EC), nie wnikają

zaś do erytrocytów [15, 52]. Podobnie mutanty *B. birlesii* w obrębie tego *locus* nie są w stanie wywołać bakteriemii u myszy [31]. Do ekspresji genów *locus trw* dochodzi na etapie opuszczenia pierwotnej niszy, *in vitro* bowiem powinowactwo bakterii do erytrocytów jest niewielkie. Pomimo, że *locus trw* koduje wszystkie białka konieczne do uformowania poru oraz pilusa, w tym układzie nie jest kodowane białko – homolog VirD4, niezbędne do translokacji białek efektorowych do komórek docelowych. Za pośrednictwem Trw dokonuje się kontakt bakteria – erytrocyt, konieczny do zajęcia inwazji erytrocytów, a aktywność systemu Trw nie jest potrzebna do infekcji EC. Alternatywna hipoteza zakłada, że brak białka homologicznego do VirD4 może być komplementowany przez VirD4 drugiego systemu sekrecyjnego. Podjednostki pilusa tego systemu T4SS decydują o tropizmie komórkowym bakterii m.in. odpowiadają za wiązanie do antygenów grup krwi na powierzchni erytrocytów. Wysoki poziom zmienności struktury aparatu sekrecyjnego Trw może być odpowiedzialny za tropizm gatunkowy poszczególnych gatunków rodzaju *Bartonella*. Tandemowe duplikacje w obrębie tego *locus* pozwalają na koekspresję wielu wariantów komponentów pilusowych: TrwL (piliny) oraz TrwJ (komponentu mniejszego). Inne zduplikowane geny *trwI* i *trwH* kodują homologi VirB6 wymagane do elongacji pilusa i jego zakotwiczenia w membrane zewnętrznej (homolog VirB7) [14, 56]. Obecność wielu kopii tych genów daje możliwość tworzenia różnych „wersji” pilusów, co może decydować o rozpoznawaniu różnych

receptorów na powierzchni erytrocytów gospodarza i tym samym decydować o specyficzności w zakresie gospodarza [14].

Poza wymienionymi wyżej systemami sekrecji T4SS w genomach *Bartonella* sp. zidentyfikowano jeszcze kilka czynników, które mogą brać udział w patogenezie. Są to między innymi Hbp/Pap 31 (HbpA u *B. quintana* i jego homolog: Pap31 u *B. henselae*) z grupy białek wiążących heminę (hemin binding protein) [8]. HbpA wykazuje cechy typowe dla białek zewnętrznej błony bakteryjnej OMP, przypisuje się mu także funkcje pośredniczenia w adhezji do fibronektyny oraz do heparyny obecnej na powierzchni komórek endotelium. Innym istotnym czynnikiem patogenezy jest indukcyjny autotransporter *Bartonella* – IBA (inducible *Bartonella* autotransporter), właściwie cała rodzina pokrewnych białek, kodowanych przez geny *iba*, których ekspresja jest specyficznie regulowana podczas infekcji EC lub w trakcie ich opuszczania. Odgrywają one także rolę w procesie inwazji erytrocytów [57]. BadA, największe znane białko bakteryjne – 340 kDa – jest silnie immunogenną adhezyją, autotransporterem o modułowej strukturze i domenach homologicznych do YadA *Yersinia enterocolitica* (rodzina TAA – trimeric autotransporter adhesins), pośredniczącą w wiązaniu do glikoprotein ECM (kolagen I/III/IV, laminina i fibronektyna), komórek nabłonka i śródbłonka, blokującą proces fagocytozy oraz odpowiedzialną za autoaglutynację bakterii. Ekspresja BadA jest dodatkowo niezbędna do aktywacji HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1: czynnika indukowanego niedotlenieniem) i sekrecji VEGF (czynnika wzrostu nabłonka naczyń krwionośnych) [25, 44, 59]. Homologiczne białka błony zewnętrznej zidentyfikowane w proteomach szczepów *B. quintana* nazwano VomPA-D (variably expressed outer-membrane protein A-D). Biorą one także udział w procesach autoagregacji komórek oraz adhezji do kolagenu. Nie są jednak wytwarzane przez wszystkie szczepy a mechanizmy warunkujące zmienność ich ekspresji nie są do końca wyjaśnione. Szczepy nie wytwarzające Vomp nie indukują sekrecji VEGF [55, 69].

Locus ial (invasion associated locus) konserwowany w genomach *Bartonella* sp. [35] składa się z 2 genów: *ialA* oraz *ialB*. Pierwszy z nich koduje hydrolazę polifosforanów nukleozydów (rodzina MutT), enzym ułatwiający usuwanie z komórki bakterii toksycznych pochodnych nukleotydydów oraz regulujący poziom nukleotydydów sygnalizacyjnych [9]. Gen *ialB* koduje białko wielkości 18-kDa zlokalizowane w błonie wewnętrznej o 60% identyczności do sekwencji aminokwasowej *Ail* (adhesion and invasion locus) *Yersinia enterocolitica*. Białka *Ial* *Bartonella* sp. są prawdopodobnie zaangażowane w proces inwazji erytrocytów, choć mechanizm tego zjawiska nie jest w szczegółach

poznany [34]. Udokumentowano, iż wprowadzenie do nieinwazyjnych komórek *E. coli* genów *ialA* oraz *ialB* nadaje tym bakteriom *in vitro* fenotyp inwazyjny względem czerwonych krwinek oraz że unieczynnienie genu *ialB* *B. bacilliformis* skutkuje obniżeniem poziomu wnikania do erytrocytów o 50% [15]. Powyżej *locus ial* zlokalizowane są: gen *ctpA* (kodujący karboksyterminalną proteazę, częściowo homologiczną do proteazy *S. Typhimurium* warunkującej przetrwanie patogenu wewnątrz makrofagów) i gen *filA* (kodujący filamentowy peptyd A, pod względem sekwencji aminokwasowej podobny np. do białka M1 *S. pyogenes*, zaangażowanego również w procesy adhezji i inwazyjności [22, 33]).

4. Inhibicja apoptozy

Istotnym elementem indukcji angiogenezy przez bakterie z rodzaju *Bartonella* jest hamowanie apoptozy komórek endotelialnych zarówno na wczesnych, jak i późniejszych etapach infekcji [27]. Główną rolę odgrywa w tym procesie substrat T4SS – białko BepA zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej komórki gospodarza. Jego aktywność skutkuje podwyższeniem poziomu komórkowego cAMP oraz zwiększoną ekspresją genów zależnych od tego czynnika. BepA, jak pokazują badania Schmid i wsp. [49], chroni EC przed apoptozą indukowaną przez limfocyty T cytotoksyczne, które są mechanizmem obronnym w trakcie chronicznych infekcji śródbłonka przez patogeny wewnątrzkomórkowe. Białko BepA pozytywnie reguluje ekspresję genów wchodzących w skład regulonów CREM/CREB (odpowiednio: cAMP response element modulator, cAMP response element binding), zależnych od NFκB i cAMP, na co wskazują porównawcze analizy transkryptomu komórek linii HUVEC zainfekowanych *B. henselae* szczepem dzikim oraz mutantem awirulentnym ($\Delta virB4$) [47]. Wczesne etapy apoptozy mikroorganizmy rodzaju *Bartonella* hamują przez wpływ na poziom kaspazy: 3 oraz 8, późniejsze – dzięki wpływowi na endonukleazy biorące udział we fragmentacji DNA. Aktywność antyapoptotyczna ograniczona jest do komórek pochodzenia nabłonkowego i prawdopodobnie silnie zależy od aktywacji GTPazy Rac, która przyczynia się do wzmożonej proliferacji i blokowania apoptozy [27].

5. NFκB – główny regulator reakcji zapalnej

Komórki śródbłonkowe odgrywają istotną rolę w stymulacji stanu zapalnego. Kontrolują one przepuszczalność naczyń krwionośnych, pozwalając na przejście leukocytów do miejsca infekcji i produkcję

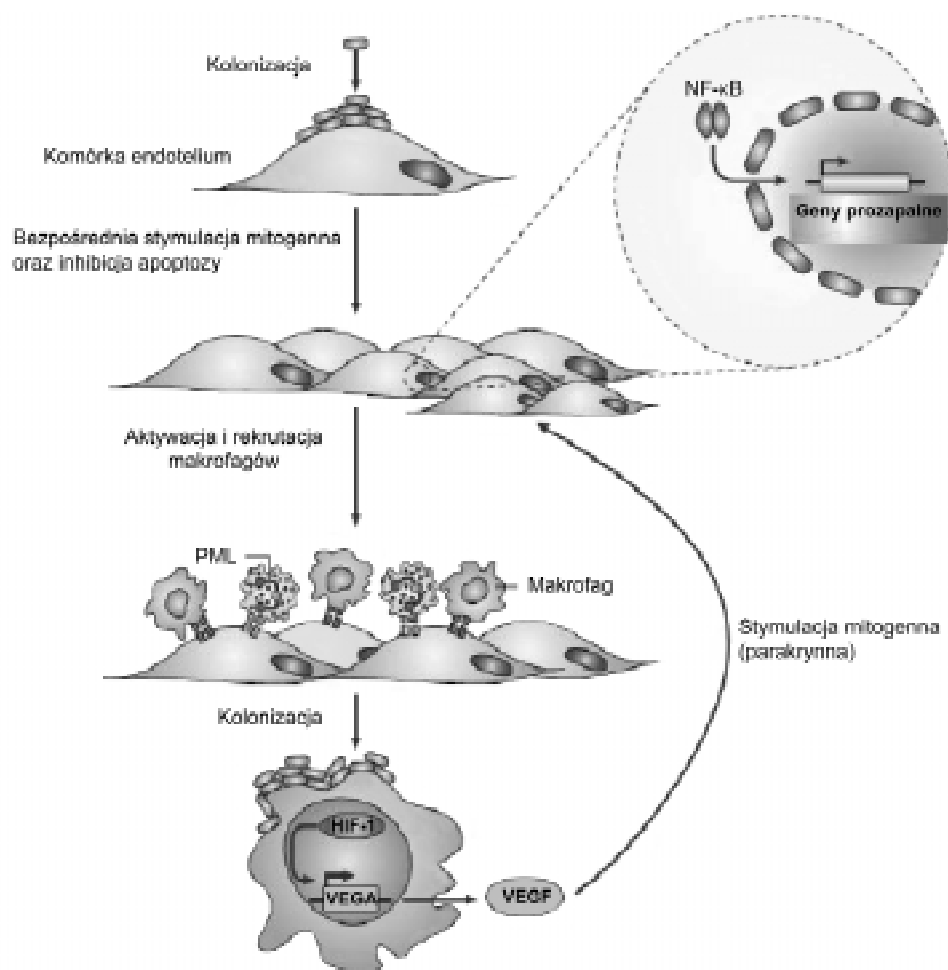
cytokin prozapalnych IL-1, IL-6, IL-8 oraz cząstek adhezyjnych. Udział w odpowiedzi wrodzonej umożliwiają im receptory TLR, które przekazują sygnał prowadzący do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB i w efekcie ekspresji cytokin i chemokin, rekrutujących makrofagi odpowiedzialne bezpośrednio za stymulację procesu angiogenezy [16]. Zmiany angioproliferacyjne powstające w trakcie infekcji *B. henselae* infiltrowane są przez PMN oraz makrofagi. Te komórki dzięki stymulacji, wydzielają VEGF i inne mitogeny dla komórek nabłonkowych, w tym też cytokiny prozapalne: TNFα, IL-1β, IL-6. Tak więc przykładowo w komórkach HMEC-1 zainfekowanych *B. henselae* transkrypcja genu kodującego chemokinę należącą do rodziny chemokin C-C: MCP-1 osiąga znacznie wyższy poziom od tego w komórkach niezainfekowanych [32]. Mechanizm warunkujący to zjawisko jest niezależny od aktywacji TLR4 – wiadomo bowiem, że LPS *Bartonella* sp. nie aktywuje tych receptorów. Toksyczność LPS *B. henselae* jest zdecydowanie niższa w porównaniu z wartością wykazywaną przez LPS przeciętnego przedstawiciela *Enterobacteriaceae*, co oszacowano poprzez pomiar produkcji IL-8 po aktywacji TLR4 przez bakteryjny lipopolisacharyd. Brak stymulacji TLR4 przez LPS *B. henselae* wynika z jego nietypowej budowy (niska zawartość węglowodanów, nietypową strukturą rdzenia lipidu A, pentaacetylacją lipidu A). Podobna budowa LPS występuje w przypadku patogenów wewnątrzkomórkowych powodujących chroniczne infekcje, jak np. *Chlamydia* spp., czy *Legionella* spp. [15, 68]. Do aktywacji NFκB dochodzi natomiast w konsekwencji interakcji EC z białkami powierzchniowymi OMP (gł. OMP1) *Bartonella* sp. [20] oraz VirB – T4SS [50]. MCP-1 łączy się z receptorem CCR2B zlokalizowanym na powierzchni monocytów i makrofagów, co warunkuje ich chemotaksję. Dzięki interakcji PMN najpierw z E-selektyną, potem z endotelialnymi ligandami np. ICAM-1 oraz działaniu chemoatraktanta (IL-8) są one również rekrutowane do miejsca infekcji. Geny kodujące wszystkie te czynniki ulegają wzmożonej ekspresji w komórkach nabłonkowych po aktywacji NFκB, co sumarycznie skutkuje najpierw ostrą, potem zaś chroniczną odpowiedzią zapalną w zainfekowanym śródbłonku [16].

6. Parakrynną pętla proliferacji komórek śródbłonka naczyń

Angiogeneza jest sekwencją ściśle powiązanych ze sobą i regulowanych zmian, od proliferacji i migracji komórek nabłonkowych, po ich reorganizację w nowe naczynia krwionośne. Żywe *B. henselae* i *B. quintana*, a także ich lizaty komórkowe indukują zarówno proliferację, jak i migrację komórek nabłonkowych [15, 21].

Fizjologiczna angiogeneza u osób dorosłych zachodzi bardzo rzadko, zaś występująca patologicznie jest markerem m.in. powstawania guza i procesu metastazy. Centralną rolę odgrywa w tym procesie mitogen charakterystyczny dla komórek nabłonkowych: VEGF, który odpowiedzialny jest także za podobne zjawisko w przypadku mięsaka Kaposi’ego. Aktywność tego czynnika zapewnienia odpowiedni przepływ krwi w guzach [67]. Czynnikiem ten po pierwsze wpływa na proliferację komórek endotelium – we współpracy z angiopoietynami [27], efrynami, ale i specyficznym pozakomórkowym białkiem bakteryjnym [21, 29]. Po drugie umożliwia migrację komórek nabłonkowych oraz zmianę morfologii monowarstwy endotelium, co dzieje się na skutek fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny za pośrednictwem GTPaz RhoA. Co ciekawe, komórki nabłonkowe zainfekowane *Bartonella* sp. mają bardzo ograniczoną zdolność ruchu, prawdopodobnie ze względu na formowanie w nich gęstych aktynowych włókien w wyniku rearanżacji cytoszkieletu [63]. Tak więc komórki, które uczestniczą w budowie nowych naczyń krwionośnych nie są komórkami zainfekowanymi, odpowiadają tylko na VEGF produkowany przez makrofagi [15]. Pojawienie się VEGF jest regulowane przez wiele czynników: reaktywne formy tlenu, hipoglikemię oraz hipoksję występującą w wielu guzach. Reakcja komórek na takie warunki skutkuje bowiem aktywacją odpowiednich czynników transkrypcyjnych, które to z kolei podwyższają poziom ekspresji genu kodującego VEGF. Tak na przykład hipoksja indukuje transkrypcję genu kodującego HIF1 (hypoxia inducible factor 1), który następnie uaktywnia transkrypcję genu kodującego VEGF. Opisano też mechanizm aktywacji VEGF bez udziału tego czynnika [15, 38]. *Bartonella* sp. indukują angioproliferację na dwa niezależne sposoby: bezpośrednio przez inhibicję apoptozy i indukcję proliferacji komórek nabłonkowych oraz pośrednio, poprzez stymulację parakrynną pętli angioproliferacji [15]. Zarówno VEGF, jak i IL-1β – stymulująca działanie VEGF – są uwalniane z makrofagów w odpowiedzi na infekcję *B. henselae* [24, 42]. Neutrofile także są zdolne do produkcji VEGF, jednak ten przypadek jest słabiej poznany (EC, w porównaniu do aktywowanych komórek układu odpornościowego, są słabymi producentami VEGF – brak autokrynną stymulacji) [24, 29].

Poza VEGF w promowaniu angioproliferacji uczestniczy także niezidentyfikowany czynnik bakteryjny. Wykazano, iż ten angiogeniczny czynnik *B. bacilliformis* jest wrażliwy na wysoką temperaturę, ma masę cząsteczkową większą niż 14 kDa oraz wytrąca go 45% siarczan amonu, stąd wnioskuje się o jego białkowym charakterze. O czynnikach angiogenicznych *B. quintana* i *B. henselae* wiadomo mniej, jednak wykazano ich inaktywację po działaniu trypsyną. Postuluje



Rys. 2. Model angioproliferacji wywołanej infekcją *Bartonella* sp. [wg 13]. Objaśnienia w tekście

się rolę białka GroEL, które odnajdywane jest we frakcji membran bakteryjnych, aczkolwiek może być aktywnie wydzielane poza komórkę poprzez T4SS. Jego rola nie została całkowicie wyjaśniona; nie wiadomo, czy działa ono bezpośrednio, czy też stanowi białko opiekuńcze dla właściwego białka stymulującego proliferację [15]. Tkanki z naczyniakowych zmian BA wykazują też wysoki poziom markerów angiogenicznego śródbłonna – receptorów VEGF: VEGFR1 i VEGFR2. Regułą jest, że nadekspresji VEGF towarzyszy nadekspresja jego receptorów w komórkach endotelium oraz ostatecznie złośliwa transformacja tych komórek w kierunku angiosarcomy [2]. Zmiany angiogenne powodowane infekcją *Bartonella* sp. są raczej łagodne (podobnie jak łagodne są guzy typu haemangioma), co może sugerować, że mechanizm zależny od VEGF nie jest w tym wypadku jedynym odpowiedzialnym za obserwowany fenotyp. W endotelium dotkniętym „verruca peruana” zaobserwowano też wysoki poziom ekspresji genu kodującego angiopoietynę 2. Białko to może działać jako chemoatraktant dla krążących progenitorowych komórek nabłonkowych [10]. Wykazano także jego wpływ na promocję

wzrostu nowotworowych guzów [60]. Aktywacja receptora angiopoietyny 2 stymuluje pobudzenie szlaku sygnalizacyjnego kinazy fosfoinozytolu-3/akt, co jest związane z hamowaniem apoptozy a także angioproliferacją [26]. Komórki tkanek dotkniętych zmianami typu „verruca peruana” wykazują także wysoki poziom aktywnej MAP-kinazy (P-MAPK). Wydaje się więc, że na indukcję procesu angioproliferacji składają się efekty współdziałania autokrynnnej produkcji angiopoietyny 2 i parakrynnnej – VEGF [10].

B. henselae wykazuje zdolność do znacznie szybszego wzrostu w dzielących się komórkach endotelium. Bakterie indukujące zmiany histopatologiczne typu BA lub BP tworzą sobie więc dogodną niszę, zapewniającą im optymalne warunki do życia [24].

7. Podsumowanie

Bakterie z rodzaju *Bartonella* jeszcze do niedawna uważane były za mikroorganizmy zupełnie niegroźne. Dziś wiadomo, iż powodują one wiele zmian chorobowych, na tyle poważnych, że zaliczono *Bartonella* sp.

do grupy tzw „emerging pathogens”. Charakterystyczny dla licznych gatunków tego rodzaju „tryb życia”, pasożytnictwo wewnątrzerytrocytowe, przenoszenie za pośrednictwem wektorów – krwio pijnych stawonogów, a także specyficzność do dwóch typów komórek: erytrocytów i śródbłonna. I właśnie wpływ bakterii na endotelium ma kluczowe znaczenie w patogenezie infekcji. *Bartonella* sp. mają bowiem zdolność promowania proliferacji, hamowania apoptozy w śródbłonku zarówno bezpośrednio – za sprawą czynników wirulencji, z których największą rolę odgrywają T4SS VirB/VirD4 i translokowane przezeń białka efektorowe – jak i pośrednio, z wykorzystaniem eukariotycznej maszyny regulacyjnej. W konsekwencji tych oddziaływań budowane są nowe naczynia krwionośne, powstają charakterystyczne guzy endotelialne, co często histopatologicznie może być nieodróżnialne od typowych zmian neoplastycznych tej tkanki. Aktywacja NFκB, stan zapalny, wzmożona produkcja VEGF i działanie angiopietyn – wszystko to towarzyszy zarówno infekcji *Bartonella* sp., jak i formowaniu naczynek. Guzy stymulowane po infekcji *Bartonella* spp. są raczej łagodne, jednakże ich powstawanie może stanowić dowód na to, iż korelacje infekcji i stanu zapalnego z kancerogenezą (może niebezpośrednie) naprawdę istnieją. Coraz szersza staje się zatem grupa bakterii związanych epidemiologicznie lub na poziomie molekularnym z nowotworzeniem: od uznanego za kancerogen *H. pylori*, przez np. *S. enterica* sv. Typhi, której nosicielstwo w pęcherzyku żółciowym zwiększa ryzyko raka tego narządu (czego dowodzą dane epidemiologiczne), przez mikroorganizmy produkujące specyficzne toksyny, mające wpływ na przebieg eukariotycznego cyklu komórkowego, regulację szlaków sygnalizacyjnych, życia i śmierci naszych komórek, po *Bartonella* sp. i wywoływaną przez nie angioproliferację.

Piśmiennictwo

- Alsmark C.M., Andersson S.G. i wsp.: The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9716–9721 (2004)
- Arbiser J.L., Larsson H., Claesson-Welsh L., Bai X., LaMontagne K., Weiss S.W., Soker S., Flynn E., Brown L.F.: Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to slowly growing angiosarcoma and high-level expression of the VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 *in vivo*. *Am. J. Pathol.* **156**, 1469–1476 (2000)
- Backert S., Selbach M.: Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol.* **13**, 476–484 (2005)
- Batterman H.J., Peek J.A., Loutit J.S., Falkow S., Tompkins L.S.: *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect. Immun.* **63**, 4553–4556 (1995)
- Billeter S.A., Diniz P.P., Battisti J.M., Munderloh U.G., Breitschwerdt E.B., Levy M.G.: Infection and replication of *Bartonella* species within a tick cell line. *Exp. Appl. Acarol.* **49**, 193–208 (2009)
- Boulouis H.J., Chang C.C., Henn J.B., Kasten R.W., Chomel B.B.: Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res.* **36**, 383–410 (2005)
- Buckles E.L., McGinnis Hill E.: Interaction of *Bartonella bacilliformis* with human erythrocyte membrane proteins. *Microb. Pathog.* **29**, 165–174 (2000)
- Carroll J.A., Coleman S.A., Smitherman L.S., Minnick M.F.: Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infect. Immun.* **68**, 6750–57 (2000)
- Cartwright J.L., Britton P., Minnick M.F., McLennan A.G.: The IalA invasion gene of *Bartonella bacilliformis* encodes a (de)nucleoside polyphosphate hydrolase of the MutT motif family and has homologs in other invasive bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 474–479 (1999)
- Cerimele F., Brown L.F., Bravo F., Ihler G.M., Kouadio P., Arbiser J.: Infectious angiogenesis: *Bartonella bacilliformis* infection results in endothelial production of angiopoietin-2 and epidermal production of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Pathol.* **163**, 1321–1327 (2003)
- Chomel B.B., Kasten R.W.: Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J. Appl. Microbiol.* (2010), doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04679.x
- Cotte V., Bonnet S., Le Rhund D., Le Naour E., Chauvin A., Boulouis H.J., Lecuelle B., Lilin T., Vayssier-Taussat M.: Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1074–1080 (2008)
- Dehio C.: *Bartonella*- host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 621–631 (2005)
- Dehio C.: Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell. Microbiol.* **10**, 1591–1598 (2008)
- Dehio C.: Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 365–390 (2004)
- Dehio C.: Recent progress in understanding *Bartonella*-induced vascular proliferation. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 61–65 (2003)
- Dehio C., Meyer M., Berger J., Schwarz H., Lanz C.: Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J. Cell Sci.* **110**, 2141–2154 (1997)
- Dehio C., Schulein R.: The VirB/VirD4 type secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol. Microbiol.* **46**, 1053–1067 (2002)
- Engel P., Dehio C.: Genomics of host-restricted pathogens of the genus *Bartonella*. *Genome Dyn.* **6**, 158–169 (2009)
- Fuhrmann O., Arvand M., Gohler A., Schmid M., Krull M., Hippenstiel S., Seybold J., Dehio C., Suttrop N.: *Bartonella henselae* induces NF-κB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect. Immun.* **69**, 5088–5097 (2001)
- Garcia F.U., Wojta J., Broadley K.N., Davidson J.M., Hoover R.L.: *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells *in vitro* and is angiogenic *in vivo*. *Am. J. Pathol.* **136**, 1125–1135 (1990)
- Greub G., Raoult D.: *Bartonella*: new explanations for old diseases. *J. Med. Microbiol.* **51**, 915–923 (2002)

23. Guptill L.: Bartonellosis. *Vet. Microbiol.* **140**, 347–359 (2010)
24. Kempf V.A.J., Volkmann B., Schaller M., Sander C.A., Alitalo K., Riess T., Autenrieth I.B.: Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell. Microbiol.* **3**, 623–632 (2001)
25. Kempf V.A., Lebedziejewski M., Alitalo K., Wälzlein J.H., Eehalt U., Fiebig J., Huber S., Schütt B., Sander C.A., Müller S., Grassl G., Yazdi A.S., Brehm B., Autenrieth I.B.: Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation*, **111**, 1054–1062 (2005)
26. Kim I., Kim J.H., Moon S.O., Kwak H.J., Kim N.G., Koh G.Y.: Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt signal transduction pathway. *Oncogene*, **19**, 4549–4552 (2000)
27. Kirby J.E., Nekorchuk D.M.: *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4656–4661 (2002)
28. Kordick D.L., Breitschwerdt E.B.: Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1655–1656 (1995)
29. Maeno N., Oda H., Yoshiie K., Rezwanul Whahid M., Fujimura T., Matayoshi S.: Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact. *Microb. Pathog.* **27**, 419–427 (1999)
30. Maurin M., Raoult D.: *Bartonella (Rochalimaea)* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 273–292 (1996)
31. Mavris M., Saenz H., Monteil M., Boulouis H.J., Dehio C., Vayssier-Taussat M.: Characterization of genes involved in long-term bacteremia in mice by *Bartonella birtlesii*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1063**, 312–314 (2005)
32. McCord A.M., Burgess A.W.O., Whaley M.J., Anderson B.E.: Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells promotes monocyte/macrophage chemoattractant protein 1 gene expression and protein production and triggers monocyte migration. *Infect. Immun.* **73**, 5735–5742 (2005)
33. Minnick M.F., Anderson B.E.: *Bartonella* interactions with host cells. *Subcell Biochem.* **33**, 97–123 (2003)
34. Mitchell S.J., Minnick M.F.: Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect. Immun.* **63**, 1552–1562 (1995)
35. Mitchell S.J., Minnick M.F.: Cloning, functional expression, and complementation analysis of an inorganic pyrophosphatase from *Bartonella bacilliformis*. *Can. J. Microbiol.* **43**, 734–743 (1997)
36. More M.I., Pohlman R.F., Winans S.C.: Genes encoding the pKM101 conjugal mating pore are negatively regulated by the plasmid-encoded KorA and KorB proteins. *J. Bacteriol.* **178**, 4392–4399 (1996)
37. Perkocha L.A., LeBoit P.E. i wsp.: Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatitis in association with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1581–1586 (1990)
38. Perry B.N., Arbiser J.L.: The duality of angiogenesis: implications for therapy of human disease. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2160–2166 (2006)
39. Podsiadły E., Karbowski G., Tylewska-Wierzbanowska S.: Presence of *Bartonella* spp. in *Ixodidae* ticks. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 120–121 (2009)
40. Podsiadły E., Sokołowska E., Tylewska-Wierzbanowska S.: Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* infections in Poland in 1998–2001. *Przegl. Epidemiol.* **56**, 399–407 (2002)
41. Pulliainen A.T., Dehio C.: *Bartonella henselae*: subversion of vascular endothelial cell functions by translocated bacterial effector proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 507–510 (2009)
42. Resto-Ruiz S.I., Schmiederer M., Sweger D., Newton C., Klein T.W., Friedman H., Anderson B.E.: Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect. Immun.* **70**, 4564–4570 (2002)
43. Rhomberg T.A., Truttmann M.C., Guye P., Ellner Y., Dehio C.: A translocated protein of *Bartonella henselae* interferes with endocytic uptake of individual bacteria and triggers uptake of large bacterial aggregates via the invasome. *Cell. Microbiol.* **11**, 927–945 (2009)
44. Riess T., Andersson S.G., Lupas A., Schaller M., Schäfer A., Kyme P., Martin J., Wälzlein J.H., Eehalt U., Lindroos H., Schirle M., Nordheim A., Autenrieth I.B., Kempf V.A.: *Bartonella* Adhesin A mediates a proangiogenic host cell response. *J. Exp. Med.* **200**, 1267–1278 (2004)
45. Rolain J.M., Foucault C., Guieu R., La Scola B., Brouqui P., Raoult D.: *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Lancet*, **360**, 226–228 (2002)
46. Saenz H.L., Engel P., Stoeckli M.C., Lanz C., Raddatz G., Vayssier-Taussat M., Birtles R., Schuster S.C., Dehio C.: Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion systems as host adaptability factors. *Nat. Genet.* **39**, 1469–1476 (2007)
47. Sassone-Corsi P.: Coupling gene expression to cAMP signaling: Role of CREB and CREM. *Int. J. Biochem Cell Biol.* **30**, 27–38 (1998)
48. Scheidegger F., Ellner Y., Guye P., Rhomberg T.A., Weber H., Augustin H.G., Dehio C.: Distinct activities of *Bartonella henselae* type IV secretion effector proteins modulate capillary-like sprout formation. *Cell. Microbiol.* **11**, 1088–1101 (2009)
49. Schmid M.C., Scheidegger F., Dehio M., Balmelle-Devaux N., Schulein R., Guye P., Chennakesava C.S., Biedermann B., Dehio C.: A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis. *PLoS Pathog.* **2**, e115 (2006)
50. Schmid M.C., Schulein R., Dehio M., Denecker G., Carena I., Dehio C.: The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **52**, 81–92 (2004)
51. Schmiederer M., Anderson B.: Cloning, sequencing and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens virB* region. *DNA Cell Biol.* **19**, 141–147 (2000)
52. Schroder G., Dehio C.: Virulence-associated type IV secretion systems of *Bartonella*. *Trends Microbiol.* **13**, 336–342 (2005)
53. Schulein R., Seubert A., Gille C., Lanz C., Hansmann Y., Piemont Y., Dehio C.: Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J. Exp. Med.* **193**, 1077–1086 (2001)
54. Schulein R., Vergunst A.C. i wsp.: A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 856–861 (2005)
55. Schulte B., Linke D., Klumpp S., Schaller M., Riess T., Autenrieth I.B., Kempf V.A.J.: *Bartonella quintana* variably

- expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. *Infect. Immun.* **74**, 5003–5013 (2006)
56. Seubert A., Hiestand R., de la Cruz F., Dehio C.: A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **49**, 1253–1266 (2003)
57. Seubert A., Schulein R., Dehio C.: Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 555–560 (2002)
58. Spach D.H., Callis K.P., Paauw D.S., Houze Y.B., Schoenknecht F.D., Welch D. F., Rosen H., Brenner D.J.: Endocarditis caused by *Rochalimaea quintana* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 692–694 (1993)
59. Szczesny P., Linke D., Ursinus A., Bar K., Schwarz H., Riess T.M., Kempf V.A., Lupas A.N., Martin J., Zeth K.: Structure of the head of the *Bartonella* adhesin BadA. *PLoS Pathog.* **4**, e1000119 (2008)
60. Tanaka S., Mori M., Sakamoto Y., Makuuchi M., Sugimachi K., Wands J.R.: Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Invest.* **103**, 341–345 (1999)
61. Ticona E., Huaroto L., Garcia Y., Vargas L., Madariaga M.G.: The pathophysiology of the acute phase of human bartonellosis resembles AIDS. *Med. Hypotheses*, **74**, 45–49 (2010)
62. Vayssier-Taussat M., Le Rhun D., Bonnet S., Cotte V.: Insights in *Bartonella* host specificity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1166**, 127–132 (2009)
63. Verma A., Davis G.E., Ihler G.M.: Formation of stress fibres in human endothelial cells infected with *Bartonella bacilliformis* is associated with altered morphology, impaired migration and defects in cell morphogenesis. *Cell. Immunol.* **3**, 169–180 (2001)
64. Walker T.S., Winkler H.H.: *Bartonella bacilliformis*: colonial types and erythrocyte adherence. *Infect. Immun.* **31**, 480–486 (1981)
65. Weisburg W.G., Woese C.R., Dobson M.E., Weiss E.: A common origin of rickettsiae and certain plant pathogens. *Science*, **230**, 556–558 (1985)
66. Williams-Bouyer N.M., Hill E.M.: Involvement of host cell tyrosine phosphorylation in the invasion of Hep-2 cells by *Bartonella bacilliformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**, 191–201 (1999)
67. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J.: Vascularspecific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, **407**, 242–248 (2000)
68. Zahringer U., Hiestand R. i wsp.: Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J. Biol. Chem.* **279**, 21046–21054 (2004)
69. Zhang P., Chomel B.B., Schau M.K., Goo J.S., Droz S., Kelminson K.L., George S.S., Lerche N.W., Koehler J.E.: A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13630–13635 (2004)