

Ihre Namen: _____

Übung 8: Molekulare Evolution 1: Hat der Chirurg seine Patienten mit Hepatitis C infiziert?

In einem Paper im „Journal of Medical Virology“ von 2002 berichteten Stefan Ross und seine Kollegen von der Universität Essen von ihrer Untersuchung einer möglichen Ansteckung von Patienten durch einen Chirurgen. Im Juli 2000 teilte der Chirurg seinem Krankenhaus mit, dass er sich mit dem Hepatitis C Virus (HCV) angesteckt habe. HCV infiziert die Leber und wird durch Kontakt mit dem Blut eines Infizierten übertragen. Obwohl viele Infizierte keine Symptome zeigen, kommt es bei anderen Patienten zu schweren Leberschäden.

Der Chirurg war Spezialist in der orthopädische Notfallchirurgie. Dort werden z.B. schwere Knochenbrüche nach Autounfällen operiert. Dies beinhaltet schnelles und genaues Arbeiten mit Sägen, Hämmern, Bohrern und Schrauben. Es ist nicht ungewöhnlich, dass sich sogar vorsichtige Chirurgen bei der Arbeit schneiden.

Die Sorge des Krankenhauses galt nun der Frage, ob der Chirurg einen oder mehrere seiner Patienten mit Hepatitis C infiziert hatte. Von 207 Patienten wurden Blutproben genommen, von denen drei positiv auf HCV getestet wurden. Einer dieser Patienten war bereits vor seiner Operation mit HCV infiziert und ein anderer hatte einen Virusstamm, der nur sehr entfernt verwandt war mit dem des Chirurgen. Der letzte Patient jedoch hatte einen HCV-Stamm, der zum selben Subtyp wie der des Arztes gehörte. Es stellte sich nun die Frage: Wurde der Patient vom Chirurgen infiziert oder stammte die Infektion aus einer anderen Quelle?

Wir können diese Frage beantworten, indem wir einen evolutionären Baum rekonstruieren. Diese Übungsanleitung und das Computerprogramm „ForensicEA Lite“ sollen dazu dienen, sich in die Logik der Evolutionsbiologie einzufinden, auf der solche Bäume beruhen. Es wird des Weiteren auch eine Methode eingeführt, um solche Bäume zu erstellen. Am Ende werden wir Ihnen die Ergebnisse von Ross *et al.* präsentieren. Es liegt dann an Ihnen, zu entscheiden, ob der Chirurg die Quelle der Infektion war oder nicht.

Falls das Programm Forensic EA noch nicht auf Ihrem Computer installiert ist, gehen Sie bitte zu <http://faculty.washington.edu/herronjc/SoftwareFolder/ForensicEALite.html> und klicken Sie auf Download Forensic EA Lite Software for Windows, laden es herunter und legen es auf dem Desktop ab.

Teil1 : Evolution innerhalb eines Patienten

Um genau nachvollziehen zu können wie ein Virus übertragen wird, ist es zunächst wichtig festzustellen, dass eine Virusinfektion aus einer Population von vielen individuellen Viruspartikeln (Virionen) in einem Wirt besteht. Die Infektion beginnt mit einem oder wenigen Virionen, die in den Patienten eindringen. Doch diese Eindringlinge fangen an sich zu vermehren und bilden eine große Population. Findet während der Reproduktion eine Mutation statt, so wird diese Population nun genetisch variabel. Diese Population von Virionen kann nun evolvieren. Dies geschieht z.B. aufgrund von Selektion durch das Immunsystem des Wirtes (diese Annahme stimmt für einige Abschnitte des Virusgenoms welche Proteine produzieren, die vom Immunsystem erkannt und angegriffen werden. Dies ist nicht der Fall für das gesamte Genom).

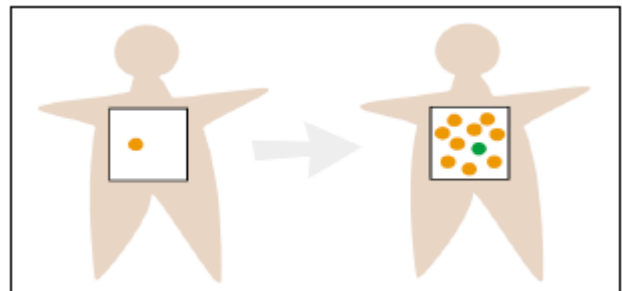


Bild 1: Eine Virusinfektion ist eine Population von Viruspartikeln. Eine oder wenige Virionen infizieren den Patienten. Dort vermehren sie sich und formen eine Population. Mutationen während der Replikation führen zu genetischer Variabilität. Das grüne Virion ist ein Mutant. Die Population kann nun evolvieren.

Um zu sehen wie Evolution durch Selektion von statten geht, werden wir Änderungen in einer einfachen Modellpopulation von Viren beobachten, welche wir mit Hilfe eines Computerprogramms simulieren werden. Starten Sie hierzu das Programm „ForensicEA Lite“. Nachdem das Werbefenster verschwindet (einmal klicken) sehen Sie ein Fenster mit der Bezeichnung „Divergence“ (Bild 2). Im Kasten oben links befindet sich eine Population von Virionen, die in einem Patienten leben. Diesen Patienten bezeichnen wir als „Patient Zero“, so wird klassischerweise ein Patient bezeichnet, von dem eine Epidemie ausgeht. Klicken Sie nun auf ein einzelnes Virion und lassen Sie die Maustaste gedrückt. Sie sehen nun ein Bild des Virions zusammen mit einer Nukleotidsequenz, die 100 Basenpaare des Genoms darstellt (HCV ist eigentlich ein RNA Virus, zur Darstellung wurde hier jedoch die cDNA Sequenz gewählt, wie man sie durch Sequenzierung erhält).

Virionen gleicher Farbe sind genetisch identisch. Die meisten, wenn nicht alle, Virionen in der Population sind schwarz. Diese sind genetisch identisch zu dem Virion, das den Patienten infiziert hat. Einige Virionen können andersfarbig sein. Dies sind Mutanten, welche sich vom Gründer-Virion in ein oder zwei Nukleotiden unterscheiden. Sie können die Sequenzen von zwei Virionen vergleichen, indem sie die Virionen in die kleinen Kästen unten links ziehen. Das Programm nennt Ihnen dann die Identität des Patienten aus dem das Virion stammt („source“), die Nukleotidsequenz, sowie die Anzahl an Unterschieden zwischen den zwei Sequenzen. Ziehen Sie ein schwarzes Virion von „Patient Zero“ in das obere Kästchen. Wir werden es als Referenz während der Simulation benutzen.

Die Virionen reproduzieren sich in diesem Modell folgendermaßen: in jeder Reproduktionsphase wählt das Programm ein Virion zufälligerweise aus und kopiert es. Danach wird ein zweites Virion zufälligerweise gewählt und ebenfalls kopiert. Manche Virionen können das Glück haben mehrmals kopiert zu werden, während andere gar keine Nachkommen produzieren.

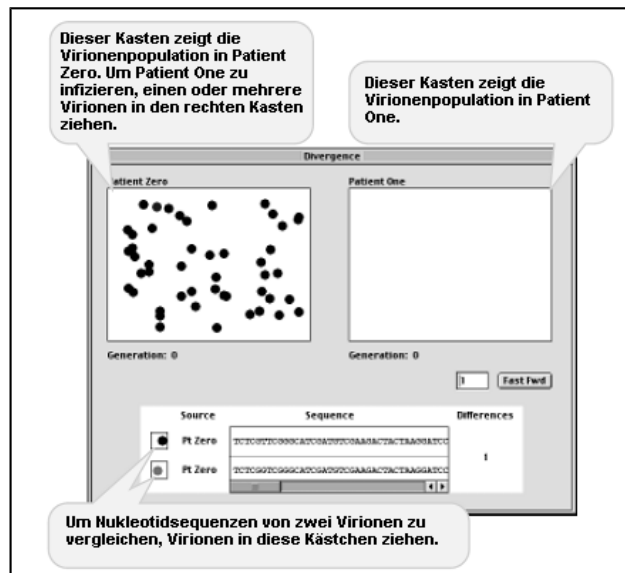


Bild 2: „Divergence“-Fenster

1) An welches evolutionäre Modell erinnert Sie dieser Vorgang?

Sobald 50 Nachkommen produziert wurden, sterben die Virionen der Elterngeneration. Die Nachkommen vermehren sich in der nächsten Reproduktionsphase auf gleiche Weise. Der „Generation“ Zähler unter dem Kasten stellt die Anzahl an Generationen da, die seit der Infektion vergangen sind. Mit einem Klick auf den „Fast Fwd“ Knopf können sie jeweils eine neue Generation erstellen.

Viel mehr steckt nicht hinter unserem Modell. Virionen werden geboren, bekommen die Chance sich zu reproduzieren und sterben. Wie soll in solch einer Population nun Evolution stattfinden? Es gibt wenig oder gar keine Variation und, bis jetzt, keine Selektion. Variation und Selektion sind jedoch notwendige Zutaten für adaptive Evolution.

Um Variation zu erzeugen beinhaltet unser Modell die Möglichkeit von Mutationen. Wie wir gesehen haben, besitzt jedes Virion ein Genom welches als cDNA von 100 Nukleotiden Länge dargestellt wird. Jedes Mal, wenn ein Virion einen Nachkommen produziert, wird auch sein Genom kopiert. Doch dieser Kopiervorgang ist nicht perfekt. Manchmal wird ein A mit einem T vertauscht, ein T mit einem G, und so weiter. Diese Fehler, oder Mutationen, führen zu genetischer Variation in unserer Population. Sobald eine Mutation eine neue Nukleotidsequenz (oder Genotyp) erstellt, verändert das Virion seine Farbe. Klicken Sie sich durch einige Generationen. Von Zeit zu Zeit tauchen neue Farben innerhalb der Population auf.

Um nun Selektion in unser Modell zu integrieren, stellen wir uns vor, dass das Immunsystem gelernt hat, Proteine zu erkennen, die von Virionen in den vorhergehenden Generationen produziert wurden. Es erkennt jedoch keine Proteine von neuen Mutanten. Daher haben neue Mutanten eine höhere Chance Nachkommen zu produzieren als andere Virionen in der Population.

Beachten Sie, dass unser Modell eine Zufallskomponente beinhaltet. Durch reines Glück können sich manche Genotypen häufiger vermehren als andere. Diese werden in der Population immer häufiger. Genauso gibt es Genotypen, die sich zufälligerweise seltener reproduzieren als andere. Diese werden immer seltener und können sogar völlig verschwinden.

2) Welche zwei Mechanismen der Evolution sind hier am Werk?

Wählen Sie im Menü "File" und klicken Sie auf "Reset...". Setzen Sie die Populationsgröße auf 100 und die Mutationen auf "neutral". Stellen Sie sicher, dass Sie ein Virion im oberen Kästchen des Sequenzvergleichs gespeichert haben. Sie werden nun mehrere 100 Generationen simulieren, wobei Sie alle 50 Generationen eine Nukleotidsequenz mit der Ausgangssequenz vergleichen. Um den Vorgang zu beschleunigen, tragen

Teil 3: Evolutionäre Bäume

Bisher haben wir betrachtet, wie eine Viruspopulation innerhalb eines einzelnen Patienten evolviert und wie Populationen in verschiedenen Patienten divergieren. Nun können wir darüber nachdenken, wie wir mit Hilfe von Nukleotidsequenzen eine evolutionäre Geschichte rekonstruieren können, um damit festzustellen, ob ein bestimmter Arzt einen bestimmten Patienten infiziert hat.

Interpretation von evolutionären Bäumen

Schließen sie alle Fenster innerhalb von "ForensicEA Lite". Wählen Sie im Menü "Simulation" und klicken Sie auf "Tree". Dies öffnet ein Fenster ähnlich dem in Bild 3. Im unteren Bereich der grünen Fläche befindet sich ein kleiner weißer Kasten. Dieser repräsentiert eine Population von Virionen innerhalb eines Wirts. Wie in früheren Simulationen können Sie ein individuelles Virion-Genom inspizieren, indem Sie mit der Maus auf ein Virion klicken und die Taste gedrückt halten. Sie können ebenso die Genome von zwei Virionen vergleichen, indem Sie sie in die kleinen Kästchen unten links ziehen.

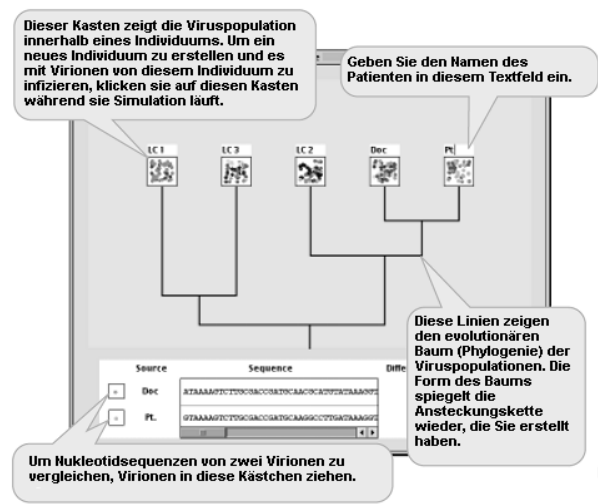


Bild 3: "Tree" Fenster von "ForensicEA Lite"

In dieser Simulation werden wir uns mit mehreren Wirten beschäftigen. Zur besseren Übersicht kann jeder Wirt einzeln benannt werden. Klicken Sie auf das weiße Textfeld über dem Populationskasten und nennen Sie die Population "LC 1". Dies steht für "Local Control 1". Dies könnte ein HCV-infiziertes Individuum sein, welches im selben Ort wie der Arzt und der Patient lebt, von dem wir aber nicht wissen, ob er oder sie in der Ansteckungskette nah oder entfernt zum Arzt oder Patienten steht.

Klicken Sie nun auf "Fast Fwd". Lassen Sie die Simulation für etwa 100 Generationen laufen. Während die Simulation läuft, klicken sie auf den Kasten mit der Population von "LC 1". Es erscheint ein neuer Kasten, der einen neuen Wirt repräsentiert. Klicken sie auf Pause.

"ForensicEA Lite" infiziert diesen neuen Wirt automatisch mit einem zufällig ausgewählten Virion aus der Population von "LC 1". Nennen Sie den neuen Wirt "LC 2". Beachten Sie die Linien, die die beiden Populationen von "LC 1" und "LC 2" verbinden. Dies soll anzeigen, dass beide Populationen miteinander verwandt sind.

Lassen Sie die Simulation für weitere 100 Generationen laufen und klicken Sie erneut auf "LC 1". Nennen Sie den neuen Wirt "LC 3".

11) Woran erkennen Sie im evolutionären Baum (den Verbindungslinien zwischen den Populationen) die Tatsache, dass die Ansteckung von "LC 3" durch "LC 1" erst vor kurzem stattgefunden hat, während die Ansteckung von "LC 2" weiter zurück liegt?

Nach weiteren 100 Generationen klicken Sie nun auf "LC 2". Nennen Sie den neuen Wirt "Doc". Dies ist der Arzt unter Verdacht, und in diesem Szenario hat er sich bei "LC 2" angesteckt (vielleicht während einer Operation).

12) Wie würde der evolutionäre Baum aussehen, wenn sich der Arzt vor kurzem bei "LC 1" angesteckt hätte? Wie, wenn der Arzt von einem Touristen aus einer weit entfernten Stadt vor kurzem infiziert wurde? Skizzieren Sie das hier:

Ansteckung von LC1

Ansteckung von Tourist

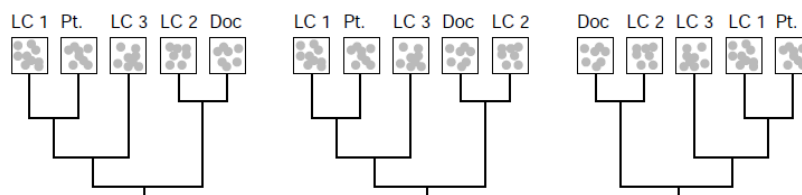
Nachdem noch einmal 100 Generationen vergangen sind, klicken Sie auf "Doc". Nennen Sie den neuen Wirt "Pt." für Patient. In diesem Szenario hat der Chirurg tatsächlich seinen Patienten infiziert. Lassen Sie die Simulation zum Schluss noch für weitere 50 Generationen laufen und klicken Sie auf "Pause". Ihr Baum sollte nun dem in Bild 3 ähneln (wobei die Längen der Äste etwas unterschiedlich sein können).

13) Betrachten Sie den evolutionären Baum. Woran erkennen Sie in dem Baum, dass der Patient vor kurzem vom Arzt infiziert wurde?

14) Wie würde der Baum aussehen, wenn der Patient nicht vom Arzt angesteckt wurde, sondern der Arzt vom Patienten? Erstellen Sie eine Skizze.

15) Schließen Sie das Fenster und lassen Sie die Simulation erneut laufen. Denken Sie sich Ihre eigene Ansteckungskette aus und lassen Sie den Patienten von jemand anderem infiziert werden. Sieht der Baum so aus wie Sie es erwartet hätten? Erstellen Sie mehrere unterschiedliche Bäume, bis Sie sicher sind, dass Sie die Entfernung von zwei Individuen innerhalb der Ansteckungskette nur durch das Betrachten der evolutionären Bäume nachvollziehen können.

Es ist auch wichtig darüber nachzudenken, was man durch reines Betrachten des evolutionären Baumes NICHTS über die Richtung der Ansteckung aussagen kann. "Forensic EA Lite" erstellt den neuen Wirt immer rechts vom Wirt, der die Quelle der Ansteckung ist. Dies war eine willkürliche Entscheidung. Wir hätten es auch so programmieren können, dass der neue Wirt links auftaucht. Oder mal links, mal rechts, rein nach dem Zufallsprinzip. Die drei dargestellten Bäume zeigen denselben Verwandtschaftsgrad zwischen den einzelnen Virenpopulationen.



Die Population von "LC 1" ist z.B. immer näher mit der Population aus dem Patienten verwandt als mit der Population aus "LC 3". Allerdings müssen diese Bäume nicht unbedingt dieselbe Ansteckungskette widerspiegeln. Z.B. könnte "LC 2" vom Arzt angesteckt worden sein oder der Arzt wurde von "LC 2" infiziert.

16) Sind die obigen drei Bäume vereinbar mit einem Szenario, in dem der Arzt das erste infizierte Individuum war und somit die Quelle aller Infektionen? Sind sie vereinbar mit einem Szenario, in dem der Arzt das letzte infizierte Individuum war?

17) Wenn man ausser dem Baum (den Bäumen) keine anderen Informationen hätte, also man z. B. nicht wüsste wer der erste Infizierte war, wäre es dann möglich, dass der Patient von LC2 angesteckt worden ist?

18) Was kann uns so ein Baum allein also sagen über die Ansteckungen?

Teil 4: Rekonstruktion evolutionärer Bäume

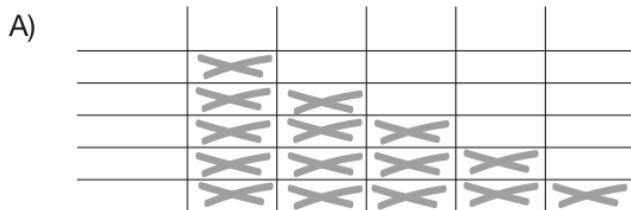
Betrachten Sie den letzten evolutionären Baum, den Sie in "ForensicEA Lite" erstellt haben. Falls die vertikalen Äste relativ kurz sind, wiederholen Sie die Simulation. Es sollten mindestens 50 bis 100 Generationen zwischen Ansteckungen vergehen und zum Schluss 5 Viruspopulationen vorhanden sein.

Ihre Aufgabe besteht nun darin, den evolutionären Baum dieser 5 Populationen zu rekonstruieren, und alle möglichen Aussagen über die Ansteckungskette zu treffen, wobei nur die Nukleotidsequenzen zur Verfügung stehen, die an der Spitze des Baumes entnommen werden können.

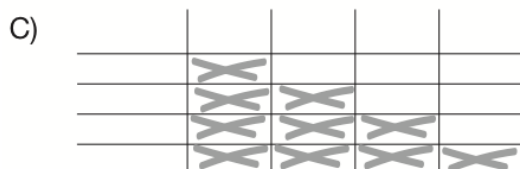
Dies ist dieselbe Herausforderung vor der Biologen stehen, die versuchen die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse von lebenden Individuen, Populationen oder Arten zu bestimmen. Der einzige Unterschied ist, dass wir die wahren Verwandtschaftsverhältnisse unserer 5 Populationen bereits kennen, denn "ForensicEA Lite" hat sie während der Evolution der Populationen für uns festgehalten. Biologen, die mit echten Populationen arbeiten, kennen den wahren Verlauf der Evolution fast nie. Alles was sie machen können, ist aufgrund der verfügbaren Daten begründete Vermutungen anzustellen.

Es gibt viele Methoden, um evolutionäre Bäume mit Hilfe von Nukleotidsequenzen zu erstellen. Die meisten sind mathematisch sehr komplex. Vielen Methoden ist aber gemein, dass sie von einer einfachen Annahme ausgehen: Je länger zwei Populationen von einander getrennt sind – d. h. die Zeit zurück zu einem gemeinsamen Vorfahren – desto genetisch unterschiedlicher sind sie. Oder anders gesagt, je ähnlicher sich zwei Populationen sind, desto näher stehen sie sich in einem evolutionären Baum.

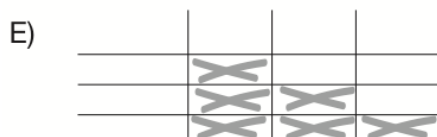
Versuchen Sie, mit der Ihnen bekannten UPGMA Methode Ihren Baum, den Sie mit "ForensicEA Lite" erstellt haben, zu rekonstruieren. Benutzen Sie dazu die untere Graphik. Die genetische Distanz ist dabei die Anzahl der Unterschiede zwischen den Nukleotidsequenzen von zwei Virionen, die Sie zufällig aus den Populationen auswählen. Ziehen dazu die Virionen in die kleinen Kästchen unten links und halten sie die Unterschiede in der Tabelle fest. Nachdem Sie die Tabelle komplett erstellt haben, führen Sie die UPGMA-Prozedur durch.



B) Tree:



D) Tree:



F) Tree:

Vergleichen Sie Ihren UPGMA-Baum mit dem tatsächlichen Baum. (Bedenken Sie, dass man denselben Baum auf unterschiedliche Weise zeichnen kann. Das wichtige sind die Abzweigungen der gemeinsamen Vorfahren).

19) Wie gut war UPGMA darin die Wahrheit zu rekonstruieren?

20) UPGMA ist nicht unbedingt die beste Methode, um evolutionäre Bäume zu erstellen. Manchmal macht es einen richtigen Baum, manchmal einen falschen. In welchen Situationen funktioniert UPGMA wohl nicht so gut?

Teil 5: Der Chirurg und der Patient

In Bild 4 sehen Sie den evolutionären Baum, den R. Stephen Ross und Kollegen erstellt haben. Sie benutzten dabei Nukleotidsequenzen von HCV Virionen aus dem deutschen Chirurgen, dem Patienten sowie von einigen Kontrollen. Betrachten Sie zunächst nur den vereinfachten Baum (Bild 4A). Dieser Baum enthält jeweils ein einzelnes Virion aus dem Chirurgen, dem Patienten sowie aus 5 lokalen Kontrollen.

21) Können Sie anhand von Baum A sagen, dass der Chirurg den Patienten mit HCV infiziert hat?

22) Wenn man bedenkt, dass für den Baum nur 5 Kontrollen verwendet worden sind, können wir denn anhand des Baumes überhaupt sicher sein, dass entweder der Patient den Arzt oder der Arzt den Patienten angesteckt hat?

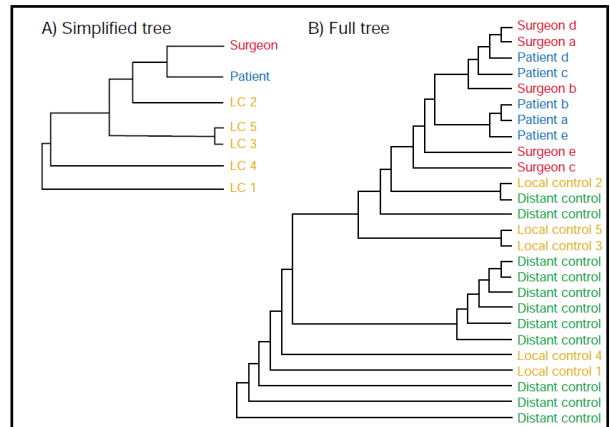


Bild 4: Rekonstruierter Baum von HCV Virionen aus dem Chirurgen (Surgeon) seinem Patienten (Patient), sowie aus geographisch lokalen und weit entfernten Kontrollen. Quelle: Ross et al. (2002)

Betrachten Sie nun den großen Baum (Bild 4B). Dieser beinhaltet Kontrollen aus weiter entfernten Städten („distant control“) zusätzlich zu den fünf Kontrollpersonen aus dem Ort, in dem Chirurg und Patient leben. Außerdem enthält der Baum jeweils 5 Virionen aus dem Chirurgen und dem Patienten statt nur einem, d. h. Patient a bis e sind alles Proben aus einem einzigen Patienten (nicht aus fünf verschiedenen Patienten) und Surgeon a bis e sind alles Proben aus dem einen angeklagten Arzt.

23) Wenn alle 5 Patienten-Proben aus einer Person stammen und alle 5 Surgeon-Proben auch aus nur einer Person, wieso bilden diese 5 Proben nicht jeweils eine monophyletische Gruppe, einen Cluster? Wieso sind sie so vermischt? Nehmen Sie bei der Diskussion bitte an, dass der Baum korrekt ist, also die tatsächliche Phylogenie widerspiegelt.

24) Stärkt oder schwächt der große Baum die Annahme, dass der Chirurg seinen Patienten mit HCV infiziert hat (anstatt andersrum)? Erklären Sie warum! Was ist Ihre endgültige Schlussfolgerung in diesem Fall?

Bibliography

- Fitch, W. M., J. M. Leiter, et al. 1991. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88: 4270-4274.
- Leitner, T., D. Escanilla, et al. 1996. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 10864-10869.
- Ross, R. S., S. Viazov, and M. Roggendorf. 2002. Phylogenetic analysis indicates transmission of hepatitis C virus from an infected orthopedic surgeon to his patient. *Journal of Medical Virology* 66: 461-467.