

## *Forderungen nach einer Reklassifizierung der Spezies Echinococcus multilocularis: Möglichkeiten und Grenzen der „Molekularen Taxonomie“*

H. Rinder

**Einleitung** Innerhalb der Gattung *Echinococcus* werden 4 morphologisch und biologisch klar abgegrenzte Arten unterschieden, die darüberhinaus noch zu sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern führen (5): *E. granulosus* (BATSCH, 1786), Erreger der zystischen Echinokokkose, *E. multilocularis* LEUCKART, 1863, Erreger der alveolären Echinokokkose, *E. vogeli* RAUSCH & BERNSTEIN, 1972, Erreger der polyzystischen Echinokokkose in Südamerika und die beim Menschen seltene, mit *E. vogeli* weitgehend sympatrische Spezies *E. oligarthrus* (DIESING, 1863). Trotz dieser klaren Systematik gab es in den letzten Jahren eine Reihe von Forderungen nach einer Revision innerhalb dieser Gattung (3, 6).

Begründet wurden diese Forderungen nach taxonomischen Revisionen durch die Ergebnisse von DNA-Sequenzvergleichen innerhalb und zwischen den einzelnen *Echinococcus* spp. Die DNA wurde aus Isolaten der 4 *Echinococcus*-Arten und bei *E. granulosus* auch aus Isolaten von verschiedenen Zwischenwirten gewonnen. Per Computer wurden diese Sequenzen dann abgeglichen und als Stammbäume (Dendrogramme) ausgegeben, die wiederum phylogenetische Beziehungen widerspiegeln sollen. Die Untersuchung zweier mitochondrialer Gene, Cytochrom-c-Oxidase I (COI) und Nikotinamid-Dehydrogenase (NAD), sowie die des ersten internen transkribierten „Spacers“ (ITS1) des chromosomalen Gens der ribosomalen RNA (rDNA) zeigten, daß das untersuchte *E. multilocularis*-Isolat in den Ast der *E. granulosus*-Gruppe fiel und mit dem *E. granulosus*-Isolat eines Pferdes enger verwandt zu sein schien als manche *E. granulosus*-Isolate untereinander (3).

**Sind *E. multilocularis* und *E. granulosus* konspezifisch?** Tatsächlich wurde aufgrund der genomischen Daten konstatiert, daß *E. multilocularis* nicht von *E. granulosus* abzugrenzen sei und daß sich lediglich *E. vogeli* und *E. oligarthrus* von den beiden ersteren Arten unterschieden (3). Alternativ wurde vorgeschlagen, daß mindestens vier *E. granulosus*-Stämmen der Artrang zuzuerkennen sei (6).

Während es dem Molekularbiologen bei der isolierten Betrachtung der abgeleiteten Dendrogramme leichter fallen mag, eine Konspezifität von *E. multilocularis* und *E. granulosus* zu akzeptieren, ist dies für den Parasitologen, dem auch die biologischen, morphologischen, immunologischen und klinischen Unterschiede vertraut sind, nicht unbedingt der Fall. Allerdings ist eine Gegenargumentation für ihn oft schwierig, da die verwendeten molekularbiologischen Methoden durchaus etabliert, aber die benutzten Computer-Algorithmen – nicht nur für ihn – kaum nachvollziehbar

sind. Vielmehr entsteht der Eindruck, als böten molekularbiologische Methoden endlich eine objektive und quantifizierbare Grundlage zur Beschreibung phylogenetischer Zusammenhänge und als seien die scheinbar subjektiveren, morphologischen und biologischen Methoden der traditionellen Taxonomie angestaubt und überholt.

Symptomatisch für diesen Trend ist, daß teilweise taxonomische Revisionen gefordert werden, ohne die originären Arbeiten zur Taxonomie von *E. multilocularis* zu diskutieren (3), nämlich den Erstvorschlag sowie dessen Ableitung und Begründung für die noch heute valide Nomenklatur (7) sowie umfangreiche biologische und morphologische Arbeiten zur Charakterisierung dieser Spezies, einschließlich der Etablierung des vollständigen Entwicklungszyklus im Labor (8).

### **Der Trend zur „molekularen“ Taxonomie**

Die beschriebene Ignorierung von Ergebnissen „traditioneller“ parasitologischer Methoden bei der geforderten taxonomischen Revision von *E. multilocularis* ist nur eines von zahlreichen Beispielen für einen verbreiteten Trend, nicht nur in der Parasitologie. In der Bakteriologie wurde bereits 1992 eine neue Mykobakterienspezies postuliert und auch gleich benannt, und zwar alleine aufgrund von Sequenzdaten amplifizierter PCR-Produkte und ohne daß überhaupt eine Kultur des Erregers vorhanden gewesen wäre (1). Wenig Einfluß hatten auch die kurz zuvor erschienenen und vom Internationalen Komitee für Systematische Bakteriologie empfohlenen Mindeststandards zur Beschreibung neuer Mykobakterienspezies (4). Erst nachträglich, nachdem die Kultivierung geglückt war, wurden einige, wenn auch nicht alle, der dort geforderten 21 Kriterien geprüft (2).

Sind also DNA-Sequenzen ein bequemer kurzer Weg zur Beantwortung taxonomischer Fragen? Schließlich gibt es kaum einen subjektiven Spielraum bei der Generierung von DNA-Sequenzen: Sieht man von Polymerasefehlern und Sequenzierungsartefakten einmal ab, kann ein Nukleotid an einer bestimmten Position einer klonierten DNA-Sequenz eben nur eine von vier Möglichkeiten sein, und eben nicht „hauptsächlich Guanin, etwas Cytosin und ein wenig Adenin“. Im Gegensatz zu phänotypischen Merkmalen, die oft in einer gewissen Variationsbreite vorliegen können, bestehen DNA-Sequenzen aus diskreten Einheiten und sind so für eine Computerauswertung praktischerweise bereits „digitalisiert“. Sind sie damit aber bereits a priori für phylogenetische Untersuchungen geeigneter als die traditionellen, phänotypischen Methoden der „klassischen“ Taxonomie?

### **Zur Aussagekraft „objektiver“ genetischer Daten**

Zur Klärung dieser Frage sollen die scheinbar objektiven, computer-generierten Ergebnisse der genotypischen Untersuchungen bei *E. multilocularis* im Folgenden genauer betrachtet werden. Wie bereits erwähnt, wurde die Konspezifität von *E. multilocularis* und *E. granulosus* aufgrund des Ergebnisses einer gemeinsamen Auswertung von Sequenzdaten zweier mitochondrialer Gene, COI und NAD, gefordert. Auffällig ist jedoch, daß sich die einzeln abgeleiteten Dendrogramme der beiden Gene sowohl untereinander als auch von dem gemeinsamen Dendrogramm deutlich unterschieden (3). So war beispielsweise nach den COI-Sequenzen ein Pferdestamm von *E. granulosus* mit *E. vogeli* näher verwandt als mit anderen *E. granulosus*-Isolaten. Wenn aber die Sequenzdaten eines einzelnen Gens unsinnige phylogenetische Zusammenhänge implizieren, wie zuverlässig ist dann die Mittelung mit den Daten eines zweiten Gens?

### **Computer liefern immer ein Ergebnis**

Eine andere Autorengruppe zeigte bei Verwendung der gleichen Sequenzdaten, daß die phylogenetischen Schlüsse auch vom verwendeten Computerprogramm abhängig waren (6). Wenn nun aber unterschiedliche Gene unterschiedliche phylogenetische Zusammenhänge ergeben und das Ergebnis zusätzlich auch vom verwendeten Computerprogramm abhängig ist, stellt sich zwangsläufig die Frage, welches der verschiedenen Ergebnisse zutrifft, ob überhaupt eines davon richtig ist, und ob sich daraus die Synonymisierung von *E. multilocularis* mit *E. granulosus*, beziehungsweise die Etablierung von vier neuen *E. granulosus*-Arten ableiten läßt.

Da die gleichen Daten je nach Analysemethode unterschiedliche Ergebnisse liefern, die nicht alle gleichzeitig richtig sein können, erscheint die Datenlage zur Beantwortung dieser Fragen offensichtlich nicht ausreichend zu sein. Weniger Argwohn hätte jedoch die Kenntnis von nur einem der unterschiedlichen Phylogenien hervorgerufen, erstellt mit exakt erhobenen Sequenzdaten definierter Gene und mit aufwendigen Computerprogrammen objektiv ausgewertet. Wie aber kann die Validität computergenerierter Phylogenien beurteilt werden, wenn die Tatsache alleine, daß ein Dendrogramm generiert werden konnte, noch keinen hinreichenden Beweis für deren Richtigkeit darstellt? Schließlich können die abgeleiteten phylogenetischen Beziehungen auch von der Wahl der sogenannten „Außengruppe“ abhängen, wie auch von der Auswahl und der Anzahl der zu vergleichenden Sequenzen selbst, was wiederum großen Einfluß auf die initiale Ausrichtung („alignment“) der Sequenzen haben kann, die jeder Dendrogramm-Konstruktion vorausgeht und der im Vergleich zu den verschiedenen dendrographischen Analysemethoden fälschlicherweise kaum Beachtung geschenkt wird.

Es stellt sich deshalb die Frage, was „gute“ phylogenetische Zuordnungen von „schlechten“ Dendrogrammen unterscheidet. Oft wird versucht, die Vor- und Nachteile der einzelnen Analysemethoden, vor allem die der algorithmischen Methoden, wie zum Beispiel der Distanzmatrix-Methoden (paarweise „Cluster“-Analyse, „Neighbour Joining“) und die der Methoden mit einem Optimierungskriterium, beispielsweise der „Parsimony“-Analyse (Optimierungskriterium ist eine „minimale Evolution“) und der „Maximum Likelihood“-Methode (Optimierungskriterien sind möglichst „wahrscheinliche“ Mutationen) ausdiskutieren. Der Schlüssel zur Antwort liegt aber eher in den Primärdaten, weniger in der Art des verwendeten Analyseprogramms. Wenn zwei bewährte Programme bei gleichen Sequenzdaten unterschiedliche Phylogenien liefern, ist primär nicht die Qualität der Programme anzuzweifeln sondern eher die Eignung der Primärdaten zur Ableitung phylogenetischer Beziehungen. Ein Computer wird auch bei ungeeigneten Daten kaum eine Analyse verweigern. Was aber sind „ungeeignete“ Daten?

### **Informative und nicht-informative Daten**

Als Beispiel sei der menschliche Fingerabdruck genannt. Auch hier lassen sich mehr oder weniger große Ähnlichkeiten feststellen, aus deren Ausmaß, natürlich zu Unrecht, auf Verwandtschaftsverhältnisse geschlossen werden könnte. Dies ist ein Beispiel für „überdiskriminierende“ Daten, mit denen zwar Individuen voneinander unterschieden, nicht aber sinnvolle phylogenetische Beziehungen abgeleitet werden können. Es handelt sich demnach um „nicht-informative“ Daten. Ebenfalls nicht-informativ kann das Gegenteil sein, wenn nämlich bei einer untersuchten DNA-Sequenz nur wenige Mutationen gefunden werden und jeder weitere untersuchte polymorphe Locus das abgeleitete Dendrogramm verändert (ein einfacher Test, ob dieser Fall vorliegt ist die getrennte Analyse beider Hälften einer DNA-Sequenz). Während es noch relativ einfach erscheinen mag, diese Extreme zu erkennen, stellt sich die Frage, wie weniger offensichtliche nicht-informative Primärdaten identifiziert werden können. Hierzu müssen drei Kriterien genannt werden:

Vorsicht ist geboten, wenn unterschiedliche bewährte phylogenetische Analysemethoden unterschiedliche Ergebnisse liefern. Hier ist dann weniger die Eignung der einzelnen Methoden zu diskutieren als vielmehr die Eignung der Primärdaten.

Ebenfalls bedenklich ist, wenn unterschiedliche Zielgene unterschiedliche phylogenetische Zusammenhänge liefern. Hier könnte ganz einfach die Anzahl der in einem oder beiden Genen vorhandenen Polymorphismen zu klein sein, oder bei Mehrkopie-Genen, wie beispielsweise den Genen der ribosomalen RNA, könnten Sequenzen verschiedener rDNA-Klassen verglichen worden sein und damit paraloge anstatt orthologe Gene.

Drittens ist Vorsicht geboten, wenn das Ergebnis genotypischer Untersuchungen in eklatanter Weise den Ergebnissen der „klassischen“ Taxonomie widerspricht, wie dies am Beispiel der geforderten Synonymisierung von *E. multilocularis* und *E. granulosus* aufgezeigt wurde.

## Möglichkeiten und Grenzen der „molekularen Taxonomie“

Um die Möglichkeiten der „molekularen“ Taxonomie sinnvoll einschätzen und nutzen zu können, müssen auch deren Grenzen erkannt werden. Es ist unerlässlich zu erkennen, daß die Entscheidung, ob eine gegebene Methode zur Beantwortung einer bestimmten Frage geeignet ist oder nicht, davon abhängt, wie das Objekt dieser Frage (zum Beispiel Taxa im allgemeinen und Spezies im besonderen) definiert ist. Bei sich sexuell fortpflanzenden Organismen ist allgemein akzeptiert, daß die Art funktionell definiert ist, zum Beispiel durch die Fähigkeit (uneingeschränkt) fruchtbare Nachkommen zu erzeugen, auch wenn die genaue Definition seit ERNST MAYRS „Artbegriff und Evolution“ umstritten ist und keine Einigung darüber besteht, ob die Spezies-Barriere nur eine sterile  $F_1$ -Generation erfordert, oder ob erst eine sterile  $F_2$ -,  $F_{50}$ - oder  $F_1$ -Generation dieses Kriterium erfüllt. Der entscheidende Punkt ist, daß der Artbegriff der Molekularbiologie a priori nicht zugänglich ist, solange die Art funktionell definiert ist. Natürlich ist die Entwicklung und Diversifizierung von Genotypen nicht unabhängig vom Verlauf der Evolution und der Entwicklung von Arten, und genotypische Vergleiche können zumindest Hinweise auch auf einen möglichen Speziesstatus von untersuchten Isolaten liefern. Eine wichtige, heute oft vernachlässigte methodische Voraussetzung, die in vielen „traditionellen“, scheinbar überholten taxonomischen Untersuchungen selbstverständlich war, ist die, daß das Ausmaß der Polymorphismen innerhalb der untersuchten Populationen ausreichend beschrieben werden muß, bevor taxonomische Fragen, zum Beispiel die einer möglichen Konspezifität, sinnvoll diskutiert werden können. Viele Dendrogramme in der molekularen Taxonomie basieren auf den Genotypen von jeweils nur einem oder wenigen Isolaten der zu unterscheidenden Taxa, was besonders abträglich sein kann, wenn eine Auflösung nahe des Speziesniveaus angestrebt wird.

Natürlich gibt es keine absoluten Prozentwerte von DNA-Homologien, die den verschiedenen taxonomischen Ebenen entsprechen, nicht einmal für Taxa der gleichen Ebene, beispielsweise Spezies der gleichen Gattung. Wenn aber die genetische Variation innerhalb zweier Populationen um Größenordnungen kleiner ist als die zwischen den Populationen und wenn sich diese Populationen in dendrographischen Analysen unabhängig von den verwendeten Algorithmen und willkürlich gewählten Programmparametern klar trennen (das heißt, wenn sich ihre DNA-Sequenzen bereits durch die unmittelbare Anschauung unterscheiden lassen und nicht erst durch eine bestimmte Wahl der Programmparameter), so ist dies doch zumindest ein Hinweis darauf, daß die Populationen verschiedenen Taxa angehören sollten. Einer zweiten Argumentation folgend scheint es trivial, daß sexuelle Fortpflanzung durch einen Austausch genetischen Materials gekennzeichnet ist. Deshalb ist auch der Nachweis eines Genflusses zwischen Mitgliedern einer Population ein starker Hinweis auf das Vorliegen einer Konspezifität. Zugegebenermaßen, wie auch bei der Korrelation von DNA-Homologien zu taxonomischen Ebenen, ist es leichter, sich bei Extremen zu einigen, und wie das Beispiel von *E. multilocularis* zeigte, wird es Fälle geben, wo die Beschreibung knapp bemessener Zielsequenzen bei nur wenigen Individuen eine Aussage nicht ohne weiteres rechtfertigt.

Zusammenfassend muß eingestanden werden, daß die molekulare Taxonomie nur Indizienweise liefern kann, sei es zu Fragen der Taxonomie im allgemeinen oder zur Konspezifität im besonderen. Sie kann nichtsdestoweniger aber im Einzelfall von großem Wert sein, besonders wenn phänotypische (morphologische, biochemische und immunologische) Charakteristika mit berücksichtigt werden. Denn wissenschaftliche Methoden, auch die der Molekularbiologie, operieren nicht mit der „Wahrheit“, sondern immer nur mit Wahrscheinlichkeiten, und eine Hypothese im wissenschaftlichen Sinn, sei es eine taxonomische Zuordnung oder die Validierung eines Speziesstatus, kann niemals „bewiesen“ sondern immer nur widerlegt werden.

## Fazit

Der Verlockung rasch erzeugter und überinterpretierter genetischer Daten, die mit mehr oder weniger geeigneten Methoden an mehr oder weniger geeigneten Zielgenen erhoben werden, sollte widerstanden und Prinzipien, die in früheren, „traditionellen“ morphologischen und biologischen Untersuchungen selbstverständlich waren – und sei es nur das einer genügend großen Stichprobe zur Beschreibung einer Population – sollten nicht vorschnell als überholt und antiquiert abgetan

werden. Die scheinbar objektive und exakt quantifizierbare Beschreibung eines engen genetischen Locus unklarer phylogenetischer Bedeutung bei nur wenigen Isolaten darf nicht als bequeme Abkürzung und als Ersatz für umfassende und sorgfältige Methoden der klassischen Systematik akzeptiert werden.

**Zusammenfassung** Der Artrang der Spezies *Echinococcus multilocularis* LEUCKART, 1863 wird nach neueren molekularbiologischen Untersuchungen kontrovers diskutiert. Computer-generierte Stammbäume aufgrund von DNS-Sequenzvergleichen widersprechen einer von *E. granulosus* getrennten phylogenetischen Entwicklung und weisen *E. multilocularis* den Rang eines *E. granulosus*-Stammes zu. Je nach Autor sollten mehreren *E. granulosus*-Stämmen der Artrang zugebilligt werden oder aber *E. multilocularis* mit *E. granulosus* synonymisiert werden. Aber auch die Wahl des Zielgens und die Wahl des Computeralgorithmus beeinflussten die resultierenden Stammbäume. Die Zusammenschau der bisher verfügbaren phänotypischen und genotypischen Daten gibt Anlaß zur Warnung vor taxonomischen Revisionen, die alleine auf einzelnen, divergenten Beschreibungen von Genotypen beruhen.

**Schlüsselwörter** *Echinococcus multilocularis*, molekulare Taxonomie, Phylogenie, Spezies.

**Summary** *Calls for a reclassification of the species Echinococcus multilocularis: Potentials and limitations of "molecular taxonomy"*

The species status of *Echinococcus multilocularis* LEUCKART, 1863 has been controversially discussed after recent molecular biologic findings. Computer generated dendrograms based on DNA sequences contradict a phylogenetic development separate from *E. granulosus* and suggest a close relationship of both species. According to different authors, several *E. granulosus* strains should either be granted species status or *E. multilocularis* should be synonymized with *E. granulosus*. But depending on the target gene and the computer algorithm employed divergent dendrographic plots were observed. The consideration of the thus far available phenotypic and genotypic data presents reason to caution of taxonomic revisions which are solely based on single, divergent descriptions of genotypes alone.

**Key words** *Echinococcus multilocularis*, molecular taxonomy, phylogeny, species.

#### Literatur

1. BÖTTGER, E. C. et al. (1992): Disseminated "Mycobacterium genavense" infection in patients with AIDS. *Lancet* 340, 76-80.
2. BÖTTGER, E. C., HIRSCHL, B., COYLE, M. B. (1993): *Mycobacterium genavense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 841-843.
3. BOWLES, J., BLAIR, D., McMANUS, D. P. (1995) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110, 317-328.
4. LÉVY-FRÉBAULT, V. V., PORTAELS, F. (1992) Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 315-323.

5. RAUSCH, R. L. (1997):  
Echinococcus granulosus: biology and ecology.  
In: ANDERSEN, F. L. (Hrsg.):  
Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern countries with special reference to Morocco, 18-53.  
1. Aufl., Brigham Young University, Provo (USA).
6. THOMPSON, R. C. A., LYMBERY, A. J., CONSTANTINE, C. C. (1995):  
Variation in Echinococcus: towards a taxonomic revision of the genus.  
Advances in Parasitology 35, 145-176.
7. VOGEL, H. (1955):  
Über den Entwicklungszyklus und die Artzugehörigkeit des europäischen Alveolarechinococcus.  
Deutsche Medizinische Wochenschrift 80, 931-932.
8. VOGEL, H. (1957):  
Über den Echinococcus multilocularis Süddeutschlands.  
Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie 8, 404-454.

**Korrespondenzadresse** Dr. rer. nat. Dr. med. Heinz Rinder  
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin  
Universität München  
  
Leopoldstraße 5  
D-80802 München · Bundesrepublik Deutschland

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1998

Band/Volume: [20](#)

Autor(en)/Author(s): Rinder H.

Artikel/Article: [Forderungen nach einer Reklassifizierung der Spezies Echinococcus multilocularis: Möglichkeiten und Grenzen der "Molekularen Taxonomie" 79-84](#)