

Wenn Bartonellen ihre Anker auswerfen

Bartonella henselae verbindet Infektionsforschung mit Blutgefäßwachstum



Bei gesunden Menschen verläuft die Infektion mit *Bartonella henselae* als vergleichsweise harmlose »Katzenkratzkrankheit«. Erst mit Beginn der AIDS-Pandemie zeigte sich, dass das Bakterium bei immungeschwächten Patienten auch die pathologische Neubildung von Blutgefäßen auslösen kann. Diese Pathogenitätsstrategie unterscheidet die Spezies der Bartonellen von allen anderen bakteriellen Infektionserregern des Menschen. Für Mikrobiologen ist *Bartonella henselae* deshalb ein interessanter Modellorganismus, weil Blutgefäßwachstum in erster Linie eine Domäne der Tumorforschung ist.

von **Christiane Beerlage,**
Fiona O'Rourke und Volkhard A. J. Kempf

Das Bakterium *Bartonella henselae*, bekannt als Erreger der Katzenkratzkrankheit, besiedelt die Endothelzellen von Blutgefäßen. Diese Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigt die grün markierten Bakterien auf der rosa angefärbten Zelle.

Der Beginn der AIDS-Pandemie Anfang der 1980er Jahre rückte viele Krankheitsbilder in das Bewusstsein der Infektionsmedizin, die davor lediglich als »Raritäten« galten. Keime, die nur unter bestimmten Bedingungen pathogen sind (opportunistische Erreger), machten den immungeschwächten Patienten zu schaffen. Neben atypischen Lungenentzündungen (zum Beispiel verursacht durch *Pneumocystis jirovecii*) häuften sich unter anderem Berichte über Blutgefäßwucherungen bei AIDS-Patienten. Diese litten hierbei unter schmerzhaften, blutgefüllten, tumorähnlichen Schädigungen (Läsionen) der Haut . Später erkannte man, dass diese Läsionen auch in inneren Organen auftreten können und durch das überschießende Wachstum von kleinen Blutgefäßen charakterisiert sind. In Gewebeproben (Biopsien) aus diesen Läsionen wurden mikroskopisch stäbchenförmige Bakterien nachgewiesen. Da eine empirische Antibiotika-Behandlung häufig eine komplette Rückbildung der Erkrankung bewirkte, folgerte man, dass die Gefäßneubildungen durch eine bakterielle Infektion verursacht sind. Das

brachte der Krankheit den Namen »Bazilläre Angiomatose« ein ¹¹. Bald wurde ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen der Krankheit und dem Kontakt der Betroffenen mit Katzen hergestellt.

Molekulare Verfahren zum Nachweis unbekannter Erreger waren zu dieser Zeit noch nicht entwickelt [siehe »Mikrobiologischer Nachweis von Erregern«, Seite 28]. Insofern waren die Kultivierung und anschließende biochemische Charakterisierung von Bakterien die einzige Möglichkeit, neuartige Pathogene zu identifizieren. Im Falle der Bazillären Angiomatose war dies schwierig, da die Erreger sich auf Nährböden nicht gut vermehren lassen. Erst 1991 konnte der Erreger der Bazillären Angiomatose schließlich identifiziert werden. Damals war die Polymerase Kettenreaktion (PCR) zwar schon als Verfahren bekannt, aber erst mit der gezielten Amplifikation konservierter Genabschnitte der 16S-rDNA konnte ein universeller Bakterien-Nachweis etabliert und im Falle der Bazillären Angiomatose zum erfolgreichen Einsatz gebracht werden. Dies gelang erstmals David Relman an der Stanford

University (Kalifornien, USA). Er identifizierte die bis dahin unbekanntenen Bakterien zunächst als *Bartonella quintana*-ähnliche Spezies¹⁸¹. Sie wurden dann endgültig als *Bartonella henselae* klassifiziert. Später stellte sich heraus, dass die bereits bekannte bakterielle Spezies *B. quintana* ebenfalls vaskuloproliferative Erkrankungen auslösen kann.

Von einem nahe verwandten Bakterium der gleichen Gattung, *Bartonella bacilliformis*, wusste man zu dieser Zeit bereits, dass es ähnliche Krankheitsbilder auslösen kann: Die Carrion'sche Erkrankung zeichnet sich in der ersten Phase durch eine Vermehrung der Erreger in den roten Blutkörperchen (Erythrozyten) aus (»Oroya-Fieber«). In der zweiten Phase treten Gefäßneubildungen (»Verruga peruana«) auf. Diese Erkrankung ist auf die südamerikanischen Anden begrenzt. Somit war seit den 1990er Jahren klar, dass die Gattung *Bartonella* Erreger mit vaskuloproliferativen Eigenschaften einschließt (*B. bacilliformis*, *B. henselae*, *B. quintana*). Diese Fähigkeit zur Induktion von Blutgefäßwachstum unterscheidet Bartonellen von allen anderen humanpathogenen Bakterien.

Heute ist es mit komplexen Nährmedien möglich, *B. henselae* sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigmedien zu kultivieren. Im Vergleich zu anderen Erregern wachsen sie jedoch sehr langsam. Mikrobiologisch handelt es sich bei der Spezies der *Bartonella* um gram-negative Stäbchenbakterien, die als alpha-2-Proteobakterien klassifiziert werden. *B. henselae* wächst fakultativ intrazellulär, das heißt, diese Bakterien können sich sowohl innerhalb als auch außerhalb von Wirtszellen vermehren.

Ein Bakterium mit zwei Gesichtern

Viel häufiger als die Bazilläre Angiomatose löst die Infektion mit *B. henselae* die »Katzenkratzkrankheit« aus. Wenn der Erreger von infizierten Katzen auf immunkompetente Menschen (in erster Linie Kinder) übertragen wird, kommt es zu einer ausgeprägten Entzündung der ableitenden Lymphknoten. Während die Katzenkratzkrankheit fast immer spontan ausheilt, verursacht *B. henselae* bei immunsupprimierten Patienten chronische Infektionen, in deren Verlauf offensichtlich angiogenetische Prozesse in Gang gesetzt werden¹¹¹.

Obwohl die Bazilläre Angiomatose wegen der deutlich verbesserten antiretroviralen HIV-Therapie mittlerweile keine große klinische Relevanz mehr besitzt, ist die Tatsache, dass Bartonellen als einzige bekannte bakterielle Spezies angiogenetische Prozesse induzieren können, von großem wissenschaftlichem Interesse. *B. henselae* wird heute als Modellorganismus für die Untersuchung bakterieller Infektionen mit Gefäßbeteiligung angesehen. Dies könnte von fachübergreifendem Interesse sein, da der Prozess der Angiogenese in verschiedenen medizinischen Fragestellungen (etwa

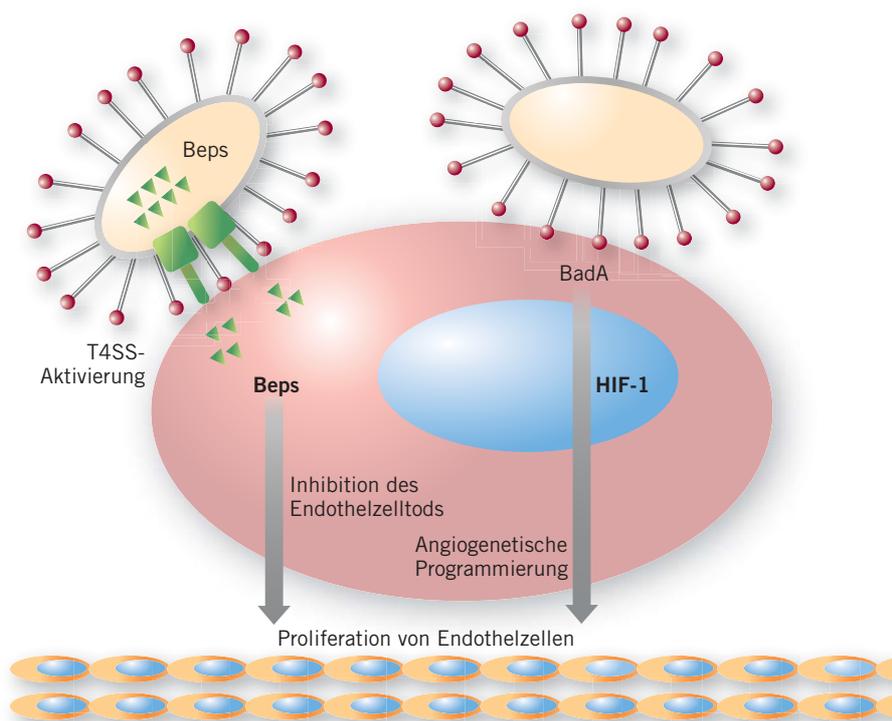


2 Bazilläre Angiomatose. Blutfüllte Hautläsionen bei einer 49-jährigen AIDS-Patientin mit Bazillärer Angiomatose am Unterschenkel. Die Patientin litt an einer fortgeschrittenen HIV-Infektion.

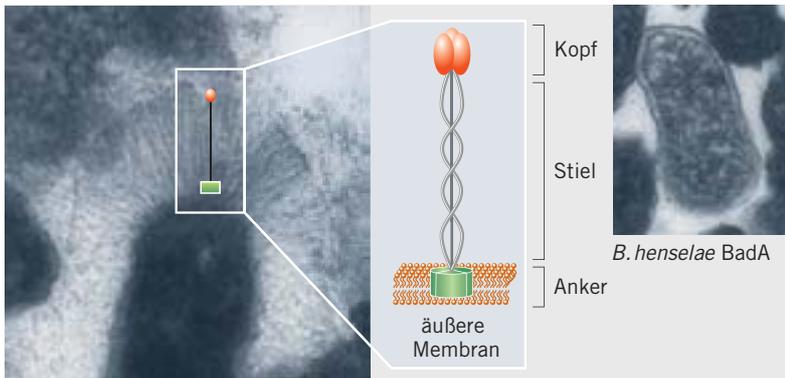
bei malignem Tumorwachstum) eine wichtige Rolle spielt und bakterielle Infektionen im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen immer wieder kontrovers diskutiert werden.

Pathogenität von *B. henselae*

Es ist schwierig, die Pathogenese einer Bazillären Angiomatose zu untersuchen. Dies liegt unter anderem daran, dass *B. henselae* sehr gut an seinen primären Wirt (Katze) sowie an den Fehlwirt (Mensch) angepasst zu sein scheint. Aufgrund dieser Wirtsspezifität existieren bis heute keine Tiermodelle für die Bazilläre Angiomatose. Bislang wurde deshalb der Infektionsprozess von *B. henselae* überwiegend *in vitro* unter Zuhilfenahme von Zellkulturmodellen untersucht, denn Bartonellen können viele verschiedene Zelltypen infizieren. Als Habitat der Erreger gelten Endothelzellen (Zellen, die Blutgefäße auskleiden). Diese Vermutung ist durch die Beobachtung begründet, dass *B. henselae* in den Gefäßwucherungen der Bazillären Angiomatose kulturell, molekularbiologisch und auch mikroskopisch nachweisbar ist¹¹¹. In der Tat erweisen sich Endothelzellen als hochgradig empfindlich für Infektionen mit *B. henselae*. Nach primärer Infektion werden die Bartonellen zum Teil einzeln, zum Teil als bakterielle Agglomerate in die Endothelzellen aufgenommen. Dort per-



3 Biologie von *B. henselae*-Infektionen. In der Auslösung von vaskuloproliferativen Krankheitsbildern durch *B. henselae* überlagern sich wahrscheinlich mehrere Mechanismen. Zum einen kommt es nach Infektion mit den Erregern zur Hemmung des programmierten Zelltods (Apoptose). Dies ist in erster Linie durch Proteine (Beps) verursacht, die vom Bakterium in die Wirtszelle injiziert werden. Zum anderen kommt es (abhängig von der Expression von BadA) zur Aktivierung einer HIF-1 regulierten Zellantwort, die ihrerseits zur Proliferation von Endothelzellen beiträgt.



sistieren die Erreger in einer bisher noch nicht genau charakterisierten Vakuole.

Bartonellen verhindern das Absterben der infizierten Zellen, indem sie über ein spezielles Sekretionssystem (»VirB/D4-Typ IV Sekretionssystem«) bakterielle Proteine in die Zelle injizieren (*Bartonella*-Effektor-Proteine). Diese verhindern die Auslösung des programmierten Zelltods (Apoptose), der bei der Eliminierung infizierter Zellen eine wichtige Rolle spielt. Zur Aufrechterhaltung des Habitats »Endothelzelle« setzen *B. henselae* im Verlauf einer Infektion noch andere Mechanismen ein. So aktivieren sie die Freisetzung angiogenetisch wirksamer Zytokine oder stimulieren das Wachstum der Endothelzellen auch direkt [zur Übersicht siehe ^[4]].

Angiogenese: Wachstum von Blutgefäßen

Bei gesunden Erwachsenen findet Blutgefäßwachstum nicht statt. Die einzige Ausnahme ist der Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut bei Frauen. Angiogene-

Elektronenmikroskopie von *B. henselae* (Stamm Marseille) und schematische Zeichnung des Adhäsins BadA. Das Bakterium exprimiert auf seiner Oberfläche einen dichten BadA-Saum. Die Länge von BadA beträgt circa 240 Nanometer, die Größe des trimeren Proteinkomplexes liegt bei circa 1000 Kilodalton (Monomer circa 340 Kilodalton). Warum BadA eine derartig bemerkenswerte Länge besitzt, ist derzeit nicht klar. Das trimere Adhäsins ist durch den »Membrananker« in der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien verankert. Ein langer und aus repetitiven Elementen bestehender »Stiel« bedingt die extreme Länge von BadA. An der Spitze von BadA befindet sich der »Kopf«, der ebenfalls aus verschiedenen Unterelementen zusammengesetzt ist. Der Kopf ist für eine Reihe der biologischen Funktionen von BadA (zum Beispiel Adhärenz an Wirtszellen und Proteine der extrazellulären Matrix) verantwortlich. Die genaue Rolle des Stiels im Infektionsverlauf ist bislang kaum bekannt, er könnte bei der Bindung des Bakteriums an einzelne Matrixproteine eine wichtige Rolle spielen. Im Vergleich dazu eine elektronenmikroskopische Aufnahme *B. henselae* BadA-. Dieser Stamm zeigt keine Expression von BadA.

se (Gefäßneubildung) wird erst bei pathologischen Vorgängen aktiviert, etwa während der Heilung einer tiefen Hautwunde oder bei Sauerstoffmangel im Gewebe, wie er bei Tumorerkrankungen oder Durchblutungsstörungen auftritt. Am Anfang dieses mehrstufigen Prozesses stehen Signalkaskaden, in denen unter anderem Zytokine ausgeschüttet werden. Bestandteile des Gewebes (der extrazellulären Matrix) werden aufgelöst; Endothelzellen vermehren sich und wandern in Richtung der schlechter mit Sauerstoff versorgten Bereiche.

Der Schlüsselfaktor für die Aufrechterhaltung der Sauerstoff-Versorgung und Steuerung der Angiogenese in Säugetieren ist der Hypoxie-induzierbare Faktor HIF-1. Er wird aktiviert, sobald Sauerstoffmangel im

Die Autoren



Diplom-Biologin Christiane Beerlage, 30, studierte Biologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen. 2008 begann sie ihre Promotion an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Zurzeit ist sie Doktorandin am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum der Goethe-Universität. Ihr Forschungsgebiet ist die Analyse der Rolle von HIF-1 in Infektionen mit *Staphylococcus aureus*.

Diplom-Biologin Fiona O'Rourke, 26, studierte Biologie an der Mount Allison University in Sackville/New Brunswick (Kanada). 2007 erhielt sie den Bachelor of Sciences with Honours. Nach Studienjahren an den Universitäten in Frankfurt und Tübingen (2008/2009) begann sie 2010 ihre Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum der Goethe-Universität. Ihr Forschungsgebiet ist die Interaktion von *Bartonella henselae* mit Endothelvorläuferzellen.

Prof. Dr. Volkhard A. J. Kempf, 41, studierte Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und an der Universität Oxford (England). Er war von 1997 bis 2001 Assistenzarzt am Max von Pettenkofer-Institut, München, wo er 1991 auch promovierte. Von 2001 bis 2008 war er Assistenzarzt, Facharzt und Oberarzt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Während dieser Zeit schloss er seine Habilitation ab (2006). Seit 2009 ist er Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum der Goethe-Universität. Seine Forschungsgebiete sind die Pathogenität von *Bartonella henselae*, die Rolle von HIF-1 in Infektionen und schnelle molekulare Erregernachweise bei Infektionen des Menschen.

christiane.beerlage@kgu.de
orourke@med.uni-frankfurt.de

volkhard.kempf@kgu.de
www.kgu.de/index.php?id=165

Mikrobiologischer Nachweis von Erregern

Direkte Verfahren:

- mikroskopisch (Lichtmikroskop, Elektronenmikroskop)
- kulturell (auf Nährböden, in Flüssignährmedien, in Zellkulturen)
- molekulargenetisch (hochempfindlicher Nachweis für Erreger, die schlecht oder nicht kultivierbar sind): Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein spezifischer Genbereich des Erregers ausgewählt und mithilfe von Oligonukleotidsequenzen (Primern) markiert. Das Enzym DNA-Polymerase vervielfältigt diesen Abschnitt, so dass er in ausreichender Menge für den Nachweis vorliegt.

Die Kombination des mikroskopischen Nachweises mit der Anzucht in Kultur geht auf Robert Koch (1870er Jahre) zurück. Molekularbiologische Verfahren zum Erregernachweis wurden erst ab den 1990er Jahren entwickelt.

Indirekte Verfahren:

Bei schlecht erreichbaren oder nicht kultivierbaren Erregern versucht man, die Erreger-spezifischen Antikörper aus dem Blutserum des Patienten nachzuweisen. Neuere Verfahren detektieren Erreger-spezifische T-Zellen (zum Beispiel bei Tuberkulose).

Gewebe entsteht. Bei ausreichendem Sauerstoffgehalt wird dagegen die Untereinheit HIF-1 α innerhalb von Minuten abgebaut. Auch *B. henselae* aktiviert im Infektionsverlauf HIF-1¹⁹¹. HIF-1 fungiert dabei gewissermaßen als »Genschalter« für verschiedene angiogene Zytokine. Zu diesen Genen gehört beispielsweise der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der bekanntermaßen eine wesentliche Rolle beim Blutgefäßwachstum in malignen Tumoren spielt.

Ein Bindeprotein mit Kopf, Stiel und Anker

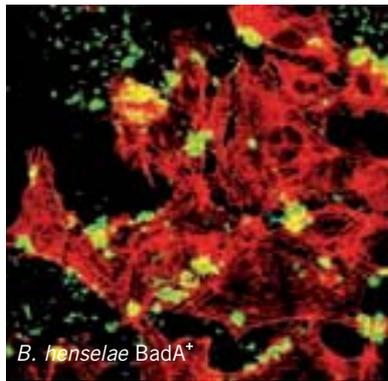
Bartonella Adhäsins A (BadA) ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von *B. henselae*. Es hat eine doppelte Funktion: Einerseits vermittelt es die Bindung der Bakterien an den Wirt, andererseits ist es für die Aktivierung von HIF-1 von entscheidender Bedeutung. BadA ist ein Außenmembranprotein von enormer Größe (drei monomere Proteinketten bilden ein hochmolekulares Trimer), das sich aus einem globulären Kopf, einem langen Stiel und einem Membrananker zusammensetzt. **■** Besonders wichtig ist seine Funktion als Adhäsins, also als Bindeprotein zwischen dem Bakterium und Endothelzellen einerseits sowie dem Bakterium und Proteinen der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Kollagene) andererseits¹⁹¹. Erst die Bindung von Bartonellen an Wirtszellen ermöglicht ihre Interaktion mit dem Wirt und die Induktion verschiedener zellulärer Prozesse (etwa die HIF-1-Aktivierung und VEGF-Sekretion). Bartonellen, die kein BadA auf ihrer Membranoberfläche exprimieren, binden kaum noch an Proteine der extrazellulären Matrix oder an Endothelzellen. Offensichtlich kommt der Kopf-Domäne von BadA in der Adhärenz an Zellen und Proteine sowie in der Auslösung von Angiogenesekaskaden eine entscheidende Bedeutung zu. Die Rolle der langen Stiel-Untereinheit von BadA im Infektionsprozess ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt weitgehend unklar [zur Übersicht siehe¹⁴¹].

Aktivierung von HIF-1: ein generelles Phänomen in bakteriellen Infektionen?

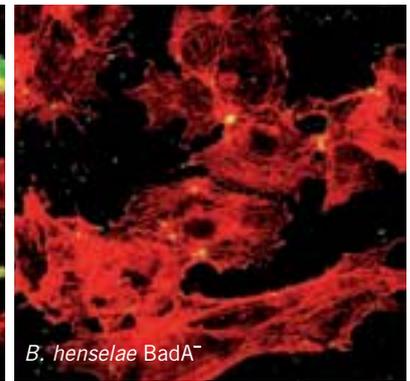
Zwischenzeitlich ist bekannt, dass die Aktivierung von HIF-1 keinesfalls ein für Bartonellen spezifisches Phänomen ist. Auch viele andere Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Yersinia enterocolitica* können im Infektionsverlauf zu einer Aktivierung von HIF-1 führen^{13,101}. Dies ist sowohl in Zellkulturmodellen als auch an Gewebeproben von Menschen mit Infektionserkrankungen gezeigt worden.

Offensichtlich verursachen verschiedene Faktoren und Vorgänge in Infektionen eine Aktivierung von HIF-1: (i) bakterielle Lipopolysaccharide (Bestandteile der Zellwand von gramnegativen Bakterien)¹²¹, (ii) der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im infizierten Gewebe¹¹⁰¹, (iii) die Expression von BadA bei *B. henselae*¹⁹¹ sowie (iv) bakterielle Siderophore (Eisenkomplexbildner, zum Beispiel von Durchfallerregern)¹³¹. Welche biochemischen Vorgänge zu diesen Vorgängen beitragen, ist bislang nur ansatzweise erforscht.

Auch die biologische Rolle von HIF-1 in Infektionen ist weitgehend unklar. Während bei Infektionen mit *B. henselae* die Aktivierung von Gefäßwachstum als Maßnahme zur Sicherung des eigenen Habitats »Endothelzelle« verstanden werden kann, scheint HIF-1 in unterschiedlichen Infektionsmodellen sowohl protektive als auch antiprotektive Wirkung zuzukommen.



B. henselae BadA⁺



B. henselae BadA⁻

■ 30-minütige Infektion von Endothelzellen mit *B. henselae*, die BadA exprimieren (BadA+) oder nicht exprimieren (BadA-). Adhärenente Bakterien sind grün angefärbt, das Aktin-Zytoskelett der Endothelzellen ist rot. Es ist deutlich zu erkennen, dass BadA-defiziente Bakterien wesentlich weniger häufig an Endothelzellen adhären.

So ist HIF-1 essenziell für die Aktivität von Makrophagen (also das Abtöten von Bakterien durch Fresszellen) und die Bildung von antimikrobiellen Peptiden in der Haut^{15,71}. Zum anderen wirkt sich die Hemmung von HIF-1 positiv auf das Überleben in Sepsis- und Peritonitis-(Bauchfellentzündungs-)Modellen aus^{16,101}. Da die Sepsis, eine generalisierte Infektion, für Patienten lebensbedrohlich sein kann, stellt die gezielte Beeinflussung von HIF-1-regulierten Prozessen einen neuartigen und attraktiven Ansatz in der Therapie von schweren Infektionen dar. **◆**

Literatur

- ¹¹¹ Adal, K. A., C. J. Cockerell, and J. Petri-WA 1994 *Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to Rochalimaea* N. Engl. J. Med. 330: 1509–1515.
- ¹²¹ Blouin, C. C., E. L. Page, G. M. Soucy, and D. E. Richard 2004 *Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha* Blood 103: 1124–1130.
- ¹³¹ Hartmann, H., H. K. Eltzschig, H. Wurz, K. Hantke, A. Rakin, A. S. Yazdi, G. Matteoli, E. Bohn, I. B. Autenrieth, J. Karhausen, D. Neumann, S. P. Colgan, and V. A. Kempf 2008 *Hypoxia-independent activation of HIF-1 by Enterobacteriaceae and their siderophores* Gastroenterology 134: 756–767.
- ¹⁴¹ Kaiser, P. O., T. Riess, F. O'Rourke, D. Linke, and V. A. Kempf 2011 *Bartonella spp.: throwing light on uncommon human infections* Int. J. Med. Microbiol. 301: 7–15.
- ¹⁵¹ Peyssonnaud, C., A. T. Boutin, A. S. Zinkernagel, V. Datta, V. Nizet, and R. S. Johnson 2008 *Critical role of HIF-1alpha in keratinocyte defense against bacterial infection* J. Invest. Dermatol. 128: 1964–1968.
- ¹⁶¹ Peyssonnaud, C., P. Cejudo-Martin, A. Doedens, A. S. Zinkernagel, R. S. Johnson, and V. Nizet 2007 *Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis* J. Immunol. 178: 7516–7519.
- ¹⁷¹ Peyssonnaud, C., V. Datta, T. Cramer, A. Doedens, E. A. Theodorakis, R. L. Gallo, N. Hurtado-Ziola, V. Nizet, and R. S. Johnson 2005 *HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes* J. Clin. Invest. 115: 1806–1815.
- ¹⁸¹ Relman, D. A., J. S. Loutit, T. M. Schmidt, S. Falkow, and L. S. Tompkins 1990 *The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens* N. Engl. J. Med. 323: 1573–1580.
- ¹⁹¹ Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Wälzlein, U. Ehehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf 2004 *Bartonella adhesin A mediates a proangiogenic host cell response* J. Exp. Med. 200: 1267–1278.
- ¹¹⁰¹ Werth, N., C. Beerlage, C. Rosenberger, A. S. Yazdi, M. Edelmann, A. Amr, W. Bernhardt, E. C. von, K. Becker, A. Schäfer, A. Peschel, and V. A. Kempf 2010 *Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens* PLoS. ONE. 5: e11576.