

Einführung

Die Aufklärung der stammesgeschichtlichen (phylogenetischen) Beziehungen zwischen den Mikroorganismen ist eine der zentralen Aufgaben in der modernen Mikrobiologie. Mit dem evolutionären Stammbaum (Woese and Fox, 1977; Ludwig et al., 1998; Woese, 1998; Woese, 2000) des Lebens soll die Verwandtschaft einzelner Spezies untereinander beschrieben werden. Insbesondere ist dabei von Interesse, in wie vielen evolutionären Schritten die Mikroorganismen aus gemeinsamen Vorläufern (Fitch, 1971; Guttman and Dykhuizen, 1994; Tibayrenc, 1996; Ochman et al., 1999) hervorgegangen sind. Die Bedeutung von Rekombinationen für die Evolution (Guttman and Dykhuizen, 1994) bakterieller Populationen ist v.a. aufgrund von Ergebnissen klar geworden, die u.a. mittels **MultiLocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE)** sowie der Nukleotidsequenzanalyse einzelner Gene bzw. Genome ermittelt wurden. Im vorliegenden Kapitel soll eine dritte Methode diskutiert werden, die eine Weiterentwicklung der MLEE darstellt, jedoch auf der Analyse von Nukleotidsequenzen basiert. Es handelt sich um die **MultiLocus-Sequenz-Typisierung (MLST)**, welche die Vorteile der beiden o.g. Techniken miteinander verbindet. Die MLST hat dazu geführt, dass man sowohl die Existenz von Klonen als auch die hohe Rate von Rekombinationen bei mehreren bakteriellen Pathogenen erklären kann (Groisman and Ochman, 1994). Unter Klonen versteht man eine Gruppe von Mikroorganismen derselben Spezies, die von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, die ihre genetische Information vertikal von Generation zu Generation weitergeben und identische oder zumindest sehr ähnliche Eigenschaften besitzen (Hacker and Heesemann, 2000).

Die anhand der MLST ermittelten Daten stimmen mit "epidemischen" Populationsstrukturen überein, in denen sich einzelne Klone trotz des häufigen Auftretens von Rekombinationen durchsetzen. Die biologische Bedeutung dieser selektiven Vorteile im Verhältnis zur Virulenz ist jedoch unklar. Die ermittelten Daten haben neben dem rein wissenschaftlichen Interesse insbesondere weitreichende Einflüsse auf die Definition einer bakteriellen Spezies, auf den Umgang mit Antiinfektiva-resistenten Bakterien sowie die Einschätzung der Gefahren durch die Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in die Umwelt. Deshalb stellt die systematische Analyse bakterieller Phylogenie eine zentrale Aufgabe auch der Infektionsmediziner dar (McDaniel et al., 1995; Wieler et al., 1997; Perna et al., 1998; Liu et al., 1999; Ostroff, 1999; Picard et al., 1999). Hierfür stehen im Wesentlichen zwei Stammbaumprogramme zur Verfügung, die unter den Begriffen Distanz und Parsimonie laufen. Bei den Distanzmethoden wird ein phylogenetischer oder

evolutionärer Abstand (E_D) mit Hilfe eines Computers berechnet, indem dieser jede Position im Datensatz zählt, bei denen Sequenzunterschiede auftreten. Parsimonie ist eine weitere vielbenutzte Methode der phylogenetischen Analyse. Mit ihr werden Stammbäume berechnet, die auf der Annahme beruhen, dass nur die minimale Anzahl von Sequenzänderungen (Parsimonie informative Stellen – PiS), die notwendig ist, um zwei divergierende Linien mit einem gemeinsamen Vorfahren zu verbinden, wirklich stattgefunden hat. Auch dieser Ansatz summiert die Anzahl der Sequenzunterschiede in einem gegebenen Datensatz, aber der Algorithmus behandelt die Daten auf eine andere Art, als das die Distanzprogramme tun. Die Dendrogramme ähneln sich zwar, auch wenn die Abfolge der Verzweigungen ausgehend vom selben Datensatz oft variieren kann. Von besonderem Interesse sind hierbei die nicht-synonymen (Sharp and Li, 1987b; Sharp and Li, 1987a) Transitionen und Transversionen der Stämme, da sie die oben beschriebenen Parsimonie-informativen Stellen darstellen.

Bis vor kurzem dachten Evolutionsbiologen über die Evolution von Bakterien kaum nach, ganz im Gegensatz zu weitreichenden Überlegungen zur Evolution einer Vielzahl anderer Organismen (Smith et al., 2000). So gab es z.B. keine fossilen Funde mit phänotypischen Merkmalen, die zeitgeschichtlich korreliert werden konnten. Auch vermehren sich Bakterien nicht sexuell, d.h. sie wählen keine Partner nach bestimmten Merkmalen aus. Deshalb stand lange Zeit das Dogma, dass Bakterien sich einfach zweiteilen, Klone ausbilden und dann unter bestimmten Selektionsdrücken entweder eine Ausbreitung erfahren oder absterben. Insbesondere galt die bakterielle Evolution als relativ unspektakulär, denn aufgrund des fehlenden sexuellen Austausches von DNA wurde nur eine geringe Heterogenität erwartet (Smith et al., 1993). In den letzten Jahren wurde jedoch zunehmend klar, dass durch eine Vielzahl von Mutationsereignissen sowie aufgrund der Möglichkeit des horizontalen Gentransfers (Felsenstein, 1985; Li, 1993) die bakterielle Populationsstruktur wesentlich komplexer ist. Es waren insbesondere zwei Umstände, die dazu führten, dass die Aufklärung der Populationsstrukturen in den Mittelpunkt des Interesses zu rücken.

Zum einen ist es die wachsende Entwicklung von Resistenzen gegen Antiinfektiva, die sich zu einem echten gesundheitspolitischen Problem entwickelt. Hier besteht der Bedarf, die Verbreitung von resistenten Populationen aufzuklären. Allein rein ökonomisch betrachtet ist die Ausbildung von Resistenzen gegen Antiinfektiva einer der weltweit wichtigsten Veränderungen im Gesundheitssystem (Bork et al., 1998; Maiden et al., 1998; Reid et al., 2000; Chan et al., 2001).

Der andere Grund war der, dass mit der zunehmenden Automatisierung in der Molekularbiologie die Gewinnung von DNA-Sequenzen immer einfacher und kostengünstiger wurde bzw. immer noch wird. D.h., dass die Populationsstrukturen durch eine systematische Analyse von Genen bzw. Genabschnitten unter Anwendung mathematischer Modelle recht robust analysierbar geworden ist. Da diese Automatisierung im Zusammenhang mit dem Aufbau von Datenbanken auch die Möglichkeit eröffnete, Daten schnell und einfach auszutauschen, können Entwicklungen bakterieller Populationen inzwischen weltweit global betrachtet werden.

Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die Generierung molekularer Daten und damit Fortschritte in den Analysen bakterieller Populationen in starker Abhängigkeit zu technischen Entwicklungsschritten steht. Die u.g. drei Methoden können diesbezüglich als Meilensteine gewertet werden:

1. Bei der **MultiLocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE)** werden Variationen innerhalb eines Housekeeping-GenLocus durch Unterschiede in der elektrophoretischen Motilität des jeweiligen Genproduktes indirekt bestimmt (Whittam et al., 1983b).
2. Mit der automatisierten Generierung von Nukleotidsequenzdaten steht eine Technik zur Verfügung, die ein außerordentlich hohes Maß an Genauigkeit bietet, mit welchem Populationsvariationen sehr exakt bestimmt werden können. Auf diese Weise konnten zunächst i.d.R. 50 Isolate miteinander verglichen werden (Enright and Spratt, 1999).
3. Mit der inzwischen etablierten **MultiLocus-Sequenz-Typisierung (MLST)** werden üblicherweise Genfragmente mit einer Länge von annähernd 500 Nukleotiden von 7 bis 9 Housekeeping-Genen sequenzanalysiert. Diese Analysen können mit mehreren hundert Isolaten durchgeführt werden (Selander et al., 1986; Snel et al., 1999; Chan et al., 2001).

Bei aller kontinuierlichen Fortentwicklung der Methoden muss jedoch klargestellt werden, dass die Fragestellungen differieren, die mit den jeweiligen Methoden beantwortet werden können. Um dies zu verdeutlichen, soll zunächst ein kurzer historischer Rückblick gegeben werden. Ein gutes Beispiel für die Anwendung der jeweiligen Analyse-Methoden stellen Bakterien der Gattung *Neisseria* dar. Das Genus *Neisseria* umfasst humanpathogene Erreger, insbesondere den Erreger der Gonorrhoe, *Neisseria gonorrhoeae* und den Erreger der bakteriellen Meningitis, *N. meningitidis*. Diese Pathogene sind sehr wirtsspezifisch, sie sind an den Menschen sowie an höhere Primaten angepasst. Schon aus diesem Grunde muss davon ausgegangen werden, dass populationsgenetische Daten anderer Bakterien, z.B. solcher Bakterien, die sich vorwiegend im Erdboden aufhalten wie etwa *Bacillus* oder *Clostridium* wahrscheinlich andere Ergebnisse hervorbringen werden.

Eine zentrale Frage im Hinblick auf die Evolution war immer die Rolle der genetischen Rekombination innerhalb bakterieller Populationen (Stephens, 1985). Obwohl das Vorkommen von Rekombination bei Bakterien bereits vor über 50 Jahren (Smith, 1998; Smith and Smith, 1998) gezeigt wurde, besteht weiterhin Unsicherheit hinsichtlich deren Rolle in natürlichen Populationen. Horizontaler Gentransfer ist offensichtlich bei der Epidemiologie von pathogenen Bakterien von praktischer Bedeutung und wird zunehmend wichtiger bei genetisch veränderten Bakterien, die vermehrt eingesetzt werden (Feil et al., 1999; Smith et al., 2000). Eine zweite Frage widmet sich der Verwandtschaft zwischen pathogenen Stämmen von Bakterien und den viel häufigeren Populationen von verwandten Bakterien bei Mensch und Tier, die keine klinischen Symptome hervorrufen. Genetische Vergleiche von diesen beiden Populationen werden helfen, die Herkunft von neuen pathogenen Stämmen zu erklären und die involvierten genetischen Unterschiede zu identifizieren.