

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Biowissenschaften

Fachgebiet: *Mikrobiologie*

Betreuer: Prof. Dr. Mirko Basen

Ihr Name: Christoph Prohaska

(e-mail: christoph.prohaska@uni-rostock.de)

Evolution (hyper-)thermophiler Bakterien bei verringerten Wachstumstemperaturen

Deutsche Zusammenfassung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Hypothese von der Existenz eines thermophilen *Last Universal Common Ancestor* (LUCA), von welchem ausgehend sich (hyper-)thermophile Organismen schrittweise zu mesophilen entwickelten. Anhand von fünf ausgewählten Bakterienstämmen (*Kosmotoga olearia*, *Moorella thermoacetica*, *Thermus thermophilus*, *Thermoanaerobacter kivui* und *Thermotoga maritima*), die anhand ihrer Biologie entweder evolutionär in die Nähe des LUCA gerückt werden können oder eine hohe ökologische Toleranz gegenüber der Umgebungstemperatur zeigen, sollte mittels adaptiver Laborevolution (ALE) experimentell überprüft werden, ob eine Anpassung (hyper-) thermophiler Organismen an verringerte Wachstumstemperaturen grundsätzlich möglich ist.

Die Charakterisierungen der Bakterienstämme ergaben für alle getesteten Stämme außer *K. olearia* minimale Wachstumstemperaturen unterhalb ihrer publizierten Minimaltemperatur. Insbesondere *Th. kivui* und *Tt. maritima* zeichneten sich als geeignete Kandidaten für ALE-Experimente aus. Durch serielle Kultivierung bei einer suboptimalen Temperatur von 45 °C für *Th. kivui* wurde aus dem zuvor bereits auf gleiche Art adaptierten Stamm TKA45P67 durch 233 weitere Transfers der Stamm TKA45P300 erzeugt, während durch 67 Transfers des Typstamms DSM2030 der unabhängig adaptierte Stamm TKB45P67 hervorging. Für *Tt. maritima* erfolgten Kultivierungen bei 45 °C und 50 °C. Ausgehend vom Typstamm DSM3109 konnten nach 50 Transfers auf 45 °C der Stamm ATM45P50 und durch 100 Transfers auf 50 °C der Stamm ATM50P100 erzeugt werden. Die Stämme wurden morphologisch und wachstumsphysiologisch charakterisiert.

Th. kivui TKA45P300 zeigte eine Verschiebung seiner optimalen Wachstumstemperatur (T_{OPT}) von 66 °C auf 60 °C, sowie signifikante Erhöhungen der Wachstumsraten bei verringerten Temperaturen. Weiterhin konnten im Vergleich zum Typstamm 18 Einzelnucleotid-polymorphismen (SNPs) dokumentiert werden, welche in mindestens 30 % der Individuen innerhalb der Population auftraten, darunter waren potenzielle Gene des Fettsäurestoffwechsels wie TKV_c16680 (Patatin) betroffen. Transkriptomanalysen ergaben für den Typstamm DSM2030 und den adaptierten Stamm TKA45P300 eine durchschnittliche Gesamtzahl von

2160 (± 18) transkribierten Genen. Im Typstamm bei 45 °C waren im Vergleich zur T_{OPT} 80 Gene mindestens vierfach differentiell exprimiert, während beim Vergleich von DSM2030 und dem adaptierten Stamm bei einer Wachstumstemperatur von 45 °C eine differentielle Expression von 63 Genen (2,9 %) festgestellt wurde, hierunter Gene mit potenzieller Beteiligung am Fettsäuremetabolismus sowie der Purinsynthese und auffällig viele Transportproteine.

Für *Tt. maritima* konnte keine Verschiebung der T_{OPT} , jedoch Erhöhungen der Wachstumsraten bei 60, 50 und 45 °C dokumentiert werden. Mikroskopische Verfahren dokumentierten eine Verringerung der Zellgrößen bei niedrigeren Temperaturen bei gleichzeitiger Bildung von Zellaggregaten mit extrazellulären Substanzen. Für ATM50P100 konnten 7 SNPs identifiziert werden, darunter eine Nonsense-Mutation in einem potenziellen Gen des Fettsäuremetabolismus. Die Transkriptomanalysen ergaben in allen Stämmen 1607 (± 19) transkribierte Gene, von denen im Typstamm DSM3109 beim Vergleich einer Wachstumstemperatur von 50 °C und 80 °C 93 Gene differentiell exprimiert waren. Typstamm DSM3109 und adaptierter Stamm ATM50P100 unterschieden sich beim Wachstum bei 50 °C in der differentiellen Expression von 31 Genen mit besonderer Auffälligkeit von Genen mit einer Beteiligung am Aminosäure- und Pyrimidinstoffwechsel.

Die Verschiebung der T_{OPT} bei *Th. kivui* sowie die erhöhten Wachstumsraten bei suboptimalen Wachstumstemperaturen beider Organismen zeigen, dass eine Anpassung von einer höheren zu einer niedrigeren T_{OPT} grundsätzlich möglich ist. Für eine abschließende Bewertung, ob die Evolution eines LUCA von thermophilen zu mesophilen Temperaturen mit Hilfe der ausgewählten Organismen nachvollzogen werden kann, ist eine Fortführung der ALE-Experimente erforderlich, welche zu einer sukzessiven Veränderung der T_{OPT} , aber auch der minimalen Wachstumstemperatur (T_{MIN}) führen sollte. Verschiedene OMICS-Ansätze könnten darüber hinaus das Verständnis für die Anpassung thermophiler Bakterien an dauerhaft verringerte Wachstumstemperaturen erweitern und unser Verständnis für die Organisation von Genomen, sowie für die Funktion einzelner Gene steigern.

Englische Zusammenfassung

This study focuses on the hypothesis of the existence of a thermophilic Last Universal Common Ancestor (LUCA), from which mesophilic organisms gradually evolved. Using five selected bacterial strains (*Kosmotoga olearia*, *Moorella thermoacetica*, *Thermus thermophilus*, *Thermoanaerobacter kivui*, and *Thermotoga maritima*) – which, based on their biology, can either be placed evolutionarily close to LUCA or exhibit high ecological tolerance to ambient temperature – adaptive laboratory evolution (ALE) was used to experimentally investigate whether adaptation of (hyper-)thermophilic organisms to lower growth temperatures is fundamentally possible.

Characterization of the bacterial strains revealed for all tested strains except *K. olearia*, a minimum growth temperatures below their published minimum temperatures. In particular, *Th. kivui* and *Tt. maritima* emerged as suitable candidates for ALE experiments. Using the method of serial cultivation at a suboptimal temperature of 45 °C for *Th. kivui*, the strain TKA45P300 was generated from the previously adapted strain TKA45P67 after 233 additional

transfers: In addition the independently adapted strain TKB45P67 emerged from 67 transfers of the type strain DSM2030. For *Tt. maritima*, cultivation was performed at 45 °C and 50 °C. Starting from the type strain DSM3109, the strain ATM45P50 was generated after 50 transfers at 45 °C, and the strain ATM50P100 was generated after 100 transfers at 50 °C. The strains were characterized morphologically and in terms of their physiology.

Th. kivui TKA45P300 exhibited a shift in its optimal growth temperature (T_{OPT}) from 66 °C to 60 °C, as well as significant increases in growth rates at lower temperatures. Compared to the reference strain, 18 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were documented that occurred in at least 30% of the individuals within the population; among these were potential genes involved in fatty acid metabolism, such as TKV_c16680 (patatin). Transcriptome analyses revealed an average total of 2,160 (± 18) transcribed genes for the reference strain DSM2030 and the adapted strain TKA45P300. In the reference strain at 45 °C, 80 genes were differentially expressed at least fourfold compared to T_{OPT} , while a comparison of DSM2030 and the adapted strain at a growth temperature of 45 °C revealed differential expression of 63 genes (2.9%), including genes potentially involved in fatty acid metabolism and purine synthesis, as well as a strikingly large number of transport proteins.

For *Tt. maritima*, no shift in the T_{OPT} was observed, but increases in growth rates were documented at 60, 50, and 45 °C. Microscopic analysis revealed a reduction in cell size at lower temperatures, accompanied by the formation of cell aggregates containing extracellular substances. For ATM50P100, seven SNPs were identified, including a nonsense mutation in a potential gene involved in fatty acid metabolism. Transcriptome analyses revealed 1,607 (± 19) transcribed genes in all strains, of which 93 genes were differentially expressed in the reference strain DSM3109 when comparing growth temperatures of 50 °C and 80 °C. The type strain DSM3109 and the adapted strain ATM50P100 differed in the differential expression of 31 genes during growth at 50 °C, with genes involved in amino acid and pyrimidine metabolism being particularly notable.

The shift in the T_{OPT} for *Th. kivui*, as well as the increased growth rates at suboptimal growth temperatures for both organisms, indicate that adaptation from a higher to a lower T_{OPT} is possible. To conclusively assess whether the evolution of LUCA from thermophilic to mesophilic temperatures can be traced using the selected organisms, it is necessary to continue the ALE experiments, which should lead to a gradual change in the T_{OPT} as well as in the minimum growth temperature (T_{MIN}). Furthermore, various OMICS approaches could expand our understanding of how thermophilic bacteria adapt to permanently reduced growth temperatures and enhance our understanding of genome organization as well as the function of individual genes.