

Experimentelle Evolution einer synthetischen Symbiose zwischen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Daniel Effert

März 2023

1. Gutachter*in: Prof. Rupert Mutzel

2. Gutachter*in: Prof. Mitja Remus-Emsermann

Disputation am 18.02.2024

Danksagung

Schreiben musste ich diese Arbeit zwar allein – doch an ihrem guten Gelingen beteiligt waren jede Menge mir nahestehender Menschen, denen ich Dank schulde.

An dieser Stelle, und mögen mir alle anderen verzeihen, muss mein Doktorvater Professor Rupert Mutzel alleinig genannt werden. Zu jeder Uhrzeit und Feiertagen war er für mich da, hat mich aufgebaut und mir immer geholfen, auch wenn es mal die ein oder andere schwerere Phase gegeben hat. Das werde ich dir nicht vergessen. Danke dir Rupert!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „**Experimentelle Evolution einer synthetischen Symbiose zwischen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae***“ selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die verwendeten Quellen und Hilfsmittel sowie wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation ist in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden.

Daniel Effert

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Zusammenfassung	9
Abstract	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	12
1.1 Darwin und Kollegen	12
1.2 Symbiotische Beziehungen	13
1.3 Einführung in die experimentelle Evolution	14
1.4 Die kontinuierlichen Kulturen	16
1.5 Hypothesen zum Ausgang des Symbioseexperiments	19
1.5.1 „Historischer“ Hintergrund dieser Arbeit	19
1.5.2 Szenarium für die experimentelle Evolution einer synthetischen Symbiose zwischen <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.6 Die Versuchsorganismen und das Set-up	21
1.6.1 Das Bakterium <i>Escherichia coli</i>	21
1.6.2 Der Hefepilz <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.6.3 Obligate Syntrophie zwischen <i>E. coli</i> XE2479 und <i>S. cerevisiae</i> YA2800-2	23
2 Zielsetzung der Arbeit	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Verwendete Kits und Chemikalien	28
3.1.2 Bakterien- und Hefestämme	29
3.1.3 Medien und Wachstumsbedingungen	31
3.1.4 Oligonukleotide	33
3.1.5 Datenbanken	34
3.2 Methoden	34
3.2.1 Messung der optischen Dichte (OD_{600})	34
3.2.2 Zentrifugieren	34

3.2.3	Kultur in Flüssigmedien	35
3.2.4	Kultur auf Festmedium und KBE-Bestimmung.....	35
3.2.5	Konservieren und Waschen der Mikroorganismen	36
3.2.6	Bestimmen der Generationszeiten mittels Wachstumskurven	37
3.2.7	Sensitivitätsbestimmung mittels Plattendiffusionstests	38
3.2.8	Konditionierungsversuche	39
3.2.9	Evolutionsmaschine (Genemat)	40
3.2.10	Extraktion genomischer DNA	43
3.2.11	NGS-Genomsequenzierung	43
3.2.12	Überprüfung der Stämme auf ihre genetische Identität.....	44
3.2.13	Agarose Gelelektrophorese.....	45
3.2.14	Mikroskopie.....	45
3.2.15	Statistik	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Kultur auf Festmedium	47
4.1.1	YA2800-2	47
4.1.2	XE2479	48
4.2	Agardiffusionstests mit XE2579/YA2800-2	49
4.2.1	Abhängigkeit von <i>S. cerevisiae</i> YA2800-2 von Phosphat oder metabolischen Produkten von <i>E. coli</i> XE2479 und Sensitivität gegen G418	50
4.2.2	Abhängigkeit von <i>E. coli</i> XE2479 von Sulfit oder metabolischen Produkten von <i>S. cerevisiae</i> YA2800-2 und Sensitivität gegen Kanamycin	51
4.3	Konditionierungsversuche	52
4.3.1	<i>E. coli</i> XE2479 im konditionierten Medium SGX- Δ SO ₄ ²⁻	52
4.3.2	<i>S. cerevisiae</i> YA2800-2 im konditionierten Medium SGX- Δ PO ₄ ³⁻	53
4.4	Das Symbioseexperiment im Genemat	54
4.4.1	Kinetik der Symbioseexperimente	54
4.4.2	KBE-Bestimmung im laufenden Symbioseexperiment.....	56
4.5	Bestimmung der Generationszeiten	59
4.6	Serielle Verdünnung mit anschließender KBE-Bestimmung	60

4.6.1	XE2479 in SGX-Flüssigmedium (+Phosphat).....	61
4.6.2	XE2479 und XE2096 in SGPI-Flüssigmedium (+Phosphonat).....	62
4.7	Überprüfung der Mikroorganismen auf ihre genetische Integrität.....	63
4.7.1	PCR.....	63
4.7.2	Genomanalyse / NGS.....	64
4.7.3	Lichtmikroskopie während des Symbioseexperiments.....	67
5	Diskussion.....	69
5.1	Kultur und Bestimmung der Phänotypen auf Festmedium.....	69
5.1.1	Wachstumsverhalten von <i>S. cerevisiae</i> YA2800-2 auf Komplex- und Agarplatten mit chemisch definiertem Medium.....	69
5.1.2	Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> XE2479 auf Komplex- und Agarplatten mit chemisch definiertem Medium.....	71
5.2	Agardiffusionstests mit XE2479/YA2800-2.....	72
5.2.1	Abhängigkeit von <i>S. cerevisiae</i> YA2800-2 von Phosphat oder metabolischen Produkten von <i>E. coli</i> XE2479 und Sensitivität gegen G418.....	72
5.2.2	Abhängigkeit von <i>E. coli</i> XE2479 von Sulfid oder metabolischen Produkten von <i>S. cerevisiae</i> YA2800-2 und Sensitivität gegen Kanamycin.....	74
5.3	Konditionierungsversuche mit XE2479 und YA2800-2.....	75
5.3.1	Konditionierungsversuche mit XE2479.....	75
5.3.2	Konditionierungsversuche mit YA2800-2.....	76
5.4	Experimentelle Symbiose.....	77
5.4.1	Kinetik der Symbioseexperimente.....	77
5.4.2	KBE-Bestimmung und mikroskopische Untersuchungen im laufenden Symbioseexperiment.....	80
5.4.3	KBE-Verhalten von XE2479 mit dem Vektor <i>pXEN154phnCDE</i> und XE2096, während serieller Verdünnungen.....	85
5.5	Evolution der Generationszeiten im Genematexperiment.....	87
5.6	NGS-Daten im Kontext des Symbioseexperiments.....	88
5.6.1	SNVs in XE2479 nach 130 Tagen.....	88
5.6.2	SNVs in YA2800-2 nach 130 Tagen.....	91
5.6.3	SNVs im Phosphonatkrptogen in XE2479.....	94

6	Ausblick.....	96
7	Literaturverzeichnis.....	99

Zusammenfassung

Symbiosen markieren wichtige Übergänge in der Evolution lebender Organismen. Es ist weitgehend unbekannt, wie sie sich etablieren. Ein Schritt zum Verständnis könnte sein, synthetische Symbiosen unter strikt kontrollierten, selektiven Bedingungen im Labor zu erzeugen und diese mikrobiologisch und molekularbiologisch zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurde eine Strategie entwickelt und angewendet, um zwei willkürlich ausgewählte Organismen, das Bakterium *Escherichia coli* und den eukaryontischen Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* unter obligater metabolischer Kopplung in kontinuierlicher Kokultur in Suspension zu einer symbiotischen Assoziation zu zwingen. Als Kopplungsfaktoren wurden die chemischen Elemente Schwefel und Phosphor gewählt. *E. coli* wurde genetisch so verändert, dass der erste Schritt in der Assimilation von Schwefel, die Reduktion von Sulfat, nicht mehr katalysiert werden kann; als Schwefelquelle muss Sulfit durch *S. cerevisiae* bereitgestellt werden. *S. cerevisiae* kann im Gegenzug nicht auf Phosphonaten als Phosphatquelle wachsen; Phosphat muss durch den Stoffwechsel von *E. coli* aus dem Substrat Phosphonat bereitgestellt werden. Voruntersuchungen bestätigten die gegenseitige Abhängigkeit der beiden Organismen von der jeweiligen metabolischen Leistung des Partnerorganismus: In Kokultur kann der verwendete *E. coli*-Stamm in einem chemisch definierten Medium mit Sulfat als einziger Schwefelquelle wachsen, wenn Schwefel in reduzierter Form durch *S. cerevisiae* beigesteuert wird, die Hefe kann mit Phosphonat als einziger Phosphatquelle wachsen, wenn Phosphat durch *E. coli* aus Phosphonat freigesetzt wird. In zwei unabhängigen Experimenten im „Genemat“-Format mit Sulfat und Phosphonat als einzigen Schwefel- und Phosphatquellen konnten beide Organismen über ≈ 815 und ≈ 642 Generationen in kontinuierlicher Kokultur persistieren. In jedem der beiden Experimente wurden zwei adaptive Ereignisse registriert und charakterisiert, die zu erhöhten Verdünnungsraten (d.h. zu einer erhöhten Produktivität des gekoppelten Systems) führten. DNA-Sequenzanalysen der Genome der evolvierten Organismen identifizieren genetische Veränderungen während des Experiments, die dazu beigetragen haben könnten. Mikroskopische Inspektionen von Proben aus der Kultur zeigten eine Tendenz zur physikalischen Assoziation der beiden Organismen während bestimmter Phasen der Kokultur.

Abstract

Symbioses mark important transitions in the evolution of living organisms. How they become established is largely unknown. A step towards understanding those, could be creating synthetic symbioses under strictly controlled, selective conditions in the laboratory and characterizing them microbiologically and molecularly. In this work, a strategy has been developed and applied to force two randomly chosen organisms, the bacterium *Escherichia coli* and the eukaryotic microorganism *Saccharomyces cerevisiae*, into a symbiotic association under obligate metabolic coupling in continuous co-culture in suspension. The chemical elements sulphur and phosphorus were chosen as coupling factors. *E. coli* has been genetically modified so the first step in sulphur assimilation, the reduction of sulphate, can no longer be catalysed. As a source of sulphur, sulphite must be provided by *S. cerevisiae*. Conversely, *S. cerevisiae* cannot grow on phosphonates as a phosphate source. Phosphate must be provided by the metabolism of *E. coli* from the substrate phosphonate. Preliminary investigations confirmed the mutual dependence of the two organisms on the respective metabolic activity of the partner organism: in co-culture, the chosen *E. coli* strain can grow in a chemically defined medium with sulphate as the sole sulphur source if sulphur is contributed to reduced form by *S. cerevisiae*. Yeast can grow with phosphonate as the sole source of phosphate when phosphate is released from phosphonate by *E. coli*. In two independent experiments at the "Genemat"-format with sulphate and phosphonate as the sole sources of sulphur and phosphate, both organisms were able to persist for ≈ 815 and ≈ 642 generations in continuous co-culture. In each of these two experiments, two adaptive events were observed and characterized that led to increased dilution rates (i.e., increased productivity of the coupled system). DNA sequence analyses of the genomes from the evolved organisms identified genetic changes during the experiment that may have contributed to the adaptation events. Microscopic inspection of samples from the culture showed a tendency towards physical association of the two organisms during certain phases of the co-culture.

Abkürzungsverzeichnis

AA Amino acid

Amp Ampicillin

AmpR Ampicillinresistenz

APS Adenosin-5-phosphosulfat

Bp Basenpaare

ddH₂O bidestilliertes Wasser

DNase Desoxyribonuklease

dNTPs Desoxyribonukleosidtriphosphate

E Extinktion

EB Elution buffer

EDTA Ethylendiamintetraacetat

HK Hauptkultur

Kan Kanamycin

LB Lysogeny broth

MC Mindestkonzentration

MM Mastermix

MOPS 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure

MPS Methylphosphonsäure

OD optische Dichte

PAPS 3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat

PCR *Polymerase chain reaction*

PEP Phosphoenolpyruvat

RPM Revolutions per minute

TBE TRIS-Borat-EDTA-Puffer

T_m Schmelztemperatur

TRIS Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

ÜN über Nacht

ÜNK Übernachtkultur

VK Vorkultur

WT Wildtyp

YNB Yeast nitrogen base

YPD Yeast extract peptone dextrose

1 Einleitung

1.1 Darwin und Kollegen

Aus den Lehrbüchern ist uns die Redewendung „*Survival of the fittest*“ gleichbedeutend mit „*Überleben der Passendsten*“ geläufig geworden. Geprägt wurde diese Aussage von Herbert Spencer (1864) (Herbert, 1864), später aufgegriffen und diskutiert von Charles Darwin (1869). Während H. Spencer sich nicht genau äußerte, wer der „Fitteste“ sei, gab C. Darwin bereits eine Orientierung darüber:

„Es ist nicht die stärkste der Spezies, die überlebt, noch die intelligenteste, die überlebt. Es ist diejenige, die am anpassungsfähigsten an Veränderungen ist“.
(Darwin & Murray, 1859)

Das darwinistische Modell der Evolution durch natürliche Selektion besagt, dass Evolution ein allmählicher Prozess der Veränderung ist (*standard evolutionary theory = SET*), welche durch Anhäufung von zufälligen Mutationen, gefolgt von kompetitiver Selektion, vonstattengeht. Dieses Modell ist seit fast 170 Jahren die zugrunde liegende Evolutionstheorie in der Biologie und geht somit nahtlos in die Moderne der Molekularbiologie über, nach der Entdeckung von DNA und RNA als genetische Bausteine des Lebens (Watson & Crick, 1953). Laut Darwin kann:

„Natur [...] niemals einen Sprung machen, sondern muss mit den langsamsten und kürzesten Schritten voranschreiten“ (Darwin & Murray, 1859)

Dennoch scheinen evolutionäre Sprünge offensichtlich, sowohl in der Paläontologie (Erwin & Valentine, 2013) als auch bei molekularen phylogenetischen Analysen (Takemura, 2001). Dies weist darauf hin, dass das Konzept des Gradualismus durch natürliche Selektion nicht für alles evolutionäre Leben auf der Erde zutreffen kann (Ridley, 2011). Eine Alternative zur „*standard evolutionary theory*“ bietet uns die „*modern synthesis*“ (Dobzhansky, 1938; Huxley, 1942) und seit 2008 eine Überarbeitung dieser: „*extended evolutionary synthesis = ESS*“ (Laland & Uller, 2015). An dieser Stelle soll nicht über die Notwendigkeit der ESS befunden werden (Pigliucci, 2010). Beide erklären aber den Artenwandel und die Makroevolution, unter Hinzunahme von Genetik, Populationsbiologie, Paläontologie, Zoologie, Botanik und Systematik.

Unter Zuhilfenahme der „*modern synthesis*“ und ESS wurden zwei Hypothesen aufgestellt, welche die Evolutionssprünge erklärten:

- i. *Punctuated equilibrium* (Theorie des durchbrochenen Gleichgewichts): Arten bleiben über große geologische Zeitspannen phänotypisch unverändert (Stasis). Durch plötzliche Umweltänderungen kommt es zu einer explosiven Evolutionsphase (explosive Formbildung), gefolgt von einer neuen Stasis. (Gould & Eldredge, 1977)
- ii. Das Symbiosemodell besagt, dass große Sprünge aufgetreten sind, wenn zwei oder mehr Organismen fusionieren und eine neue taxonomische Gruppe bilden. (Ryan, 2002)

Für den inhaltlichen Aufbau dieser Arbeit wird weiterführend das Symbiosemodell tiefergehend betrachtet.

1.2 Symbiotische Beziehungen

Symbiosen gehören vielleicht zu den größten Rätseln der Biologie. Auch historisch gesehen gibt es immer wieder Verwirrung bei der Definition von Symbiose (Sapp, 1994). Einige behaupten sogar, dass es an dieser Stelle zu keiner Auflösung dieses Durcheinanders kommen wird und sich nicht an den vielen Definitionen zu stören sei (Whitfield, 1979; Wilkinson, 2001). Jedoch benötigen komplexe Wissenschaften eine akkurate Sprache, welche klare Definitionen voraussetzt.

Auch wenn Anton de Bary (Bary, 1879) den Begriff „*Symbiosis*“ geprägt hat, welcher im erweiterten Verständnis noch immer im angloamerikanischen Raum gebräuchlich ist, war es der deutsche Wissenschaftler Albert Bernhard Frank, der den Begriff Symbiotismus erstmalig verwendet hat (Frank & Leunis, 1877). Diese Arbeit stützt sich auf folgende Definition, ursprünglich geprägt von B. Frank:

„Symbiose beschreibt die Vergesellschaftung von mindestens zwei Organismen unterschiedlicher Art, die für beide Partner vorteilhaft ist.“

Als das Konzept der Symbiose erstmalig Ende des 19. Jahrhunderts vorgestellt worden war, wurde diese als neues oder ungewöhnliches Leben verortet, auch von Darwin. Wahrscheinlich bezog er daher die Symbiose nicht in seine Theorien der natürlichen Selektion mit ein (Ryan, 2002). Herbert Spencer beschreibt mit „*survival of the fittest*“ den Wettbewerb der natürlichen Selektion. Werden Kommensalismus und/oder Mutualismus (Symbiosen) mit Konkurrenz (natürliche Selektion) verglichen, sind die Interaktionen der Organismen vollkommen unterschiedlich und finden auf unterschiedlichen Organisationsebenen statt. Während der

Kommensalismus oder die Symbiose zwischen unterschiedlichen Ordnungen stattfinden, findet Konkurrenz normalerweise zwischen ähnlichen Spezies statt. Die Art und Weise, wie die Beziehung der beteiligten Arten die Fitness beeinflusst, erfordert verschiedene evolutionäre Paradigmen. Bei der Konkurrenz steigt die Fitness des einen Organismus, und damit sinkt die des anderen bis zum Aussterben. Während beim Mutualismus die Fitness zu Gunsten beider Organismen steigt, steigt die Fitness beim Parasitismus bei einem der Organismen zu Lasten des anderen. Gibt es in dem Fall ein ausbalanciertes System, wird die Fitness des parasitierten Organismus nicht so weit abgeschwächt, dass es zum Aussterben dessen kommt. Dieses Gleichgewicht kann gestört werden, wenn es zu extremen ökologischen Änderungen kommt (Roossinck, 2005). Der Wechsel von negativen zu positiven Beziehungen scheint besonders dann erleichtert zu sein, wenn ungünstige Umweltbedingungen die Einzelorganismen so limitieren, dass eine Symbiose einen starken selektiven Vorteil bietet (Odum, 1983).

Es ist davon auszugehen, dass zu jedem Beginn einer Symbiose ein gewisses Maß an „Feindseligkeit“ besteht. Und nur durch eine angemessene Regulierung und oft aufwendige Anpassung wird der Zustand des gegenseitigen Nutzens aufrechterhalten und letztendlich manifestiert, ggf. in einer Eusymbiose. Dieser anfängliche Mutualismus wird zufällig begonnen. Er funktioniert aufgrund von komplizierten physikalischen und chemischen Anpassungen zwischen beiden Partnern. Diese Anpassungen assoziieren nicht nur zwischen den Organismen, sondern stehen auch in direktem Austausch mit der Umwelt (Wells & Huxley, 1931). Sollte es zu einer Schiefelage der balancierten Einstellungen während solch einer beginnenden Symbiose kommen, kann diese wieder zusammenbrechen (Lewis, 1973).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Symbiose als eine Sprungfeder der Evolution betrachtet werden muss. Das Einstellen einer solchen ist aber ein diffiziler und seltener Prozess. Wie bei allem in der belebten und unbelebten Natur hat es etwas mit „Zufall und Notwendigkeit“ zu tun (Monod, 1970).

1.3 Einführung in die experimentelle Evolution

Experimentelle Evolution geschieht, wenn eine Population von Organismen einer kontrollierten Umwelt ausgesetzt wird, um deren Adaptationsdynamiken festzustellen. Sämtliche Parameter (z. B. Populationsgröße, Variabilität, Maß der Auslenkung vom Ausgangszustand) können unter Laborbedingungen kontrolliert werden (Kawecki & Lenski, 2012). Von Dallinger und Huxley (1878) wurde das wohl erste, unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführte Evolutionsexperiment vorgenommen. Hier wurden Mikroorganismen graduell über Jahre an höhere Temperaturen angepasst. Durch natürliche Selektion konnte am Ende die Population bei Temperaturen überleben, welche 30 Kelvin über der Ausgangstemperatur lag (Dallinger &

Huxley, 1878). Ab diesem Zeitpunkt wurden Evolutionsexperimente durchgeführt, um verschiedene Hypothesen auszutesten, unter anderem:

- Lamarcksche Evolutionstheorie (Agar, 1931; Rhine & McDougall, 1933)
- Genetische Variation (Dobzhansky & Queal, 1938; Middleton, 1915)
- Natürliche Selektion und Zucht (Pearl, 1915; Reed & Reed, 1948)
- Merkmalvererbung (Lenski, 1991; Siegel, 1962; Yoo, 1980)
- Symbiosen und Parasitismus (Ebert, 1998; Salt & Gray, 1934)
- Gerichtete Evolution (Beaudry & Joyce, 1992; Francis & Hansche, 1973)
- Xenobiotica und Biokatalyse (Bornscheuer & Altenbuchner, 1998; Kimoto & Yamashige, 2013; Marlière et al., 2011; Stemmer, 1994)

Allen gemeinsam ist, einen Organismus unter kontrollierten Bedingungen zu einem vorher definierten Zustand zu evolvieren und dies auch reproduzierbar (Garland & Rose, 2009). Dies kann im Labor beobachtet werden, wenn sich Organismen durch natürliche Selektion (Allelfrequenzänderung) an ihre neuen Umgebungsbedingungen adaptieren. Adaptationen treten in Form von neu erworbenen Mutationen oder Allelfrequenzänderungen auf (Long & Liti, 2015). Weiterhin können „*genetic drift*“ und „*gene flow*“ eine Rolle spielen (Kawecki & Lenski, 2012). Obgleich viele Studien von natürlicher Selektion handeln, besteht zuweilen eine Unklarheit des Konzeptes (Gildenhuis, 2019). Im Allgemeinen geht es bei natürlicher Selektion um das begründete Bestehenbleiben und Weitergeben angepasster biologischer Fitness, resultierend aus einer Veränderung des Phänotyps. Dabei ergibt sich die Fitness aus dem Phänotyp, welcher konform seiner Umgebung ist (Fieher, 1922; Futuyma, 2013; Wade & Kalisz, 1990). Gebräuchlich wird bei Evolution durch natürliche Selektion auch von „adaptiver Evolution“ gesprochen, während bei der „*Neutral theory of molecular evolution*“ die meisten aufgetretenen Mutationen als neutral eingestuft werden, sprich dem Organismus keine direkten Vor- oder Nachteile entstehen. Es wird sogar so weit gegangen, dass die Gendrift für die Evolution der Gene die bedeutsamere Stufe einnimmt. Dennoch schließt die „*Neutral theory of molecular evolution*“ die Veränderung für bestimmte Gene durch selektionsgetriebene Veränderung nicht aus, vorausgesetzt diese sind nicht letal (Kimura, 1968a, 1968b).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich eine Population von Organismen an eine Herausforderung adaptieren kann, indem sie die nötigen (genetischen) Veränderungen in einem Schritt oder einer Abfolge von nicht unmöglichen Schritten durchführt (Smith, 1970). Dabei müssen Ausgangspunkt, adaptiver Weg und Endpunkt des Experiments definiert sein. In den meisten Fällen wird es auf eine selektive Herausforderung mehrere Lösungen geben. In dem selektiven Szenarium müssen daher Seitenwege blockiert werden, zum Beispiel durch

entsprechende genetische Konstruktion der Ausgangsorganismen oder die Wahl bestimmter chemischer physikalischer Parameter (Marlière et al., 2011).

1.4 Die kontinuierlichen Kulturen

Um Organismen unter definierten und kontrollierten Bedingungen zu einem vorher definierten Zustand zu evolvieren, müssen wir grundsätzlich nur den Gesetzen der Thermodynamik gehorchen. Offenbar gibt es in der Natur physikalische, genealogische und auch ökologische Zwänge, die dieses freie Evolvieren verhindern. Evolvierende Populationen von diesen Zwängen zu befreien, eine Natur der freien Entfaltung zu bieten ist ein technisches, kein theoretisches Problem. Dieses Problem ist für den Fall großer Populationen kleiner biologischer Einheiten mit der kontinuierlichen Kultur gelöst.

Die kontinuierliche Kultur von Mikroorganismen ist eine Technik von zunehmender Bedeutung in der Mikrobiologie. Wesentliches Merkmal dieser Technologie ist, dass das mikrobielle Wachstum in einer kontinuierlichen Kultur unter konstanten Bedingungen stattfindet. Das heißt, Wachstum findet mit einer konstanten Rate und in einer konstanten Umgebung statt. Faktoren wie pH-Wert, Konzentrationen der Nährstoffe, Stoffwechselprodukte und Sauerstoff, die sich fortwährend in einer Batchkultur (Hungate & Macy, 1973) ändern, werden in einer kontinuierlichen Kultur konstant gehalten. Darüber hinaus können diese Faktoren unabhängig gesteuert werden. Diese Eigenschaften der kontinuierlichen Kulturtechnik machen sie zu einem wertvollen Forschungsinstrument (Elsworth & Herbert, 1956).

Üblicherweise wird die serielle Subkulturtechnik zu kontinuierlicher Kultur hinzugezählt. Bei der seriellen Kultur werden Kulturgefäße mit sterilem Nährmedium mit der gewünschten Kultur inokuliert. Nach definierter Inkubationszeit wird ein Teil der Kultur in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium überimpft. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden (Lenski & Travisano, 1994). In dieser begrenzten Umwelt mit endlichen Ressourcen kann es keine unendlichen großen Populationen geben. Daher kann es zum Aussterben der Population kommen bzw. zu stagnierendem Wachstum. Eine Population im begrenzten Raum verändert auch ihre Umwelt, z. B. die Zusammensetzung der Ressourcen, es entsteht „Umweltverschmutzung“, es wird sich der Platz streitig gemacht etc. Die Sache wird kompliziert und chaotisch. Für die experimentelle Evolution ist Chaos aber unerwünscht, da unter definierten und kontrollierten Bedingungen experimentiert werden soll.

Eine praktikable Lösung hierzu boten Novicks und Szilards *Chemostat* und zeitgleich die Entwicklung von Monods *Bactogene* zur Herstellung einer definierten, unstrukturierten, unbegrenzten Umwelt dadurch, dass sie sich im Gleichtakt mit der Proliferation lebender Einheiten erneuert. Wachstum der Population und die Erneuerung der Ressourcen werden

automatisch balanciert (Monod, 1950; Novick & Sziliard, 1950). Wird solch eine Kulturapparatur beimpft, so wird sich nach einer kurzen Adaptationsphase ein „steady state“ einstellen. In diesem bleiben die chemischen und physikalischen Umweltbedingungen und der Zustand der Organismen so lange konstant, bis das System durch ein biologisches Ereignis ausgelenkt wird. Typischerweise geschieht dies nach Auftauchen einer genetischen Veränderung. Nachdem diese genetische Veränderung aufgetreten ist, stellt sich ein neuer „steady state“ ein. Während der „steady state“-Phasen ist das System einfach zu beschreiben, aus einem Verhalten nach einer Auslenkung können die Eigenschaften der adaptiven Veränderung extrahiert werden (Kubitschek, 1970).

Betrachten wir zwei Idealfälle, Chemostat und Turbidostat (Abbildung 1).

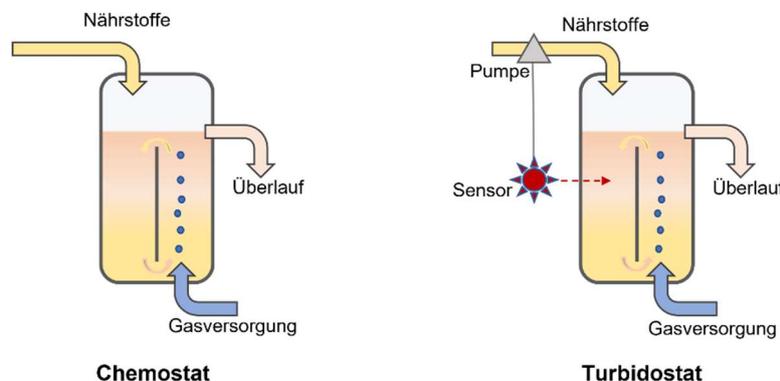


Abbildung 1: Skizze eines Chemostats und Turbidostats, mit „Airlift“-Technologie. Das Umwälzen der Kultur erfolgt durch Eintrag von Luft und einem Trennsteg im Reaktor. Im Medium des Reaktionsgefäßes befinden sich alle benötigten Nährstoffe, außer einem limitierenden. Im Chemostaten monopolisiert der Organismus, welcher die Ressourcen am besten nutzt. Im Turbidostat monopolisiert der Organismus, welcher die höchste Proliferationsrate aufweist.

Im Chemostaten wird ein Kulturgefäß von konstantem Volumen in definierten physikalischen Bedingungen mit konstanter Rate mit frischem Nährmedium versorgt. Da das Volumen konstant ist, wird mit gleicher Rate Organismensuspension entfernt. Wenn die Population nicht proliferiert, wird ihre Dichte exponentiell abnehmen. Damit die Populationsdichte konstant bleibt, muss die Population mit einer Rate wachsen, die genau der Rate der Verdünnung mit frischem Medium entspricht. Ist die Verdünnungsrate kleiner als die maximale Wachstumsrate, so wird die Population die gegebene Umwelt maximal ausnutzen, ihre Dichte wird durch die Konzentration eines einzigen Nahrungsfaktors (oder auch die Akkumulation eines wachstumshemmenden Faktors) limitiert. In diesem „steady state“ kann die Fitness eines Individuums definiert werden. Eine genetische Veränderung wird die Fitness seiner Nachkommen entweder verringern, erhöhen oder nicht beeinflussen. Wird die Fitness reduziert, so verschwindet die neue Population mit einer Rate, die durch den Fitnessunterschied bestimmt wird, aus dem System. Wird die Fitness erhöht, wird der veränderte Typ die Ausgangspopulation verdrängen, das System erreicht einen neuen „steady

state“ und bleibt dort bis zu einer neuen biologischen Veränderung. Im Chemostat finden wir also immer denjenigen Typ von Organismus, der die vorhandenen Ressourcen am effizientesten nutzt.

Im Turbidostat ist die Erneuerung der Umwelt von der Populationsdichte abhängig (Bryson & Szybalski, 1952). Die Population hat auf unbegrenzte Ressourcen Zugriff. Weil die Populationsdichte konstant gehalten wird, ist hier der „*steady state*“ durch eine konstante Proliferationsrate aller biologischen Einheiten definiert. Diejenigen Varianten werden das System monopolisieren, die die höchste Proliferationsrate haben. Wieder können Fitness, Fitnessunterschiede und Populationsdynamik beschrieben werden, diesmal aber nicht anhand der Populationsdichte, sondern anhand der Verdünnungsrate und ihrer Veränderung über die Zeit.

In der kontinuierlichen Kultur sehen wir zu den Messzeitpunkten diejenigen Typen, welche die meisten Nachkommen im System hinterlassen haben. Dies wäre beim Chemostaten derjenige, der am besten mit den vorhandenen Ressourcen auskommt, und beim Turbidostaten derjenige, der am schnellsten proliferiert. Nachdem zu Beginn an diesen Technologien großes Interesse gezeigt wurde, erlosch dieses nach kurzer Zeit jedoch wieder. Es zeigte sich bei den Langzeitexperimenten mit Chemostat und Turbidostat ein gravierender Nachteil, der bei der seriellen Subkultur nicht auftrat. Es kommt zu einer schnellen positiven Selektion von biofilmbildenden Mikroorganismen, so dass am Ende eines Experiments allein die residente Population persistiert, obgleich es nicht der gewünschten selektiven Strategie entspricht (Chao & Ramsdell, 1985). Zu diesem grundsätzlichen Problem kommt hinzu, dass Biofilme die Schlauchapparaturen verstopfen und den Sensor für das Messen der Trübung der Flüssigkultur blockieren.

Das Problem der biofilmbildenden Mikroorganismen konnte durch die Fluidtechnik (Genematen, 3.2.9) gelöst werden. Der Genemat erlaubt die kontinuierliche Proliferation großer Populationen von Organismen unter strikt kontrollierten Bedingungen ausschließlich in Suspension, indem er automatisch residente, adaptiv statische Varianten regelmäßig und vollständig zerstört. Die Population von Organismen in Suspension bleibt zu jedem Zeitpunkt erhalten, Subpopulationen werden nur als Folge kontinuierlicher oder konditionaler Verdünnung aus dem System entfernt. Der Genemat macht Organismen adaptiv dynamisch (Mutzel & Marlière, 2010). In der seriellen Subkultur wird dieses Problem dadurch umgangen, dass „besiedelbare“ Oberflächen regelmäßig entfernt werden.

1.5 Hypothesen zum Ausgang des Symbioseexperiments

Symbiose kombiniert die metabolischen Potenziale zweier Organismen in einem neuen Organismus mit neuartigen, unterschiedlichen metabolischen Eigenschaften und einem neuen adaptiven Potenzial. Die Entstehung von Symbiosen ist der Beginn von großen evolutionären Veränderungen. Dennoch sind die selektiven Kräfte und Anpassungsmechanismen, welche eine Symbiose entstehen lassen, weitestgehend unbekannt. Die Selektion künstlicher Symbiosen unter definierten Bedingungen gilt als Meilenstein, um ihre Entwicklung zu verstehen (Szathmáry & Smith, 1995). Interaktionen zwischen Räuber und Beute oder Parasit und Wirt konnten unter selektiven Bedingungen experimentell in Richtung Symbiose getrieben werden (Odum, 1983). Es kam zu genetischen Veränderungen, welche zu kooperativem Verhalten führten (Jeon, 2004).

1.5.1 „Historischer“ Hintergrund dieser Arbeit

Mitte der 1990er Jahre führten Marlière und Mutzel ein Experiment zur Selektion einer künstlichen Symbiose zwischen dem Bakterium *Escherichia coli* und Amöben von *Dictyostelium discoideum* durch (R. Mutzel, persönliche Mitteilung). Diese Organismen stehen in einer Räuber-Beute-Beziehung. Frühe Experimente, in denen *E. coli* und *D. discoideum* als Modellsystem für Lotka/Volterra-Räuber-Beute-Beziehungen verwendet wurden, führten in kontinuierlicher Kultur regelmäßig zur raschen Eradikation der Amöben (Tsuchiya & Drake, 1972). In einem Minimalmedium, welches Wachstum von *E. coli* erlaubt, das als Nahrungsquelle für *D. discoideum* dient, genießen Bakterien, die durch genetische Veränderung ihrer Oberflächenstruktur prädatationsresistent werden, einen Selektionsvorteil gegenüber solchen Bakterien, die von den Amöben erkannt und phagozytiert werden. In kontinuierlicher Kultur werden nach dem Erscheinen resistenter Bakterien die verbliebenen Wildtyp-Bakterien rasch durch den Prädator entfernt, der danach keine Nahrung mehr findet und aus dem System ausgewaschen wird. Um die Persistenz beider Organismen zu erzwingen, wurde ein System der metabolischen Kopplung über den Stoffwechsel der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin gewählt. Während *E. coli* einfache Schwefelverbindungen verwerten kann, um Cystein zu synthetisieren und Cystein in Methionin umzuwandeln, ist *D. discoideum* auf Methionin als essenzielle Aminosäure angewiesen, die zu Cystein metabolisiert werden kann, aber auch als Energiequelle dient (in diesem Fall wird das Kohlenstoffgerüst in den Citratzyklus eingespeist, und Schwefel und Stickstoff werden als Sulfid und Ammonium freigesetzt). In einem Medium mit Methionin als einziger Schwefelquelle konnte die Persistenz beider Organismen über lange Zeiträume (> 1000 Generationen von *D. discoideum*) erzwungen werden, doch emanzipierte sich *E. coli* letztlich aus der erzwungenen Syntrophie mit der Entwicklung eines neuen Stoffwechselwegs für die Verwertung von Methionin als Schwefelquelle (R. Mutzel, persönliche Mitteilung). In diesem de novo

evolvierten Stoffwechselweg wird Methionin mit ATP zu S-Adenosylmethionin umgesetzt, dessen Aminopropylgruppe nach Decarboxylierung auf das Polyamin Putrescin (Butan-1,4-diamin) übertragen wird, um Spermidin (Monoaminopropylputrescin) zu bilden. Aus dem 5'-Thiomethyladenosin-Produkt dieser Reaktion wird Adenin rezykliert und aus der dabei abgespaltenen 5'-Thiomethylribose Methylmercaptan freigesetzt, das - wahrscheinlich in Form des Endprodukts H₂S - als Schwefelquelle dient.

Dieses Experiment wurde später von Jens Baumgardt in seiner Doktorarbeit wiederholt (Baumgardt, 2006) und führte nach langer Kokultur wieder zur Evolution des in dem ursprünglichen Experiment selektierten Stoffwechselwegs zur Verwertung von Methionin als Schwefelquelle für *E. coli*. Da in dem evolvierten Stoffwechselweg der Stickstoff aus Methionin in einem metabolischen Endprodukt, Spermidin, fixiert wurde und Methionin deshalb nicht als Stickstoffquelle dienen kann (R. Mutzel, unveröffentlichte Beobachtungen), führte Baumgardt ein weiteres Experiment der Kokultur von *E. coli* und *D. discoideum* durch, in welchem Methionin einzige Quelle sowohl für Schwefel als auch für Stickstoff war. Auch in diesem Experiment emanzipierte sich *E. coli* schließlich aus der erzwungenen Syntrophie mit der Selektion eines neuen Stoffwechselwegs (der unterschiedlich zu dem für die Verwertung von Methionin als Schwefelquelle war). Der Ansatz der experimentellen Evolution einer Symbiose aus einem Räuber-Beute-Paar wurde danach nicht weiterverfolgt.

1.5.2 Szenarium für die experimentelle Evolution einer synthetischen Symbiose zwischen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

Das in dieser Arbeit beschriebene Experiment zielt darauf ab, eine künstliche Symbiose unter rational konzipierten und streng kontrollierten Laborbedingungen aus *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* zu etablieren. Aufgrund des natürlichen Verhaltens der verwendeten Organismen muss davon ausgegangen werden, dass einer den anderen aus dem System verdrängt, wenn beide unabhängig voneinander leben können. Um die Koexistenz beider Organismen in einer Kokultur zu gewährleisten, wurde ein selektives Szenarium entworfen (1.6.3, Abbildung 2), das ihre Persistenz über die Verfügbarkeit der chemischen Elemente Schwefel und Phosphor erzwingt. In diesem Szenarium muss *E. coli* die Hefe mit einer verwertbaren Phosphatquelle versorgen. Als Substrat wurde Phosphonat gewählt, das von *S. cerevisiae* nicht als Phosphorquelle verwertet wird, aus dem aber *E. coli* Phosphat freisetzen kann. *S. cerevisiae* muss *E. coli* mit einer verwertbaren Quelle von Schwefel versorgen. Da Wildtyp-Stämme beider Organismen Sulfat verwerten können, wurde das *E. coli*-Genom durch Deletion verschiedener Gene für den ersten Schritt der Sulfatassimilation genetisch so manipuliert, dass *E. coli* auf Schwefel in reduzierter Form (Sulfid, Sulfid) angewiesen ist. Voraussetzung ist, dass beide Organismen die jeweiligen Substrate (Phosphonat, Sulfat) aufnehmen, in das vom Partner der Syntrophie verwertbare

Derivat (Phosphat, Sulfit) umwandeln und in den extrazellulären Raum abgeben. Eine Chemostat-Kokultur unter diesem Regime wird ein Gleichgewicht erreichen, in dem die Dichte beider Organismen durch den jeweiligen Nährstoff bestimmt wird, der das Wachstum von *E. coli* oder *S. cerevisiae* begrenzt (Monod, 1949). Die Biomasse-Ausbeute des Systems wird von der Effizienz der Freisetzung des limitierenden Faktors abhängen. Genetische Anpassung, z.B. durch verbesserte Aufnahme, erhöht den selektiven Vorteil der jeweiligen Mikroorganismen. Unter den adaptiven Varianten, die sich über Generationen herausbilden, könnten sich folgende zwei Szenarien durchsetzen:

- i. Es könnte einen Übergang von obligater Syntrophie zu Symbiose geben. Enge Assoziation zwischen den Mikroorganismen würde eine effizientere Aufnahme von limitierenden Nährstoffen durch beide Organismen ermöglichen, ohne dass sich der Wachstumsfaktor im Medium verdünnt. Im Gegenzug kommt es zur Verringerung der Nahrungsverfügbarkeit für Varianten, die nicht kooperieren. Sukzessive Schritte der genetischen und metabolischen Integration könnten eine symbiotische Assoziation beider Mikroorganismen miteinander zur Folge haben, d.h. eine neue genetische Einheit, die nicht mehr getrennt werden kann.
- ii. Es könnte sich eine Emanzipation aus der metabolischen Kopplung ergeben. Hier würde einer der beiden Mikroorganismen einen Weg finden, um das limitierende Molekül eigenständig zu katabolisieren. Somit könnte dieser Mikroorganismus das System monopolisieren.

1.6 Die Versuchsorganismen und das Set-up

Der Verlauf eines Genematen-Experiments (Mutzel & Marlière, 2010) ist von den gewählten Mikroorganismen abhängig. Für diese Arbeit, welche sich auf Symbiosen konzentrierte (siehe: Zielsetzung der Arbeit), fiel die Wahl auf das Bakterium *Escherichia coli* (1.6.1) und den Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* (1.6.2). Beide Mikroorganismen stammen aus unterschiedlichen Domänen des Lebendigen, Bakterien und Eukaryonten (1.2) und weisen kurze, aber auch ähnliche Generationszeiten auf (1.4 & 4.5). Die folgenden zwei Abschnitte beleuchten die Testorganismen im Allgemeinen. Im dritten Abschnitt (1.6.3) werden die Testorganismen und die Planung des Experimentes tiefergehend vorgestellt.

1.6.1 Das Bakterium *Escherichia coli*

Für diese Arbeit wurde *E. coli* K12/MG1655 als einer der beiden Versuchsorganismen ausgewählt. Der gut charakterisierte Mikroorganismus besitzt ein Genom von ungefähr 4.6 MBp, dessen Sequenz erstmals von Frederick R. Blattner und Kollegen (1997) veröffentlicht wurde (Blattner & Plunkett, 1997). Erstmals wurde *E. coli* im Verdauungstrakt des Menschen

Ende des 19. Jahrhunderts von Theodor Escherich identifiziert, der als Namenspate für diesen Mikroorganismus steht. Von da an wurde *E. coli* der meist erforschte und genetisch am häufigsten modifizierte Organismus weltweit (Blount, 2015). Die Einzelzelle ist rundum begeißelt, gram-negativ und stäbchenförmig, mit einer Durchschnittsgröße von 1 µm in Länge zu 0.3 µm in Breite. *Escherichia coli* gehört zu der Klasse der Gammaproteobacteria mit der Ordnung der Enterobacterales in der Familie der Enterobacteriaceae (Madigan & Bender, 2022). *E. coli* kann heterotroph Energie sowohl durch Atmung (aerob) als auch durch Fermentation (anaerob) gewinnen. Die Generationszeiten verschiedener Stämme variieren zwischen 20 und 60 min im LB-Komplexmedium. *E. coli* ist der am meisten genutzte Modellorganismus. Es konnten viele unterschiedliche Stämme isoliert und charakterisiert werden. Für evolutionäre Studien bietet das eine gute Referenz (Eydallin & Liu, 2017). Kurze Generationszeiten, die Möglichkeit zur Nutzung verschiedener Medienzusammensetzungen und einfache genetische Manipulation machen *E. coli* optimal für die experimentelle Evolution und führten bereits zu bemerkenswerten Veröffentlichungen. Studien zeigten, dass unterschiedliche Medienzusammensetzungen und Umweltbedingungen zu genetischer Heterogenität innerhalb von 2000 Generationen führten (Cooper & Lenski, 2010), zu horizontalem Gentransfer zwischen *Shigella dysenteriae* und *E. coli* (Luria & Burrous, 1957) sowie zum Ausbilden einer symbiotischen Beziehung zwischen *Acanthamoeba* und *E. coli* (Alsam & Jeong, 2006). Diese Beispiele zeigen nur einen Bruchteil von dem, was mit *E. coli* als Versuchsorganismus möglich ist.

1.6.2 Der Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*

Als zweiter Testorganismus wurde *Saccharomyces cerevisiae*, auch bekannt als Bäckerhefe, ausgewählt. Dieser Einzeller wird traditionell als Modell für niedere eukaryotische Organismen genutzt. Studien an Hefen haben enorme Beiträge zu unserem Verständnis des Lebens der Zelle und ihres Stoffwechsels geleistet. 1888 von Emil Christian Hansen erstmalig isoliert und beschrieben (Hansen, 1895), wurde *S. cerevisiae* als erster eukaryotischer Organismus mit einem Genom von 13 MBp auf 16 Chromosomen vollständig sequenziert (Goffeau & Barrell, 1996). Wildhefen konnten auf Oberflächen von Früchten, im Verdauungstrakt, auf der Oberfläche von Insekten und Säugetieren sowie im Boden und auch in Gewässern gefunden werden (Martini, 1993). Die Einzelzelle von *S. cerevisiae* ist rund bis oval. Sie hat einen Durchmesser von 5-10 µm und vermehrt sich durch Knospung. Sie gehört zur Klasse der Saccharomycetes mit der Ordnung Saccharomycetales zur Familie der Saccharomycetaceae (Feldmann & Branduardi, 2012). Laborstämme haben eine Generationszeit von ca. 90 min, im YPD-Komplexmedium, bei 28-30 °C. Die Hefe verhält sich fakultativ anaerob. Die Energiegewinnung kann über Zellatmung als auch Gärung vorgenommen werden (Sherman, 2002). Durch die einfache Handhabung wird *S. cerevisiae* als eukaryotischer

Modellorganismus verwendet, aufgrund seiner Merkmale wie Größe, Generationszeit, Zugänglichkeit, Genetik sowie der Möglichkeit, sie leicht manipulieren zu können (Botstein & Fink, 2011). Dass sich *Saccharomyces cerevisiae* auch für die experimentelle Evolution eignet, konnte 2011 durch Chih-Jen Huang gezeigt werden, indem schrittweise eine Kulturtemperatur von 42 °C erreicht worden ist (Huang & Lu, 2018). Weiterhin konnte im Labor ein „cross-feeding“ zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *Lactobacillus lactis* beobachtet werden (Ponomarova & Gabrielli, 2017). Daher bietet sich *Saccharomyces cerevisiae*, genau wie *E. coli*, als Modellorganismus für Evolutionsexperimente an.

1.6.3 Obligate Syntrophie zwischen *E. coli* XE2479 und *S. cerevisiae* YA2800-2

Mit *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* haben wir zwei Mikroorganismen, welche den geforderten Rahmenbedingungen für eine symbiotische Beziehung entsprechen. Sie gehören unterschiedlichen phylogenetischen Domänen an (siehe 1.2), weisen ähnliche Kulturbedingungen auf und besitzen ähnliche Generationszeiten. Da *E. coli* sich heterotroph ernähren kann, wird sich bei einer gemeinschaftlichen Kultivierung keine symbiotische Beziehung ergeben, sondern vermutlich ein Amensalismus, welcher unter Umständen zum Aussterben von *S. cerevisiae* oder von *E. coli* führen kann (Errington, 1946). Mit der Einführung einer Substratabhängigkeit beider Organismen voneinander kann verhindert werden, dass einer den anderen überwächst. Sobald einer der beiden Mikroorganismen aus dem System verschwindet, würde der andere das essenzielle Nahrungsmolekül verlieren und somit ebenfalls aussterben. Dieses Konsortium orientiert sich nach der Populationskinetik von Monod, welches Vorhersagen zum Wachstum von Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Konzentration der Substrate ermöglicht (Monod, 1949).

Ein selektives Szenario wurde entworfen (obligate Syntrophie), um die Persistenz beider Organismen in kontinuierlicher Kultur zu erzwingen. Jeder der Mikroorganismen ist streng abhängig von einem Metaboliten, welcher nicht selbst katabolisiert werden kann. Die Kokultur wird mit einem chemisch definierten Medium (Tabelle 9) versorgt, das alle Komponenten für das Wachstum von *E. coli* XE2479 und *S. cerevisiae* YA2800-2 bereitstellt, für *E. coli* XE2479 jedoch ohne nutzbare Schwefelquelle, und für *S. cerevisiae* YA2800-2 steht keine verwertbare Phosphorquelle zur Verfügung. Allerdings wird eine verwertbare Phosphor- oder Schwefelquelle vom jeweils anderen Mikroorganismus zur Verfügung gestellt (Abbildung 2).

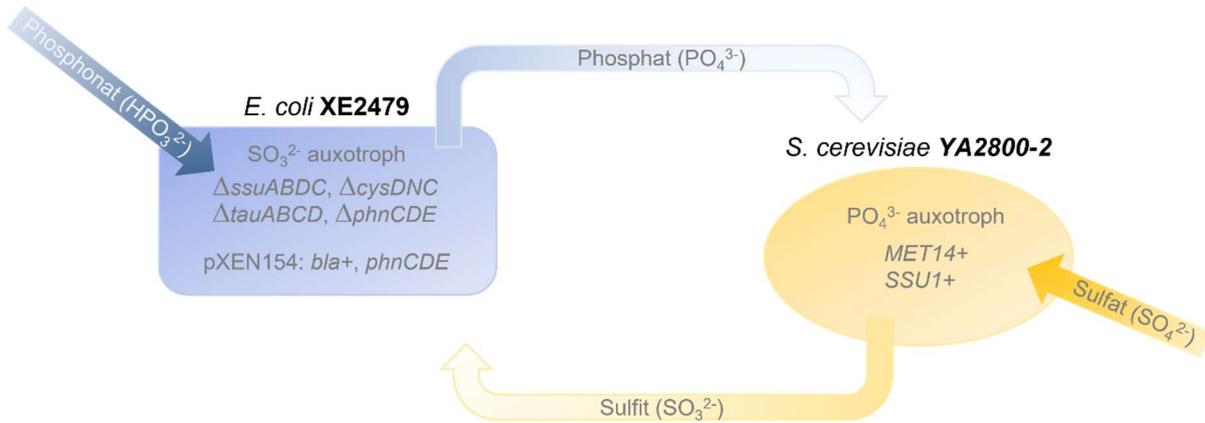


Abbildung 2: Grafische Darstellung der obligaten Syntrophie zwischen *E. coli* XE2479 und *S. cerevisiae* YA2800-2 unter Nennung relevanter Gene, Katabolite und Metabolite.

Die Knockout-Mutante *E. coli* XE2479 ist nicht in der Lage, unter Cystein- und Sulfatmangel Taurine und aliphatische Sulfonate als Schwefelquelle zu nutzen. Die mit dem Schwefelmetabolismus assoziierten Gene *ssuADCB*, *tauABCE* und *cysDNC* sind deletiert (Abbildung 3). *ssuABC* und *tauABC* kodieren verschiedene Untereinheiten eines periplasmatischen ABC-Transporters (Eichhorn & van der Ploeg, 2000). Das TauD-Protein ist eine α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase, die bevorzugt Sulfit aus Taurin freisetzt. SsuD katalysiert die Desulfonierung von aliphatischen Sulfonaten. Die Deletion des *cysDNC*-Operons führt dazu, dass sowohl die Sulfatadenylyltransferase, welche die intrazelluläre Akkumulation von Sulfat durch die Synthese von Adenosin-5-phosphosulfat (APS) katalysiert, als auch die Adenylylsulfatkinase, welche die Phosphorylierung von APS zu 3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat (PAPS) katalysiert, ausgeschaltet wird (van der Ploeg & Eichhorn, 2001).

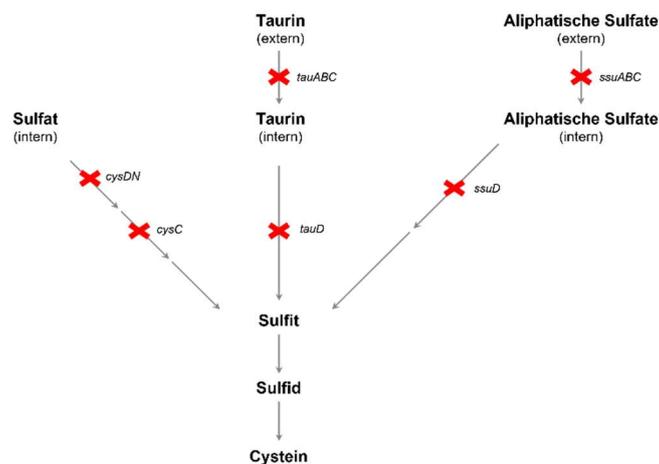


Abbildung 3: Vereinfachte grafische Darstellung der Cysteinbiosynthese von *E. coli* XE2479. Inaktivierte Gene wurden rot markiert.

Damit *E. coli* Phosphonat verstoffwechseln kann, braucht es das komplette *phn*-Operon mit den 14 Einzelgenen *phnCDEFGHIJKLMNOP* (*phnC-P*) (Makino & Kim, 1991). Bei XE2479 wurden die fehlenden Gene *phnCDE* in dem Ausgangsstamm XE2096 (Δ *phnCDE*) mit der Transformation des Plasmids pXEN154 ergänzt (siehe unten, Tabellen 5). Die ersten drei Gene des *phn*-Operons *phnCDE* kodieren einen membranständigen ABC-Transporter für Phosphonate (Wanner & Boline, 1990). *phnC* kodiert eine ATP-bindende Kasette (Linton & Higgins, 1998), *phnD* ein transmembranes Bindeprotein und *phnE* eine Phosphonat-Permease (Stasi & Neves, 2019). Dieser Membrantransporter ist Bestandteil des *phn*-Operons, welcher den intrazellulären Transport von Phosphonaten sowie die Gewinnung von Phosphor unter Spaltung der C-P-Bindung von Alkylphosphonaten reguliert (Chen, 1990).

Im zweiten Testorganismus *S. cerevisiae* YA2800-2 werden *MET14* und *SSU1* durch einen starken Promotor in *LEU2.Kl* aus *Kluyveromyces lactis* überexprimiert (Guedener & Heinisch, 2002). Die Überexpression von *SSU1* zusammen mit *MET14* führt zu einer Anreicherung von Sulfit um das 10-fache, wobei *SSU1* einen Sulfitmembrantransporter kodiert, welcher Sulfit zur Entgiftung ausschleust (Park & Bakalinsky, 2000). Sulfitbildung als Teil der Aminosäurebiosynthese ist sehr komplex und stark reguliert (Abbildung 4). Extrazelluläres Sulfat wird durch ein hochspezifisches Transportsystem, welches *SUL1* und *SUL2* kodieren, in die Zelle geschleust. Die Sulfatadenylyltransferase (*MET3*) katalysiert daraufhin den nächsten Schritt der Sulfatakkumulation, durch Phosphorylierung des Sulfats, unter Verbrauch von ATP, bei dem Adenosin-5-phosphosulfat (APS) entsteht. In einem weiteren Phosphorylierungsschritt wird das APS durch die Adenylsulfatkinase (*MET14*) in PAPS umgesetzt. Durch NADP-abhängige Reduktion von PAPS in Anwesenheit von Thioredoxin durch die PAPS-Reduktase (*MET16*) reichert sich Sulfit an (Donalies & Stahl, 2002).

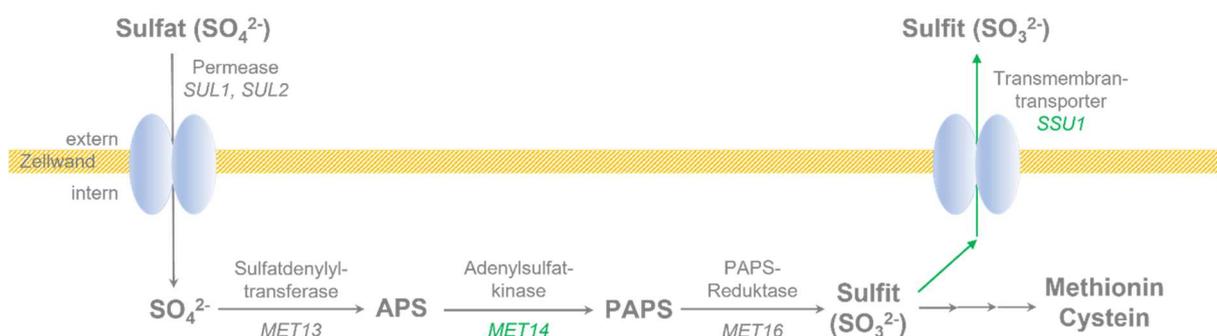


Abbildung 4: Grafische Darstellung der assimilatorischen Reduktion von Sulfat zu Sulfit während der Biosynthese von Methionin und Cystein in *S. cerevisiae* YA2800-2. Die strukturellen Gene und Enzyme für die verschiedenen Schritte werden angezeigt. Grün gekennzeichnet sind die hochregulierten Gene und der damit zusammenhängende Efflux von Sulfit. APS = Adenosinphosphosulfat; PAPS = 3-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat.

Werden nun *E. coli* XE2479 und *S. cerevisiae* YA2800-2 in Minimalflüssigmedium mit Phosphonat (Tabelle 9) kokultiviert, wird das vorhandene Sulfat von der Hefe akkumuliert, zu

Sulfit reduziert und steht durch extrazellulären Transport dem Bakterium als externe Schwefelquelle zur Verfügung (Abbildung 4). Im Gegenzug sezerniert das Bakterium Phosphat als Phosphorquelle für die Hefe, da Hefe Phosphonat nicht metabolisieren kann, im Gegensatz zum Bakterium, welches das *phn*-Operon zur Verfügung hat. Nur durch die Stoffwechsellistung beider Organismen kann somit das Überleben beider Symbiosepartner sichergestellt werden. Keiner kann den Anderen überwachsen, ohne sich selbst „auszurotten“ (Monod, 1949).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Endosymbiontentheorie wird als Fundament für die Entwicklung mehrzelliger Lebensformen verstanden, doch sind die Voraussetzungen, diese zu erlangen, unbekannt (Margulis, 1981). Für diese Arbeit wurden daher drei Einzelziele gesetzt.

Zum Ersten soll in dieser Arbeit mittels molekularbiologischer und mikrobiologischer Voruntersuchungen gezeigt werden, dass zwischen den beiden Testorganismen XE2479 und YA2800-2 ein metabolisches Abhängigkeitsverhältnis erzeugt werden kann (obligate Syntrophie). Die abgegebenen Metabolite des einen Mikroorganismus sollen obligates Nahrungssubstrat für den anderen Mikroorganismus darstellen. Hierzu sollen alle nötigen Kontrollen sowie Negativkontrollen durchgeführt werden.

Zum Zweiten soll eine Langzeitsymbiose zwischen den Testorganismen XE2479 und YA2800-2 mittels Genematen in einem chemisch definierten Medium etabliert werden. Davor, danach und währenddessen soll die Kokultur physiologisch charakterisiert werden.

Abschließend, falls es zum erfolgreichen Etablieren einer Langzeit-Kokultur gekommen ist, soll jeweils eine Genomanalyse der evolvierten Mikroorganismen vorgenommen werden. Es soll ein Überblick gegeben werden, welche Gene verändert sind, und diskutiert werden, ob diese in Assoziation mit der Symbiose stehen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Kits und Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Kits und Enzyme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Kits und Enzyme

Name	Hersteller, Kat.-Nr.	Verwendung
Bacterial Genomic DNA Isolation Kit	NorGen Biotek Corp., Thorold, ON, CA; 17900	Aufreinigung von genomischer bakterieller DNA für PCR
Plasmid Mini Kit (100)	Qiagen, Hilden, DE; 12125	Aufreinigung von Plasmid DNA für PCR
Genomic DNA Purification Kit (Maxi)	Qiagen, Hilden, DE; 19060	Aufreinigung von genomischer DNA für NGS
nexttec Genomic DNA Isolation Kit from Yeast	nexttec Biotechnologie GmbH, Hilgertshausen, DE; 60.250	Aufreinigung von genomischer Hefe DNA für PCR
PCR MasterMix (2×)	Thermo Scientific, MA, USA; K0171	Standard PCR
DNA-Gel-Ladefarbstoff (6×)	Thermo Scientific, MA, USA; 11541575	Gelelektrophorese Ladepuffer
GeneRuler DNA-Ladder Mix	Thermo Scientific, MA, USA; #SM0333	Gelelektrophorese, Marker
GeneRuler DNA-Ladder LR Mix	Thermo Scientific, MA, USA; #SM1193	Gelelektrophorese, Marker
DNA Stain Clear G	SERVA, Heidelberg, DE; 39804.02	Gelelektrophorese, Gelfarbstoff
Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE; A3711.0001	Degradieren von Zellwänden
RNAase	Merck KGaA, Darmstadt, DE; 10109142001	Degradieren von RNA
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt, DE; 3115828001	Degradieren von Proteinen

Puffer und Aminosäuremische wurden sterilfiltriert. Aminosäuremische wurden aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zum Einstellen des pH-Werts wurde NaOH (Merck KGaA, Darmstadt, DE) eingesetzt.

Tabellen 2: Puffer, welche in der Arbeit verwendet wurden

SG-Puffer zur Medientvorbereitung (10×) und zum Neutralisieren (1×) des Genemats.

10× SulphosGlu Puffer (pH=7.4)	Zusammensetzung	Hersteller
3-(<i>N</i> -Morpholino) propansulfonsäure	400 mM	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Natriumacetat	100 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Zum Waschen der Mikroorganismen wurde Basismedium verwendet.

Basismedium	Zusammensetzung	Hersteller
YNB	6,52 g/l	Formedium, Norfolk, UK
Glucose	111 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SG-Puffer (10×), pH=7.4	100 ml/l	siehe Tabellen 2
AA-MixII (100×)	10 ml/l	siehe Tabelle 4

Zum Sterilisieren des Genemats wurde konzentrierte Natronlauge genutzt.

Sterilisationslösung	Zusammensetzung	Hersteller
NaOH	5 M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Zum Rekonstituieren des Primerstocks und Eluieren der genomischen DNA wurde EB-Puffer genutzt.

EB-Puffer (pH=8,5)	Zusammensetzung	Hersteller
Tris-HCl	100 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Tabelle 3: TBE-Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Für die Gele wurden 1,5% Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) hinzugefügt.

10× TBE	Zusammensetzung	Hersteller
TRIS-HCL	1 M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Borsäure	1 M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
EDTA	25,3 mM	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE

Tabelle 4: Aminosäure/Basenmix (AA-Mix) zur Medienvorbereitung

Die Mixe wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Den Medien wurden sie nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

100× AA-MixI	Zusammensetzung	Hersteller
L-Adenin	7,4 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
L-Histidin	12,9 mM	Merck KGaA, Darmstadt, DE
L-Tryptophan	24,5 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
100× AA-MixII	Zusammensetzung	Hersteller
L-Adenin	7,4 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
L-Histidin	12,9 mM	Merck KGaA, Darmstadt, DE
L-Tryptophan	24,5 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
L-Cystein	41,3 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
100× AA-MixIII	Zusammensetzung	Hersteller
L-Adenin	7,4 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
L-Histidin	12,9 mM	Merck KGaA, Darmstadt, DE
L-Tryptophan	24,5 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
L-Leucin	15,3 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

3.1.2 Bakterien- und Hefestämme

In Tabellen 5 sind *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* Stämme aufgelistet, welche für Evolutionsexperimente und Kontrollen verwendet wurden. Während der Arbeit wurde festgestellt, dass die verwendeten *E. coli* Stämme auch ohne genetische Modifikation ein funktionstüchtiges Phosphonatoperon besitzen. Daten hierzu sind unter 4.4, 4.6 und 5.4.3 zu finden.

Tabellen 5: Mikroorganismen, welche in den Experimenten verwendet wurden. Mit Originalgenotypangaben der AG Sansonetti

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
XE2096 (Ausgangsstamm/AS)	Δ ssuABCD FRT+ Δ cysDNC::FRT+ Δ tauABCD:: FRT+ Δ phnCDE ▼ phnF:: <u>aad</u> +FRT+PT5+	AG Sansonetti, Institut Pasteur, Paris
XE2479 (Testorganismus/TO)	Δ ssuABCD FRT+ Δ cysDNC::FRT+ Δ tauABCD:: FRT+ Δ phnCDE ▼ phnF:: <u>aad</u> +FRT+PT5+ pXEN154 phnCDE+ <u>bla</u> +	AG Sansonetti, Institut Pasteur, Paris
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
CC789-2A (AS)	<i>ade2-</i> , <i>his3-</i> , <i>leu2-</i> , <i>trp1-</i> ,	AG Sansonetti, Institut Pasteur, Paris
YA2800-2 (TO)	<i>ade2-</i> , <i>his3-</i> , <i>leu2-</i> , <i>trp1-</i> <i>leu2</i> :[LEU2.KI-MET14-SSU1]	AG Sansonetti, Institut Pasteur, Paris
Stamm	Charakteristika/Phänotyp	Referenz
XE2479 (TO)	+Sulfit, +Phosphonat, -Sulfat	AG Sansonetti, Institut Pasteur, Paris
XE2096 (AS)	+Sulfit, -Sulfat	AG Sansonetti, Institut Pasteur, Paris
CC789-2A (AS)	-Ade, -His, -Trp, -Leu, -Phosphonat	AG Sansonetti, Institut Pasteur, Paris
YA2800-2 (TO)	-Ade, -His, -Trp, -Phosphonat, +Sulfit	AG Sansonetti, Institut Pasteur, Paris

Unterstrichene Gene stehen für ihre Resistenzen; – steht für auxotroph; + steht für prototroph; ▼=Insertion

Gen	Funktion	Gen ID
<i>ssuABCD</i>	L-Cystein Biosynthese IV	EG10187, EG10193, EG10417
<i>cysDNC</i>	L-Cystein Biosynthese I	EG10187, EG10193, EG10192
<i>tauABCD</i>	Taurin Degradation	EG12423
<i>phnCDE</i>	Phosphonat/Phosphat Transporter	EG10713, EG10714, EG11283
<i>ade2</i>	Purinnukleotid Biosynthese	S000005654
<i>his3</i>	Katalysiert Histidin Biosynthese	S000005728
<i>leu2</i>	Katalysiert Leucin Biosynthese	S000000523
<i>trp1</i>	Katalysiert Tryptophan Biosynthese	S000002414
<i>MET14</i>	Sulfatassimilation/Methionin Metabolismus	S000001484
<i>SSU1</i>	Sulfitefflux/Membranpumpe	S000006013
<i>LEU2.KI</i>	Promoter	---

3.1.3 Medien und Wachstumsbedingungen

Alle steril verwendeten Arbeitsmittel wurden bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Puffer und Flüssigmedien wurden in zuvor autoklavierten Kulturflaschen sterilfiltriert.

Wachstumsbedingungen von *E. coli* und *S. cerevisiae*

Platten wurden bei 30 °C inkubiert, Schüttelkulturen bei 30 °C und 210 rpm. Für die Selektion wurden Ampicillin [100 µg/l] (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE), Kanamycin [50 µg/ml] (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) und Streptomycin [100 µg/ml] (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) für *E. coli* und G418 [20 µg/l] (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) für *S. cerevisiae* nach dem Autoklavieren oder vor der Sterilfiltration hinzugefügt. Zum Einstellen des pH-Werts wurde NaOH (Merck KGaA, Darmstadt, DE) verwendet.

Tabellen 6: Vollmedium und chemisch definiertes Medium für *E. coli*

Für Platten wurden 20 g/l Agar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) hinzugefügt.

Lysogeny Broth Medium (LB), pH=7	Zusammensetzung	Hersteller
Trypton/Pepton	10 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	5 g/l	VWR International, Darmstadt, DE
Hefeextrakt	5 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Für Festmediumpplatten wurden 10 g/l Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) hinzugefügt.

SulphosGluXE2479 Medium (SGX)	Zusammensetzung	Hersteller
YNB CYN67	6,52 g/l	Formedium, Norfolk, UK
Glucose	20 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SG-Puffer (10×), pH=7.4	100 ml/l	siehe Tabellen 2
AA-MixII (100×)	10 ml/l	siehe Tabelle 4
KH ₂ PO ₄	6 mM	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Tabellen 7: Vollmedium und chemisch definiertes Medium für *S. cerevisiae*

Für Festmediumplatten wurden 20 g/l Agar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) hinzugefügt.

Yeast Extract-Peptone-Dextrose Medium (YPD)	Zusammensetzung	Hersteller
Hefeextrakt	10 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pepton	10 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glucose	20 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Für die Platten wurden 10 g/l Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) hinzugefügt.

SulphosGluYA2800-2 Medium (SGY)	Zusammensetzung	Hersteller
YNB	6,52 g/l	Formedium, Norfolk, UK
Glucose	20 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SG-Puffer (10×), pH=7.4	100 ml/l	siehe Tabellen 2
AA-MixI (100×)	10 ml/l	Siehe Tabelle 4
KH ₂ PO ₄	6 mM	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Für die Platten wurden 10 g/l Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) hinzugefügt.

SulphosGlu YA2800-2+Leucin Medium (SGY+Leu)	Zusammensetzung	Hersteller
YNB	6,52 g/l	Formedium, Norfolk, UK
Glucose	20 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SG-Puffer (10×), pH=7.4	100 ml/l	siehe Tabellen 2
AA-MixIII (100×)	10 ml/l	siehe Tabelle 4
KH ₂ PO ₄	6 mM	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Tabelle 8: Medien für die Konditionierungs- und Agardiffusionstests

Für die Platten wurden jeweils 10 g/l Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) hinzugefügt.

SulphosGluXE2479ΔSO₃²⁻ Medium (SGX-ΔSO₄²⁻)	Zusammensetzung	Hersteller
YNB	6,52 g/l	Formedium, Norfolk, UK
Glucose	20 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SG-Puffer (10×), pH=7.4	100 ml/l	siehe Tabellen 2
AA-MixI (100×)	10 ml/l	siehe Tabelle 4
KH ₂ PO ₄	6 mM	Merck KGaA, Darmstadt, DE

SulphosGluYA2800-2ΔPO₄³⁻ Medium (SGY-ΔPO₄³⁻)	Zusammensetzung	Hersteller
YNB	6,52 g/l	Formedium, Norfolk, UK
Glucose	20 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SG-Puffer (10×), pH=7.4	100 ml/l	siehe Tabellen 2
AA-MixI (100×)	10 ml/l	siehe Tabelle 4
Methylphosphonat	3 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Tabelle 9: Medien für die Evolutionsexperimente von *E. coli* und *S. cerevisiae*

SulphosGluPhosphonatΔSO₃²⁻ Medium (SGPI)	Zusammensetzung	Hersteller
YNB	6,52 g/l	Formedium, Norfolk, UK
Glucose	20 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SG-Puffer (10×), pH=7.4	100 ml/l	siehe Tabellen 2
AA-MixI (100×)	10 ml/l	siehe Tabelle 4
Methylphosphonat	3 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SulphosGluPhosphonat+SO₃²⁻ Medium (SGPII)	Zusammensetzung	Hersteller
YNB	6,52 g/l	Formedium, Norfolk, UK
Glucose	20 g/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
SG-Puffer (10×), pH=7.4	100 ml/l	siehe Tabellen 2
AA-MixII (100×)	10 ml/l	siehe Tabelle 4
Methylphosphonat	3 mM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

3.1.4 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, DE) synthetisiert. Die Lyophilisate wurden, dem Synthesereport gemäß, in EB-Puffer gelöst (100 pmol/μl Endkonzentration) und bei -21 °C gelagert. Davon ausgehend wurden 10 pmol/μl Arbeitslösungen mit nukleasefreiem Wasser hergestellt.

Tabelle 10: Oligonukleotide

Name	Organismus	Sequence (5'-3')	T_m
MET14_for	<i>S. cerevisiae</i>	TGGCTAGAAACAGTTACTGCTCC	61 °C
MET14_rev	<i>S. cerevisiae</i>	TTTCAATGAACTTCAAACCAGCCTCC	61 °C
ssuABCD_for	<i>E. coli</i>	CACTAACATCTGGCAAAGTCAC	57 °C
ssuABCD_rev	<i>E. coli</i>	TTACGATGCCAAACGTCAG	57 °C
phnD_for	<i>E. coli</i>	AGCTGGGCGTGAAGGTCAAC	60 °C
phnD_rev	<i>E. coli</i>	TCCATCGCCGACAGATTGCC	60 °C

Die Primerhybridisierungstemperaturen wurden experimentell mittels Gradienten-PCR ermittelt.

3.1.5 Datenbanken

Tabelle 11: Verwendete Software und Datenbanken

Name	Verwendung	Quelle
Microsoft Office Plus 2019		Microsoft Corporation; Redmond, WA, US
Geneious Prime 2022.0.1	DNA-Analyse	Biomatters, Ltd.; Auckland, NZ
ZEN (blue edition) v. 3.3.89	Mikroskopieaufnahmen und Betrieb des Zeiss AxioImager	Carl Zeiss Microscopy; Jena, DE
NCBI	BLAST, Literatur (PubMed) etc.	The National Center for Biotechnology Information (NCBI); http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EcoCyc	<i>E. coli</i> Datenbank	SRI Internation, CA, USA; http://www.ecocyc.org
Saccharomyces Genome Database (SGD)	<i>S. cerevisiae</i> Datenbank	Stanford University, CA, USA https://www.yeastgenome.org
Open Vector Editor 17.1.10	Vektorkarten, Sequenzanalyse	TeselaGen Biotechnology Inc.; San Francisco, CA, USA
ExpASy	Translate tool	(Gasteiger & Gattiker, 2003)
Primer design	Primerdesign	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE https://eurofinsgenomics.eu/de/dna-rna-oligonucleotides/oligo-tools/primer-design-tools/
Allplan 2019	Bauplan zeichnen	Nemetschek, München, DE

3.2 Methoden

3.2.1 Messung der optischen Dichte (OD_{600})

In dieser Arbeit wurde die Zelldichte mittels photometrischer Messung bestimmt. Die optische Dichte gilt als Maß für den Gehalt an Mikroorganismen in einem definierten Volumen. Die Messung wurde an einem Spektralphotometer (GeneQuant 1300, Biochrom, Ltd; Cambridge, UK), mit monochromatischem Licht einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Die Abschwächung des monochromatischen Lichts beim Durchgang durch die befüllte Küvette (BrandTech™ BRAND™ UV-Cuvette; Thermo Fisher, MA, USA) verhält sich dabei laut dem Lambert-Beer'schen-Gesetz proportional zur optischen Dichte der untersuchten Suspension.

Eine Leerwertmessung des Kulturmediums wurde vorangestellt (0-Wert). Dadurch wurde die verursachte eigene Lichtabsorption von Medium und Küvette eliminiert. Damit eine zuverlässige Messung innerhalb des Linearitätsbereichs des Photometers gewährleistet bleibt, wurde ab einer $OD_{600} > 1,5$ eine 1:10 Verdünnung der Suspension mit dem verwendeten Kulturmedium vorgenommen.

3.2.2 Zentrifugieren

In der Arbeit wurden verschiedene Zentrifugationsschritte durchgeführt. Wurden lebende Zellen benötigt, wurde bei 4 °C, 2000 × g, 15 min zentrifugiert. Wurde der Überstand benötigt,

wurde bei 4 °C, 16000 × g, 10 min zentrifugiert (Mikrozentrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, DE; Allegra X-30 IVD, Beckmann Coulter, CA, USA). Bei den verwendeten Kits wurde nach Herstellerprotokoll gearbeitet.

3.2.3 Kultur in Flüssigmedien

In der Arbeit wurden für *E. coli* und *S. cerevisiae* Vorkulturen (Übernachtkultur, ÜNK) sowie Konditionierungsversuche als Schüttelkulturen angelegt (Elbing & Brent, 2019a). Dies ist notwendig, damit sich die Mikroorganismen an ihr jeweiliges Kulturmedium sowie deren Bedingungen (3.1.3) anpassen können. Als Inokulum diente ein Aliquot vom Kryo-Stock (3.2.5) oder eine Einzelkolonie der Nähragarplatte.

Mit einer ausgeglühten Impföse wurde eine Einzelkolonie in einen Schikanekolben mit vorgelegtem Kulturmedium überführt. Beim Start mit einem Aliquot wurde der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes verwendet. Das Mitführen einer Sterilkontrolle aus unbeimpftem Flüssigmedium war hierbei obligatorisch und dient dem Ausschluss von Kontaminationen der verwendeten Glasgeräte oder des Mediums. Die Mikroorganismen wurden bei 30 °C, 210 rpm aerob inkubiert, für *E. coli* 18-24 h und für *S. cerevisiae* 24-36 h. Passagiert wurde in das jeweilige Kulturmedium bei Konditionierungsversuchen 1:10, bei Vorkulturen und serieller Verdünnung 1:100. Wurde ein Medienwechsel durchgeführt, wurde ebenfalls 1:100 passagiert. Zum Adaptieren an das neue Medium musste nochmals zweimal passagiert werden.

Die Zelldichte kann zu jedem Zeitpunkt mit dem Spektralphotometer (3.2.1) ermittelt werden. Hierdurch können notwendige Berechnungen und daraus resultierende Verdünnungen für Hauptkulturen (3.2.6; 3.2.9) durchgeführt werden.

$$x_{VK} = x_{HK} + \left(\frac{OD_{600(soll)}}{OD_{600(haben)}} \right)$$

Formel 1: Berechnung des einzusetzenden Volumens der Vorkultur (x_{VK} [ml]) für die Herstellung einer Hauptkultur (x_{HK} [ml])

Die angesetzte Hauptkultur wurde nun unter den gewünschten Bedingungen weiter kultiviert.

3.2.4 Kultur auf Festmedium und KBE-Bestimmung

Häufiger benötigte Mikroorganismen wurden auf ihrem jeweiligen Plattenmedium (3.1.3, Elbing & Brent, 2019b) kultiviert. Es bewährte sich ein Verdünnungsausstrich mit einer sterilen Impföse. Der Inkubationszeitraum betrug 24 h für *E. coli* und für *S. cerevisiae* 48 h, jeweils bei 30 °C. Die fertig inkubierten Platten können, mit Parafilm (IDL GmbH & Co. KG, Nidderau, DE) abgedichtet, mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Als koloniebildende Einheit (KBE) bezeichnet man einzelne oder mehrere zusammenhängende Individuen von Mikroorganismen, die durch ihre Vermehrung in oder auf einer Nährplatte (3.1.3) eine Kolonie bilden. Diese Größe wird bei der Methode zur Quantifizierung lebender Mikroorganismen verwendet.

Von der zu testenden Kultur/Probe wurde eine Verdünnungsreihe angelegt (10^{-1} - 10^{-10}). Als Verdünnungsmedium diente das Basismedium (Tabellen 2). Von den gewünschten Verdünnungen wurden 100 µl auf Nähragar (3.1.3) ausplattiert.

Tabelle 12: Schema zum Ausplattieren für den KBE-Test

Organismus	Medium	Selektionsmittel
XE2479	Lysogeny Broth	Streptomycin/Ampicillin
XE2479	Lysogeny Broth	---
XE2096	Lysogeny Broth	Streptomycin/Ampicillin
XE2096	Lysogeny Broth	Streptomycin
YA2800-2	Yeast Extract-Peptone-Dextrose	Kanamycin

Es wurde gleichmäßig ausplattiert, so dass im Idealfall alle Individuen der Mikroorganismen einzeln voneinander entfernt liegen. Nach der Inkubation (3.1.3) wurden einzelne Kolonien sichtbar. Anschließend konnten die Kolonien der sinnvollen Verdünnungsstufen ausgezählt werden. Nun konnte die Lebendkeimzahl festgestellt werden. Die Anzahl vitaler Mikroorganismen wird in koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml angegeben.

$$KBE/Unit = \frac{\#Kolonien * Verdünnungsfaktor}{ausplattiertes\ Volumen}$$

Formel 2: Berechnung der koloniebildenden Einheiten pro ml einer Probe

3.2.5 Konservieren und Waschen der Mikroorganismen

Die Mikroorganismen wurden für die Agardiffusionstests (3.2.7) oder die Genematexperimente drei Mal gewaschen (3.2.9), um Sulfat und Phosphat zu entfernen. Bei einem Waschschrift wurden die Zellen abzentrifugiert (3.2.2), der Überstand verworfen, mit Basismedium (Tabellen 2) resuspendiert und dann erneut abzentrifugiert.

Zur längerfristigen Konservierung und Stammhaltung wurden die Mikroorganismen bei -70 °C als DMSO-Kryostocks (DMSO Endkonzentration 7 %) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) in ihrem jeweiligen Vollmedium (3.1.3) gelagert. Für alle Mikroorganismen wurde am Anfang der

Arbeit ein DMSO-Kryostock mit 210 Aliquoten angelegt, damit zu jedem maßgeblichen Experiment von genetisch identischem Ausgangsmaterial ausgegangen werden kann.

3.2.6 Bestimmen der Generationszeiten mittels Wachstumskurven

Die Erstellung von Wachstumskurven dient der Charakterisierung der Mikroorganismen anhand ihres Wachstumsverhaltens in ihrem definierten Flüssigmedium (3.1.3). Dazu wurde die Veränderung der optischen Dichte (3.2.1) einer Schüttelkultur im zeitlichen Verlauf gemessen. Basierend darauf wurden die Generationszeiten der Mikroorganismen (3.1.2) unter den gegebenen Wachstumsbedingungen bestimmt.

Ausgehend von der Vorkultur (3.2.3) des zu untersuchenden Organismus in dem jeweiligen Flüssigmedium wurde die Experimentalkultur (30 ml) auf 0,1 OD₆₀₀ eingestellt. Die Experimentalkultur wurde kontinuierlich bei 30 °C, 210 rpm inkubiert.

In Intervallen wurden Messpunkte photometrisch (600 nm) gemessen. Dabei wurde für jeden Messpunkt das arithmetische Mittel von drei technischen Replikaten herangezogen. Nach dem letztgenommenen Messpunkt wurde die Schüttelkultur über Nacht inkubiert. Nach 24 h wurde ein Abschlusswert (OD₆₀₀, 3.2.1) bestimmt. Zu jeder Messreihe (n=3) gab es 3 biologische Replikate.

Die ermittelte optische Dichte wurde grafisch gegen die Zeit (t_{min}) aufgetragen. Durch lineare Regression wurde in der halblogarithmischen Darstellung die Geradensteigung μ (spezifische Wachstumsrate) bestimmt. Mit Formel 3 wurde die Wachstumsrate bestimmt:

$$\mu = \frac{(\ln x_t - \ln x_0)}{t - t_0}$$

Formel 3: Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ
 $\mu_{[\text{min}^{-1}]}$; $x_t = \text{OD}_{600}$ zum Messzeitpunkt t ; $x_0 = \text{OD}_{600}$ zum Messzeitpunkt t_0 ; $t_{[\text{min}]}$

Mit Formel 5 berechnet sich die Generationszeit t_d :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Formel 4: Berechnung der Generationszeit t_d , μ =Wachstumsrate [min^{-1}]; t_d =Generationszeit [min]

3.2.7 Sensitivitätsbestimmung mittels Plattendiffusionstests

Der Plattendiffusionstest (Hudzicki, 2009) ist ein mikrobiologisches Testverfahren (nach dem Koch'schen Plattengussverfahren). Es verwendet feste Nährmedien in Petrischalen. Auf diese werden wachstumsfördernde und/oder wachstumshemmende Substanzen appliziert. In die Agarose werden *E. coli* oder *S. cerevisiae* in suspendierter Form eingegossen. Diese führen nach dem Bebrüten zu einem makroskopisch sichtbaren Bewuchs, welcher durch eine Trübung erkennbar ist. Aufgrund des Konzentrationsgefälles diffundiert die applizierte Substanz durch das Festmedium. In dem Bereich, wo die Konzentration noch hoch genug ist, reagieren die Testorganismen sensitiv, und es bildet sich ein Hemm- bzw. "Ammenhof". Die Größe des Hofes verhält sich dabei proportional zur Sensitivität gegenüber der eingesetzten Substanz. Bei einem Ammenhof reagieren die Mikroorganismen sensitiv mit Wachstum auf das Substrat. Bei einem Hemmhof reagieren die Mikroorganismen sensitiv mit ausbleibendem Wachstum auf die Substanz.

In dieser Arbeit wurde der Plattendiffusionstest verwendet, um Sensitivitäten gegenüber Antibiotika aufzuzeigen. Zusätzlich wurde die jeweilige Auxotrophie (XE2479 mit ΔSO_3^{2-} ; YA2800-1 mit ΔPO_4^{3-}) nachgewiesen.

Herstellen der Agardiffusionstestplatten

Eine Übernachtkultur wurde mit einem Klon des zu testenden Organismus inokuliert. Bei 30 °C, 210 rpm, im Schikanekolben wurde 18-24 h inkubiert. Die fertige Übernachtkultur wurde drei Mal gewaschen (3.2.5) und auf die gewünschte OD_{600} (3.2.1) eingestellt. 1 ml der gewaschenen eingestellten Kultur wurde ins vorbereitete, auf 40 °C abgekühlte Plattenmedium eingegossen. Beim Herstellen des Plattenmediums wurde 1 % (w/v) Agarose verwendet, da Agar-Agar Verunreinigungen von Sulfat und Phosphat enthält.

Tabelle 13: Vorbereiten der Diffusionstestplatten

Organismus	Flüssigmedium ÜNK (10 ml)	benötigte OD_{600}	Plattenmedium (30 ml)	Bebrütung bei 30 °C
XE2479	SGX (Tabellen 6)	2	SGX- ΔSO_3^{2-} (Tabelle 8)	24 h
YA2800-2	SGY (Tabellen 7)	3	SGY- ΔPO_4^{3-} (Tabelle 8)	48 h

Bestückung der Diffusionstestplatten

In der Arbeit wurden zwei Varianten des Plattendiffusionstests vorgenommen. Zum einen der Lochtest; zum anderen der Blättchentest (Biemer, 1973). Bei dem Lochtest (Abraham & Chain, 1941) wird ein Loch ($L = \varnothing 8 \text{ mm}$) in die Platte gestanzt und später mit 250 μl zu testender Lösung bestückt. Beim Blättchentest wird auf ein zuvor autoklaviertes Testblättchen ($B = \varnothing$

6 mm, Whatman Antibiotic Assay Discs, Merck KGaA, Darmstadt, DE) eine definierte Menge der zu testenden Substanz appliziert. Nachdem das Blättchen durchgetrocknet ist, wird es auf die jeweilige Position der Diffusionsplatte gebracht.

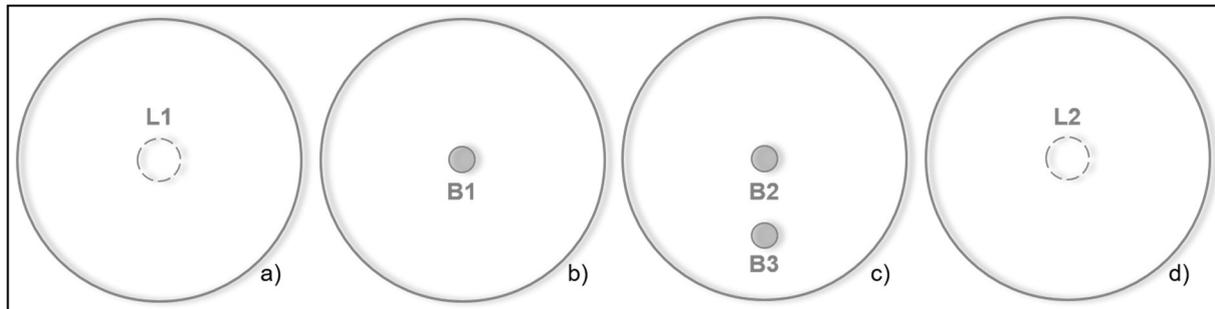


Abbildung 5: Schema für den Plattendiffusionstest, eingegossen YA2800-2

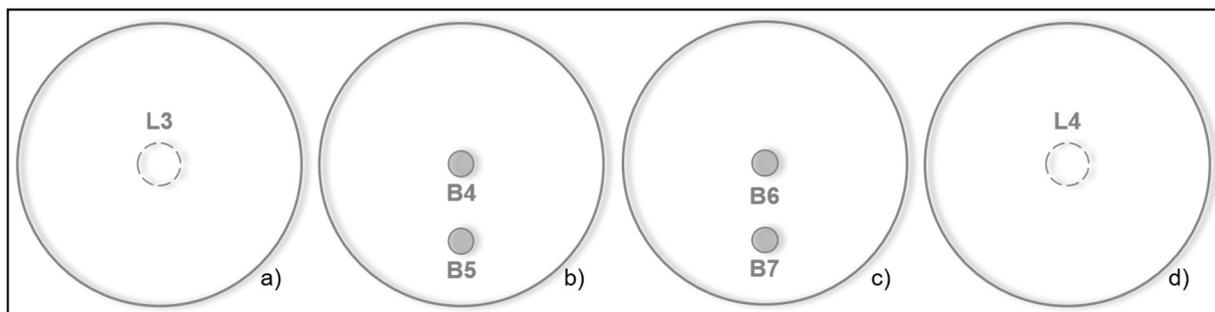


Abbildung 6: Schema für den Plattendiffusionstest, eingegossen XE2479

Tabelle 14: Übersicht der Bestückung vom Loch (L) und dem Testblättchen (B), Menge und deren Zweck

Bestückung	Substanz (steril)	Menge	Zweck
L1	Überstand XE2096	250 µl	Negativkontrolle
L2	Überstand XE2479	250 µl	Cross Feeding
L3	Überstand CC789-2A	250 µl	Negativkontrolle
L4	Überstand YA2800-2	250 µl	Cross Feeding
B1 & B3	G418	70 µM	Mykozidkontrolle
B2	KH ₂ PO ₄	30 µM	Positivkontrolle
B4 & B7	Kanamycin	4,1 µM	Antibiotikakontrolle
B5	Ampicillin	5,7 µM	Antibiotikakontrolle
B6	Cystein	48,5 mM	Positivkontrolle

3.2.8 Konditionierungsversuche

Ein konditioniertes Medium ist ein Medium, in dem zuvor einer der beiden Versuchsorganismen für einen definierten Zeitraum inkubiert wurde. Wichtig ist, dass das Ausgangsmittel zuvor frei von dem gewünschten, sekretierten Molekül ist. Während der

Inkubationszeit gibt der Organismus seine Stoffwechselprodukte in das Medium ab, unter anderem auch das Molekül, für welches der darauffolgende Organismus auxotroph ist. Nun kann der zweite Organismus in dem zuvor konditionierten Medium herangezogen werden. Somit kann die metabolische Kopplung nachgewiesen werden.

Eine Vorkultur (3.2.3) des gewünschten Organismus wurde in dem jeweiligen chemisch definierten Medium (40 ml, 3.1.3) angesetzt und für 24-36 h inkubiert. Es ist wichtig, dass ausreichend lange inkubiert wird, damit sich genügend vom benötigten Molekül anreichert. Darüber hinaus sollte nicht zu lange inkubiert werden, da sonst der Produzent selbst das Molekül wieder verstoffwechseln könnte. Die Vorkultur wurde nun abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße, 4 °C Lagerung).

Nun wurde 1 ml des gewaschenen und auf OD_{600} 0,1 eingestellten Zweitorganismus in 9 ml des konditionierten Mediums hinzugefügt. Jeweils nach 24 h, 48 h & 72 h wurden weitere 10 ml des konditionierten Mediums hinzugefügt und zu jedem Arbeitszeitpunkt die OD_{600} gemessen. Als Negativkontrolle dienen das nicht konditionierte Medium und der Ausgangsstamm (Tabelle 8).

Tabelle 15: Die verwendeten Organismen, deren Konditionsmedium und Auxotrophie

Erstorganismus	Konditionierendes Medium	Zweitorganismus/Auxotrophie	Zweck
XE2479	SGY- ΔPO_4^{3-}	YA2800-2 / Phosphonat	Phosphonat → Phosphat
XE2096	SGY- ΔPO_4^{3-}	YA2800-2 / Phosphonat	Negativkontrolle
YA2800-2	SGX- ΔSO_4^{2-}	XE2479 / Sulfat	Sulfat → Sulfit
CC789-2A	SGX- ΔSO_4^{2-}	XE2479 / Sulfat	Negativkontrolle

3.2.9 Evolutionsmaschine (Genemat)

Die in dieser Arbeit verwendete Apparatur (Marlière & Mutzel, 1998) dient zur kontinuierlichen Proliferation lebender Zellen in Suspension. Während der gesamten Arbeit wurde ein Turbidostat-Regime gefahren. Der Genemat vernichtet automatisch residente, adaptiv statische Varianten. Kultivierte Populationen befinden sich in der log-Phase, wenn die Bedingungen konstant gehalten werden. Wichtige Faktoren sind: konstante Temperatur, zell-dichteabhängiges Zuführen von frischem Medium (Schwellenwertdichte) und gleichzeitiges Abführen von Zellen und verbrauchtem Medium. Das Volumen des abgeführten Zell/Mediumgemisches entspricht dem der Frischmediumzufuhr. Der Genemat wurde für die hier beschriebenen Experimente so programmiert, dass eine optische Dichte von 1,4 der Schwellenwert ist, an dem mit frischem Medium verdünnt wird. Dieser Vorgang unterstützt das Wachstum von Subpopulationen, welche besser an die Bedingungen angepasst sind, und entfernt durch Verdünnung Subpopulationen, welche schlechter adaptiert sind.

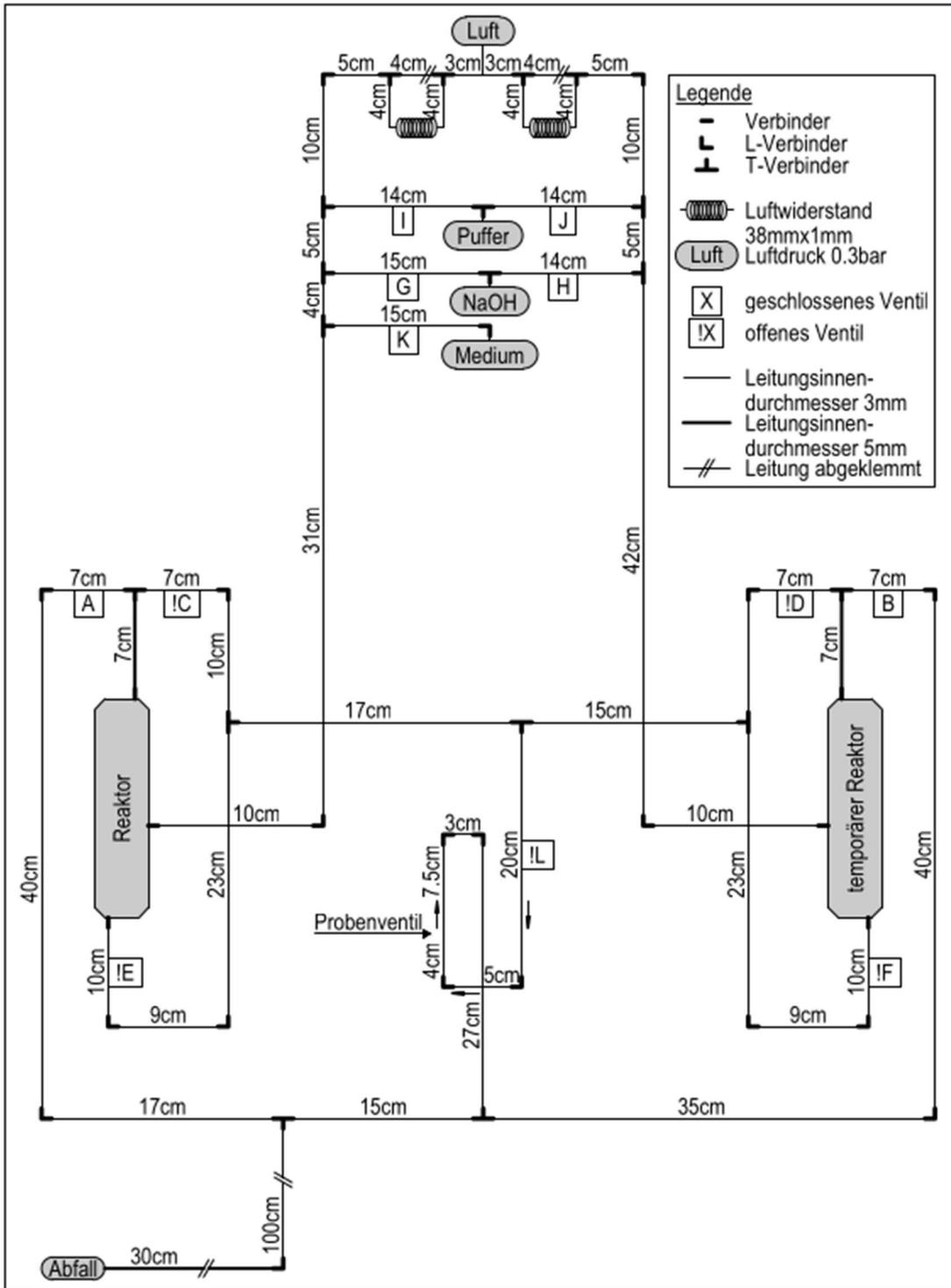


Abbildung 7: Genemat als Prinzipskizze

Durch periodische Überführung der Kultursuspension in einen zweiten Reaktor kann der erste Reaktor mit 5 M NaOH sterilisiert werden. Im Anschluss wird der Reaktor mit Basismedium neutralisiert (Tabellen 2). Der erste Reaktor ist nun bereit für die Rücküberführung der Kultursuspension. Anschließend wird der zweite Reaktor wieder vorbereitet (NaOH,

Basismedium) und steht bereit für den kommenden Waschzyklus. Dieser Ablauf stellt sicher, dass sich bildende Biofilme in jedem Teil der Apparatur, die mit lebenden Zellen in Kontakt war, zerstört werden und die Suspension lebender Organismen zu jedem Zeitpunkt erhalten bleibt. Das Verfahren (alternierende Sterilisation) verhindert die Selektion statischer, verdünnungsresistenter Populationen. Es werden statische Varianten gegenselektioniert und dynamische Varianten bevorzugt, die zunehmend besser an die gewählten Kulturbedingungen angepasst sind.

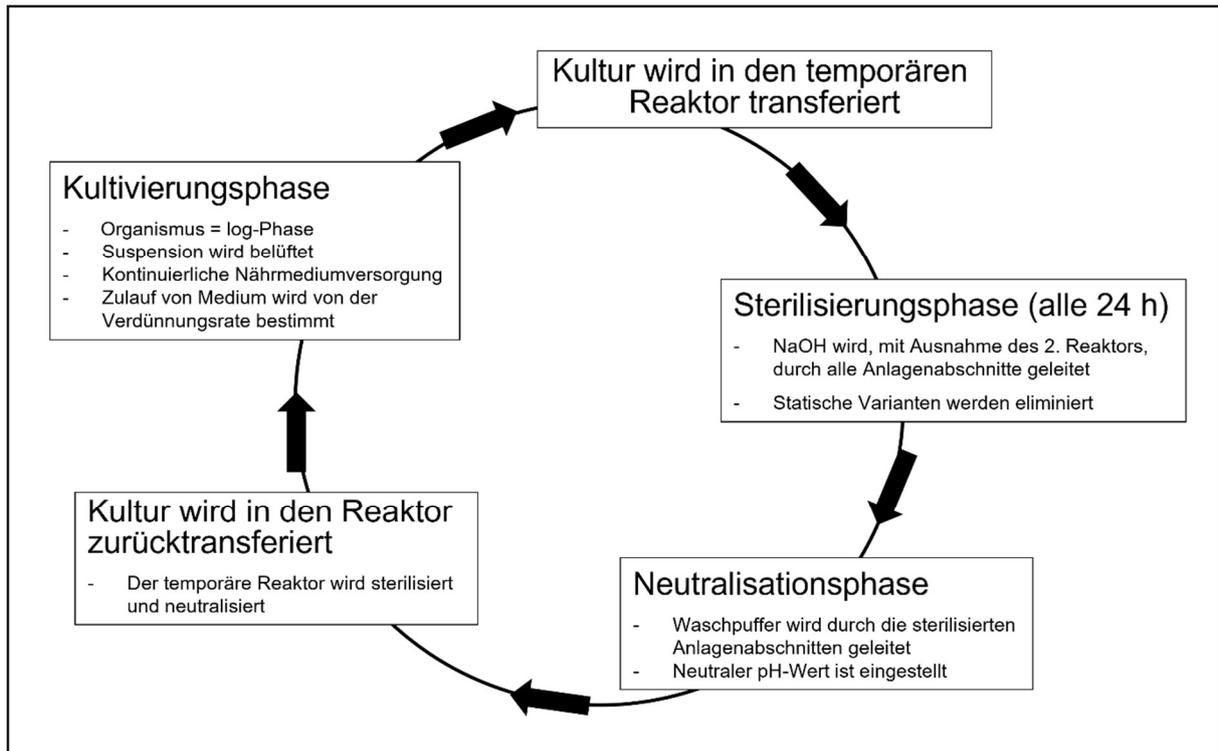


Abbildung 8: Betriebszyklus des Genemats, schematisch

Animpfen des Genemats

Die Mikroorganismen wurden im jeweiligen chemisch definierten Medium (3.1.3) vorkultiviert. Die zuvor gewaschenen Zellen (3.2.5) wurden mittels Photometer (3.2.1) auf die gewünschte optische Dichte eingestellt. Bei den Evolutionsexperimenten wurden verschiedene Verhältnisse der Mikroorganismen ausgetestet, ausgehend von *E. coli* 1 OD = 1×10^9 Zellen und *S. cerevisiae* 1 OD = 1×10^7 Zellen. Die vorbereitete Kultur mit einem Gesamtvolumen von 25 ml wurde komplett über den Maschinenprobenanschluss mit einer sterilen 50 ml Kunststoffspritze angeimpft.

Tabelle 16: Animpfen des Genemats mit verschiedenen Mikroorganismen und deren Medien

Organismus	Maschinenmedium (Tabelle 9)	Zweck
XE2479	SGPI	Negativkontrolle
YA2800-2	SGPI	Negativkontrolle
XE2479/YA2800-2	SGPI	Evolutionsexperiment

Probenentnahme aus dem Genemat

Unter aseptischen Bedingungen wurden 2 ml am Maschinenprobenanschluss aspiriert. Ein Teil der Probe wurde bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3.2.5, Reserve, "Fossil record") eingelagert. Ein Tropfen der Kultur wurde mikroskopisch auf die Morphologie der Organismen (3.2.14) analysiert. Mit dem Rest wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, auf die jeweiligen Platten ausgebracht und der KBE-Wert bestimmt (3.2.4).

Der Event Data Logger (EL-USB-5, LASCAR electronics, Wiltshire, UK) zeichnete das Öffnen des Frischmedienventil (Abbildung 7, Ventil K) auf. Mit den EL-USB-5 Daten konnte das Gesamtdurchlaufvolumen des Frischmediums und damit die Verdünnungsrate ermittelt werden.

3.2.10 Extraktion genomischer DNA

Genomische DNA wird für Polymerasekettenreaktionen, Restriktionsanalysen und Sequenzierungen (NGS, Sanger) benötigt. Hierzu wurde DNA aus Übernachtskulturen von *S. cerevisiae* und *E. coli* mit dem jeweiligen Kit (Norgene Biotek Corp., Thorold, CA; Qiagen, Hilden, DE) nach dessen Herstellerprotokoll aufgereinigt.

3.2.11 NGS-Genomsequenzierung

NGS (Illumina) wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg, DE durchgeführt (Shendure & Ji, 2008). Hierfür wurde die zuvor aufgereinigte genomische DNA (3.2.10) eingeschickt. Zur Auswertung der erhaltenen Genomdaten wurde Geneious Prime 2022.0.1 verwendet.

Das Detektieren der "Single Nucleotide Variants" (SNVs) und "small insertions and deletions" (indels) aus den NGS-Rohdaten kann in folgende drei Schritte unterteilt werden.

1. Alignment/Abgleich – Die kurzen NGS-Reads (100 – 300 Bp) werden gegen ein Referenzgenom abgeglichen und zugeordnet (Li & Durbin, 2009).
2. Variant Calling – Nach dem Alignment werden die Unterschiede (Mutationen) im Testgenom im Vergleich zum Referenzgenom identifiziert (Koboldt & Chen, 2009; McKenna & Hanna, 2010).

3. Filtern und Annotation – Die SNVs werden gefiltert und „reads“ mit geringer Qualität entfernt. Anschließend können die Gene, welche die Mutationen tragen, „annotiert“ werden (Simpson & Wong, 2009; Zerbino & Birney, 2008).

3.2.12 Überprüfung der Stämme auf ihre genetische Identität

Escherichia coli XE2479 und XE2096 besitzen einen *ssuABCD*-Knockout. Bei *Saccharomyces cerevisiae* YA2800-2 ist gegenüber CC789-2A eine LEU2.KI Kasette eingefügt. Diese genetischen Merkmale wurden genutzt, um zu Beginn und während der laufenden Evolutionsexperimente die verwendeten Stämme auf ihre genetische Identität zu testen.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die aufgereinigte DNA wurde PCR-amplifiziert mit 2 x PCR MasterMix (Thermo Scientific, MA, USA). Hierzu wurden 50 ng bis 100 ng genomische DNA als Template verwendet. In Tabelle 18 werden die Reaktionsansätze dargestellt.

Tabelle 17: PCR-Ansatz mit 2× PCR Mastermix, Reaktionsvolumen 25 µl

Zusammensetzung	Menge [µl]	Endkonzentration
2× PCR Master Mix	10 µl	2,5 U (inkl. 400µM dNTPs, 1 mM MgCL ₂)
Primer 1	0,5 µl	50 pmol
Primer 2	0,5 µl	50 pmol
Template	10 µl	50-250 ng
PCR-Wasser (nukleasefrei)	4 µl	---

Tabelle 18: Konfiguration des Thermocyclers (T100 Thermal Cycler, BioRad, CA, USA)

Zyklusschritte #2-4 werden 35× wiederholt.

#	Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
1	initiale Denaturierung	95 °C	3"
2	Denaturierung	95 °C	30'
3	Primerhybridisierung	(3.1.4)	30'
4	Elongation	72 °C	1-3,5"
5	terminale Elongation	72 °C	7"
6	Kühlung	8 °C	bis Probenentnahme

Das Mitführen einer Positivkontrolle (hier: „housekeeping“-Gen) wie das Mitführen einer Negativkontrolle (ohne Template-DNA) sind zum Ausschluss falsch-positiver Detektionssignale erforderlich.

Die PCR-Fragmente wurden wie unter 3.2.13 beschrieben detektiert.

Zusätzlich wurden NGS-Sequenzierungen (3.2.11) durchgeführt. Weiterführend wurde unter Zuhilfenahme der Mikroskopie (3.2.14) eine optische Inspektion der Organismen durchgeführt.

3.2.13 Agarose Gelelektrophorese

Fragmente der PCR wurden nach Größe anhand ihrer individuellen Wechselwirkung mit dem Agarosegel (1,5 % (w/v) Agarose, in 1× TBE) (Tabelle 33.1.1) zusammen mit DNA Stain Clear G (SERVA, Heidelberg, DE) bei der Migration in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierzu wurden die zu testenden Proben mit 6× Ladepuffer (Thermo Scientific, MA, USA) angesetzt, zu einer finalen Konzentration von 1× vor Migrationsstart. Dies dient dem besseren Einsinken der Probe und der kontinuierlichen Kontrolle des Migrationsfortschritts. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde GeneRuler DNA-Ladder Mix und GeneRuler DNA-Ladder LR Mix (Thermo Scientific, MA, USA) herangezogen. Im Elektropherogramm können die DNA-Fragmente im Anschluss mit einem UV-Transilluminator detektiert werden.

3.2.14 Mikroskopie

Während der Versuche, aber nach jeder Probenahme des Genemats, wurden die Organismen morphologisch begutachtet. Die Organismen wurden ohne Verdünnung auf Gelatine-beschichteten Objektträgern (0,8 % w/v Gelatine (Sigma-Aldrich, MO, USA), H₂O) fixiert. Die vorbereiteten Proben wurden an dem Zeiss Axio Imager.Z2 („*phase contrast*“) mit den Vergrößerungen 40× und 100× (Ph2 und Ph3 Kondensator) mikroskopiert. ImageJ/Fijii (Standardeinstellung) wurde zur Bildauswertung verwendet.

3.2.15 Statistik

In die Abbildungen wurde eine Trendlinie eingepasst, für eine bessere Übersicht, falls der Determinationskoeffizient $R^2 < 0,9$ lag.

Für die statistische Erhebung (Hellbrück, 2016) der Ergebnisse wurde der p-Wert (t-Test, Excel 2205) herangezogen. Er misst die Wahrscheinlichkeit, dass ein in der Stichprobe beobachteter Unterschied zwischen zwei Gruppen zufällig entstanden sein könnte (die Nullhypothese stimmt).

Die Nullhypothese wird abgelehnt, wenn der berechnete p-Wert unter dem Signifikanzniveau (α) liegt. Das Signifikanzniveau wurde mit 7,5 % vordefiniert (Fittkau, 2021). Das heißt, es besteht eine Chance von eins zu 13,3, dass bei der behaupteten Hypothese ein Fehler vorliegt. Demzufolge ergibt sich:

$\alpha < 0,01$ = hoch signifikant

$\alpha < 0,075$ = signifikant

$\alpha \geq 0,075$ = nicht signifikant

In dieser Arbeit wurde in den Abbildungen die statistische Signifikanz in Form von Asterisken abgebildet:

$p < 0,001$ = ***

$p < 0,015$ = **

$p < 0,075$ = *

4 Ergebnisse

4.1 Kultur auf Festmedium

Vor Beginn des Genmatenexperiments wurden die Organismen auf Agarplatten unter verschiedenen Kulturbedingungen begutachtet (3.2.4). Die Kulturen wurden zuvor aufgereinigt und zu jedem Zeitpunkt molekularbiologisch (4.7.1, 3.2.12) auf ihre genetische Identität überprüft.

4.1.1 YA2800-2

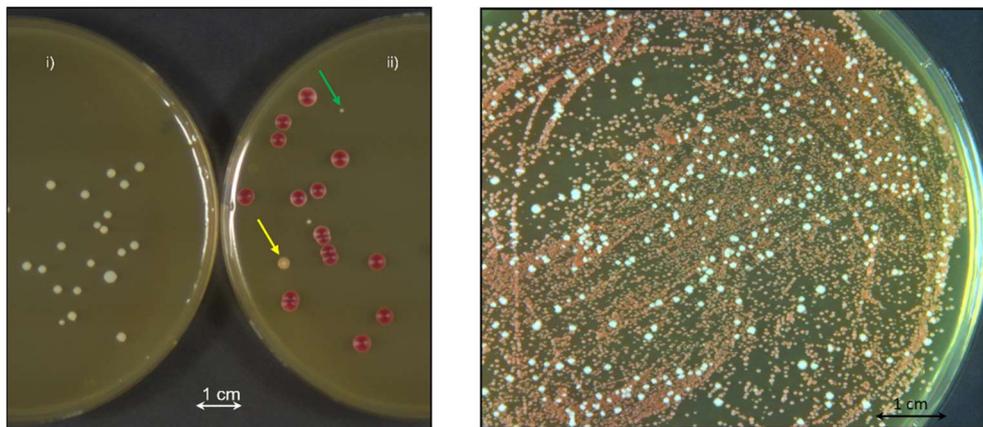


Abbildung 9: a) YA2800-2 auf 2 % YPD-Agar, 48 h inkubiert, aus ÜNK ausverdünnt 10^{-7} i) bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, ii) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; b) YA2800-2 auf 2 % YPD-Agar, 48 h inkubiert, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, aus ÜNK, ausverdünnt 10^{-2} .

Bei der Inkubation von *Saccharomyces cerevisiae* YA2800-2 unter verschiedenen Bedingungen wurden zwei Phänotypen identifiziert. Phänotyp-1 war weiß-cremefarben, gleichmäßig rund, undurchsichtig, halbkugelig, mit scharfer Abgrenzung zum Nähragar. Die Koloniedurchmesser variierten zwischen $< 0,5$ und $1,5$ mm (Abbildung 9a-i). Phänotyp-2 war rot, gleichmäßig rund, undurchsichtig, erhaben, mit scharfer Abgrenzung zum Nähragar. Der Koloniedurchmesser betrug ≈ 2 mm (Abbildung 9a-ii). Neben diesen beiden wurde ein Hybridphänotyp beobachtet (Abbildung 9a-i, gelber Pfeil). Dieser unterschied sich vom Phänotyp-2 lediglich in der Farbe und war rosa. Die Überprüfung der genetischen Identität von isolierten Klonen (2.2.12) zeigte die Anwesenheit der LEU2.KI-Kassette in allen Isolaten. Die Möglichkeit einer Kontamination kann daher ausgeschlossen werden.

Bei den YPD-Platten mit 10^{-7} Verdünnung, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 h Inkubation war ausschließlich der weiß-cremefarbene Phänotyp zu beobachten. Wurde die YPD-Platte mit 10^{-7} Verdünnung hingegen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, war der rote Phänotyp vorherrschend. Vereinzelt waren hier auch der Hybridphänotyp und der weiße Phänotyp festzustellen, aber beide mit reduziertem Wachstum (Koloniedurchmesser $< 0,5$ mm) (Abbildung 9a-ii, siehe Pfeile). Der nach Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

beobachtete Phänotyp-2 ist vermutlich das Resultat eines „*phase shifts*“ in Antwort auf Temperaturstress (Lederberg & lino, 1956).

Wurde die ÜNK YA2800-2 so verdünnt und ausplattiert, dass kein Zellrasen entstand, aber ein dichtzusammenhängendes Einzelkoloniebild (Abb. 5b, bei 30 °C, 48 h), wuchsen Phänotyp-1 und der Hybridphänotyp in einem ungefähren Verhältnis von 1:10. Auffällig war, dass Phänotyp-1 (weiß-cremefarben) eine unregelmäßig geränderte Koloniemorphologie aufwies (Abbildung 9b).

Geruchssensorisch war *S. cerevisiae* YA2800-2 ohne Ausnahme charakteristisch phenolaromatisch.

4.1.2 XE2479

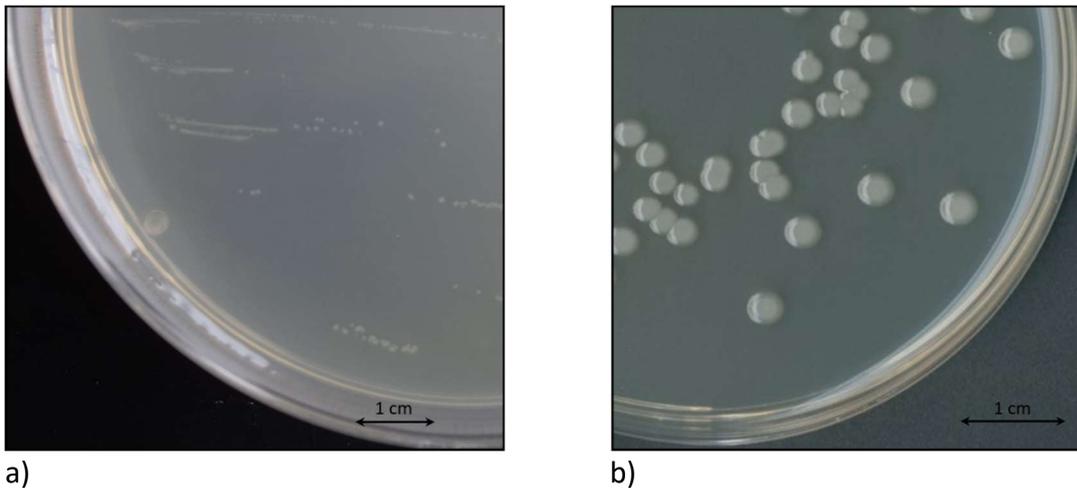


Abbildung 10: *E. coli* XE2479 auf 2 % LB-Agar, 30 °C, Einzelkolonien; a) 24 h b) 36 h.

Unter Standardbedingungen (30 °C, LB-Komplexmedium) wies *E. coli* XE2479 kreisrunde, konvexe, glatte Kolonien auf. Diese waren milchig-weiß, durchscheinend, glänzend. Bei einer Inkubationszeit von ≈ 24 h waren diese < 1 mm im Durchmesser (Abbildung 10a). Bei einer Inkubationslänge von ≈ 36 h betrug der Koloniedurchmesser $2,5 \leq 4,5$ mm (Abbildung 10b).

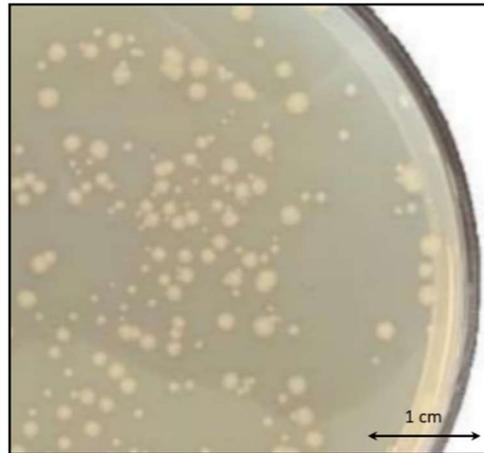


Abbildung 11: Einzelkolonien von *E. coli* XE2479 auf 2 % LB-Agar, Ampicillin 100 µg/ml, 30 °C, 36 h.

Unter Wachstumsstress (Nährstoffmangel, Selektionsdruck) änderte sich die Koloniemorphologie (Abbildung 11). Es waren verschiedene Koloniedurchmesser zu beobachten, jedoch waren alle $\leq 2,5$ mm. Kolonieförmigkeiten von wellenförmig bis leicht unregelmäßig („frizzy“) wurden beobachtet. Unverändert blieben diese milchig-weiß, durchscheinend, glänzend.

Zu jedem Messzeitpunkt war der indoltypische Standardgeruch von *E. coli* festzustellen.

4.2 Agardiffusionstests mit XE2579/YA2800-2

Agardiffusionstests nach dem Koch'schen Plattengussverfahren wurden durchgeführt, um die Substratabhängigkeiten (PO_4^{3-} und SO_3^{2-}) der Organismen voneinander aufzuzeigen. In die SGY- ΔPO_4^{3-} -Agaroseplatten wurde YA2800-2 eingegossen und in SGX- ΔSO_3^{2-} -Agaroseplatten XE2479. Die Kulturen wurden zuvor gewaschen und ihre OD_{600} eingestellt (3.2.1). Die zu testenden Substrate wurden in eine Ausstanzung oder auf ein Testplättchen appliziert. Die Platten wurden bei 30 °C für 48 h inkubiert. Bei einem Ammenhof reagierten die Mikroorganismen sensitiv (mit Wachstum) auf das Substrat. Bei einem Hemmhof reagierten die Mikroorganismen sensitiv (mit ausbleibendem Wachstum) auf die Substanz.

Bei den „cross-feeding“-Experimenten wurden Metabolite vom ersten Organismus dem zweiten Organismus zur Verfügung gestellt, welche sensitiv auf diese reagierten. Wiederum stellte dieser zweite Mikroorganismus, welcher bereits von den zur Verfügung gestellten Metaboliten abhängig war, dem ersten Mikroorganismus Metaboliten zum Verstoffwechseln zur Verfügung.

4.2.1 Abhängigkeit von *S. cerevisiae* YA2800-2 von Phosphat oder metabolischen Produkten von *E. coli* XE2479 und Sensitivität gegen G418

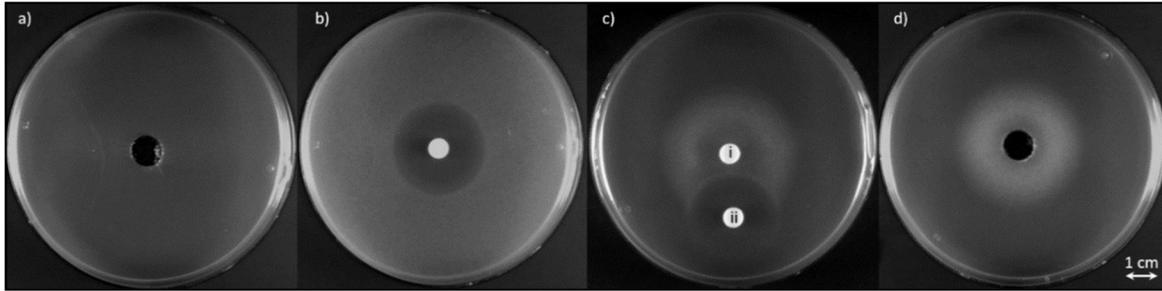


Abbildung 12: Agardiffusionstest nach dem Koch'schen Plattengussverfahren; 1 ml einer gewaschenen 3 OD ÜNK YA2800-2 (aus SGY) wurden in 1 %ige Agarose SGY- ΔPO_4^{3-} eingegossen (a, c, d), bei b) mit 1,8 mM KH_2PO_4 . Folgendes wurde in eine Ausstanzung oder auf ein Testplättchen appliziert: a) 250 μl sterilen Überstands von XE2096, b) 70 μM G418, c) i = 30 μM KH_2PO_4 & ii = 70 μM G418, d) 250 μl sterilen Überstands von XE2479; inkubiert 24 h-36 h, 30 °C, 210 rpm.

Als Negativkontrolle (Abbildung 12a) diente der sterilfiltrierte Überstand (250 μl) der XE2096-Schüttelkultur. Es war kein Ammenhof zu beobachten. Bei der Antibiotikakontrolle (Abbildung 12b; 70 μM G418), wurde ein Hemmhof mit 30 mm ausgemessen. Bei dieser Platte wurde zuvor 1,8 mM KH_2PO_4 in die Agarose mit eingegossen, um Wachstum zu erlauben. Bei Platte c (Abbildung 12), welche als Positivkontrolle diente (mit eingefügter Antibiotikakontrolle), wurde auf das Testplättchen-i 30 μM in 20 μl KH_2PO_4 und auf das Testplättchen-ii 70 μM G418 in 20 μl gegeben. Es entstand ein Ammenhof mit einem Durchmesser von 55 mm. Zusätzlich wurde der Ammenhof von einem Hemmhof mit 36 mm geschnitten. Eindeutig zu beobachten war, dass der Hemmhof am Außenrand gesamtheitlich einen dichteren Wachstumsring ($\approx 1,5$ mm) bildete. Ein Ammenhof mit 42 mm wurde bei der Targetplatte (Abbildung 12d) gemessen. In die Ausstanzung wurde 250 μl steriler Überstand einer XE2479 Kultur appliziert. Zusätzlich traten bei den Ammenhöfen ein schmaler innerer und ein breiter äußerer Wachstumsring auf. Der innere zeigte im Vergleich zum äußeren eine geringere Organismendichte.

4.2.2 Abhängigkeit von *E. coli* XE2479 von Sulfid oder metabolischen Produkten von *S. cerevisiae* YA2800-2 und Sensitivität gegen Kanamycin

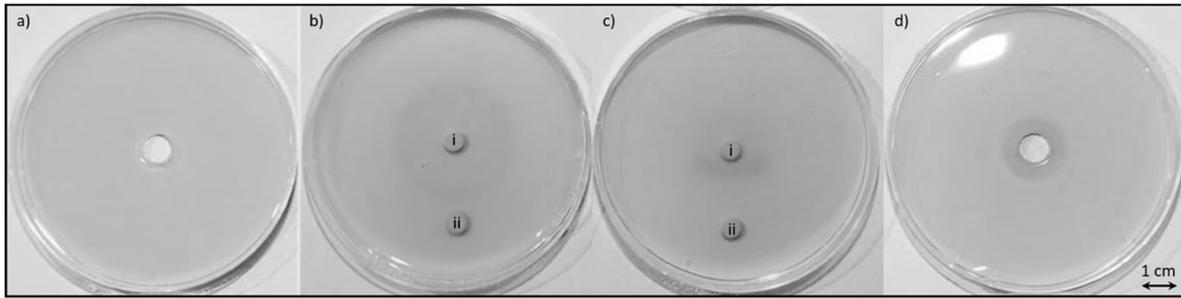


Abbildung 13: Agardiffusionstest nach dem Koch'schen Plattengussverfahren; 1 ml einer gewaschenen 2 OD ÜNK XE2479 (aus SGX) wurden in 1 %ige Agarose SGX- Δ SO₃²⁻ eingegossen (a, c, d), bei b) mit 72,7 mM Cystein. Folgendes wurde in die Ausstanzung oder auf ein Testplättchen appliziert: a) 250 μ l sterilen Überstands einer *S. cerevisiae* CC789-2A Flüssigkultur, b) i = 4,1 μ M Kanamycin, ii = 5,7 μ M Ampicillin, c) i = 48,5 mM Cystein und ii = 4,1 μ M Kanamycin, d) 250 μ l sterilen Überstands von YA2800-2; inkubiert 24 h-36 h, 30 °C, 210 rpm

Als Negativkontrolle (Abbildung 13a) diente der sterilfiltrierte Überstand (250 μ l) der CC789-2A Schüttelkultur. Es war kein Ammenhof zu beobachten. Bei der Antibiotikakontrolle (Abbildung 13b; i = 4,1 μ M Kanamycin; ii = 5,7 μ M Ampicillin, in 20 μ l) wurde bei Ampicillin kein Hemmhof gemessen; bei Kanamycin hingegen 31 mm. Bei dieser Platte wurde zuvor 72,7 mmol Cystein in die 1 %ige Agarose mit eingegossen. Bei Platte-c (Abbildung 13), welche als Positivkontrolle diente (mit eingefügter Antibiotikakontrolle) wurde auf das Testplättchen-i 48,5 mM Cystein und auf das Testplättchen-ii 4,1 μ M Kanamycin in 20 μ l gegeben. Es entstand ein Ammenhof mit einem Gesamtdurchmesser von 21 mm. Zusätzlich wurde der Ammenhof von einem Hemmhof mit 36 mm geschnitten. Ein Ammenhof mit 20 mm wurde bei der Targetplatte (Abbildung 13d) gemessen. In die Ausstanzung wurde 250 μ l steriler Überstand einer YA2800-2 Schüttelkultur appliziert.

Tabelle 19: Zusammenfassung Ammen- & Hemmhofdurchmesser der Agardiffusionstests

	Platte	Ammenhof [mm]	Hemmhof [mm]	Eigenschaft
YA2800-2	a)	---	---	Negativkontrolle
	b)	---	30	Antibiotikakontrolle
	c)	55	36	Positivkontrolle mit Mykozidkontrolle
	d)	42	---	Cross Feeding Platte
XE2479	a)	---	---	Negativkontrolle
	b)	---	31 = Kan/0 = Amp	Antibiotikakontrolle
	c)	21	24	Positivkontrolle mit Antibiotikakontrolle
	d)	20	---	"Cross Feeding"-Platte

Die Agardiffusionstests zeigten, dass *E. coli* XE2479 vom Substrat (SO₃²⁻) und von einem oder mehreren von *S. cerevisiae* YA2800-2 sekretierten Metaboliten abhängig ist. Ebenso reagierte

S. cerevisiae YA2800-2 sensitiv auf sekretierte Substrate von XE2479 und auf Phosphat. Die Kontrollen verifizierten das "cross feeding".

4.3 Konditionierungsversuche

Um die Substratabhängigkeiten der Mikroorganismen *E. coli* XE2479 und *S. cerevisiae* YA2800-2 voneinander nachzuweisen, wurden Konditionierungsversuche durchgeführt.

4.3.1 *E. coli* XE2479 im konditionierten Medium $\text{SGX-}\Delta\text{SO}_4^{2-}$

Zur Bereitstellung einer verwertbaren Schwefelquelle wurde $\text{SGX-}\Delta\text{SO}_4^{2-}$ Medium von YA2800-2 konditioniert. Die Populationsdichte von XE2479 wurde in konditioniertem Medium eingestellt ($0,1 = \text{OD}_{600}$, Tag 0) und die Zellen wurden inkubiert (3.2.8, 3.2.5). Alle 24 h wurde eine Passage durchgeführt mit konditioniertem Medium 1:100 seriell verdünnt und die OD-Werte ($n=3$) gemessen. Als Kontrollen wurde nicht konditioniertes Medium herangezogen und $\text{SGX-}\Delta\text{SO}_4^{2-}$ konditioniert durch den Wildtyp *S. cerevisiae* CC789-2A (Tabellen 5).

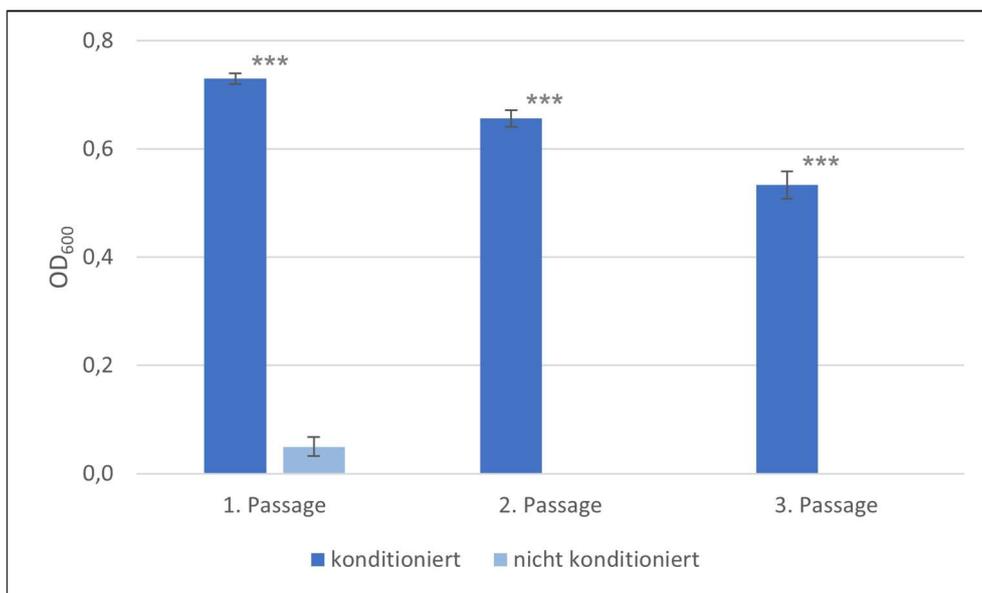


Abbildung 14: Wachstum von *E. coli* XE2479 im zuvor von YA2800-2 konditionierten $\text{SGX-}\Delta\text{SO}_4^{2-}$ Medium, als Endpunktmessung, bei 37 °C, 210 rpm (Startkultur $\text{OD}_{600} = 0,1$). Aufgetragen sind die gemessenen OD_{600} Werte ($n=3$) auf der y-Achse und die Messzeitpunkte (eine Passage nach je 24 h) auf der x-Achse. Als Kontrolle diente nicht konditioniertes $\text{SGX-}\Delta\text{SO}_4^{2-}$ Medium. Nach jeweils 24 h wurde 1:100 in konditioniertes Medium überimpft.

XE2479 zeigt im zuvor konditionierten Medium (Startkultur $\text{OD}_{600} = 0,1$, Tag 0) nach 24 h Inkubation ($\text{OD}_{600} = 0,73$), nach 48 h Inkubation ($\text{OD}_{600} = 0,66$) und nach 72 h ($\text{OD}_{600} = 0,53$) Wachstum. Die Kontrolle mit dem nicht konditionierten Medium wurde gleich behandelt, und es konnte kein signifikantes Wachstum festgestellt werden. Ebenfalls war kein Wachstum zu beobachten bei dem Konditionsversuch von $\text{SGX-}\Delta\text{SO}_4^{2-}$ Medium mit dem Wildtyp *S. cerevisiae* CC789-2A (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 *S. cerevisiae* YA2800-2 im konditionierten Medium SGX- Δ PO₄³⁻

E. coli XE2479 konditioniert SGX- Δ PO₄³⁻ Medium, welches Phosphonat als Phosphat für *S. cerevisiae* verfügbar macht. Die Dichte von YA2800-2 wurde in konditioniertem Medium eingestellt (0,1 = OD₆₀₀, Tag 0), und die Zellen wurden inkubiert (3.2.8, 3.2.5). Alle 24 h wurde eine Passage durchgeführt mit konditioniertem Medium 1:100 seriell verdünnt und die OD-Werte (n=3) gemessen. Als Kontrolle wurden nicht konditioniertes Medium und der Wildtyp *E. coli* XE2096 (Tabellen 5) zum Konditionieren von SGX- Δ PO₄³⁻herangezogen.

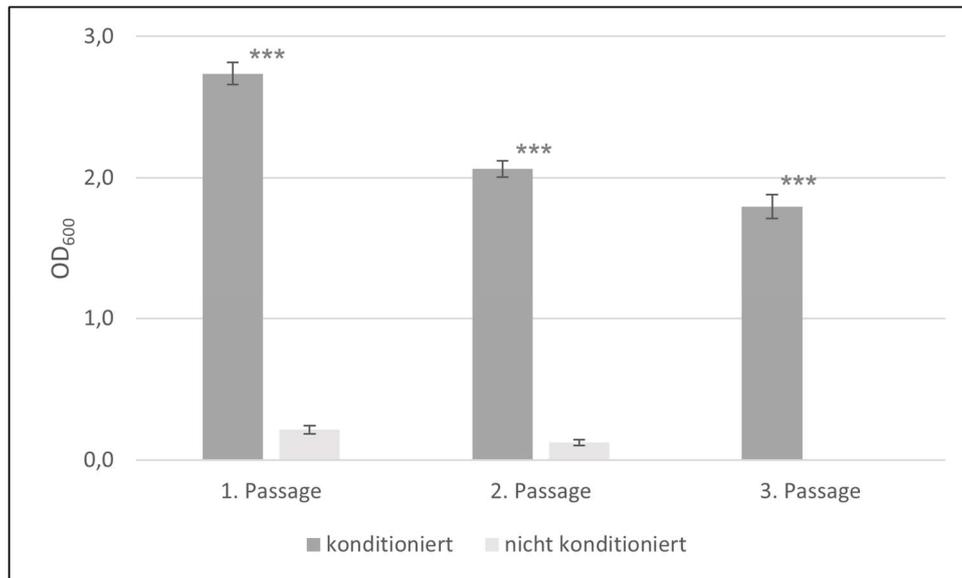


Abbildung 15: Wachstum von *S. cerevisiae* YA2800-2 im zuvor von XE2479 konditionierten SGX- Δ PO₄³⁻ Medium, als Endpunktmessung, bei 37 °C, 210 rpm (Startkultur OD₆₀₀ = 0,1). Aufgetragen sind die gemessenen OD₆₀₀ Werte (n=3) auf der y-Achse und die Messzeitpunkte (eine Passage nach je 24 h) auf der x-Achse. Als Kontrolle diente nicht konditioniertes SGX- Δ PO₄³⁻ Medium. Nach 24 h wurde 1:100 in konditioniertes Medium überimpft.

YA2800-2 zeigt im konditionierten Medium (Startkultur OD₆₀₀ = 0,1, Tag 0) nach 24 h Inkubation (OD₆₀₀ = 2,74), nach 48 h Inkubation (OD₆₀₀ = 2,06) und nach 72 h (OD₆₀₀ = 1,80) Wachstum. Die Kontrolle mit dem nicht konditionierten Medium wurde gleich behandelt, und es konnte kein signifikantes Wachstum festgestellt werden. Ebenfalls war kein Wachstum bei dem Konditionsversuch von SGX- Δ PO₄³⁻ Medium mit dem Wildtyp *E. coli* XE2096 zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Die Konditionierungsexperimente zeigten, dass beide Mikroorganismen XE2479 und YA2800-2 voneinander abhängig sind und sich jeweils gegenseitig essenzielle Substrate zur Verfügung stellen. Die Negativkontrollen (nicht konditioniertes Medium und mit dem Wildtyp konditioniertes Medium) fielen regelrecht aus. Es zeigte sich kein Wachstum der Zielorganismen, XE2479 und YA2800-2.

Da gezeigt wurde, dass eine metabolische Abhängigkeit zueinander besteht, konnte im SGPI -Medium das Symbioseexperiment im Genemat durchgeführt werden.

4.4 Das Symbioseexperiment im Genemat

4.4.1 Kinetik der Symbioseexperimente

Die vorgelegten Untersuchungen sollen die Fragestellung beantworten, ob eine symbiotische Langzeitkultivierung von *E. coli* XE2479 und *S. cerevisiae* YA2800-2 möglich ist. Als Arbeitshypothese wurde formuliert, dass beide Mikroorganismen eine stabile symbiotische Biozönose eingehen und sich gegenseitig mit dem benötigten sekretierten Substrat (v.v.) am Leben halten. Sollte ein Substrat nicht in ausreichender Konzentration vorliegen und einen Schwellenwert unterschreiten, würde dies zum Absterben der symbiotischen Lebensgemeinschaft führen.

Für diese Arbeit stehen zwei Genematexperimente zur Verfügung. Beide Experimente wurden kontrolliert beendet; das erste an Tag 130 (Abbildung 16) und das zweite an Tag 98 (Abbildung 17). Der Genemat wurde mit den Mikroorganismen XE2479/YA2800-2 im Verhältnis 1:5 (Experiment 1) und 1:10 (Experiment 2) angeimpft. Dargestellte Generationszeiten beziehen sich auf die Lebensgemeinschaft. Die ermittelten Verdünnungsraten (Abbildung 16, Abbildung 17) wurden gemittelt dargestellt (3.2.9).

Sind das Volumen des Reaktors und die Durchflussrate/Verdünnungsrate bekannt, können mit folgender Gleichung die Generationen ($1/T$, Wachstumsrate) errechnet werden:

$$1/T = \frac{w}{v} * 1/\ln 2$$

Formel 5: w = Verdünnungsrate, v = Reaktorvolumen

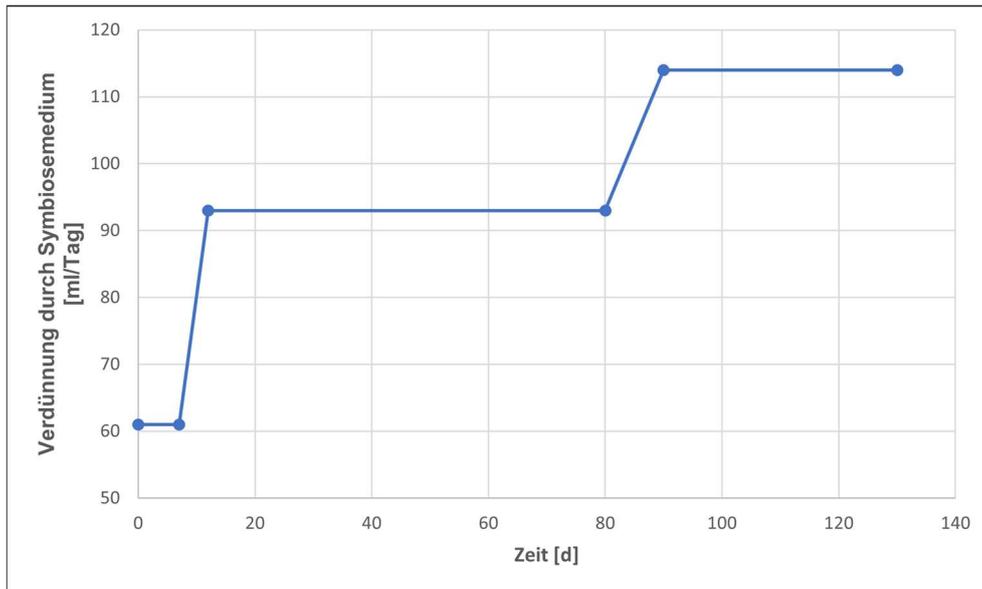


Abbildung 16: Evolutionäre Kinetik der Symbiosekultur XE2479 mit YA2800-2 in SGPI unter Turbidostat-Regime. Kinetik des Wachstumsverhaltens in kontinuierlicher Kultur bei 30 °C, mit einer Verdünnung [ml] pro Tag über einen Zeitraum von 130 Tagen (Experiment 1).

An den ersten sieben Tagen wurde eine Durchflussrate von $w = 61$ ml/d (nach ≈ 31 Generationen) gemessen. Ab Tag 7 bis Tag 12 wurde ein Ansteigen der Durchflussrate beobachtet. Diese pendelte sich in den folgenden 68 Tagen auf $w = 93$ ml/d (nach ≈ 456 weiteren Generationen) ein. Ab Tag 80 bis Tag 90 wurde ein weiterer Anstieg der Durchflussrate festgestellt, welche bis zur Beendigung des Experiments an Tag 130 kontinuierlich blieb. Die Durchflussrate stieg bis zum Ende des Experiments auf $w = 114$ ml/d (nach ≈ 328 weiteren Generationen). Das Experiment 1 umfasste in den 130 Tagen Laufzeit insgesamt ≈ 815 Generationen.

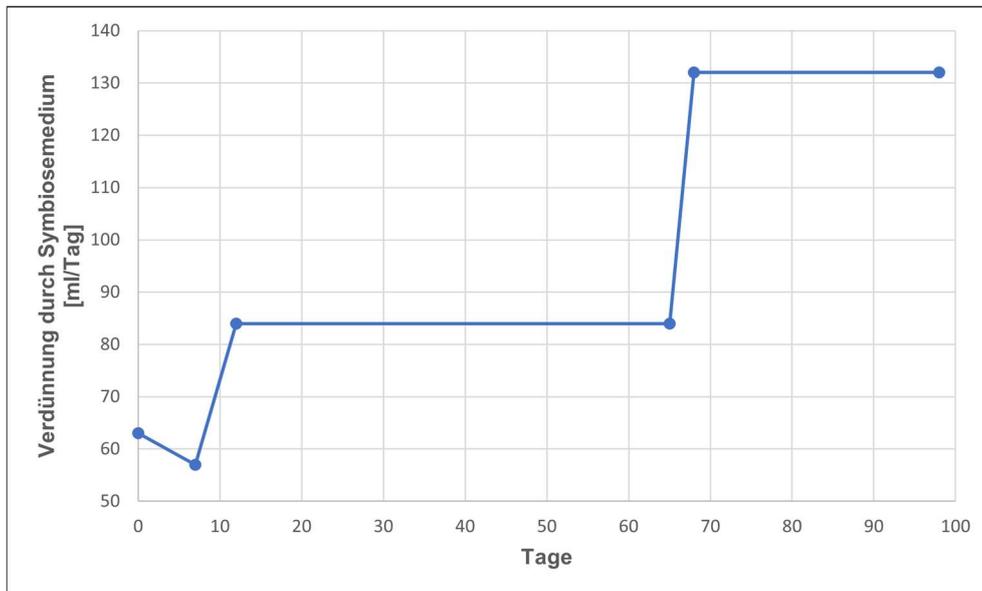


Abbildung 17: Evolutionäre Kinetik der Symbiosekultur XE2479 mit YA2800-2 in SGPI unter Turbidostat-Regime. Kinetik des Wachstumsverhaltens in kontinuierlicher Kultur bei 30 °C, mit einer Verdünnung [ml] pro Tag über einen Zeitraum von 98 Tagen (Experiment 2).

An den ersten acht Tagen wurde eine Durchflussrate von $w \approx 61,5$ ml/d (nach ≈ 35 Generationen) gemessen. Ab Tag 8 bis Tag 12 wurde ein Ansteigen der Durchflussrate beobachtet. Diese pendelte sich in den folgenden 53 Tagen auf $w = 84$ ml/d (nach ≈ 321 weiteren Generationen) ein. Ab Tag 65 bis Tag 68 wurde ein weiterer Anstieg der Durchflussrate festgestellt, welcher bis zum Abbruch des Experiments an Tag 98 kontinuierlich blieb. Die Durchflussrate stieg bis zum Ende des Experiments auf $w = 132$ ml/d (nach ≈ 286 weiteren Generationen). Das Experiment 2 umfasste in 98 Tagen Laufzeit insgesamt ≈ 642 Generationen.

Offenbar treten in beiden Experimenten jeweils zwei adaptive Veränderungen auf, die zu einer Erhöhung der Wachstumsrate des Systems führen und damit zu einer erhöhten Verdünnungsrate (Abbildung 16, Abbildung 17).

4.4.2 KBE-Bestimmung im laufenden Symbioseexperiment

Während des Evolutionsexperiments im Genemat wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben (3.2.9) entnommen. Die benötigte Verdünnungsreihe wurde auf die jeweilige Nähragarplatte ausplattiert (3.2.4). Die folgenden Abbildungen zeigen die Kinetik der koloniebildenden Einheiten zur jeweiligen Probenentnahme.

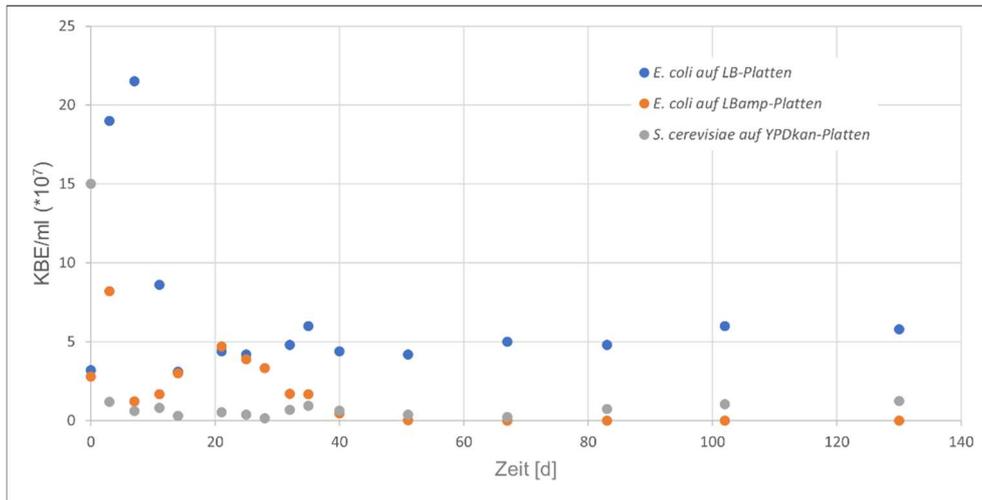


Abbildung 18: KBE-Kinetik Bestimmung für das Evolutionsexperiment 1 (130 Tage, Turbidostat, 30 °C), die entsprechende Verdünnung wurde für XE2479 auf eine LB-Platte (blau) und eine Selektionsplatte LB-Amp Platte (orange) ausplattiert. Für YA2800-2 wurde eine YPD-Kan Platte (grau) verwendet. Werte zum jeweiligen Messzeitpunkt (gleicher Farbe) wurden auf der x-Achse t in Tagen aufgetragen. Auf der y-Achse sind die koloniebildenden Einheiten (KBE) abzulesen (n = 1).

An Tag 0 wurde der Genemat mit den Mikroorganismen XE2479 und YA2800-2 im Verhältnis 1:5 angeimpft. Nach einer gemeinsamen Etablierungsphase (Tag 1-35) mit schwankender Anzahl von KBE stabilisierte sich ab Tag 40 das Verhältnis der Symbiosekultur XE2479 und YA2800-2 bis zu Tag 130 auf 5:1. Bereits in den ersten sieben Tagen sank die Population von YA2800-2, um $\approx 93\%$, auf ein für das gesamte Experiment stabiles Niveau von $10^{-6} - 10^{-7}$. Für XE247 stieg die LB-Gesamtpopulation bis zum 7. Tag auf das 7-fache an. An Messtag 7 reagierten 99 % der XE2479 Population sensitiv auf Ampicillin. Danach sank die Gesamtpopulation bis Messtag 14 ab. An Messtag 14 und 21 gab es kaum noch XE2479, welche auf Ampicillin sensitiv reagierten. Ab Tag 25 sank die ampicillinresistente Population stetig ab, bis ab Tag 83 keine mehr nachweisbar war. Von Tag 25 an blieb die ampicillinsensitive XE2479 Population stabil bei $\approx 5 \cdot 10^7$ KBE bis zum Messtag 130 (Abbildung 18).

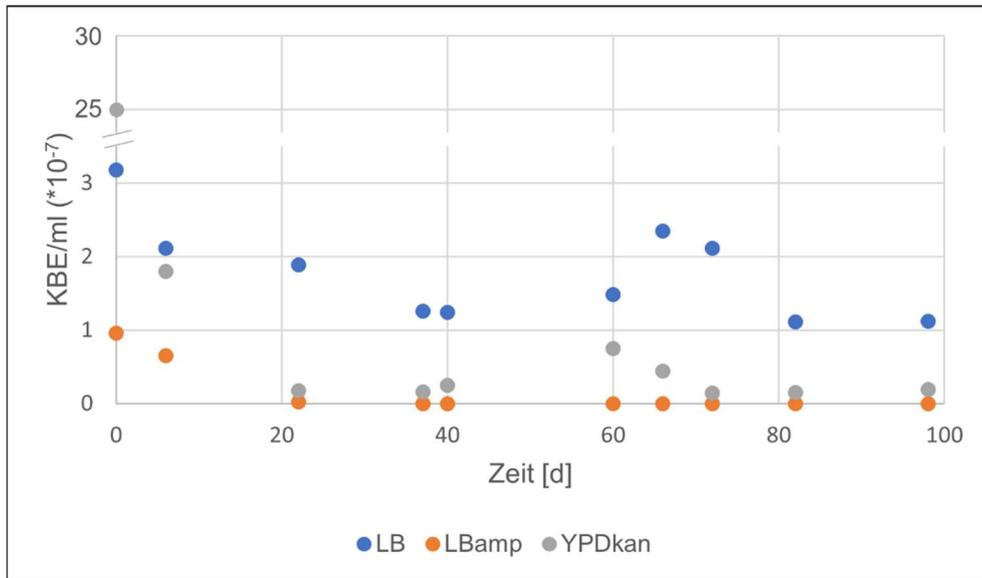


Abbildung 19: KBE-Kinetik Bestimmung für das Evolutionsexperiment 2 (98 Tage, Turbidostat, 30°C), die entsprechende Verdünnung wurde für XE2479 auf eine LB-Platte (blau) und eine Selektionsplatte LB-Amp Platte (orange) ausplattiert. Für YA2800-2 wurde eine YPD-Kan Platte (grau) verwendet. Werte zum jeweiligen Messzeitpunkt (gleicher Farbe), t in Tagen aufgetragen. Auf der y-Achse sind die koloniebildenden Einheiten (KBE) abzulesen (n = 1).

Am Tag 0 wurde der Genemat mit den Mikroorganismen XE2479 und YA2800-2 im Verhältnis 1:10 angeimpft. Nach einer Etablierungsphase (Tag 1-6) stabilisierte sich ab Tag 6 das Verhältnis der Symbiosekultur XE2479 und YA2800-2 bis zu Tag 98 auf 5:1. Bereits in den ersten fünf Tagen sank die Population von YA2800-2 auf ein für das gesamte Experiment stabiles Niveau von $\approx 10^6$. Die XE247 LB-Gesamtpopulation sank bis zum 22. Tag um die Hälfte und blieb bis zum Ende auf diesem Niveau. An Messtag 7 reagierten 99 % der XE2479 Population sensitiv auf Ampicillin. Danach sank diese Population bis Messtag 14 ab. Ab Messtag 22 gab es kaum noch XE2479, welche auf Ampicillin sensitiv reagierten. Bis Messtag 39 sank die ampicillinresistente Population stetig ab, bis ab Messtag 40 keine mehr nachweisbar war. Von Tag 22 an blieb die ampicillinsensitive XE2479 Population stabil bei $\approx 2 \cdot 10^6$ KBE bis zum Messtag 98 (Abbildung 19).

Das Verhältnis der Mikroorganismen XE2479 und YA2800-2 betrug am Ende beider Experimente $\approx 5:1$. Im Vergleich zum Start wurde YA2800-2 in einem 5-fachen bzw. 10-fachen Überschuss inokuliert. Am Tag 0 beider Experimente bestand der größte Teil der XE2479-Population aus ampicillinresistenten Zellen. Am Ende beider Experimente waren keine ampicillinresistenten *E. coli* XE2479 mit dem Plasmid *pXEN154 phnCDE* mehr nachweisbar. Dennoch konnte Phosphonat als alleinige Phosphorquelle verwendet werden (Anhang **Fehler!** **Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Am Ende beider Experimente wurden nur ampicillinsensitive XE2479 *E. coli* nachgewiesen. Auch blieb der PCR-Nachweis für das Plasmid *pXEN154_phnCDE*, das die für die Phosphonatverwertung kodierenden Gene enthält, erfolglos (Daten nicht gezeigt). Während der Experimente muss sich eine Adaptation von XE2479 ergeben haben, welche erlaubt, Phosphonat zu verwerten, ohne aber das ergänzende Phosphonateron *phnCDE* auf dem Plasmid *pXEN154* zu benötigen. Zu vermuten ist, dass sich bereits im *E. coli* Genom selbst ein Phosphonatstoffwechselweg befindet (Lee, 1992). Sequenzierdaten werden hierüber Aufschluss geben.

4.5 Bestimmung der Generationszeiten

Generationszeiten von XE2479 und YA2800-2 wurden bestimmt ($n = 3$). Verglichen wurden jeweils das Komplexmedium mit den synthetischen Medien. Weiterhin wurden die Generationszeiten vor den Genematexperimenten mit den Generationszeiten nach den Genematexperimenten miteinander verglichen.

Mediumkontrollen ohne Inokulum wurden als Negativkontrolle verwendet. Bei allen Ansätzen waren diese negativ und werden im Diagramm nicht aufgeführt. Als weitere Negativkontrollen wurden XE2479 in SGPI (keine nutzbare Schwefelquelle) und YA2800-2 in SGPII (keine nutzbare Phosphorquelle) mitgeführt. In drei Ansätzen konnte jeweils kein Wachstum festgestellt werden (Tabelle 20).

Mittels der Regressionsgeraden wurde die spezifische Wachstumsrate μ in $[\text{h}^{-1}]$ bestimmt (Formel 3). Daraus ergaben sich folgende Generationszeiten (Formel 4, Tabelle 20).

Tabelle 20: Zusammenfassung der Generationszeiten (Präevolution / Postevolution)

Organismus	Kulturmedium	t_d [h] Präevolution	t_d [h] Postevolution	Faktor des beschleunigten Wachstums	α
XE2479	LB	2,0	1,9	1,05	
XE2479	SGX	3,5	2,1	1,4	*
XE2479	SGPII	5,8	2,3	1,61	**
YA2800-2	YPD	4,0	2,8	1,3	*
YA2800-2	SGX	6,8	3,3	1,51	**
Kontrollen					
XE2479	SGPI (ΔSO_3^{2-})		Kein Wachstum		***
YA2800-2	SGPII (ΔPO_4^{3-})		Kein Wachstum		***

Festzustellen ist, dass sich die Generationszeiten der beiden Mikroorganismen in ihren verschiedenen Medien um 30 % - 50 % verkürzt haben, nachdem sie im Genemat kultiviert wurden. Bei XE2479 im LB-Medium war vor und nach dem Genemat-Experiment nur eine geringe Verkürzung der Generationszeit festzustellen, welche als nicht signifikant zu betrachten ist. Die Generationszeiten von XE2479 und YA2800-2 in ihren Minimalmedien wurden mit ≈ 50 % Verkürzung am stärksten optimiert, in ihren Komplexmedien dagegen um 5 %-30 % (Tabelle 20).

Bei den Kontrollen wurde weder vor noch nach dem Genemat-Experiment Wachstum festgestellt. Hieraus kann geschlossen werden, dass es zu keiner horizontalen Genübertragung gekommen war. Beide Mikroorganismen sind weiterhin abhängig vom benötigten Substrat, welches vom anderen Organismus durch Sekretion zur Verfügung gestellt wird.

4.6 Serielle Verdünnung mit anschließender KBE-Bestimmung

Bei der seriellen Verdünnung wurde der Zielmikroorganismus im gewünschten Medium angeimpft und über 24 h bei 210 rpm, 30 °C inkubiert. Wurde mindestens 1 OD₆₀₀ erreicht, ist 1:100 ins gleiche frische Medium überimpft und unter denselben Bedingungen weiter inkubiert worden (3.2.3). Am Tag des Überimpfens wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und die entsprechende Verdünnung auf die ausgewählten Agarplatten ausplattiert. Die Ausgangsprobe für die Verdünnungsreihe wurde zuvor auf 1 OD₆₀₀ eingestellt (3.2.4, 3.2.1).

Dieser Versuchsblock wurde durchgeführt, nachdem sich bei den Genematexperimenten zeigte, dass am Ende nur ampicillinsensitive *E. coli* nachzuweisen waren, diese jedoch Phosphonat als alleinige Phosphorquelle verstoffwechseln können. Zwei Teilexperimente wurden dazu durchgeführt, zum einen im chemisch definierten Medium mit Phosphat (4.6.1) und zum anderen im chemisch definierten Medium mit Phosphonat (4.6.2).

4.6.1 XE2479 in SGX-Flüssigmedium (+Phosphat)

XE2479, welches ein Plasmid (Tabellen 5) mit einer Ampicillinresistenz besitzt, wurde am Tag 0 in SGX-Flüssigmedium (Tabellen 6) angeimpft. Als Positivkontrolle diente XE2479 in SGXamp-Flüssigmedium. Ausplattiert wurde auf LBamp-Agarplatten und LB-Agarplatten. Für die Kontrolle wurden LBamp-Agarplatten verwendet.

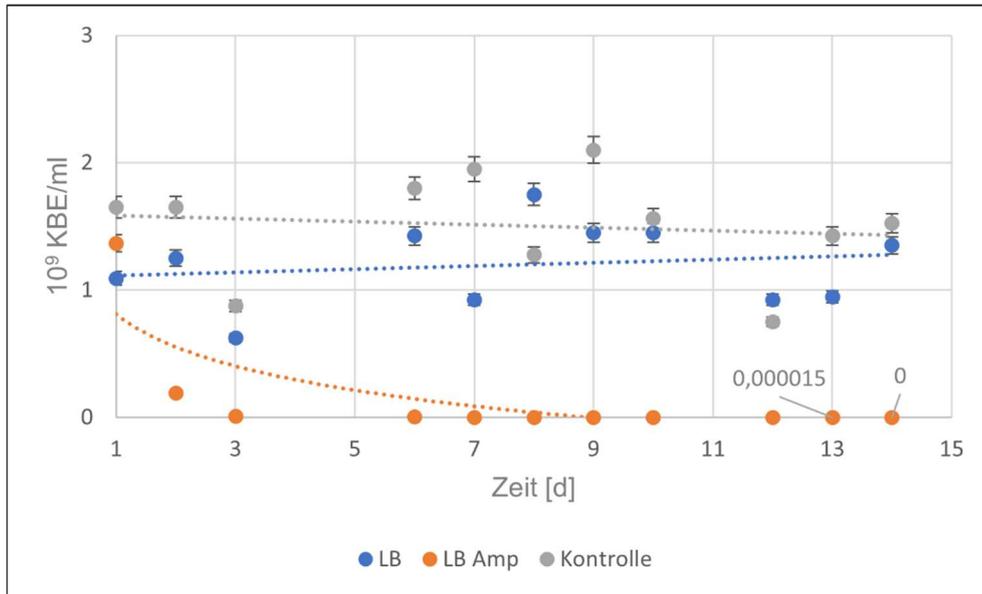


Abbildung 20: Koloniebildende Einheiten für XE2479 in SGX-Flüssigmedium, inkubiert 24 h, 210 rpm, 30 °C. Die Probe wurde eingestellt auf $OD_{600} = 1$, ausplattiert auf LB (blau) und LB-Ampicillin (orange) Agarplatten. Als Kontrolle (grau) diente XE2479 in SGXamp-Flüssigmedium, auf LBamp-Agarplatten. Trendlinien in der jeweiligen Farbe wurden gepunktet eingelegt. Die Fehlerbalken sind in Prozent dargestellt ($n = 3$).

Während der ersten drei Passagen fielen die KBE von XE2479 auf den Ampicillinselektionsplatten (Abbildung 20: orange) von $\approx 1 \cdot 10^9$ auf $\approx 1 \cdot 10^6$ (um 99 %), bis an Tag 14 keine KBE mehr auf LBamp-Agarplatten nachweisbar waren. Obgleich die ampicillinresistenten XE2479 über 14 Tage abnahmen, blieben die ampicillinsensitiven XE2479 auf einem konstanten Niveau von $\approx 1 \cdot 10^9$ bis zum Ende des Experiments (Abbildung 20: blau). Die in SGXamp-Flüssigmedium inkubierte Kontrolle (Abbildung 20: grau) zeigte auf den Selektionsplatten eine gleichbleibende Anzahl an koloniebildenden Einheiten von $\approx 1 \cdot 10^9$.

Nach 13 Passagen war keine ampicillinresistente XE2479 Population mehr nachweisbar. Auch mittels Kolonie-PCR konnte das Ampicillinresistenzgen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren unabhängigen Experiment konnte gezeigt werden, dass sich eine Adaptation von XE2479 ergeben haben muss, welche dazu führte Phosphonat zu verwenden, ohne aber die Phosphonatoperon ergänzenden Gene *phnCDE* zu benötigen.

4.6.2 XE2479 und XE2096 in SGPI-Flüssigmedium (+Phosphonat)

XE2479 und XE2096 wurden im chemisch definierten Medium SGPI und SGPI+Ampicillin inkubiert. Das SGPI-Flüssigmedium enthält als alleinige Phosphorquelle Phosphonat (Tabelle 9). XE2479 enthält ein Plasmid (bla+), welches die Phosphonatverwertung kodiert. Dem Wildtyp XE2096 fehlt dieses Plasmid (Tabellen 5). Die angelegten Verdünnungsreihen der jeweiligen Kultur wurden auf LB und/oder LBamp-Agarplatten ausgebracht und die koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt (3.2.4).

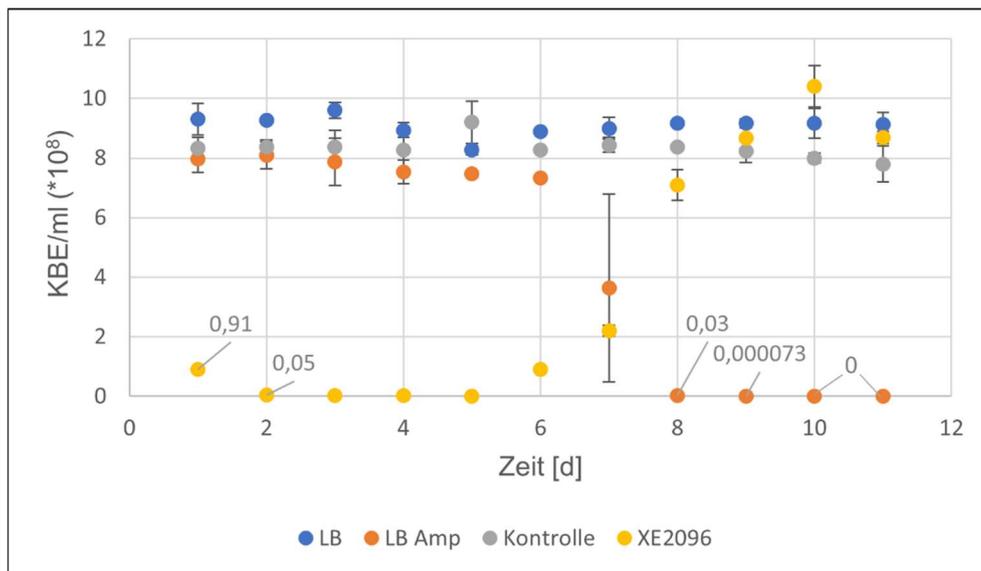


Abbildung 21: Koloniebildende Einheiten für XE2479 und XE2096 in SGPI-Flüssigmedium, inkubiert 24 h, 210 rpm, 30 °C. Die Proben wurde eingestellt auf $OD_{600} = 1$, ausplattiert für XE2479 auf LB (blau) und LB-Ampicillin (orange) Agarplatten. Als Kontrolle (grau) diente XE2479 in SGPIamp-Flüssigmedium, ausplattiert auf LBamp Selektionsplatten. XE2096 wurde in SGPI-Flüssigmedium inkubiert (24 h, 210 rpm, 30 °C) und dann auf LB-Agarplatten (gelb) ausplattiert. Die Fehlerbalken sind in Prozent dargestellt (n = 3).

Während der ersten 6 Passagen sanken die KBE für XE2479 auf LBamp-Selektionsplatten (Abbildung 21: orange) nur geringfügig ab. Am Tag 7 sank die Menge der KBE um $\approx 50\%$, von $8 \cdot 10^8$ auf $4 \cdot 10^8$ ab. Am 8. Tag waren nur noch $\approx 1\%$ der XE2479 Population ampicillinresistent. Ab 10 Passagen sind keine ampicillinresistenten XE2479 nachweisbar. Über den gesamten Zeitraum des Experiments blieb hingegen die ampicillinsensitive Population (Abbildung 21: blau) von XE2479 stabil, bei ungefähr $9 \cdot 10^8$. Als Kontrolle (Abbildung 21: grau) diente XE2479, kultiviert in SGPI-Flüssigmedium mit Ampicillin, auf LBamp-Agarplatten ausplattiert. Hier blieb über die gesamte Dauer des Experiments die ampicillinresistente Population stabil bei $\approx 8 \cdot 10^8$.

Zusätzlich wurde der Wildtyp XE2096 mit in das Experiment einbezogen. Dieser enthält nicht das Plasmid mit dem Ampicillin-Resistenzgen und der zusätzlichen Geninformation für die Phosphonatverwertung. Nach dem Animpfen ($0,1 OD_{600}$) sank die Population auf 5%, von

$\approx 1 \cdot 10^8$ KBE auf $5 \cdot 10^6$ KBE. Bis inklusive der 6. Passage fand kein 1:100 Überimpfen statt, da die Minimum-OD-Dichte von $OD_{600} = 1$ nicht überschritten worden war. Ab dem 7. Tag wurde im Kolben eine eindeutige Trübung festgestellt. Ab dem 8. Tag konnte wieder 1:100 verdünnt werden. Die KBE pendelte sich ab dort bei $\approx 8 \cdot 10^8$ ein (Abbildung 21: gelb). An Tag 11 wurde eine Probe auf eine Ampicillinselektionsplatte ausgestrichen ($n = 3$), es konnte kein Wachstum festgestellt werden.

4.7 Überprüfung der Mikroorganismen auf ihre genetische Integrität

4.7.1 PCR

Zu jedem Zeitpunkt konnte die Identität der verwendeten Mikroorganismen mittels eines spezifischen PCR-Systems nachgewiesen werden.

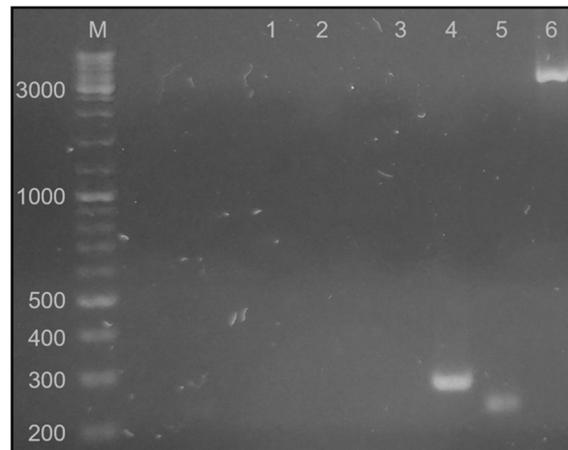


Abbildung 22: Elektropherogramm zum Nachweis der genetischen Identität der verwendeten Mikroorganismen. Pipettierschema Spur 1: Wasserkontrolle für *MET14* Primerset; 2: Wasserkontrolle für *ssuABCD* Primerset; 3: Δ *MET14* (Wildtyp CC789-2A); 4: *MET14* (Mutante YA2800-2); 5: Δ *ssuABCD* (Mutante XE2489); 6: *ssuABCD* (Wildtyp XE2096); M: *GeneRuler DNA Ladder Mix*. Aufgetragen wurden 5 μ l Probe und 3 μ l Marker, bei einem 1 %igen Agarose TBE-Gel, angefärbt mit 1 μ l *DNA Stain Clear G*. Als Laufpuffer diente 1 \times TBE-Puffer, inkubiert bei 100 V, 30 min.

Die Wasserkontrollen für beide Primersets (Tabelle 10) fielen regelrecht aus (Abbildung 22: Spur 1 und 2). Das Primerset *ssuABCD*_for und rev ermöglichte eine eindeutige Unterscheidung der Deletionsmutante XE2479, mit einer Bande bei 243 Basenpaaren (Abbildung 22: Spur 5, Δ *ssuABCD*), vom Wildtypstamm XE2096, mit einer Bande bei 3380 Basenpaaren. Hier konnte das gesamte *ssuABCD*-Operon amplifiziert werden (Abbildung 22: Spur 6).

Mit dem Primerset *MET14*_for und rev wurde mit einer Bande bei 283 Basenpaaren der Zielorganismus YA2800-2 identifiziert (Abbildung 22, Spur 4). Rote wie weiße Kolonien entsprachen dem Zielorganismus YA2800-2. Es handelte sich somit zu jedem Zeitpunkt um

den identischen Genotyp, obgleich mit unterschiedlicher Färbung der Kolonien (siehe, 4.1.1). Keine Bande wurde detektiert, wenn es sich um den Referenzstamm CC789-2A handelte (Abbildung 22, Spur 3).

Neben der Möglichkeit, die Zielorganismen mittels molekularbiologischer Methoden direkt zu verifizieren, wurde auch Lichtmikroskopie (4.7.3) herangezogen, um eventuelle Kontaminationen festzustellen.

4.7.2 Genomanalyse / NGS

Um genetische Veränderungen zu analysieren, die während der Evolutionsexperimente auftraten, wurden die evolvierten Genome von XE2479 und YA2800-2 jeweils sequenziert (3.2.11). Als Vergleichssequenz wurde das Genom der nicht evolvierten Stämme XE2479 und YA2800-2 herangezogen. Es wurde erwartet, dass Mutationen auftraten, welche sich als Anpassung an die Kulturmethode ergaben oder welche direkt im Zusammenhang mit dem Symbioseexperiment standen. Als „*cut off*“ bei der Mutationsfrequenz wurde 95 % gewählt.

Aufgrund von technischen Problemen während der Sequenzierung stand bis zum Abschluss dieser Arbeit nur die sequenzierten Daten für das erste Symbioseexperiment (130 Tage Laufzeit) zur Verfügung.

XE2479

Tabelle 21: Übersicht der veränderten Gene von *E. coli* XE2479 (Experiment 1) am Tag 130, im Vergleich zu XE2479 am Tag 0.

#	Position	Gene	Product/Name	EcoCyc Accession#	Mutation Frequency	Effect	Impact	Codon Change	AA Change	Function	Source
1	2880635	<i>casD</i>	type I-E CRISPR system Cascade subunit	G7427	100 %	synonymous_variant	LOW	A ₁₁₄ >G ₁₁₄	Leu ₁₃₈ >Leu ₁₃₈	<i>casD</i> defense response	(Jackson & Golden, 2014)
2	2060322	<i>cbI</i>	DNA-binding transcriptional activator	G7071	99,69 %	missense_variant	MODERATE	G ₅₉₃ >T ₅₉₃	Arg ₁₉₈ >Leu ₁₉₈	Starvation regulator; Amino acid biosynthesis Cysteine	(Iwanicka-Nowicka & Hryniewicz, 1995)
3	2540359	<i>cysA</i>	sulfate/thiosulfate ABC transporter	EG10183	100 %	disruptive_inframe_deletion	MODERATE	del GCGCGCGC TGGC _{444_455}	Arg ₁₄₉ _Ala ₁₅₀	ATP-binding subunit of a high-affinity sulfate/thiosulfate uptake system	(Hryniewicz & Sirko, 1990)
4	4425544	<i>prfB</i>	primosomal replication protein N	EG10764	100 %	missense_variant	MODERATE	G ₂₅ >A ₂₅	Gly ₉ >Ser ₉	factor; DNA - replication, repair	(Cadman & Lopper, 2005; Ng & Mariani, 1996)
5	2867455	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma factor	EG10510	99,40 %	stop_gained	HIGH	C ₉₇ >T ₉₇	Gln ₃₅ *	Master regulator for general stress and biofilm associated	(Patten & Kirchhof, 2004; Weber & Polen, 2005)
6	4108889	<i>sbp</i>	sulfate/thiosulfate ABC transporter periplasmic binding protein Sbp	EG10929	100 %	missense_variant	MODERATE	C ₁₆ >T ₁₆	Ala ₁₉ >Val ₁₉	Sbp was identified in a set of 'sulfate starvation induced' (SSI) proteins, mediates high affinity uptake of sulfate/thiosulfate	(Jacobson & He, 1991; Sirko & Zatyka, 1995)

YA2800-2

Tabelle 22: Übersicht der veränderten Gene von *S. cerevisiae* YA2800-2 (Experiment 1) am Tag 130, im Vergleich zu YA2800-2 am Tag 0.

#	Position	Gene	Product/Name	YeastCyc/ SGD Acc. #	Mutation Frequency	Effect	Impact	Codon Change	AA Change	Function	Source
1	73353	<i>MRP1</i>	mitochondrial 37S ribosomal protein mS43	G3O-29901 S000002755	99,23%	synonymous_variant	Low	C ₆₃₂ >T ₆₃₂	Ala ₂₁₁ >Ala ₂₃₂	Coding for mitochondrial ribosomal protein	(Myers & Crivellone, 1987)
2	20811	<i>PUS2</i>	tRNA pseudouridine synthase 2	S000003031	99,08%	disruptive_inframe_deletion	MODERATE	del GCA _{483_485}	del Gln ₁₆₂	Pseudouridine synthase; converts uridine to pseudouridine in transfer RNA (tRNA) and messenger RNA (mRNA); localized to mitochondrion	(Behm-Ansmant & Branlant, 2007)
3	20818	<i>PUS2</i>	s.o.	s.o.	100,00%	disruptive_inframe_insertion	MODERATE	ins AAG _{490_492}	ins Glu ₁₆₄	s.o.	s.o.
4	134622	<i>TIM54</i>	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim54	G3O-31517 S000003590	100,00%	synonymous_variant	LOW	C ₆₁₂ >T ₆₁₂	Ile ₂₀₄ >Ile ₂₀₄	Translocation of mitochondrial preproteins across the inner membrane (Tim22-Tim45 translocase)	(Kerscher & Holder, 1997; Sirrenberg & Bauer, 1996)
5	11678	<i>IRC4</i>	sibling lethal factor (slf)	G3O-30048 S000002948	99,19%	frameshift_variant&stop_lost&splice_region_variant	HIGH	del TTCCTCGTTGG GAAGGAATAAAAAGC AAGTAACACTTTTTC TGAGCATTTTATTAC GTT _{698_27*}	fs Phe ₂₃₃	produces a protein that is able to inhibit cell growth in neighboring colonies (up to cell death), induces sporulation	(Taylor & Taylor, 2016)
6	179754	<i>MRN1</i>	Multicopy supressor of RSC-Nhp6 synthetic lethality	G3O-34078	100,00%	conservative_inframe_insertion	MODERATE	dup CTGCAACTAAA GCCTGGCCAACCAAT GTACAAAAGAGAGC CGACGCTGAAGCTTG GCATTGG _{340_402}	Trp ₁₃₄ _Leu	cell wall biogenesis, heat shock regulation	(Reynaud & Brothers, 2021)

4.7.3 Lichtmikroskopie während des Symbioseexperiments

Um Kontamination mit anderen Organismen auszuschließen und die morphologische Entwicklung der Zielorganismen zu überwachen, wurde Lichtmikroskopie durchgeführt. Alle Proben wurden zuvor gründlich gevortext und bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert (3.2.14).

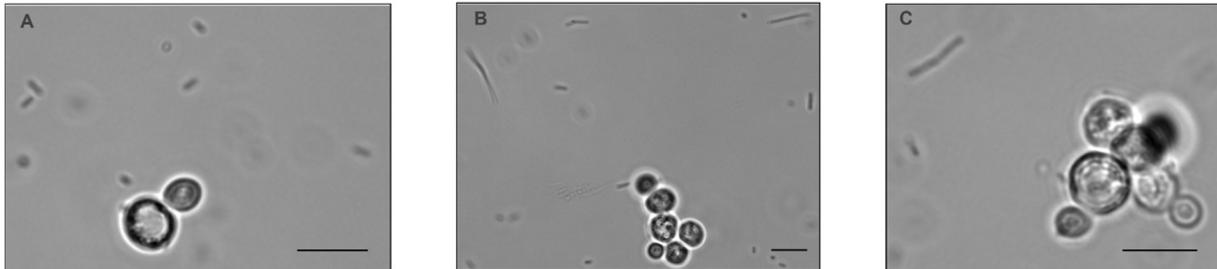


Abbildung 23: Representative Hellfeldmikroskopiebilder im Phasenkontrast von den Mikroorganismen XE2479 und YA28002 während des Experiments im Genemat. (A) Tag 0. (B) Tag 25. (C) Ende des Symbioseexperiments. Der Maßstab im Bild entspricht jeweils 10 µm.

An Tag 0 der Experimente waren einheitlich verteilt stäbchenförmige, 2-3 µm lange *E. coli* zu beobachten. Kettenbildung wurde nicht festgestellt. Diese hatten eine zitternde Eigenbewegung bzw. bewegten sich im Gegensatz zu den beobachteten Hefezellen, welche stillruhend im Sichtfeld lagen, ungerichtet vorwärts. Die Hefezellen lagen gleichmäßig, einzeln im Sichtfeld. Hefezellen, welche sich in der Sprossung befanden, lagen in Mutter- mit Tochterzelle vereint vor. Gesamtheitlich waren die Hefezellen gleichmäßig rund geformt, mit glatter Zellwand. Der Nucleus war gut sichtbar (Abbildung 23A).

Beide Genemat-Experimente zeigten ≈ 25. Tag das gleiche Bild (Abbildung 23 B). Zu beobachten waren filamentöse *E. coli* Zellen, mit Längen von 5-20 µm. Die kürzeren Zellen zeigten ein gleichmäßiges Zittern, ohne starke Vorwärtsbewegung. Eine Krümmungsbewegung konnte bei den filamentösen Zellen beobachtet werden, ohne Vorwärtsschwimmbewegung. Bei der Hefe wurden überwiegend aneinanderheftende Zellansammlungen festgestellt. Meist waren die Einzelzellen in diesen Klumpen unregelmäßig rund und kaum mit Knospung. Bei den Hefezellen im Zentrum der Zellansammlung waren Aggregate im Inneren dieser festzustellen. Bei den äußeren Hefezellen waren anhaftende, nicht filamentöse *E. coli* zu beobachten (Abbildung 23 B).

Repräsentativ ist die Abbildung 23 C am Ende für beide Symbioseexperimente (Tag 130 und Tag 98). Es wurden weiterhin filamentöse *E. coli*, < 12 µm festgestellt. Der größte Anteil war jedoch normal groß und normal geformt. Beobachtet wurde eine stärkere *E. coli*-typische, ungerichtete Vorwärtsbewegung im Vergleich zum 25. Tag. Weiterhin wurden anheftende, normal große *E. coli* an den Hefezellen festgestellt, im Gegensatz zum Starttag. Die Hefezellen

waren wiederholt nur in festen Ansammlungen zu beobachten und gleichmäßig rund mit glatter Oberfläche. Die äußeren Zellen wurden nach außen hin kleiner. Es wurde gleichmäßig und in der gesamten Probe gute Knospung festgestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Zellbild am Tag 0 literaturtypischer Morphologie und Verhalten entsprach. Im Verlauf des Genemat-Experiments (Abbildung 23 B) war Zellstress zu beobachten, mit atypischer Morphologie. Am Ende war das Gesamtzellbild jedoch wieder einheitlich mehr wie an Tag 0. Nur noch vereinzelt filamentöse *E. coli* und hauptsächlich Hefezellansammlungen mit anhaftenden, normalgroßen *E. coli* wurden beobachtet.

5 Diskussion

Die Technologie der kontinuierlichen Kultivierung ist ein ausgezeichnetes Werkzeug für die experimentelle Evolution von großen Populationen von Zellen unter streng kontrollierten, selektiven Laborbedingungen (5.4). Zuvor musste sichergestellt werden, dass die geplante künstliche Symbiose auch wirklich stattfinden kann bzw. die gewünschte Substratabhängigkeit besteht. Hierzu wurden mit Agardiffusionstests (5.2) und Konditionierungsversuchen (5.3) Voruntersuchungen durchgeführt. Mikrobiologische Eigenheiten der Testorganismen XE2479 und YA2800-2 konnten unter 5.1 und 5.5 beschrieben und abschließend erklärt werden.

Am Ende der Diskussion gilt es zu bewerten:

- i. Konnte eine künstliche Symbiose etabliert werden, und gab es in diesen evolutionäre Anpassungen?

oder

- ii. Wurde ein mikrobielles Konsortium etabliert mit kulturbedingten Anpassungen (Lenski, 1991)?

5.1 Kultur und Bestimmung der Phänotypen auf Festmedium

Wurden die Testorganismen aus dem Kryostock oder während laufender Experimente ausplattiert, konnten bei beiden Mikroorganismen jeweils unterschiedliche Phänotypen festgestellt werden. Für die geplanten Experimente muss jedoch sichergestellt sein, dass es sich bei den auftretenden unterschiedlichen Phänotypen um den identischen Genotyp handelt. Die folgenden Unterpunkte 5.1.1 und 5.1.2 werden diese Phänomene klären.

5.1.1 Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae* YA2800-2 auf Komplex- und Agarplatten mit chemisch definiertem Medium

Beim Kultivieren auf Festmediumplatten (YPD, 2 %) wurden zwei unterschiedliche Phänotypen festgestellt, ein weiß-cremefarbener und ein rot-pigmentierter. Herschel Roman (Roman, 1956) beschrieb bereits das Auftreten von rot-pigmentierten Phänotypen neben den weißen. Zwei Gene, *ade1* (Reaume & Tatum, 1949) und *ade2* (Ephrussi, 1949), deren Produkte sich unter anderem an der Purinbiosynthese beteiligen, sind verantwortlich für die Einlagerung des Pigments, wenn sie mutiert (inaktiviert) sind. Ist jeweils eines der beiden Gene mutiert oder beide gleichzeitig (Silver & Eaton, 1969), werden Stoffwechselzwischenprodukte nicht weiter prozessiert, sondern akkumulieren. Bei einer Mutation von *ade1* reichert sich 5-Aminoimidazol-4-carboxylatribonucleotid (CAIR) an und bei einer Mutation von *ade2* 5-

Aminoimidazolribonukleotid (AIR) (Fisher, 1969). Da sich *ade2* epistatisch zu *ade1* verhält, kann die Reaktion wie folgt dargestellt werden:



Abbildung 24: Anreicherung von AIR und CAIR in *ade2*- und *ade1*-Mutanten. AIR, 5-Aminoimidazolribonukleotid; CAIR, 5-Aminoimidazol-4-carboxylatribonucleotid, SAICAR, 5-Aminoimidazol-4-succinocarboxylatribonucleotid.

CAIR ist nicht direkt an der Pigmentbildung beteiligt, sondern wird zu AIR abgebaut (Lukens & Buchanan, 1959). Das rote Pigment resultiert aus der Polymerisation von AIR (Smirnov, 1967).

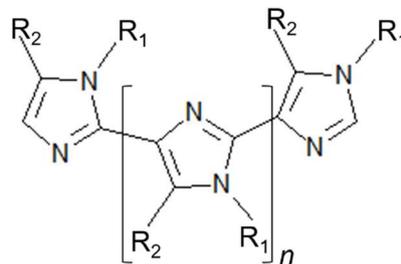


Abbildung 25: Struktur des roten Pigments. R₁, Ribosyl; R₂, Aminogruppe.

Weißer Phänotypen resultieren ebenfalls, wenn YA2800-2 Adenin-auxotroph für *ade2* ist und sich zusätzliche Mutationen auf den Genen *ade4*, *ade5*, *ade8*, *ade6* und *ade7* einstellen. Diese zusätzlichen Mutationen ("upstream") blockieren weitergehend die Adeninbiosynthese, bevor sich das rote Pigment bilden kann. Weiterhin haben solche weißen Hefezellen mit zusätzlichen Mutationen auf den oben genannten Genen einen selektiven Vorteil gegenüber den *ade2* rot-pigmentierten. Der Imidazolring (Abbildung 25) verursacht toxische Effekte, welche den Zellmetabolismus hemmen und somit die Wachstumsrate senken. Bei ständig anhaltender Verdünnung würden die roten *ade2* Hefezellen ausgewaschen werden (Ugolini & Bruschi, 1996).

Da der YA2800-2 Ausgangsstamm die *ade2*-Mutation trägt und daher Adenin-auxotroph und rot-pigmentiert ist, erklärt sich nach kurzer Anwachszeit (3.2.3) und anschließendem Ausplattieren (3.2.4) das 10:1 Weiß-rot-Verhältnis. Die zusätzlichen Mutationseignisse in den oben genannten Genen müssen sich erst ergeben, damit nicht pigmentierte Zellen aufwachsen. Durch die erhöhte Fitness (Ugolini & Bruschi, 1996) sind die weißen Kolonien gegenüber den roten Kolonien größer.

Abschließend kann gesagt werden, dass alle Experimente mit YA2800-2 den gleichen genetischen „background“ hatten. Es handelt sich bei den unterschiedlichen Phänotypen

nicht um zwei unterschiedliche Organismen, sondern um Phasenvariationen während der Kultivierungsphase im Ausgangsstamm. Das in der Literatur bislang unbeschriebene Phänomen, dass bei 30 °C nur weiße Zellen und bei 37 °C nur rote Zellen heranwachsen, sollte weiterhin untersucht werden.

5.1.2 Wachstumsverhalten von *E. coli* XE2479 auf Komplex- und Agarplatten mit chemisch definiertem Medium

Es war zu beobachten, dass unter Standardbedingungen (Bertani, 1951) die uns bekannte Koloniemorphologie gleichmäßig auftrat (Abbildung 10). Allerdings änderte sich das Gesamtkoloniebild, wenn Verdünnungsausstriche von XE2479 auf Agarplatten von chemisch definiertem Medium ausgebracht wurden oder Ampicillin als Selektionsmittel hinzugefügt wurde. Hier wuchs ein uneinheitliches Koloniebild mit teils gleichmäßig runden („smooth“), aber vermehrt unregelmäßig („rough“) geformten Kolonien auf. Zudem variierten die Koloniedurchmesser stark.

Es ist bekannt, dass metastabile Gene ohne Mutationen Eigenschaften von Mikroorganismen vorübergehend ändern (Davis & Dulbecco, 1968; Jordan & Burrows, 1946). Im Gegensatz zu den selteneren „*phase variations*“ (Silverman & Zieg, 1979), welche mit Mutationen von dauerhafter Natur sind, treten diese häufig, aber reversibel ein (Brinton, 1959). In *E. coli* ist solch ein Gen *flu*. Es kann als *flu*⁺ oder *flu* vorliegen. XE2479 Varianten *flu*⁺ wachsen mit Fimbrien. Als Kolonien erscheinen diese weiß-glänzend und gleichmäßig rund. XE2479-*flu* Varianten besitzen keine Fimbrien und bilden weiß-glänzende, aber unregelmäßig („frizzy“) geformte Kolonien (Diderichsen, 1980). Neben den metastabilen Genen, welche folglich in Sequenzierungen nicht nachgewiesen werden können, ändert sich der Phänotyp ebenfalls von glatt-rund zu unregelmäßig-rund, wenn es zur Acetylierung der Polysaccharidketten der Hülle kommt (Orskov & Orskov, 1979). Metastabile Gene und Acetylierungen der Polysaccharidketten führen in Stresssituationen (Fotadar & Zaveloff, 2005) zu unterschiedlichen Phänotypen, welche regelmäßig in dieser Arbeit beim Ausplattieren zu beobachten waren. Weiterführend wurde bei genetischen Analysen nicht weiter auf dieses Phänomen eingegangen.

Abschließend kann für beide Testorganismen festgestellt werden, dass es bei den phänotypischen Veränderungen um reversible Phasenvariationen (*phase variation*) handelt (Henderson, 1999). Diese sind bekannt für regulatorische Antworten auf Stress als Überlebensstrategien.

5.2 Agardiffusionstests mit XE2479/YA2800-2

Der Agardiffusionstest (Abraham & Chain, 1941) ist eine Methode zum Feststellen der Fähigkeit eines Moleküls, Wachstum zu induzieren oder zu inhibieren. Die Interpretation der Ergebnisse beruht darauf, dass Moleküle frei durch das Festmedium diffundieren (Cooper & Woodman, 1946). Boyan Bonev beschreibt ausführlich den mathematischen Hintergrund zur Berechnung der benötigten Minimalkonzentration (MC), ab welcher ein Molekül Einfluss auf den zu testenden Organismus nimmt (Bonev & Hooper, 2008).

Nach Beendigung des Experimentenblocks mit den "cross-feeding" Platten konnte anhand der Ergebnisse die Substratabhängigkeit der beiden Organismen XE2479 und YA2800-2 voneinander bestätigt werden, welche für das Evolutionsexperiment selbst Voraussetzung ist. Es war wichtig, vorab sicherzustellen, dass das XE2479/YA2800-2 Konsortium alle Anforderungen erfüllt. Folgend wird näher auf die einzelnen Experimente eingegangen, welche die Fragen beantworten:

- i. Reagiert der Testorganismus sensitiv auf eine künstliche Schwefel- bzw. Phosphorquelle mit entsprechender Hemmhofkontrolle?
- ii. „cross-feeding“ I: Reagiert der Testorganismus sensitiv auf den Überstand des Wildstamms?
- iii. „cross-feeding“ II: Reagiert der Testorganismus sensitiv auf den Überstand des Teststamms?

5.2.1 Abhängigkeit von *S. cerevisiae* YA2800-2 von Phosphat oder metabolischen Produkten von *E. coli* XE2479 und Sensitivität gegen G418

Als Negativkontrolle wurde der Kulturüberstand des *E. coli* Wildtyps XE2096 auf die zuvor präparierte Platte appliziert (3.2.7). Wie erwartet, wurde kein Ammenhof detektiert (4.2.1, Abbildung 12a). XE2096 hat kein komplettes Phosphonatoperon ($\Delta phnCDE$). Dies führt dazu, dass XE2096 die alleinige Phosphorquelle Phosphonat innerhalb der ihm gegebenen Zeit (24 – 26 h) nicht verstoffwechseln kann. Es ist zu erwähnen, dass beim Inkubieren der Vorkultur mit XE2096 kaum visuelles Wachstum ($OD < 0,3$) im Gegensatz zu XE2479 ($OD > 2$) zu beobachten war. Daraus konnten drei Rückschlüsse gezogen werden. Zum einen konnte Phosphonat nicht verstoffwechselt werden und steht somit weiterhin als Phosphorquelle im Überstand für YA2800-2 zur Verfügung. Zum anderen konnte das von XE2096 nicht metabolisierte Phosphonat auch nicht direkt von *S. cerevisiae* YA2800-2 als P – Quelle genutzt werden. Dies zeigte sich im Ausbleiben eines Ammenhofs (Pratt & Mouillon, 2004).

Als weitere Kontrolle dient Abbildung 12b (4.2.1); hier wird eine Phosphorquelle (KH_2PO_4) im Festmedium für YA2800-2 zur Verfügung gestellt. Auf ein Blättchen wurde G418 (Geneticin)

appliziert. Aufgrund der hinzugefügten Phosphorquelle gab es auf der gesamten Platte Wachstum von YA2800-2, welches mit einer Eintrübung einherging. G418 wirkt wachstumshemmend (Jimenez & Davies, 1980), und es stellte sich ein Hemmhof von 30 mm (MC = 4,45 µg/ml) ein. Zusammen mit der Negativkontrolle konnte gezeigt werden, dass YA2800-2 im chemisch definierten Medium SGY- Δ PO₄³⁻ + Phosphonat kein Wachstum zeigt, aber YA2800-2 in SGY sensitiv auf Phosphat reagiert. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass keine Verunreinigungen von Phosphat in den genutzten Chemikalien vorhanden sind, welche das Evolutionsexperiment negativ beeinflussen würden.

Um eine quantitative Aussage zu treffen, wieviel Phosphat benötigt wird, damit sichtbares Wachstum von YA2800-2 entsteht, wurde auf einer vorbereiteten SGY- Δ PO₄³⁻-Agarplatte ein Testplättchen mit KH₂PO₄ (30 µM) platziert und ein zweites mit G418 (70 µM) als Mykozidkontrolle (4.2.1, Abbildung 12c). Es entstand ein Ammenhof von 55 mm mit geschnittenem G418-Hemmhof. Nach Boyan Bonev wird eine Minimalkonzentration von MC = 3,4 µg/ml KH₂PO₄ für das Wachstum von YA2800-2 benötigt (Bonev & Hooper, 2008). Es scheint, dass KH₂PO₄ in zu hoher Konzentration einen leichten toxischen Effekt ausübt, welches die geringere Wachstumsdichte im Zentrum erklären könnte. Zugrunde liegen könnte dem, dass KH₂PO₄ in wässriger Umgebung sauer (pH = 4,4) reagiert (Jander & Blasius, 1995), was dazu führen könnte, dass der pH-Wert nahe dem Plättchen kurzzeitig stark absinkt und damit zu gehemmtem Wachstum im chemisch definierten Medium führt (Michael & Oliver, 1991). Durch das Abtöten der eingegossenen YA2800-2 Mikroorganismen werden diese im toxischen Bereich von G418 abgetötet. Die freiwerdenden Nährstoffe diffundieren nach außen weiter, und dort, wo die Konzentration von G418 unter die Minimalkonzentration (MC = 4,24 µg/ml) sinkt, entsteht ein dünner Ring an vermehrtem Zellwachstum.

Es konnte ausgeschlossen werden, dass ein Hintergrundwachstum von YA2800-2, induziert durch PO₄³⁻ - Verunreinigungen, stattfindet. Es wurde gezeigt, dass der *E. coli* Wildtyp und YA2800-2 nicht befähigt sind, Phosphonat zu verstoffwechseln oder Phosphat im Kulturüberstand bereitzustellen. Mit diesen Voraussetzungen wurde eine mit YA2800-2 beimpfte Platte mit dem Überstand von XE2479 inkubiert (4.2.1). Bei diesem „*cross-feeding*“-Experiment zeigte sich ein YA2800-2 Ammenhof von 42 mm (Abbildung 12d). Werden die zuvor gewonnenen Daten nun in Korrelation gesetzt, ergibt sich die Menge von ca. 22,9 µM Phosphormetaboliten, welche von XE2479 YA2800-2 zur Verfügung gestellt werden. Das heißt, sobald eine Mindestkonzentration von ca. 2,6 µg/ml erreicht wurde, gab es Wachstum von YA2800-2 (Bonev & Hooper, 2008).

5.2.2 Abhängigkeit von *E. coli* XE2479 von Sulfit oder metabolischen Produkten von *S. cerevisiae* YA2800-2 und Sensitivität gegen Kanamycin

Als Negativkontrolle wurde der Überstand des Wildtyps *S. cerevisiae* CC789-2A auf die zuvor präparierte Platte appliziert (3.2.7). Wie erwartet, wurde kein Ammenhof detektiert (4.2.1, Abbildung 13a). Der Wildtyp *S. cerevisiae* CC789-2A ist nicht befähigt, Sulfit vermehrt zu metabolisieren und aktiv zu sezernieren (Donalies & Stahl, 2002) und somit *E. coli* XE2479 zur Verfügung zu stellen.

Als weitere Kontrolle diente Abbildung 13b. XE2479 wurde auf Sensitivität gegenüber Kanamycin (4,1 μM) und Ampicillin (5,7 μM) getestet. Wie erwartet, wurde kein Hemmhof bei Ampicillin detektiert, da sich XE2479 resistent gegenüber Ampicillin verhält. Codiert wird die Ampicillinresistenz durch *bla* (Sutcliffe, 1978) auf dem Plasmid pXEN154, welches XE2479 trägt. Solange sich XE2479 resistent gegenüber Ampicillin verhält, kann die Anwesenheit des Plasmids mit den Genen *phnCDE* bestätigt werden. Im Gegensatz zu der Ampicillinresistenz wurde mit Kanamycin ein Hemmhof von 31 mm detektiert (MC = 1,39 $\mu\text{g/ml}$) (Hamao & Masahiro, 1957). Eubakterien reagieren sensitiv auf Kanamycin (Kashiwagi & Miyaji, 1992). Diese Kontrolle wurde eingeführt, um sicherzustellen, dass es sich im Experiment um XE2479 mit dem Plasmid handelt und nicht um einen Organismus, der generell resistent gegen Ampicillin ist.

XE2479 ist aufgrund seiner Modifikationen ($\Delta\text{ssuABCD}$, ΔcysDNC , $\Delta\text{tauABCD}$) nicht in der Lage, schwefelhaltige Aminosäuren (Cystein, Methionin) aus Sulfat zu synthetisieren. Ein Ammenhof von 21 mm mit einem Cystein bestückten Blättchen (48,5 mM) konnte detektiert werden. Die benötigte Mindestkonzentration (Bonev & Hooper, 2008) wurde mit MC = 10,8 $\mu\text{g/ml}$ berechnet. Zusätzlich wurde auf die XE2479 Agardiffusionsplatte ein Kanamycinblättchen mit 4,1 μM als Kontrolle platziert (Abbildung 13c). Es bildete sich ein Hemmhof von 21 mm (MC = 1,4 $\mu\text{g/ml}$). Zusammen mit dem Cystein-Ammenhof und der Kanamycinkontrolle bestätigt XE2479 das erwartete Verhalten gegenüber den eingesetzten Molekülen.

Das „*cross feeding*“-Experiment wurde mit der Annahme durchgeführt, dass der verwendete Stamm XE2479 eine unterbrochene Cystein/Methionin Proteinbiosynthese aus Sulfat besitzt (Tabellen 5). Als Ersatzschwefelquelle kann Sulfit (SO_3^{2-}) für die Proteinbiosynthese (Cobey & Handler, 1956) dienen. Es muss allerdings sichergestellt werden, dass weiter keine Schwefelquellen geringerer Oxidationsstufe vorhanden sind, da diese bevorzugt werden und die Aufnahme von Sulfit inhibieren (Uria-Nickelsen & Leadbetter, 1994). Es konnte bei den vorigen Agardiffusionstests gezeigt werden, dass es kein Hintergrundwachstum von XE2479 gibt, die Cystein/Methionin Proteinbiosynthese blockiert ist, aber auch der Wildtyp von *S.*

cerevisiae kein Wachstum von XE2479 induzieren kann (Abbildung 13a). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass XE2479 sensitiv auf Schwefelquellen reagiert (Abbildung 13c). Es wurde nun in die Ausstattung der sterilen Überstand von YA2800-2 appliziert. Es konnte ein Ammenhof von 20 mm beobachtet werden. Dieser ist auf die Sezernierung von Sulfiten zurückzuführen (Donalies & Stahl, 2002), welche dann XE2479 zur Verfügung stehen. Die berechnete Mindestkonzentration dieser Sulfitverbindungen beträgt ca. MC = 10,3 µg.

Für das gesamte Agardiffusionsexperiment kann zusammenfassend gesagt werden, dass alle benötigten Informationen erhalten worden sind. Das „*cross feeding*“ zwischen XE2479 und YA2800-2 konnte bestätigt werden. Auch konnte bestätigt werden, dass es keine Verunreinigungen von Phosphor- und Schwefelmolekülen an den Materialien oder in den Chemikalien gibt, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen würden. Deshalb können XE2479 und YA2800-2 mit den verwendeten Chemikalien und Materialien im Symbioseexperiment verwendet werden.

Im Agardiffusionstest konnten die Mindestkonzentrationen für die sezernierten Moleküle erreicht werden. Lokal konnte ein „*cross feeding*“ festgestellt werden. Es stellt sich die Frage, ob auch die Mindestkonzentrationen im Flüssigmedium erreicht werden können und somit das Symbioseexperiment im Genematen möglich ist. Das nachfolgende Kapitel wird hierüber Auskunft geben.

5.3 Konditionierungsversuche mit XE2479 und YA2800-2

Mit den Agardiffusionstests konnte die Substratabhängigkeit zwischen XE2479 und YA2800-2 erfolgreich gezeigt werden. Das Evolutionsexperiment fand im Genematen in Suspension statt. Zuvor musste festgestellt werden, ob die berechneten Minimalkonzentrationen (5.2) auch im Flüssigmedium erreicht werden können, damit die beiden Testorganismen nebeneinander existieren können. Die folgenden zwei Konditionierungstests klärten ab, ob:

- i. *E. coli* XE2479 ausreichend Phosphate sezerniert, damit YA2800-2 überlebt.
- ii. *S. cerevisiae* YA2800-1 ausreichend Sulfit sezerniert, damit XE2479 überlebt.

5.3.1 Konditionierungsversuche mit XE2479

Bei der Kontrolle mit dem nicht-konditionierten Medium SGX- Δ SO₄²⁻ wurde kein signifikantes Wachstum des Testorganismus XE2479 festgestellt. Demnach fiel die Kontrolle wie erwartet aus. Im Gegensatz dazu konnte signifikantes Wachstum von *E. coli* XE2479 beim Einsatz von zuvor konditioniertem Medium der Hefe YA2800-2 festgestellt werden (Abbildung 14). Nach

jeder Passage (1:100) und 24-stündiger Inkubation waren die OD-Werte bei $\sim 0,6$. Mit Cystein als Schwefelquelle (SGX) lag das maximale Wachstum jedes Mal bei $\sim 1,2$ (Daten nicht gezeigt). Nach statistischer Auswertung (3.2.15) konnte der p-Wert für die Experimente 24 h, 48 h und 72 h (je $n = 3$) jeweils mit $p < 10^{-6}$ gezeigt werden. Die gewonnenen Ergebnisse dürfen als „hoch signifikant“ eingestuft werden (Abbildung 14). Damit wurde die Nullhypothese widerlegt und die Ergebnisse der Konditionierungsversuche zeigen substratabhängiges Wachstum von XE2479.

Zu beobachten war, dass nach jeder Passage (alle 24 Stunden) das absolute Wachstum etwa um 10 %-20 % geringer ausfiel (Inkubation 24 h). Zu erklären wäre dies damit, dass zu Beginn ein „stock“ von sterilfiltriertem Medium angelegt worden ist, auf welchen bei jeder Verdünnung zugegriffen wurde (0 h, 24 h und 48 h). Auch wenn der „stock“ fortwährend bei 4 °C gelagert wurde, ist nicht auszuschließen, dass dieser „altert“. Die sezernierten Schwefelverbindungen (van Dien, 1997) unterliegen weiterhin Degradierung und enzymatischen Abbauprozessen (Richins, 1997). Nach 24 h ist nicht-signifikantes Wachstum ($p > 0,075$) von XE2479 in nicht-konditioniertem Medium feststellbar. Zu vermuten ist, dass trotz Waschen der Zellen Rückstände des Kulturmediums (SGX) verschleppt worden sind, welche zu minimalem Hintergrundwachstum führen (Galgiani & Stevens, 1976). Des Weiteren enthält das Zelllumen noch nicht verstoffwechselte Nährstoffe. Diese leicht zu verstoffwechselnden Nährstoffe (hier: Cystein) werden zuerst assimiliert, bevor auf die anderwärtig zur Verfügung gestellten Verbindungen zugegriffen wird.

5.3.2 Konditionierungsversuche mit YA2800-2

Bei der Kontrolle mit nicht-konditioniertem Medium $\text{SGX-}\Delta\text{PO}_4^{3-}$ wurde kein signifikantes Wachstum des Testorganismus YA2800-2 festgestellt. Demnach fiel die Kontrolle wie erwartet aus. Im Gegensatz dazu konnte signifikantes Wachstum von *S. cerevisiae* YA2800-2 beim Einsatz von zuvor konditioniertem Medium des Bakteriums XE2479 festgestellt werden (Abbildung 15). Nach jeder Passage (1:100) und 24-stündiger Inkubation waren die OD-Werte bei ~ 2 . Mit Kaliumdihydrogenphosphat als Phosphorquelle (SGY) lag das maximale Wachstum jedes Mal bei OD ~ 9 (Daten nicht gezeigt). Nach statistischer Auswertung (3.2.15) lag der p-Wert für die Experimente 24 h, 48 h und 72 h (je $n = 3$) jeweils bei $p < 10^{-5}$. Die gewonnenen Ergebnisse dürfen als „hoch signifikant“ eingestuft werden (Abbildung 15). Damit wurde die Nullhypothese widerlegt, und die Ergebnisse der Konditionierungsversuche zeigen substratabhängiges Wachstum von YA2800-2.

Wie bei den Konditionierungsversuchen mit XE2479 war auch hier auffällig, dass nach jeder Passage die OD-Ausbeute kontinuierlich abfiel. Auch hier ist wahrscheinlich fortschreitender

Abbau ("Altern") im zellfreien Überstand sowie zell-assoziierte Reserven für die niedrigeren Wachstumsausbeuten verantwortlich (siehe oben).

Mit einem p -Wert von $p > 0,075$ ist das Hintergrundwachstum von YA2800-2 im nicht-konditionierten Medium als nicht signifikant zu bewerten. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass trotz Waschens der Zellen Rückstände des Kulturmediums (SGY) verschleppt worden sind, welche zu minimalem Hintergrundwachstum führten (Galgiani & Stevens, 1976). Unter anderem waren noch nicht verstoffwechselte oder im extrazellulären Raum vorhandene Restnährstoffe vorhanden, welche zum leichten Hintergrundwachstum führten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Konsortium *E. coli* XE2479 und *S. cerevisiae* YA2800-2 auch im chemisch definierten Flüssigmedium (SGPI) bestehen wird. Die Konditionierungsexperimente haben gezeigt, dass jeweils ausreichend Phosphor- und Schwefelmetabolite sezerniert werden, damit der jeweilige Mikroorganismus mit diesen überlebt und proliferieren kann.

5.4 Experimentelle Symbiose

Nachdem mit Agardiffusionstests (5.2) und Konditionierungsversuchen (5.3) gezeigt werden konnte, dass „*cross feeding*“ zwischen XE2479 und YA2800-2 funktioniert, wurde die experimentelle Symbiose im Genematen durchgeführt (Mutzel & Marlière, 2010). Im gesamten Untersuchungszeitraum konnten zwei Langzeitexperimente (Exp. 1 = 130 Tage und Exp. 2 = 98 Tage) etabliert werden.

5.4.1 Kinetik der Symbioseexperimente

Beide Kinetikdiagramme (Abbildung 16 & Abbildung 18) zeigen sich ähnelnde Verläufe in Bezug auf den Verbrauch des Symbiosemediums. Grob zusammengefasst, gibt es zwei Plateaus, bei denen der Mediumverbrauch über längere Zeit gleichbleibend ist. Diesen beiden Plateaus vorangestellt, gibt es jeweils einen sprunghaften Anstieg der Durchflussrate des Symbiosemediums. Zu Beginn jeden Anstiegs muss eine Anpassung des einen oder anderen Mikroorganismus erfolgt sein, welche zu einem vermehrten Mediumverbrauch führte und mit höherer Fitness des Gesamtsystems einherging.

Auffällig ist, dass beide Experimente zu Beginn gleichbleibend bzw. minimal rückläufig im Mediumverbrauch waren. Eine naheliegende Begründung hierzu wäre eine Adaptationszeit der Mikroorganismen an den Genematen. Die inokulierten Zellen stammen aus einer Schüttelkultur und kommen erstmalig nach dem Animpfen in Kontakt mit dem Genematen und müssen sich an die neue Situation anpassen. Ein wichtiger Faktor ist hier die heftige Durchmischung und Begasung in den verwendeten „*Airlift*“-Reaktoren. Zusätzlich können

stoffwechselabhängige Veränderungen in den Testorganismen zu dem stagnierenden/rückläufigen Mediumverbrauch führen. Hinzu kommt, dass sich durch die fehlende Phosphatquelle und durch intrazelluläre Anreicherung von Essigsäure starker Zellstress einstellt (Guillemet & Moreau, 2012). Dient Methylphosphonat als alleinige Phosphorquelle für *E. coli*, reichert sich zusätzlich verstärkt Methan an (Chen, 1990). Darüber hinaus steigt die Konzentration von Formiat (Abbildung 26). Formiat und Methan verursachen ebenfalls Zellstress, worauf mit retardierendem Wachstum von *E. coli* geantwortet wird (Kirkpatrick & Maurer, 2001).

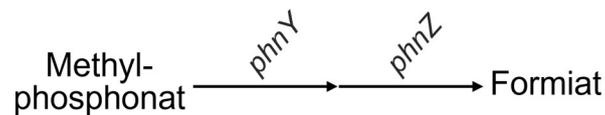


Abbildung 26: Reaktion von Methylphosphonat zu Formiat, mit den beteiligten Genen *phnY* und *phnZ* (Kanehisa & Goto, 2000).

Ebenfalls ist bekannt, dass rote Zellpigmente bei *S. cerevisiae* (Ugolini & Bruschi, 1996) ein Hinweis auf Wachstumslimitierung sind, gegenüber Hefen mit intakten *ade1* und *ade2* Genen oder dem blockmutierten *ade2* & *ade8*, welche ausschließlich weiße Kolonien hervorbringen (Silver & Eaton, 1969; Woods, 1969). Zusammen mit dem Obengenannten für *E. coli* und der "Eingewöhnungszeit" an den Genematen kann der stagnierende Verlauf der ersten 7 – 8 Tage erklärt werden. Die Mikroorganismen, welche am besten an die neuen Gegebenheiten angepasst sind, können sich etablieren, der Rest wird aus dem System gespült.

Interessant sind zwei Ereignisse, welche jeweils zu erhöhtem Mediumverbrauch führten. Beide Ereignisse sind in Experiment 1 und 2 festzustellen. Zu Beginn jeden Anstiegs des Symbiosemediumverbrauchs muss es zu einer genetischen Adaptation in wenigstens einem der beiden Mikroorganismen gekommen sein. Es ist zu vermuten, dass es nicht gleichzeitig in Hefe und Bakterium zu solch einer Veränderung im Genom kommt, sondern die Testorganismen jeweils auf die Veränderung mit einer eigenen Adaptation reagieren. Wichtig ist aber, dass der Zweitorganismus mit der Anpassung des Erstorganismus und damit einem stärkeren Wachstum zurechtkommt und nicht überwachsen bzw. ausgewaschen wird. Auch ist es notwendig, dass das Substratkonsortium nicht zusammenbricht. Bei einer Reihe von zusätzlich angelegten Experimenten konnten innerhalb der ersten Woche keine stabilen Populationen etabliert werden, was darauf hinweist, dass die Anwuchsphase und der erste Anpassungsschritt sensible Ereignisse darstellen. Wurden diese überwunden lief das Symbioseexperiment komplikationslos weiter.

Es wurde beschrieben, dass *E. coli* auf Phosphonat als alleiniger P-Quelle wachsen kann. Auffällig war, dass es in beiden Experimenten zu einer 6 – 7 Tage andauernden stationären

Phase kam (Alam & Bishop, 1969), welche auch in den Experimenten dieser Arbeit zu beschreiben war. Diese stationäre/retardierende Phase von *E. coli* ist auf starken Zellstress zurückzuführen, induziert durch das Fehlen der bevorzugten Phosphatquelle. Dieser Zellstress, der mit einem Absinken des intrazellulären H-Werts einhergeht, kann nach wenigen Tagen zum Absterben der gesamten *E. coli* Population führen (Kirkpatrick & Maurer, 2001; Wackett & Shames, 1987). Mit Verzögerung verstoffwechselt *E. coli* ab Tag 6 – 7 Phosphonat, welches als alleinige Phosphorquelle zu Verfügung steht. Dies spiegelt sich im ersten ansteigenden Verbrauch des Symbiosemediums wider (Abbildung 16, Abbildung 17). Hier stellt sich die Frage, warum es zu einer verzögerten Aufnahme von Phosphonat mit vorangegangenem Zellstress kommt und nicht zur sofortigen Assimilation von Phosphonat. Die Literatur beschreibt hier das Phänomen eines Kryptogens im *phnCDE* Operon (Makino & Kim, 1991).

Kryptogene sind DNA-Sequenzen, die phänotypisch inaktiv („*silent*“) vorliegen und unter Standardbedingungen vom Organismus nicht transkribiert werden. In Stresssituationen können diese durch Mutationen reaktiviert werden (Hall & Yokoyama, 1983). Im Fall des *phnCDE* Operons bildet das *phnE* Gen ein Kryptogen (Phn^-). Steht *E. coli* nur Phosphonat als alleinige Phosphorquelle zur Verfügung, wird das *phnE* Kryptogen (Phn^+) nach mehreren Tagen Inkubation mittels eines „*slip strand mechanism*“ aktiviert (Iqbal & Parker, 2004) (Initiationsstress/intrazellulärer Säurestress). Nun ist das zuvor inaktive (Phn^-) *phnCDE* Operon aktiv (Phn^+) und steht zur Verwertung von Phosphonat zur Verfügung (Abbildung 27).



Abbildung 27: *phn* – Gencluster mit den 14 Einzelgenen. *phnCDE* codieren die Transportgene für Phosphonat, aktiviert durch das Kryptogen *phnE* (grün), gefolgt von den regulatorischen Genen für die Phosphonatverwertung *phnF-P*.

Mehrere Wochen blieb der Verbrauch vom Symbiosemedium stabil, bis es zu einem zweiten Anstieg des Verbrauches kam. Nach wenigen Tagen stabilisierte sich der Mediumdurchfluss bis zum Ende der beiden Experimente. Es ist zu vermuten, dass es zu genetischen oder zellphysiologischen Anpassungen in diesem Zeitraum gekommen ist.

Abschließend soll hier erwähnt sein, dass jede Erstanpassung des einen Mikroorganismus, und somit gesteigerte Fitness, nicht zwingend zur Folge hatte, dass der zweite Mikroorganismus mitevolvierte. Es genügte vollkommen, wenn der Zweitorganismus persistierte. Ob es zu einer nachfolgenden evolutionären Anpassung beim Zweitorganismus

kommt, ist von der Stärke des veränderten Selektionsdrucks der vorangegangenen Erstanpassung abhängig. Sichergestellt ist, dass die erste Anpassung der Experimentalsymbiose (ansteigender SGX-Verbrauch, 6-7 Tage) auf Seiten von *E. coli* XE2479 liegt in Form der Aktivierung des Kryptogen *phnE* (Phn^+) und der darauffolgenden Nutzung von Methylphosphonat als alleinige Phosphorquelle.

Bis auf die 6-7-tägige Anpassungsphase bei *E. coli* gab es bei der Literaturrecherche weiter keine direkten Hinweise zu einem ähnlichen kinetischen Verlauf der Symbioseexperimente. Ob die weitere Anpassung zwischen 7. und 14. Woche auf Seiten von *E. coli* oder *S. cerevisiae* liegt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Weiteren Aufschluss darüber gab eine Genomanalyse der evolvierten Stämme im Vergleich zum nicht-evolvierten Stamm (5.6). Zuvor soll jedoch im nachfolgenden Kapitel die Dynamik der koloniebildenden Einheiten im laufenden Symbioseexperiment nähergehend betrachtet werden.

5.4.2 KBE-Bestimmung und mikroskopische Untersuchungen im laufenden Symbioseexperiment

Um die Populationsentwicklung während der Symbiose abzuschätzen, wurden Proben entnommen, ausverdünnt und für den jeweiligen Organismus auf entsprechende Agarplatten ausplattiert. *Saccharomyces cerevisiae* YA2800-2 (graue Symbole in Abb. 24 und 25 unten) wurden auf YPD-Kanamycin Agarplatten ausplattiert, um das Hintergrundwachstum von *E. coli* zu inhibieren. Für *E. coli* XE2479 wurden zum einen LB-Agarplatten verwendet, um die Gesamtpopulation (blaue Symbole in Abb. 24 und 25) zu bestimmen. Zum anderen wurden Ampicillinselektionsplatten verwendet, um den Anteil der Zellen in der Population zu ermitteln, welche das Plasmid mit dem *phnCDE*-Operon tragen (orange Symbole in Abb. 24 und 25). Bei jeder Adaptation in der Symbiose XE2479/YA2800-2 gibt es einen Anstieg im Symbiosemediumverbrauch. Der Mehrverbrauch korreliert direkt mit einer Verringerung der Generationszeit.

Wird YA2800-2 ins Verhältnis gesetzt mit der XE2479 Gesamtpopulation, fällt auf, dass beide Experimente am Ende ein *S. cerevisiae* / *E. coli* Verhältnis von $\approx 1:6$ aufweisen (Anhang: **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Sicherlich kann dieses Ergebnis in Korrelation mit dem Größenunterschied beider Organismen gesetzt werden. Hierzu gibt es Hinweise in der Literatur (Zakhartsev & Reuss, 2018). Weiterführende Untersuchungen sollten hierzu durchgeführt werden, um einen Zusammenhang zu bestätigen oder auszuschließen.

Abschließend sollte noch erwähnt werden, dass beide Experimente in unterschiedlichen Genemat-Apparaturen durchgeführt worden sind. Minimale Änderungen der Schlauchlängen und Durchmesser aufgrund voranschreitenden Alterns führen selbst maschinenintern zu veränderten Durchflussvolumina, welche sich maßgeblich auf den Ausgang der Experimente

ausüben könnten (Zellkonzentrationen). Hinzu kommt, dass die Reaktorkammern nicht industriell gefertigt waren. Bereits kleine Abweichungen der Reaktionsvolumen, Mittelsteglängen oder Glaswandstärke könnten zur Abweichung der Zellendkonzentrationen beitragen.

Werden die ersten 14 Tage der *E. coli* und *S. cerevisiae* Gesamtpopulation betrachtet, fällt auf, dass die Hefepopulation bei beiden Experimenten um $\approx 90\%$ absank und sich dann bis zum Experimentende weitestgehend auf diesem Niveau stabilisierte (siehe oben). Beim Experiment 2 gibt es zwischen den Messpunkten Tag 60 und 80 ein Maximum der KBE der Hefe- und Bakteriengesamtpopulation (Abbildung 28, grau & blau). Während am Messpunkt Tag 66 die Hefe-KBE bereits wieder sinkt, erreichen die KBE für *E. coli* dort ihren Maximalwert. Am Messpunkt Tag 72 sind beide KBE-Ausschläge von *E. coli* und *S. cerevisiae* absteigend. Bis zum Messpunkt Tag 82 haben die KBE beider Organismen wieder das Ausgangsniveau erreicht. Der KBE-Anstieg für *E. coli* XE2479 beginnt ≈ 6 Tage verzögert, im Vergleich zu dem KBE-Anstieg von *S. cerevisiae* YA2800-2 (Abbildung 28, graue Pfeile). Diese kurzzeitige Änderung der KBE beider Organismen korrespondiert mit dem steigenden Verbrauch des Symbiosemediums in diesem Zeitraum.

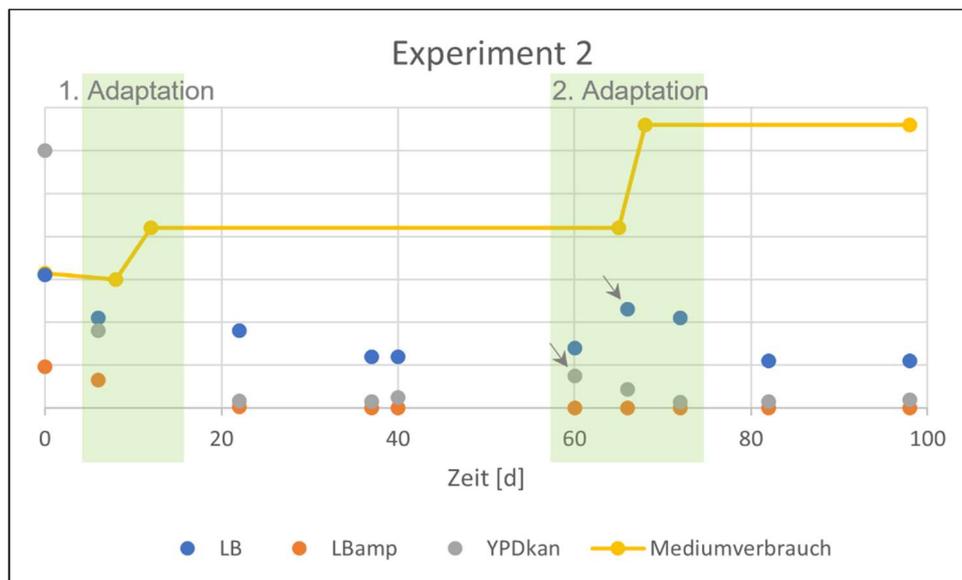


Abbildung 28: Hybriddarstellung vom Verlauf der koloniebildenden Einheiten (Originaldaten: Abbildung 19) im Zusammenhang mit dem Symbiosemediumverbrauch (gelb, Originaldaten: Abbildung 17) während des 2. Experiments über einen Zeitraum von 98 Tagen (x-Achse). KBE-Dynamik: blau = *E. coli* Gesamtpopulation, grau = *S. cerevisiae* Gesamtpopulation, orange = *E. coli* Teilpopulation mit Plasmid; grün unterlegt = Zeitraum der Adaptation (gesteigerter Symbiosemedium-Mehrverbrauch = Generationszeitenverkürzung), Pfeile markieren gemessene KBE-Maxima während der 2. Adaptationsphase.

Es kann angenommen werden, dass es zu Beginn dieses Zeitraums zu einer evolutionären Anpassung bei den Testorganismen gekommen ist. Zwei mögliche Hypothesen können hier aufgestellt werden:

- i. Zuerst gab es eine Anpassung bei *S. cerevisiae* YA2800-2, welche zu einem optimierten Wachstum führte und damit zu einer erhöhten Zelldichte. Darauf folgend standen *E. coli* XE2479 vermehrt Nährstoffe zur Verfügung, was verzögert in einem verstärkten Zellwachstum resultierte.
- ii. Zuerst gab es eine Anpassung bei *E. coli* XE2479, welche eine optimierte Sezernierung von Nährstoffen für *S. cerevisiae* in Folge hatte, ohne selbst eine Wachstumserhöhung zu verzeichnen. Daraufhin kam es zu einem verstärkten Wachstum der Hefe, verbunden mit einem Mehr an Nährstoffen für die Bakterien, welches in einer Zelldichteerhöhung resultierte.

Welche der Hypothesen zutrifft, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Hierzu gab es Genomanalysen (5.6) beider Testorganismen. Allerdings sei schon darauf hingewiesen, dass Sequenzdaten nur für die Ausgangsstämme und die Stämme am Ende des Experiments zur Verfügung stehen. Genomdaten im zeitlichen Verlauf wurden nicht generiert.

Der Genemat misst fortwährend die Lichtstreuung im IR- Bereich. Der vordefinierte OD-Wert im Turbidostatregime liegt bei $\approx 1,4$ OD. Obgleich in der Reaktionskammer der OD-Wert stabil bleibt, wurden zu Beginn der Experimente und bei der zweiten adaptiven Anpassung (Exp. 2) mehr KBE ausgezählt als zwischendurch. Dieses Phänomen ist durch die Lichtstreuung von kleinen und großen Partikeln zu erklären. Große Partikel streuen mehr Licht als kleine Partikel (Hergert & Wriedt, 2012). Das bedeutet, bei gleichem OD-Wert gibt es bei kleinen Zellen mehr KBE als bei großen Zellen oder Zellverbänden. Wir wissen, dass sich beide Mikroorganismen nach mikroskopischen Untersuchungen im Laufe der Experimente phänotypisch verändert haben. Zu Beginn wiesen Hefe wie auch Bakterien phänotypische Eigenschaften von "gesunden" Zellen auf (4.7.3, Abbildung 23A). Mit fortschreitendem Experiment konnten unter dem Mikroskop hauptsächlich filamentöse Bakterien nachgewiesen werden, und die Hefen hatten sichtlich Knospungsschwierigkeiten. *Saccharomyces cerevisiae* lagen überwiegend als Flocken vor (4.7.3; Abbildung 23B), was auf Stresssituationen hinweist (Claro & Rijsbrack, 2007). Zusätzlich waren viele nicht lebensfähige Mikroorganismen im Sichtfeld erkennbar, welche den OD-Wert erhöhen aber keine KBE ausbilden. Am Ende beider Experimente entsprach das phänotypische Erscheinungsbild der Mikroorganismen ähnlich dem zu Beginn des Experiments. *E. coli* Zellen wiesen überwiegend Standardgröße auf, vereinzelt waren noch Filamente anzutreffen (Adler & Hardigree, 1965). Teilweise hafteten *E. coli* an den Hefezellen (4.7.3, Abbildung 23C). Vermutlich bringt die physikalische Assoziation den Vorteil, dass die Organismen direkt benötigte Nährstoffe austauschen können, ohne dass diese weit diffundieren müssen. Zu Beginn der Symbiose sind die Substratkonzentrationen so gering bzw. das Transportsystem noch nicht effektiv genug, dass gegenseitiges Aneinanderheften

einen Selektionsvorteil bringt. Hefezellen lagen zu diesem Zeitpunkt weiterhin in Flocken vor, zusätzlich waren einzelne Hefezellen zu detektieren.

Insgesamt waren die Hefezellen zum Ende hin wieder weniger granuliert. Die untypischen Zellmorphologien der Mikroorganismen im Verlauf der Experimente können auf die Stresssituationen im Genemat zurückgeführt werden (Iserentant, 1996; Wehrens & Ershov, 2018). Limitiertes Nahrungsangebot, Anpassungsschwierigkeiten, sezernierte und angereicherte Stoffwechselabfallprodukte, Toxine und Selektionsdruck durch andere Mikroorganismen führen dazu. Auffällig war, dass weniger aneinanderheftende Zellen (*E. coli* + *S. cerevisiae*) zu beobachten waren als im mittleren Verlauf des Symbioseexperiments. Zu begründen wäre dies damit, dass es mit fortschreitender Symbiose zu einer verbesserten Sezernierung der Schlüsselsubstrate kommt. Damit kommt es zu einer höheren Konzentration dieser Substrate und vereinfachter Aufnahme für die Zellen. Wiederum könnten sich die Schlüsselsubstrattransporter adaptieren und bei gleichbleibender Konzentration effektiver die Nährstoffe binden und transportieren. Beide Möglichkeiten könnten die geringere Anzahl an Organismen erklären, welche am Ende des Experimentes physikalisch assoziiert sind.

Mit dem Vorgegangenen erklärt sich der KBE-Verlauf des 2. Experiments im Zusammenhang mit dem Symbiosemediumverbrauch. Zu Beginn sind die angeimpften Zellen phänotypisch unauffällig. Es liegen viele normalgroße Einzelzellen vor, daher der hohe KBE bei OD 1. Die Testorganismen geraten unter Stress, ausgelöst durch die Anpassungsphase an den Genematen und durch die Anreicherung von Zellgiften, welche eine stationäre Phase mit sich bringt, bevor das *phnCDE* Operon aktiviert wird (1. Adaptation). Diese führt zu filamentösen Zellen bei *E. coli* und Flockenbildung bei *S. cerevisiae*. Es liegen dann übergroße Einzelzellen und vermehrt Zellverbände vor (Lichtstreuung s.o.). Daher sinkt die Menge der KBE ab, obgleich der OD-Wert sich nicht ändert. Im Zeitraum von 60-80 Tagen kommt es zu einer zweiten Adaptation im Genematen. Diese führt bei beiden Testorganismen zu ansteigenden KBE. Durch die weitere Adaptation kommt es erneut zu einer gesteigerten Fitness und somit einer verstärkten Proliferation von beiden Mikroorganismen. Im Laufe des Experimentes steigen die KBE bei gleichem OD-Wert. Mit der Zeit werden all jene Zellen aus dem System gespült, welche nicht angepasst sind. Betrachtet man das verzögerte Ansteigen der *E. coli* KBE-Kurve und damit das gleichzeitige Absinken der *S. cerevisiae* KBE-Kurve (Tag 60-80), kann darauf geschlossen werden, dass die Hefe aufgrund des ansteigenden Wachstums von *E. coli* ausgewaschen wird. Im Umkehrschluss stehen weniger Substratmoleküle der *E. coli* Population zur Verfügung, welche von *S. cerevisiae* bereitgestellt werden. Daraufhin kommt das Wachstum der Bakterienpopulation zum Erliegen und sinkt auf ein Niveau ab, wo beide Organismen nebeneinander existieren können, ohne den anderen zu inhibieren oder zu überwachsen. Hier ist eindeutig die Substratabhängigkeit der

Mikroorganismen voneinander erkennbar. Ohne den einen ist der andere nicht überlebensfähig. Diese zweite Adaptation (2. Exp.) resultierte ebenfalls in einer geringeren Generationszeit und somit einem erhöhten Symbiosemediumverbrauch.

Nachdem der Zusammenhang zwischen Symbiosemediumverbrauch, KBE-Dynamik und Generationszeit für Experiment 2 dargelegt worden ist, stellt sich die Frage, warum die Symbiosemediumverbräuche des 1. Experiments und des 2. Experiments ähnlich verlaufen, die KBE-Dynamiken aber nicht (Abbildung 29 & Abbildung 28, grün unterlegt).

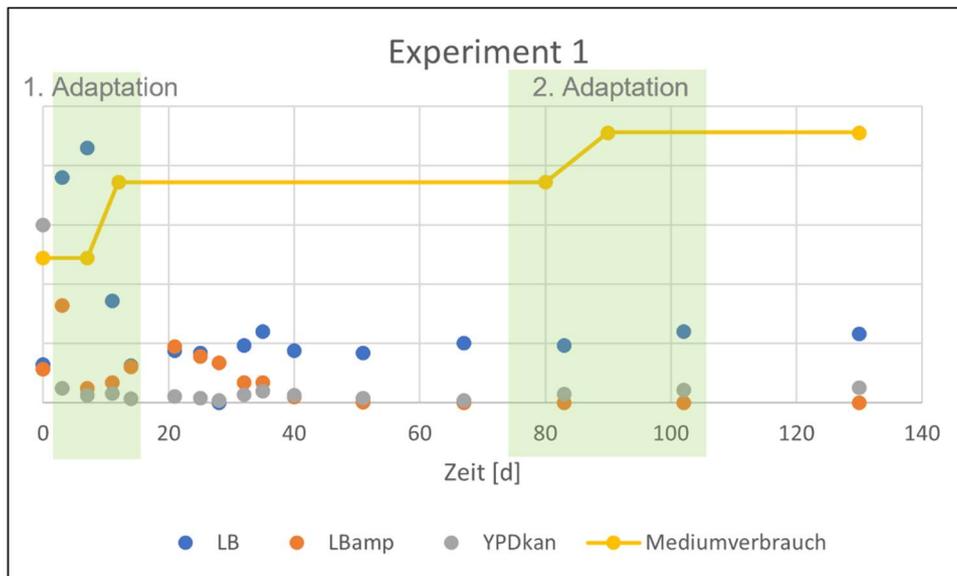


Abbildung 29: Hybriddarstellung vom Verlauf der koloniebildenden Einheiten (Originaldaten: Abbildung 18) im Zusammenhang mit dem Symbiosemediumverbrauch (gelb, Originaldaten: Abbildung 16) während des 1. Experiments über einen Zeitraum von 130 Tagen (x-Achse). KBE-Dynamik: blau = *E. coli* Gesamtpopulation, grau = *S. cerevisiae* Gesamtpopulation, orange = *E. coli* Teilpopulation mit Plasmid; grün unterlegt = Zeitraum der Adaptation (gesteigerter Symbiosemedium-Mehrverbrauch = Generationszeitenverkürzung).

Vergleicht man die KBE-Dynamik der 2. Adaptation beider Experimente miteinander, fällt auf, dass weniger Messpunkte beim 1. Experiment zur Verfügung stehen als beim 2. Experiment. Gegebenenfalls verbirgt sich hinter der Messdatenlücke eine ähnliche KBE-Dynamik beim 1. Experiment wie beim 2. Experiment. Hinweis darauf gibt der Datenpunkt von *S. cerevisiae* an Tag 83. Dieser ist 3-fach erhöht im Vergleich zum Messdatenpunkt am 67. Tag. Vorsichtig betrachtet, könnte dies den beginnenden Anstieg einleiten. Ebenfalls könnte der Messpunkt an Tag 102 der *E. coli* Gesamtpopulation das Ende der KBE-Dynamikkurve sein (siehe 2. Adaptation Exp. 2). Beide Messpunktinterpretationen von Experiment 1 würden analog in den 2. Adaptationszeitraum von Experiment 2 passen. Zusätzlich untermauert die mikroskopische Untersuchung am Ende des Experiments 1 diese Vermutung. Zwischen der ersten und zweiten Adaptation sind ebenfalls zahlreiche degenerierten Zellen zu finden. Am Ende des Experiments ähneln sich wiederum die Morphologie der Zellen von Experiment 1 und 2. Diese

Beobachtungen passen auch zum Symbiosemediumverbrauch und der KBE-Dynamik beider Experimente.

Um in Zukunft sicherzugehen, sollte bei nachfolgenden Experimenten die Messdatendichte erhöht werden, da nun abgeschätzt werden kann, in welchen Zeiträumen es zu den Adaptationen der Symbiose kommt. Dasselbe gilt auch bei der ersten Adaptation von Experiment 1 und 2. Hier steht bei Experiment 1 lediglich ein Messpunkt zur Verfügung, im Gegensatz zu 5 Messpunkten im gleichen Zeitraum bei Experiment 2. Wiederum kann hier vermutet werden, dass sich bei Experiment 2 ebenfalls ein ähnlicher KBE-Kurvenverlauf findet wie bei Experiment 1. Hinweise darauf geben ebenfalls die sich ähnelnden mikroskopischen Untersuchungen und der analoge Verbrauch des Symbiosemediums.

5.4.3 KBE-Verhalten von XE2479 mit dem Vektor *pXEN154phnCDE* und XE2096, während serieller Verdünnungen

Der Ausgangsstamm XE2096 (*aph*⁺) wurde mit dem Vektor *pXEN154 (bla*⁺) transformiert, welcher die ergänzenden Gene *phnCDE* trägt. Somit wurde der Testorganismus *E. coli* XE2479 (*aph*⁺ *bla*⁺) generiert. Dieser enthielt nun ein komplettes Phosphonatoperon *phnC-P* (PCR-Daten nicht gezeigt) (Makino & Kim, 1991). Der mit dem Vektor komplettierte Testorganismus würde demnach auf Phosphonat wachsen. Zu erwarten wäre eine konstante KBE-Population auf LBamp Selektionsplatten.

Betrachten wir nun die Daten (4.4.2), fällt sofort auf, dass bei Experimenten frühestens ab dem 40. Experimentiertag keine ampicillinresistenten XE2479 KBE mehr zu detektieren waren. Im Gegensatz dazu blieb die ampicillinsensitive Population von XE2479 fortlaufend stabil. Das heißt, dass ab diesem Zeitpunkt Phosphonat verstoffwechselt werden konnte, obgleich das Plasmid nicht mehr nachweisbar war. Mittels PCR konnte das Ampicillinresistenzgen nicht mehr nachgewiesen werden, aber das Vorhandensein von *phnCDE*. Generell könnte dies darauf hinweisen, dass es zu einer Rekombination der Phosphonatgene vom Plasmid auf Chromosom kommt.

Mit den vorangegangenen Testergebnissen diente der Ausgangsstamm XE2096 als Negativkontrolle, welcher nicht das Plasmid trägt. Zu erwarten war, dass dieser nicht im Medium mit Phosphonat als alleinige Phosphorquelle wächst. Nach mehreren Versuchen wurde festgestellt, dass XE2096 nach mehrmaliger Passage ebenfalls Phosphonat verstoffwechseln kann (4.6.2). Bereits ab der 6. Passage konnte ein Wachstum von XE2096 auf Phosphonat festgestellt werden, mit $\approx 1 \cdot 10^8$ KBE/ml, bis sich ab der 8. Passage die Population auf $\approx 9 \cdot 10^8$ KBE/ml stabil einstellte. Diese KBE-Maximalanzahl wurde auch bei den Kontrollen detektiert (Abbildung 21, grau und blau). Der PCR-Nachweis auf *phnCDE* fiel positiv aus. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass XE2096 nicht auf LBamp-Selektionsplatten

wächst. Somit konnte klargestellt werden, dass es weder zu einer Verwechslung der Stämme untereinander gekommen ist noch XE2096 mit dem Plasmid kontaminiert wurde.

Mit dem Wissen, dass der *E. coli* Ausgangsstamm XE2096 auch in Abwesenheit des Plasmids auf Phosphonat wachsen kann, wurde ein Gegenexperiment durchgeführt. Der Testorganismus XE2479 wurde im chemisch definierten Medium mit Phosphonat inkubiert, aber ohne Ampicillin. Zu erwarten war, dass über den gesamten Testzeitraum ampicillinresistente KBE zu detektieren sind, da die plasmidkodierte Phosphonatverwertung die Beibehaltung des Plasmids selektionieren sollte. Bereits nach der 6. Passage gab es ein starkes Absinken der KBE von anfänglich $\approx 9 \cdot 10^8$. Ab der 10. Passage waren keine ampicillinresistenten KBE mehr zu detektieren (Abbildung 21, orange), aber Phosphonat konnte verstoffwechselt werden.

Die erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass bereits der Ausgangsstamm XE2096 ein funktionsfähiges Phosphonatoperon besitzen muss (Makino & Kim, 1991). KBE-Verlauf sowie PCR-Nachweis bestätigen dies. Im Umkehrschluss ist es nicht verwunderlich, dass in Abwesenheit von Ampicillin im Medium über kurz oder lang das Plasmid mit dem *phnCDE*-Operon nicht mehr nachweisbar ist. Es wird am Ende schlichtweg nicht benötigt.

Wird XE2479 seriell, ohne Selektionsdruck (ohne Ampicillin, ohne Phosphonat, mit Phosphat) kultiviert, ist das Plasmid ab der 14. Passage nicht mehr nachweisbar (Abbildung 20, orange Symbole). Bei den Symbioseexperimenten im Genemat kann das Plasmid im Gegensatz bis zum 40. bzw. 83. Tag nachgewiesen werden. Während dieses Zeitraums spielt das Plasmid mit den ergänzenden Phosphonatgenen höchstens eine untergeordnete Rolle in der Phosphonatassimilation. Das Plasmid ist am Ende der Experimente dennoch nicht mehr vorhanden.

Zellen ohne Plasmid haben wahrscheinlich einen Selektionsvorteil und überwachsen die Zellen mit Plasmid. Zu Beginn der Experimente konnte durch die Standard-PCR das *phnCDE* detektiert werden, aber es ist nicht möglich zuzuordnen, ob es auf dem Genom oder auf dem Plasmid liegt. Erst die durchgeführten Experimente und spätere Genomsequenzierungen konnten aufdecken und klären, dass der zu Verfügung gestellte Stamm XE2479 gar kein ergänzendes Plasmid benötigt.

Mit der Verbesserung der Sequenzieretechnologie (Enright & Spratt, 1999) konnten neben der klassischen Einordnung von *E. coli* (z. B. „*host-associated*“) noch weiterführende Kriterien genutzt werden. Mit dem „*multilocus sequencing typing*“ wurden fünf zusätzliche *E. coli* Abstammungsgemeinschaften identifiziert. Diese unterteilen sich von *Clade1* bis *Clade5* (CI-CV), als „kryptische Linien“ („*cryptic strains*“) (Yu, 2021). Diese fünf Kladen können nicht mit

traditionellen biochemischen oder klassischen Methoden unterschieden werden. Phänotypisch erscheinen sie identisch, jedoch genotypisch nicht (Walk & Alm, 2009). Die verwendeten Mikroorganismen XE2479 und XE2096 entsprechen K-12/MG1655. Die Mehrzahl der *E. coli* Laborstämme besitzen kein funktionelles Phosphonatoperon, im Gegensatz zu den Stämmen K-12 und B (Makino & Kim, 1991). Mit dem *phnE*-Kryptogen sind diese den kryptischen Linien anzugliedern. Ob es bei der Generierung von XE2479 zu einer Verwechslung des Ausgangsstamms kam oder lediglich die Information nicht vorhanden war, dass K-12 ein funktionelles *phnCDE* Operon besitzt, kann nachfolgend nicht geklärt werden.

Abschließend ist wichtig, dass dieser Umstand das eigentliche Symbioseexperiment nicht maßgeblich beeinflusst. Eine funktionierende Phosphonatverwertung ist gegeben. Auch kann ausgeschlossen werden, dass es zu einer horizontalen Genübertragung von *phnCDE* vom Plasmid ins *E. coli* Genom gekommen ist, da der Testorganismus XE2479 grundsätzlich über ein funktionelles Phosphonatoperon verfügt.

5.5 Evolution der Generationszeiten im Genematexperiment

Vor der experimentellen Symbiose und nach Beendigung wurden die Generationszeiten der Mikroorganismen in ihrem jeweiligen Medium bestimmt (Tabelle 20). Mit diesen zusätzlichen Daten gilt es Folgendes zu klären:

- i. Handelt es sich bei der gesteigerten Fitness (5.4.2, Abbildung 28, Abbildung 29) um evolutionäre Adaptationen

oder

- ii. um Adaptationen, welche auf die Kulturmethode zurückzuführen sind?

Richard Lenski (Lenski, 1991) beschreibt, dass es zu einer Fitnesssteigerung von bis zu 34 % kommen kann, wenn Testorganismen durch serielle Verdünnung in ihrer stationären Phase durchkultiviert werden. Auffällig ist, dass bei *E. coli* und *S. cerevisiae* sowohl vor als auch nach der experimentellen Symbiose kaum Fitnessanpassungen in ihren Komplexmedien zu beobachten waren. Bei *E. coli* konnte keine signifikante Änderung festgestellt werden und bei *S. cerevisiae* lediglich eine geringe Änderung ($p < 0,075$). Die verkürzten Generationszeiten entsprechen denen der beschriebenen seriellen Kultivierung (Lenski, 1991). Im Gegensatz dazu wurde bei beiden Mikroorganismen eine signifikante Generationszeitenverkürzung in ihren Minimalmedien ausgemessen ($p = 0,075-0,01$). Am beeindruckendsten ist die Generationszeitverkürzung von $> 60\%$ von *E. coli* XE2479 im chemisch definierten Medium mit Phosphonat als alleinige Phosphorquelle. Eindeutig kann hier eine evolutionär begründete

Fitnesssteigerung (1. Adaptation) festgestellt werden. Diese wird durch Aktivierung des Kryptogens *phnCDE* via Mutation herbeigeführt (Guillemet & Moreau, 2012).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei den beiden festgestellten Fitnesssteigerungen und damit verbundenen Generationszeitenverkürzungen während der Experimente um evolutionäre Adaptationen handelt (i. Nullhypothese bestätigt). Die erste evolutionäre Adaptation wurde durch Aktivierung des Kryptogens bei XE2479 ausgelöst. Bei der zweiten evolutionären Adaptation, welche frühestens am 65. Tag auftrat, gibt es weiter keinen Nachweis in der Literatur. Für gewöhnlich treten kulturbedingte phänotypische Veränderungen binnen der ersten Stunden auf. Daher ist diese zweite Adaptation zu diesem späten Zeitpunkt sehr wahrscheinlich auf Mutationen in den Testorganismen zurückzuführen. Weiteren Aufschluss hierzu werden die Genomanalysen geben. Möglicherweise gab es auch durch die Kulturmethode induzierte genetisch basierte Adaptationen, aber diese tragen kaum zur Generationszeitenverkürzung bei. Diese Generationszeitenverkürzung würde sich sonst bei der wiederholten Kultur der Organismen in Ihrem Komplexmedium signifikant widerspiegeln (Tabelle 20). (ii. Gegenhypothese widerlegt)

5.6 NGS-Daten im Kontext des Symbioseexperiments

Nach 815 Generationen in Kokultur konnten im Abschnitt 4.7.2 sieben SNVs für *E. coli* XE2479 detektiert werden und ebenfalls sieben SNVs für *S. cerevisiae* YA2800-2. In den folgenden zwei Unterabschnitten für *E. coli* (5.6.1) und für *S. cerevisiae* (5.6.2) werden die mutierten Gene kurz charakterisiert und die gewonnenen NGS-Ergebnisse in Zusammenhang zu den durchgeführten Experimenten gesetzt. Im Abschnitt 5.6.3 wird weiterführend ein Blick auf das *phnCDE* Kryptogen in XE2479 im Zusammenhang mit den Sequenziererergebnissen geworfen.

5.6.1 SNVs in XE2479 nach 130 Tagen

Es stellt sich zu Beginn die Frage, welche von den 7 Mutationen (Tabelle 21)

- i. sind gegebenenfalls der Kulturmethode zu zuordnen
- ii. oder sind dem eigentlichen Symbioseexperiment zu verdanken?

Um die erste Frage der kulturbedingten Mutationen zu beantworten, konnte auf vier weitere NGS-Datensätzen zurückgegriffen werden, welche unabhängig voneinander im Genematen in Experimenten mit unterschiedlicher Zielsetzung durchgeführt worden sind (persönliche Mitteilung, Rupert Mutzel). Folgende Tabelle veranschaulicht ähnliche Mutationen in den jeweiligen Operons, während der einzelnen Genematenexperimente.

Tabelle 23: Ähnliche Mutationen während unterschiedlicher Experimente, welche jeweils im gleichen Operon auftraten, auf verschiedenen Loci. Der Kopf der Tabelle kodiert den *E. coli* Stamm des jeweiligen Experiments (persönliche Mitteilung, Rupert Mutzel).

XE2479	e2124	MG1655_6	JM1	MB_2
<i>casD</i>	<i>casA</i>	<i>casC</i>	---	---
<i>rpoS</i>	<i>rpoB / rpoD</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpoA / rpoB</i>	<i>rpoC / rpoS</i>

e2124 und MG1655_6 sind Produkte von Experimenten zur Evolution von Salztoleranz in *E. coli*, JM1 entstand in kontinuierlicher Kokultur von *E. coli* mit Amöben von *Dictyostelium discoideum*, MB_2 in einem Experiment zur Adaptation von *E. coli* an die nicht-natürliche Aminosäure 4-Azatriptophan.

Das ***rpoS*-Gen** im *rpo*-Operon kodiert für den Sigma-Faktor RpoS. RpoS fungiert als Regulator, generell für Zellstress. Analysen bestätigten, dass 10 % des *E. coli* Genoms direkt oder indirekt im Einfluss von RpoS stehen (Patten & Kirchhof, 2004; Weber & Polen, 2005). Es ist bekannt, dass *E. coli* effizient Biofilme bildet, welche Schutz und stabile Lebensbedingungen bieten (Barnhart & Chapman, 2006). Weiterführend ist RpoS mitverantwortlich für das Ausbilden dieses Biofilms bei oxidativem Stress (Smith & Price, 2017; Soo & Wood, 2013). Da die vorgenommenen Experimente in Suspension stattfanden und der Genemat fortlaufend automatisch residente, adaptiv statische Varianten vernichtet, erhalten die Organismen einen Überlebensvorteil, welche weniger effizient Biofilme bilden und deshalb der chemischen Zerstörung residenter Zellen entgehen. Bei XE2479 tritt eine Mutation auf, welche ein Stopcodon (Tabelle 21) inmitten der Sequenz integriert. Es kann vermutet werden, dass es zu einer Inaktivierung des Gens kommt. Ähnliche Mutationen wurden auch bei anderen Experimenten im Genemat detektiert (Tabelle 23). Damit ist die Mutation von *rpoS* wahrscheinlich auf eine Adaptation an die Kulturmethode zurückzuführen. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass es sich hier um eine stressausgelöste Adaptation handelt (Al Mamum & Lombardo, 2012). Es wäre interessant, in künftigen Untersuchungen der Frage nachzugehen, inwieweit die generelle Stressantwort (z.B. auf Hitzestress, oxidativen Stress oder Nahrungsstress) der Variante in konventioneller Kultur durch die Mutation beeinträchtigt wird.

Auch im ***cas*-Operon** konnte beim Symbioseexperiment eine Mutation detektiert werden. Es handelte sich allerdings um eine synonyme Mutation, bei der lediglich im Codon eine Base ausgetauscht wurde, aber die Aminosäure gleich blieb (Leu₁₃₈). Auch bei anderen Experimenten konnten Mutationen in diesem Operon festgestellt werden (Tabelle 23). Das Auftreten von Mutationen in diesen Genen kann Rückschluss darauf geben, dass es während der Genematenexperimente eine wichtige Rolle spielt und das Erhalten der Funktionalität essenziell ist. Die *cas* („*CRISPR-associated*") Kaskade steht in Assoziation mit dem CRISPR-Operon (Brouns & Jore, 2008). CRISPR/Cas ist im Allgemeinen für eine regulatorische

Immunabwehr der Mikroorganismen bei Angriffen von infektiösen Viren und bei der Exposition von fremder DNA bekannt (Horvath & Barrangou, 2010). Ausgeschlossen werden kann, dass es sich hierbei um Exposition gegenüber Viren handelt. Da *E. coli* in Kokultur mit *S. cerevisiae* gehalten wird, kann davon ausgegangen werden, dass *E. coli* während der gesamten Kulturzeit Kontakt mit DNA von *S. cerevisiae* hatte. Die entstandene synonyme Mutation im *casD*-Gen erklärt sich aus der hochregulierten Expression des Operon. Da es sich um ein essenzielles Operon handelt, werden sich nur Mutationen adaptieren, welche die Funktionalität nicht stören bzw. aufrechterhalten.

Eine weitere „*missense variant*“-Mutation konnte im ***priB*-Gen** detektiert werden. Hier mutierte durch eine Codonänderung Gly₉>Ser₉ (Tabelle 21). PriB ist eine Untereinheit des Primosoms. Das Primosom ist ein Multiprotein-DNA-Komplex, bestehend aus insgesamt 6 Untereinheiten. Dieser Multiproteinkomplex, bestehend aus PriA, PriB, PriC, DnaB, DnaC, und DnaT, ist an der Initiation der Replikation der DNA beteiligt (Allen & Kornberg, 1993; Windgassen & Wessel, 2018). PriB ist die Kernkomponente des Primosoms und stabilisiert die PriA-PriB-Struktur, wenn die zu reparierende DNA an PriA bindet (Liu & Nurse, 1996). Es kann nur spekuliert werden, was die Mutation vom unpolaren Glycin zum polaren Serin zur Folge haben könnte. Ogleich in den letzten Jahren intensive Forschung über das Primosom durchgeführt worden ist, bleiben viele Grundaspekte ungeklärt. Es finden sich teilweise widersprüchliche Informationen in der Literatur über den Aufbau und die Primosomstruktur (Szymanski & Jezewska, 2011). Im Idealfall würde die DNA besser an den PriA-PriB-Komplex binden. Ob sich die Protein-DNA-Interaktion verbessert oder verschlechtert, kann hier nur vermutet werden. Es gibt hierzu keine weiteren Informationen in der Literatur. Abschließend kann die Mutation weder dem eigentlichen Symbioseexperiment noch der Kulturbedingung zugeordnet werden.

Die folgenden drei mutierten Gene werden zusammen behandelt, da alle drei mit der Schwefelaufnahme unter Sulfatmangel assoziiert sind. Vorab kann gesagt werden, dass es bei ***cbl*** und ***sbp*** jeweils zu einer „*missense*“-Variation gekommen ist. Bei ***cysA*** kam es vermutlich zu einer Inaktivierung des Gens durch eine „*disruptive inframe deletion*“. Alle drei Gene kodieren einen hochaffinen ABC-Transporter für Sulfat, Thiosulfat, Molybdat und Selenit, welcher unter Cystein/Sulfatmangel exprimiert wird. Cbl, ein „*sulfate starvation-induced*“ Protein, fungiert als Transkriptionsfaktor für *sbp* und kontrolliert direkt die Expression von *sbp* (van der Ploeg & Iwanicka-Nowicka, 1999). Sbp selbst ist ein „*binding protein*“ im Periplasma von *E. coli* und interagiert mit der ABC-Transporterpermease CysAUW (Jacobson & He, 1991; Sirko & Zatyka, 1995). CysA ist eine ATP-bindende Untereinheit des oben genannten ABC-Transporters (Linton & Higgins, 1998; Sirko & Hryniewicz, 1990). In unserem Experiment steht lediglich Sulfit als einzige Schwefelquelle zur Verfügung. Die Inaktivierung eines Transporters

für höher oxidierten Schwefel könnte deshalb einen selektiven Vorteil für die Bakterien bedeuten. Energieleistungen können an dieser Stelle eingespart und an anderer Stelle effektiver genutzt werden. In anderen Mutageneseexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass ein *cysA* „knockout“ die Sulfataufnahme blockiert (Zolotarev & Unnikrishnan, 2008). Bei *Cbl* gibt es eine „missense“-Mutation von Arg>Leu. Arginin, welches ein stark basisches und polares Molekül ist, wird durch das kleine, neutrale und unpolare Leucin ersetzt. Da in der Literatur weiter keine vollständigen kristallografischen Analysen über *Cbl* existieren, ist es nicht möglich, darüber Auskunft zu geben, zu welchen Proteinstrukturänderungen es kommen könnte. Allerdings konnte in anderen Experimenten mit *Salmonella typhimurium* gezeigt werden, dass es in *cbl* zu erhöhten Ligandenbindungseffekten des Multienzymkomplexes kommt, wenn Arginin durch Leucin ersetzt wird (Kawasaki & Bauerle, 1987). Bei *Sbp* ist zu vermuten, dass es beim Austausch von Alanin zu Valin zu einer kaum bemerkbaren Änderung in der Struktur kommen wird. Beide Aminosäuren sind ähnlich klein, unpolar und neutral. Weiterhin ist in der Literatur nichts darüber bekannt, welche Auswirkungen die Mutation im *sbp*-Gen von Arg>Leu hat. Die gesteigerte Fitness bei einem *cysA* „knockout“ in einem von Sulfat und Thiosulfat freien Medium liegt auf der Hand. Auch kann nachvollzogen werden, dass *cbl* und *sbp* weiterhin funktionell bleiben. Beide Gene stehen nicht ausschließlich für den oben genannten ABC-Transporter zur Verfügung. Sie fungieren regulatorisch für weitere Operons und werden daher multifunktionell eingesetzt (Hellinga & Evans, 1985; van der Ploeg & Iwanicka-Nowicka, 1997, 1999).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich beim *cysA* „knockout“ um eine adaptive Mutation handeln könnte, da hier ein Vorteil für die XE2479 Population zu sehen ist. Für die „missense“ Mutationen von *cbl* und *sbp* ist eine Abschätzung schwieriger. Bei *cbl* liegt die Vermutung nahe, dass es zu einer adaptiven Mutation gekommen sein könnte. Weiterführende Experimente müssten klären, ob es auch bei dieser Mutation zu gesteigerten Effekten im Multienzymkomplex kommt. Bei der „missense“ Mutation in *sbp* wird es wohl kaum zu einer Veränderung in der Proteinstruktur kommen. Da aber die drei mutierten Gene im Zusammenhang mit dem Sulfatmangel stehen, kann spekuliert werden, dass es sich hier um eine „stress-induced mutation“ handelt (Ram & Hadany, 2014).

5.6.2 SNVs in YA2800-2 nach 130 Tagen

Für *S. cerevisiae* stehen keine Vergleichsdatensätze zur Verfügung wie bei *E. coli*. Somit konnte vorab nicht unterschieden werden, welche Mutationen ggf. der Kulturmethode oder der Natur des Symbioseexperiments zuzuordnen sind. Folgend werden fünf Gene von *S. cerevisiae* YA2800-2 besprochen, bei denen Mutationen aufgetreten sind (Tabelle 22).

Auffällig ist, dass es sich bei den ersten vier SNVs um zwei Gene handelt, welche jeweils eine Deletion aufweisen, aber zusätzlich eine Insertion. Damit bleiben die ORFs intakt und es gab keine bzw. minimale Änderungen der Proteinsequenz. Beim ersten Gen handelt es sich um **MRP1**, welches für das ribosomale Protein S37, die kleine ribosomale Untereinheit, codiert. Hier kam es zu einem degenerierten Codon, welches an der Position ein gleichbleibendes Alanin₂₁₁ zur Folge hatte. Diese Mutation sollte keine Folgen für das Protein haben. Anders verhält es sich beim **PUS2** Gen, welches für eine Pseudouridin-Synthase Uridin in tRNA zu Pseudouridin modifiziert. Hier kam es zu einer „*disruptive inframe deletion*“, zwei Triplets später gefolgt von einer „*disruptive inframe insertion*“. Dies hatte eine Deletion von Glutamin₁₆₂ und eine Insertion von Glutaminsäure₁₆₄ zur Folge. Ob es eine adaptive Mutation ist, kann nicht geklärt werden, da offen bleibt, welche Auswirkungen es auf die Proteinstruktur und Funktion haben könnte. Es kam somit zu einer Abänderung der Proteinsequenz. Ob dies die Gesamtstruktur des Proteins ändert, kann nur vermutet werden. In der Literatur gab es keine Hinweise darauf. Beide Gene/Proteine stehen nicht direkt in Verbindung mit dem Symbioseexperiment-Setup. Möglicherweise haben die auftretenden Mutationen mit der Kulturmethode zu tun, obgleich die Evidenz dafür fehlt.

IRC4 codiert für ein Protein, welches bei Bakterien Zelltod induziert und in niedriger Konzentration zur Sporulation führt. Dieses Protein entstammt dem Vorläuferprotein DfsB und wird „*sibling lethal factor*“ (Slf) genannt (Beer & Ariel, 2010). Slf konnte von Agarplatten aus den Zwischenräumen von *Paenibacillus dendritiformis* Einzelkolonien isoliert und aufgereinigt werden. Danach wurde es direkt auf eine Bakterienkolonie appliziert. Die Zellen in direkter Nähe starben ab und jene in einiger Entfernung sporulierten. In der Literatur gibt es keine Aussage darüber, ob *S. cerevisiae* ebenfalls Sfl sekretiert. Sfl konnte aber direkt aus *S. cerevisiae* aufgereinigt, kristallographisch untersucht und mit dem Sfl von *P. dendritiformis* verglichen werden. Identisches Sfl-Protein wurde nicht nur zwischen *P. dendritiformis* und *S. cerevisiae* festgestellt, auch bei *Clostridium difficile* sowie *Streptococcus sanguinis* und *Streptococcus gordonii* konnte es identifiziert und charakterisiert werden (Taylor & Taylor, 2016). Die NGS-Sequenzierung ergab ein „*knockout*“ des *IRC4* Gen durch ein „*frameshift_stop gained*“ (Tabelle 22). Es wurde beobachtet, dass *E. coli* XE2479 während des laufenden Symbioseexperiments mit *S. cerevisiae* YA2800-2 assoziiert (4.7.3, Abbildung 23b und c). Falls die Hefe Sfl sekretieren kann, entsteht ein Selektionsvorteil für die Hefen, bei denen *IRC4* inaktiviert ist. *E. coli* kann sich mit *S. cerevisiae* assoziieren, ohne abgetötet zu werden. Der Vorteil hieraus ist der direkte Austausch der benötigten Nahrungsmoleküle (hier: verwertbarer Phosphor für *S. cerevisiae*, Schwefel für *E. coli*), deren Konzentration in der Umgebung der sekretierenden Zelle am höchsten sein sollte. Es wäre sinnvoll, hier weitere *S. cerevisiae* Klone genetisch daraufhin zu untersuchen, ob sich der eventuelle „*knockout*“ in der Population

durchgesetzt hat. Falls dem so wäre, könnte dies ein Zwischenschritt für eine beginnende Endosymbiose darstellen.

Eine „*conservative inframe duplication*“ von 63 Basenpaaren wurde beim **MRN1-Gen** detektiert, das an der Zellwand-Biogenese und der Stressantwort beteiligt ist. Die Literatur gibt keine Auskunft darüber, welche Strukturänderungen oder welchen Einfluss diese Insertion auf die Funktionalität mit sich bringen kann. Es ist bekannt, dass Mrn1 ein RNA-bindendes Protein (RBP) ist, welches ein Genexpressionsprogramm kontrolliert, um Mitochondrien mit der Zellwand zu verlinken (Horn & Barrientos, 2008), und im Allgemeinen die Zellwandbiogenese reguliert. Generell ist solch ein RBP Target für Hunderte verschiedene mRNAs verantwortlich, welche posttranskriptionale Modifikationen durchführen können (Keene, 2007). Dies erlaubt schnelle Anpassung an wechselnde Wachstumsbedingungen oder akuten Stress (Harvey & Dezi, 2017; Miller & Brandt, 2018). Weiterhin ist bekannt, dass Mrn1⁺-Zellen besser mit Fermentation umgehen können als Mrn1⁻, welche besser an Zellrespiration adaptiert sind. Hinzu kommt, dass Mrn1⁻-Zellen vergrößerte Mitochondrien ausbilden, in Vorbereitung der verstärkten Zellatmung. Diese Anpassungen haben direkten Einfluss auf die Langlebigkeit und das Zellwachstum (Reynaud & Brothers, 2021). Weitere Untersuchungen konnten aufdecken, dass Mrn1 auch bei Hitzestress benötigt wird (Pélissier & Camougrand, 1995). Mikroskopische Untersuchungen während des Symbioseexperiments zeigten, dass es zu Teilungsproblemen bei den Hefen gekommen ist. Erst zum Ende hin sahen die Hefezellen wieder „gesünder“ aus, mit typischen Abschnürungen der Tochterzellen (4.7.3). Inwiefern Mrn1 direkt oder indirekt Einfluss hat, kann hier nur spekuliert werden, wobei mit dem oben genannten Vorwissen und den benannten Beobachtungen eine Korrelation gezogen werden könnte. Abschließend stellt sich die Frage, ob Mrn1 im Symbioseexperiment eine Rolle als Hitzeschockprotein einnimmt. Obgleich alle Experimente bei 37 °C durchgeführt worden sind, weist die Literatur daraufhin, dass es erst bei Temperaturen über 37 °C zu einer Hitzestressantwort kommt (Levin, 2005). Das Experiment wird im 37 °C Grenzbereich durchgeführt, welcher sicher Stress für den Organismus bedeutet, aber noch keinen Hitzeschock (Bresson & Shchepachev, 2020).

Abschließend ist auffällig, dass vier Gene der mutierten fünf Gene (*MRP1*, *PUS2*, *TIM54* und *MRN1*) direkt oder indirekt mit den Mitochondrien assoziiert sind. Das Symbioseexperiment fand unter aeroben Konditionen statt, daher könnte erwartet werden, dass es zu Adaptationen in mitochondrial assoziierten Genen kommt. Rückblickend können diese Anpassungen auf die Kulturmethode im Genematen zurückzuführen sein, wo die Zellsuspension durch die verwendete „*Airlift*“-Technologie sehr viel besser mit Sauerstoff versorgt wird als in einer klassischen Schüttelkultur (R. Mutzel, persönliche Mitteilung). Lediglich die Mutation im *IRC4*-Gen könnte zwanglos als Adaptation an das Symbioseexperiment betrachtet werden. Hier

kommt es zu einer gesteigerten Fitness, wenn sich *E. coli* XE2479 *S. cerevisiae* YA2800-2 annähern kann, ohne abgetötet zu werden.

5.6.3 SNVs im Phosphonatkryptogen in XE2479

In den laufenden Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass *E. coli* XE2479 Phosphonat als alleinige Phosphorquelle verstoffwechseln kann (4.6.2), auch ohne das transfizierte Plasmid mit dem ergänzenden *phnCDE* zu benötigen (Tabellen 5). Weiterführend hat die Literatur bestätigt, dass ein komplettes Phosphonatoperon inklusive des Kryptogens (*phnE*) in *E. coli* MG1655 existiert, welches unter Phosphatmangel nach Mutation aktiviert wird. Danach ist der Subtyp *E. coli* MG1655 in der Lage, Phosphonat zu verstoffwechseln (Wanner & Bolin, 1990).

Bei *phnE* handelt es sich um das Kryptogen, welches für eine Membranuntereinheit eines ABC-Transporters codiert ist. Standardmäßig liegt *phnE* in *E. coli* K12/MG1655/XE2479 im inaktiven Zustand vor und kann mit einer „*phase variation*“ Mutation aktiviert werden (Wanner, 1994). Das *phnE* Gen (*E. coli* K12/MG1655) beinhaltet ein „*triple octamer repeat*“. Durch dieses entsteht ein „*frameshift*“, und ein verfrühtes Stop Codon (*206) wird generiert. Daher kann der ABC-Transporter nicht transkribiert/translatiert werden (Phn⁻). Im Vergleich dazu sind *E. coli* B Stämme von Natur aus Phn⁺ (Abbildung 30) (Iqbal & Parker, 2004; Makino & Kim, 1991).

Motiv	A*****B*****B*****	
K12 (XE2479)	451-CCGTTTCGCTGGCGTGCTGGCGTGCTGGCGTGCTTTATCCA-490	XE2479 Phn ⁻ (präevolution)
B1	451-CCGTTTCGCTGGCGTGCTGGCG-----CTGTTTATCCA-482	XE2479 Phn ⁺ (postevolution)

Abbildung 30: Variation der *phnE* Gene von verschiedenen *E. coli* Isolaten (links), inkl. der erwarteten XE2479 Sequenz vor und nach dem Genmatenexperiment (rechts). Das Motiv repräsentiert den „*triple octamer repeat*“.

Mit diesem Vorwissen wäre zu erwarten gewesen, dass für XE2479 am Tag 130 eine Deletion von acht Basenpaaren an der Position 572-600 (*phnE* ORF) zu detektieren ist. Dieser INDEL (5'-TGCTGGCG) hätte eine Auflösung des „*frameshift*“ nach sich gezogen, und somit wäre XE2479 Phn⁺ (Abbildung 30). Dennoch konnte solch ein „*frameshift*“ in der Variantenanalyse nicht detektiert werden. In der Literatur wird ein Phänomen beschrieben, dass *E. coli* K12/MG1655 unter Phosphatmangel beim Eintreten in die stationäre Phase Organophosphate ansammelt. Wenn dann die ersten Mikroorganismen durch Auflösen des „*frameshifts*“ PhnE⁺ sind, können diese über den Phosphonattransporter auch Organophosphate abgeben. Diese abgegebenen Organophosphate stehen nun noch nicht evolvierten *E. coli* zur Verfügung. Somit könnte es zur Ausbildung einer Mischpopulation mit PhnE⁺ und PhnE⁻ *E. coli* kommen. Auch bei vermehrten Passagen unter serieller Verdünnung blieb die Mischkultur erhalten. Da wir bei der Sequenzierung von *E. coli* XE2479 keine Deletion (5'-ABB → 5'-AB) detektieren

konnten, ist zu vermuten, dass ein PhnE⁻ Klon aus der Mischkultur ausgewählt worden sein könnte. Dieses Phänomen der Mischkultur wurde bereits bei anderen Experimenten festgestellt (Guillemet & Moreau, 2012).

Das „*cross-feeding*“ von Organophosphaten und Phosphonaten zwischen PhnE⁻ und PhnE⁺ könnte essenziell für eine phosphatlimitierte (P_i) *E. coli*-Population sein. Es würde das Überleben dieser Population über einen kurzen Zeitraum sichern, wenn unterschiedliche Phosphorquellen genutzt werden, oder sogar die Verbreitung dieser Population unterstützen. Da es sich um eine reversible „*phase variation*“ handelt, erhöht sich die Fitness wieder, sobald sich die Gesamtpopulation in einer nicht P_i-limitierten Umgebung befindet. Das schnelle Anpassen mit einem alternativen Biosyntheseweg sichert die genetische Vielfalt einer Mikroorganismenpopulation (Iqbal & Parker, 2004).

6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass zwischen den Mikroorganismen *Escherichia coli* XE2479 und *Saccharomyces cerevisiae* YA2800-2 eine obligate Syntrophie erzeugt werden kann. Dies war die Voraussetzung für eine experimentelle Evolution im Genematen, im chemisch definierten Medium. Während der Langzeitkokultur konnten zwei adaptive Prozesse beobachtet werden, welche sich in einem gesteigerten Mediumverbrauch zeigten. Dies spiegelte sich auch in den verkürzten Generationszeiten beider Organismen aus der Kokultur wider. Während der Kultivierung und am Ende konnten die Mikroorganismen analysiert werden, welche sich am besten der erzwungenen Syntrophie angepasst hatten. Als einen kritischen Zeitpunkt für das Symbioseexperiment wurde die metabolische Anpassung von dem Bakterium XE2479 an Phosphonat als alleinige Phosphorquelle nach einer 6-7-tägigen Hungerphase festgestellt. Obgleich das Plasmid die ergänzenden Informationen für den Phosphonatstoffwechsel kodierte, war dieses nach 10-14 Tagen nicht mehr nachweisbar. Es zeigte sich, dass *E. coli* XE2479 doch ein vollständiges Phosphonatoperon innehielt, inklusive dem *phnE*-Kryptogen. Das Vorhandensein eines vollständigen *phn*-Operons bestätigte sich auch im Ausgangsstamm XE2096, welcher kein ergänzendes Plasmid enthielt, dennoch nach 7 Tagen mit Phosphonat als alleinige Phosphorquelle wachsen konnte (Metcalf & Wanner, 1993). Dieser Umstand wurde weiter nicht hinterfragt, weil es das eigentliche Symbioseexperiment nicht weiter beeinflusste. Sobald aber die Umstellung auf die neue Phosphorquelle erfolgreich war, gab es fortführend keine weiteren Probleme mit der Kokultur. Während des Verlaufs der Kokultur konnten phänotypische Veränderungen der Mikroorganismen unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die filamentösen *E. coli* und unregelmäßigen geformten *S. cerevisiae* konnten auf Zellstress zurückgeführt werden (Adler & Hardigree, 1965; Claro & Rijsbrack, 2007). Ausschlaggebend waren dafür die limitierten Schwefel- und Phosphorressourcen und die sich daraus ergebende Mangelsituation. Mit fortschreitender Kokultur konnte beobachtet werden, dass sich *E. coli* Zellen an Hefezellen anlagerten. Auch verbesserte sich das phänotypische Erscheinungsbild. Jedoch zeigte sich am Ende des Symbioseexperiments, dass die Bakterien/Hefe-Komplexe wieder separierten. Die sich anschließende Genomanalyse konnte teilweise Aufschluss zu den mikroskopischen Daten geben.

Bei *E. coli* XE2479 konnten sechs Mutationen detektiert werden. Vier waren „synonyme“ bzw. „missense“-Varianten. Es kann hier bei *casD*, *cbl*, *priB* und *sbp* davon ausgegangen werden, dass es zu keinen maßgeblichen Änderungen in der Proteinstruktur oder im Verhalten gekommen ist. Wobei *cbl* und *sbp* direkt mit dem *cys*-Regulon assoziiert sind (Iwanicka-Nowicka & Hryniewicz, 1995). Für *cysA*, eine ATP bindende Untereinheit eines Sulfat/Thiosulfat ABC-Transporter, wurde eine 12 Basen „inframe“-Deletion festgestellt. Des

Weiteren wurde wahrscheinlich ein knockout durch ein eingefügtes „stop“ am Anfang des *rpoS*-Gen detektiert. Der RpoS Sigmafaktor reguliert die allgemeine Stressantwort und Biofilmassoziation, in der stationären Phase (Mandel & Silhavy, 2005; Smith & Price, 2017). Beim Hefe Evolat YA2800-2 konnten ebenfalls sechs Mutationen detektiert werden. Synonyme Mutationen für die Gene *MRP1* und *TIM54* sowie ein Triplett-Deletion und Triplett-Insertion, aber an unterschiedlichen Positionen für *PUS2*. Hier könnte davon ausgegangen werden, dass dies keinen Einfluss auf Proteinfunktionalität hatte. Bei *MRN1* gab es eine „inframe“-Insertion von 21 Aminosäuren. Die Auswirkungen hierzu können nicht abgeschätzt werden, weil in der Literatur keine weiteren Informationen zu finden sind. Ein vermutlicher „Knockout“ durch einen „frameshift und stopp lost“ konnte beim *IRC4*-Gen beobachtet werden (Tabelle 22). Das *IRC4*-Gen kodiert für einen „lethal factor“, welcher artfremde Organismen in der Umgebung der Hefe abtötet. Es könnte sein, dass XE2479 durch eine Hefe mit einem intakten *IRC4* geschädigt wird, wenn *E. coli* der Hefe zu nahe kommt. Vielleicht ist durch Inaktivierung von *IRC4* eine räumliche Assoziation möglich geworden. Beide Mikroorganismen könnten durch die nun ermöglichte Assoziation effektiver Nahrungsmoleküle austauschen. Dies könnte einen erheblichen Selektionsvorteil gegenüber den anderen Mikroorganismen in der Kokultur darstellen, welche sich nicht räumlich miteinander assoziieren können.

Abschließend wurde ermittelt, dass es zu keinem Zeitpunkt der Experimente im Genematen zu einer Emanzipation von einem der beiden Mikroorganismen kam. Die Hypothese hierzu ist widerlegt worden. Mit den vorliegenden Ergebnissen wurde die erste Hypothese bestätigt, dass es zu einer Assoziation der Mikroorganismen kommt. Dies kann als ein Schritt in Richtung Endosymbiose betrachtet werden.

In der Retrospektive ergibt sich die Frage, warum sich *E. coli* wieder von *S. cerevisiae* dissoziiert, obgleich die räumlich Nähe einen Vorteil ergeben könnte. Sollte der Grund eine gesteigerte Konzentration an Sulfit im Medium sein, wäre dies durch einen Agardiffusionstest analysierbar. Weiterhin stellt sich die Frage, ob ähnliche Mutationen bei der Genomanalyse beim zweiten Experiment auftreten, im Vergleich zum ersten Experiment. Auch ist es interessant zu wissen, ob es beim Weiterführen des Symbioseexperiments über mehrere tausend Generationen zu einer Eusymbiose kommt.

Aus dem Durcharbeiten der Forschungsergebnisse ergibt sich die Frage, ob es wirklich zu einer Inaktivierung vom *cysA*-Gen gekommen ist. Die Literatur gibt Hinweise darauf, dass es durch Verdoppelungen oder Deletionen zu evolutionären Veränderungen in den *abc*-Genen der Transporter kommen kann, welche in der Tat zum Ausschalten, aber auch zur Weiterentwicklung von Genen beitragen (Michael & Karobi, 2011). Zusätzlich stellt sich die Frage, in welcher Reihenfolge die Mutationen aufgetreten sind (Kinetik). Es spielt dahingehend

eine Rolle, da *rpoS* sowie auch ABC-systeme (hier *cysA*) kontrollierende Funktionen bei der DNA-Reparatur aufweisen (Lacour & Landini, 2004; Thiagalingam & Grossman, 1993). Könnte die Inaktivierung beider Gene nachfolgend eine erhöhte Mutationsrate hervorrufen? Weitere Fragen, ausgehend von *rpoS* und *cysA*, ergeben sich im Zusammenhang mit der Cysteinbiosynthese. Eine Inaktivierung von *rpoS* hat direkten Einfluss auf das Metabolisieren von Cystein aus den alternativen Schwefelquellen Acetyl-CoA und Serin. Durch einen „Knockout“ von *rpoS* kommt es zu einer verringerten Hochregulierung von *cysEK*, welche den ersten Schritt der Serin und AcetylCoA Aktivierung kodiert (Rahman & Hasan, 2006). Ist dies eine Koinzidenz oder steht die *rpoS*-Mutation doch im direkten Zusammenhang mit der Cysteinbiosynthese? *CysA* hingegen wird nicht nur auch als Transporter für Sulfat/Thiosulfat beschrieben, sondern auch für Sulfit (Kredich, 2008). Es gibt zusätzlich ausreichend Hinweise, dass ABC-Transporter ebenfalls für Effluxreaktionen verantwortlich sind (Davidson & Chen, 2004). Würde eine Inaktivierung von *cysA* die Sulfitkonzentration intrazellulär erhöhen? Würde es generell Ressourcen einsparen, indem nicht mehr benötigte Stoffwechselwege deletiert werden?

Die Erkenntnisse im Zusammenhang mit dem *IRC4*-„Knockout“ sollten zum Anlass genommen werden, weiterführende Forschungen durchzuführen. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von *IRC4* und der räumlichen Annäherung von den Mikroorganismen, oder handelt es sich um Koinzidenz?

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, E. & Chain, E. (1941). Further observation on penicillin. *The Lancet*, 238, 177–189.
- Adler, H. & Hardigree, A. (1965). Growth and Division of Filamentous Forms of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 90, 223–226.
- Agar, W. E. (1931). A Lamarckian experiment involving a hundred generations with negative results. *Journal of Experimental Biology*, 8, 95–107.
- Al Mamum, A. & Lombardo, M. (2012). Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks. *Science*, 338, 1344–1348.
- Alam, A. U. & Bishop, S. H. (1969). Growth of *Escherichia coli* on some organophosphonic acids. *Canadian Journal of Microbiology*, 15, 1043–1046.
- Allen, G. C. & Kornberg, A. (1993). Assembly of the primosome of DNA replication in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 19204–19209.
- Alsam, S. & Jeong, S. R. (2006). *Escherichia coli* interactions with Acanthamoeba: a symbiosis with environmental and clinical implications. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 689–694.
- Barnhart, M. M. & Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60, 131–147.
- Bary, A. (1879). *Die Erscheinung der Symbiose*. Strassburg, Germany: Karl J. Trubner.
- Baumgardt, J. (2006). *Analyse von adaptationsprozessen in einem mikrobiellen Räuber-Beute-System in kontinuierlicher Kultur*. Freie Universität Berlin.
- Beaudry, A. A. & Joyce, G. F. (1992). Directed evolution of an RNA enzyme. *Science*, 257, 635–641.
- Beer, A. & Ariel, G. (2010). Lethal protein produced in response to competition between sibling bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 6258–6263.
- Behm-Ansmant, I. & Branlant, C. (2007). The *Saccharomyces cerevisiae* Pus2 protein encoded by YGL063w ORF is a mitochondrial tRNA: psi27/28-synthase. *RNA*, 13, 1641–1647.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62, 293–300.
- Biemer, J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the kirby-bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 3, 135–140.
- Blattner, F. & Plunkett, G. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 1453–1462.
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4.

- Bonev, B. & Hooper, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*, 1295–1301.
- Bornscheuer, U. & Altenbuchner, J. (1998). Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. *Biotechnology and Bioengineering*, *58*, 554–559.
- Botstein, D. & Fink, G. R. (2011). Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*, *189*, 695–704.
- Bresson, S. & Shchepachev, V. (2020). Stress-induced translation inhibition through rapid displacement of scanning initiation factors. *Molecular Cell*, *80*, 470–484.
- Brinton, C. C. (1959). Non-flagellar appendages of bacteria. *Nature*, *183*, 782–786.
- Brouns, S. J. & Jore, M. M. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, *321*, 960–964.
- Bryson, V. & Szybalski, W. (1952). Microbial Selection. *Science*, *116*, 45–51.
- Cadman, C. J. & Lopper, M. (2005). PriB stimulates PriA helicase via an interaction with single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 39693–39700.
- Chao, L. & Ramsdell, G. (1985). The effects of wall populations on coexistence of bacteria in the liquid phase of chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*, *131*, 1229–1236.
- Chen, C. M. (1990). Molecular biology of carbon-phosphorus bond cleavage. Cloning and sequencing of the *phn* (*psiD*) genes involved in alkylphosphonate uptake and C-P lyase activity in *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, *265*, 4461–4471.
- Claro, F. B. & Rijsbrack, K. (2007). Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *Journal of Applied Microbiology*, *102*, 693–700.
- Cobey, F. A. & Handler, P. (1956). Sulfite metabolism in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *19*, 324–327.
- Cooper & Lenski. (2010). Experimental evolution with *E. coli* in diverse resource environments. I. Fluctuating environments promote divergence of replicate populations. *BMC Evolutionary Biology*, *10*, 11.
- Cooper, K. E. & Woodman, D. (1946). The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *Journal of Pathology and Bacteriology*, *58*, 75–84.
- Dallinger & Huxley. (1878). I. On the life-history of a minute septic organisms with an account of experiments made to determine its thermal death point. *Proceedings of the Royal Society of London*, *27*, 332–350.
- Darwin, C. & Murray, J. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or, The preservation of favoured races in the struggle for life*. London: John Murray.

- Davidson, A. L. & Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 241–268.
- Davis, B. D. & Dulbecco, R. (1968). *Principles of microbiology and immunology*. London: Harper & Row.
- Diderichsen, B. (1980). *flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 141, 858–867.
- Dobzhansky, T. (1938). *Genetics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- Dobzhansky, T. & Queal, M. L. (1938). *Genetics of natural populations. I. Chromosome variation in populations of Drosophila pseudoobscura inhabiting isolated mountain ranges*. New York: Columbia University Press.
- Donalies, U. E. & Stahl, U. (2002). Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSU1*. *Yeast*, 19, 475–484.
- Ebert, D. (1998). Experimental evolution of parasites. *Science*, 282, 1432–1435.
- Eichhorn, E. & van der Ploeg, J. R. (2000). Deletion analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transport systems. *Journal of Bacteriology*, 182, 2687–2695.
- Elbing, K. L. & Brent, R. (2019a). Growth of *E. coli* in Liquid Medium. *Current Protocols in Molecular Biology*, 125, 81.
- Elbing, K. L. & Brent, R. (2019b). Growth of *E. coli* on Solid Media. *Current Protocols in Molecular Biology*, 125, 82.
- Elsworth, R. & Herbert, D. (1956). The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *Journal of General Microbiology*, 14, 601–622.
- Enright, M. C. & Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7, 482–487.
- Ephrussi, B. (1949). Action de l'acri flavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 351–357.
- Errington, P. L. (1946). Predation and Vertebrate Populations. *The Quarterly Review of Biology*, 21, 144–177.
- Erwin, D. H. & Valentine, J. W. (2013). *The Cambrian explosion. The construction of animal biodiversity*. Colorado: Roberts & Company.
- Eydallin, G. & Liu, B. (2017). Natural *Escherichia coli* isolates rapidly acquire genetic changes upon laboratory domestication. *Microbiology*, 163, 22–30.
- Feldmann, H. & Branduardi, P. (2012). *Yeast. Molecular and cell biology*. Weinheim: Wiley-Blackwell.
- Fisher, R. A. (1922). *The genetical theory of natural selection*. Clarendon: Proceedings of the Royal Society of Edinburgh.

- Fisher, C. R. (1969). Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 34, 306–310.
- Fittkau, K. H. (2021). *Statistik mit „R“ für Nicht-Mathematiker. Praktische Tipps für die quantitativ-empirische Bachelor-, Master- und Doktorarbeit*. Wiesbaden, Heidelberg: Springer Gabler.
- Fotadar, U. & Zaveloff, P. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 403–404.
- Francis, J. C. & Hansche, P. E. (1973). Directed evolution of metabolic pathways in microbial populations II. a repeatable adaptation in *S. cerevisiae*. *Genetics*, 74, 259–265.
- Frank, A. B. & Leunis, J. (1877). *Synopsis der Pflanzenkunde*. Hannover: Hahn.
- Futuyma, D. J. (2013). *Evolution* (3. ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Galgiani, J. N. & Stevens, D. A. (1976). Antimicrobial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10, 721–728.
- Garland, T. & Rose, M. R. (2009). *Experimental evolution: concepts, methods, and applications of selection experiments*. California: University of California Press.
- Gasteiger, E. & Gattiker, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31, 3784–3788.
- Gildenhuys, P. (2019). *Natural Selection* (Winter 2019 Edition). Stanford: The Stanford Encyclopedia of Philosophy.
- Goffeau, A. & Barrell, B. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546, 563-7.
- Gould, S. J. & Eldredge, N. (1977). Punctuated equilibria: the tempo and mode of evolution reconsidered. *Paleobiology*, 3, 115–151.
- Gueldener, U. & Heinisch, J. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 30, 23.
- Guillemet, M. L. & Moreau, P. L. (2012). Activation of the cryptic PhnE permease promotes rapid adaptive evolution in a population of *Escherichia coli* K-12 starved for phosphate. *Journal of Bacteriology*, 194, 253–260.
- Hall, B. G. & Yokoyama, S. (1983). Role of cryptic genes in microbial evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 1, 109–124.
- Hamao, U. & Masahiro, U. (1957). Production and isolation of a new antibiotic, kanamycin. *The Journal of Antibiotics, Series a*, 10, 181–188.
- Hansen, E. C. (1895). Experimental studies on the variation of Yeast-cells. *Annals of Botany*, 9, 549–560.
- Harvey, R. & Dezi, V. (2017). Post-transcriptional control of gene expression following stress: the role of RNA-binding proteins. *Biochemical Society Transactions*, 45, 1007–1014.

- Hellbrück, R. P. (2016). *Angewandte Statistik mit R. Eine Einführung für Ökonomen und Sozialwissenschaftler* (Lehrbuch, 3. Auflage). Wiesbaden: Springer Gabler.
- Hellinga, H. W. & Evans, P. R. (1985). Nucleotide sequence and high-level expression of the major *Escherichia coli* phosphofructokinase. *European Journal of Biochemistry*, *149*, 363–373.
- Henderson, I. R. (1999). Molecular switches: The ON and OFF of bacterial phase variation. *Molecular Microbiology*, *33*, 919–932.
- Herbert, S. (1864). *A System of Synthetic Philosophy*. Lausanne: Universität Lausanne.
- Hergert, W. & Wriedt, T. (2012). *The Mie Theory. Basics and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Horn, D. & Barrientos, A. (2008). Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life*, *60*, 421–429.
- Horvath, P. & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, *327*, 167–170.
- Hryniewicz, M. & Sirko, A. (1990). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *Journal of Bacteriology*, *172*, 3358–3366.
- Huang, C. J. & Lu, M. Y. (2018). Experimental Evolution of Yeast for High-Temperature Tolerance. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1823–1839.
- Hudzicki, J. (2009). *Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol*. Washington: American Society for Microbiology.
- Hungate, R. & Macy, J. (1973). *The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes*.
- Huxley, J. (1942). Evolution. The Modern Synthesis. *Evolution. the Modern Synthesis*.
- Iqbal & Parker. (2004). Reversible phase variation in the *phnE* gene, which is required for phosphonate metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *186*, 6118–6123.
- Iserentant, D. (1996). Practical aspects of yeast flocculation. *Belgian Journal of Brewing and Biotechnology*, *21*, 30–33.
- Iwanicka-Nowicka, R. & Hryniewicz, M. M. (1995). A new gene, *cbl*, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli* *cys*-regulon. *Gene*, *166*, 11–17.
- Jackson, R. & Golden, S. (2014). Structural biology. Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science*, *345*, 1473–1479.
- Jacobson, B. L. & He, J. J. (1991). Engineered interdomain disulfide in the periplasmic receptor for sulfate transport reduces flexibility. Site-directed mutagenesis and ligand-binding studies. *Journal of Biological Chemistry*, *266*, 5220–5225.

- Jander, G. & Blasius, E. (1995). *Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum. (einschliesslich der quantitativen Analyse) ; mit 61 Tabellen* (14., neu bearb. Aufl.). Stuttgart, Leipzig: Hirzel.
- Jeon, K. W. (2004). Genetic and physiological interactions in the amoeba-bacteria symbiosis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, 502–508.
- Jimenez, A. & Davies, J. (1980). Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, 287, 869–871.
- Jordan, E. O. & Burrows, W. (1946). *Textbook of bacteriology*. Philadelphia & London: W. B. Saunders Company.
- Kanehisa, M. & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 27–30.
- Kashiwagi, K. & Miyaji, A. (1992). Increase of sensitivity to aminoglycoside antibiotics by polyamine-induced protein (oligopeptide-binding protein) in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174, 4331–4337.
- Kawasaki, H. & Bauerle, R. (1987). Site-specific mutagenesis of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium*. Changing arg179 to leu alters the reciprocal transmission of substrate-induced conformational changes between the alpha and beta 2 subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 10678–10683.
- Kawecki, T. & Lenski, R. (2012). Experimental evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, 547–560.
- Keene, J. D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature Reviews Genetics*, 8, 533–543.
- Kerscher, O. & Holder, J. (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *Journal of Cell Biology*, 139, 1663–1675.
- Kimoto, M. & Yamashige, R. (2013). Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nature Biotechnology*, 31(5), 453–457.
- Kimura, M. (1968a). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217, 624–626.
- Kimura, M. (1968b). Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genetical Research*, 11, 247–269.
- Kirkpatrick, C. & Maurer, L. M. (2001). Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183, 6466–6477.
- Koboldt, D. C. & Chen, K. (2009). VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*, 25, 2283–2285.
- Kredich, N. M. (2008). Biosynthesis of Cysteine. *EcoSal Plus*, 3.
- Kubitschek, H. E. (1970). *Introduction to research with continuous cultures* (Biological techniques series, 1. print). Englewood Cliffs, N. J.: Prentice-Hall.

- Lacour, S. & Landini, P. (2004). SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *Journal of Bacteriology*, 186, 7186–7195.
- Laland, K. N. & Uller, T. (2015). The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proceedings. Biological Sciences*, 282, 20151019.
- Lederberg, J. & Lino, T. (1956). Phase Variation in *Salmonella*. *Genetics*, 41, 743–757.
- Lee, K. S. (1992). Evidence for two phosphonate degradative pathways in *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 174, 2501–2510.
- Lenski, R. E. (1991). Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *The American Naturalist*, 138, 1315–1341.
- Lenski, R. E. & Travisano, M. (1994). Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 6808–6814.
- Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 262–291.
- Lewis, D. H. (1973). Concepts in fungal nutrition and the origin of Biotrophy. *Biological Reviews*, 48, 261–277.
- Li, H. & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754–1760.
- Linton, K. J. & Higgins, C. F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Molecular Microbiology*, 28, 5–13.
- Liu, J. & Nurse, P. (1996). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. III. PriB facilitates complex formation between PriA and DnaT. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 15656–15661.
- Long, A. & Liti, G. (2015). Elucidating the molecular architecture of adaptation via evolve and resequence experiments. *Nature Reviews Genetics*, 16, 567–582.
- Lukens, L. N. & Buchanan, J. M. (1959). Biosynthesis of the Purines. *Journal of Biological Chemistry*, 234, 1799–1805.
- Luria, S. E. & Burrous, J. W. (1957). Hybridization between *E. coli* and *Shigella*. *Journal of bacteriology*, 74, 461–476.
- Madigan, M. T. & Bender, K. S. (2022). *Brock biology of microorganisms* (Sixteenth edition, global edition). Harlow: Pearson Education Limited.
- Makino, K. & Kim, S. (1991). Molecular analysis of the cryptic and functional *phn*-operons for phosphonate use in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 173(8), 2665–2672.
- Mandel, M. J. & Silhavy, T. J. (2005). Starvation for different nutrients in *Escherichia coli* results in differential modulation of RpoS levels and stability. *Journal of Bacteriology*, 187, 434–442.

- Margulis, L. (1981). *Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth*. United States: W. H. Freeman.
- Marlière, P., Patrouix, J., Döring, J., Herdewiin, P., Tricot, S., Cruveiller, S., Bouzon, M. & Mutzel, R. (2011). Chemical Evolution of a Bacterium's Genome. *Angewandte Chemie*, 123, 7247–7252.
- Martini, A. (1993). Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*, 4, 165–176.
- McKenna, A. & Hanna, M. (2010). The genome analysis toolkit: a map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20, 1297–1303.
- Metcalf, W. W. & Wanner, B. L. (1993). Evidence for a fourteen-gene, phnC to phnP locus for phosphonate metabolism in *Escherichia coli*. *Gene*, 129, 27–32.
- Michael, D. & Karobi, M. (2011). Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease. *1437-4315*, 29–37.
- Michael, F. & Oliver, S. (1991). Culture Systems. In *Saccharomyces* (pp. 249–282). Springer, Boston, MA.
- Middleton, A. R. (1915). Heritable variations and the results of selection in the fission rate of *Stylonychia pustulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1, 616–621.
- Miller, D. & Brandt, N. (2018). Systematic identification of factors mediating accelerated mRNA degradation in response to changes in environmental nitrogen. *PLOS Genetics*, 14, 1007406.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371–394.
- Monod, J. (1950). Technique, Theory and Applications of Continuous Culture. *Ann. Inst. Pasteur*, 79, 390–410.
- Monod, J. (1970). *Le Hasard et la nécessité*. Paris: Seuil.
- Mutzel, R. & Marlière, P. (2010). Methoden & Anwendungen. Experimentelle Evolution in vivo in kontinuierlicher Suspensionskultur. *BioSpektrum*, 16, 660–662.
- Myers, A. M. & Crivellone, M. D. (1987). Assembly of the mitochondrial membrane system. *MRP1* and *MRP2*, two yeast nuclear genes coding for mitochondrial ribosomal proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 3388–3397.
- Ng, J. Y. & Marians, K. J. (1996). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. I. Isolation and identification of intermediate protein-DNA complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 15642–15648.
- Novick, A. & Sziliard, L. (1950). Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36, 708–719.

- Odum, H. T. (1983). *Systems ecology; An introduction*. New York, NY: John Wiley and Sons.
- Orskov, F. & Orskov, I. (1979). Form variation in *Escherichia coli* K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*, *149*, 669–685.
- Park, H. & Bakalinsky, A. T. (2000). *SSU1* mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *16*, 881–888.
- Patten, C. L. & Kirchhof, M. G. (2004). Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Genetics and Genomics*, *272*, 580–591.
- Pearl, R. (1915). Seventeen Years Selection of a Character Showing Sex-Linked Mendelian Inheritance. *The American Naturalist*, *49*, 595–608.
- Pélissier, P. & Camougrand, N. (1995). NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the Fo-F1 ATP synthase of *S. cerevisiae*. *Current Genetics*, *27*, 409–416.
- Pigliucci, M. (2010). *Evolution, the Extended Synthesis* (The MIT Press Ser). Cambridge: MIT Press.
- Ponomarova, O. & Gabrielli, N. (2017). Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow. *Cell Systems*, *5*, 345-357.e6.
- Pratt, J. R. & Mouillon, J. M. (2004). Effects of methylphosphonate, a phosphate analogue, on the expression and degradation of the high-affinity phosphate transporter Pho84, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, *43*, 14444–14453.
- Rahman, M. & Hasan, M. R. (2006). Effect of *rpoS* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, *94*, 585–595.
- Ram, Y. & Hadany, L. (2014). Stress-induced mutagenesis and complex adaptation. *Proceedings. Biological Sciences*, *281*, 1792.
- Reaume, S. E. & Tatum, E. L. (1949). Spontaneous and nitrogen mustard-induced nutritional deficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry*, *22*, 331–338.
- Reed, S. C. & Reed, E. W. (1948). Natural Selection in Laboratory Populations of *Drosophila*. *Evolution*, *2*, 176.
- Reynaud, K. & Brothers, M. (2021). Dynamic post-transcriptional regulation by *MRN1* links cell wall homeostasis to mitochondrial structure and function. *PLOS Genetics*, *17*, 1009521.
- Rhine, J. B. & McDougall, W. (1933). Thrid report on a Lamarckian experiment. *British Journal of Psychology. General Section*, *24*, 213–235.
- Richins, R. D. (1997). Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nature Biotechnology*, *15*, 984–987.

- Ridley, M. (2011). *Evolution* (3. ed., [Nachdr.]. Malden, Mass.: Blackwell.
- Roman, H. (1956). Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21, 175–185.
- Roossinck, M. J. (2005). Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 917–924.
- Ryan, F. (2002). *Darwin's Blind Spot: Evolution Beyond Natural Selection*. Massachusetts: Houghton Mifflin Harcourt.
- Salt, G. & Gray, J. (1934). Experimental studies in insect parasitism. I.—Introduction and technique. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 114, 450–454.
- Sapp, J. (1994). *Evolution by Association. A History of Symbiosis*. Cary: Oxford University Press Incorporated.
- Shendure, J. & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26, 1135–1145.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 350, 3–41.
- Siegel, P. B. (1962). A double selection experiment for body weight and breast angle at eight weeks of age in chickens. *Genetics*, 47, 1313–1319.
- Silver, J. M. & Eaton, N. R. (1969). Functional blocks of the *ad1* and *ad2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 34, 301–305.
- Silverman, M. & Zieg, J. (1979). Flagellar-phase variation: isolation of the *rh1*-gene. *Journal of Bacteriology*, 137, 517–523.
- Simpson, J. T. & Wong, K. (2009). ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research*, 19, 1117–1123.
- Sirko, A. & Hryniewicz, M. (1990). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. *Journal of Bacteriology*, 172, 3351–3357.
- Sirko, A. & Zatyka, M. (1995). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4134–4136.
- Sirrenberg, C. & Bauer, M. F. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, 384, 582–585.
- Smirnov, M. N. (1967). Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27, 299–304.
- Smith. (1970). Natural selection and the concept of a protein space. *Nature*, 225, 563–564.
- Smith, D. R. & Price, J. E. (2017). The production of curli amyloid fibers is deeply integrated into the biology of *Escherichia coli*. *Biomolecules*, 7, 412.

- Soo, V. W. C. & Wood, T. K. (2013). Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. *Scientific Reports*, 3, 3186.
- Stasi, R. & Neves, H. I. (2019). Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiology*, 19, 79.
- Stemmer, W. P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370, 389–391.
- Sutcliffe, J. G. (1978). Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75, 3737–3741.
- Szathmáry, E. & Smith, J. M. (1995). The major evolutionary transitions. *Nature*, 374, 227–232.
- Szymanski, M. R. & Jezewska, M. J. (2011). Binding of two PriA-PriB complexes to the primosome assembly site initiates primosome formation. *Journal of Molecular Biology*, 411, 123–142.
- Takemura, M. (2001). Poxviruses and the origin of the eukaryotic nucleus. *Journal of Molecular Evolution*, 52, 419–425.
- Taylor, J. D. & Taylor, G. (2016). Structures of the DfsB Protein Family Suggest a Cationic, Helical Sibling Lethal Factor Peptide. *Journal of Molecular Biology*, 428, 554–560.
- Thiagalingam, S. & Grossman, L. (1993). The multiple roles for ATP in the *Escherichia coli* UvrABC endonuclease-catalyzed incision reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 18382–18389.
- Tsuchiya, H. M. & Drake, J. F. (1972). Predator-prey interactions of *Dictyostelium discoideum* and *Escherichia coli* in continuous culture. *Journal of Bacteriology*, 110, 1147–1153.
- Ugolini, S. & Bruschi, C. V. (1996). The red/white colony color assay in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: epistatic growth advantage of white *ade8-18, ade2* cells over red *ade2* cells. *Current Genetics*, 30, 485–492.
- Uria-Nickelsen, M. R. & Leadbetter, E. R. (1994). Comparative aspects of utilization of sulfonate and other sulfur sources by *Escherichia coli* K12. *Archives of Microbiology*, 161, 434–438.
- Van der Ploeg, J. R. & Eichhorn, E. (2001). Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 176, 1–8.
- Van der Ploeg, J. R. & Iwanicka-Nowicka, R. (1997). Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the *tauABCD* operon and other sulfate starvation-inducible genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179, 7671–7678.
- Van der Ploeg, J. R. & Iwanicka-Nowicka, R. (1999). The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 29358–29365.

- Van Dien, S. J. (1997). Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in *Escherichia coli* for investigation of phosphate secretion from the cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1689–1695.
- Wackett, L. P. & Shames, S. L. (1987). Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *Journal of Bacteriology*, 169, 710–717.
- Wade, M. J. & Kalisz, S. (1990). The cause of natural selection. *Evolution*, 44, 1947–1955.
- Walk, S. T. & Alm, E. W. (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6534–6544.
- Wanner, B. L. (1994). Molecular genetics of carbon-phosphorus bond cleavage in bacteria. *Biodegradation*, 5, 175–184.
- Wanner, B. L. & Boline, J. A. (1990). Mapping and molecular cloning of the *phn* (*psiD*) locus for phosphonate utilization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172, 1186–1196.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737–738.
- Weber, H. & Polen, T. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187, 1591–1603.
- Wehrens, M. & Ershov, D. (2018). Size Laws and Division Ring Dynamics in Filamentous *Escherichia coli* cells. *Current Biology*, 28, 972-979.
- Wells, H. G. & Huxley, J. (1931). *The Science of Life*. London: Cassell.
- Whitfield, P. (1979). *The biology of parasitism. An introduction to the study of associating organisms* (Contemporary biology). Baltimore: University Park Press.
- Wilkinson, D. M. (2001). At cross purposes. *Nature*, 412, 485.
- Windgassen, T. A. & Wessel, S. R. (2018). Mechanisms of bacterial DNA replication restart. *Nucleic Acids Research*, 46, 504–519.
- Woods, R. A. (1969). Response of *ad-2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to carbon dioxide. *Molecular & General Genetics : MGG*, 105, 314–316.
- Yoo, B. H. (1980). Long-term selection for a quantitative character in large replicate populations of *Drosophila melanogaster*: 1. Response to selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 57, 113–117.
- Yu, D. (2021). A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 67, 553–571.
- Zakhartsev, M. & Reuss, M. (2018). Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. *FEMS Yeast Research*, 18, 1–16.

- Zerbino, D. R. & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18, 821–829.
- Zolotarev, A. S. & Unnikrishnan, M. (2008). Increased sulfate uptake by *E. coli* overexpressing the SLC26-related SulP protein Rv1739c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 149, 255–266.