

DISS. ETH Nr. 23797

BIOTIC INTERACTIONS OF  
*Myxococcus xanthus*

2016

## Abstrakt

Die Evolution biologischer Abstammungslinien resultiert unter dem Strich aus deren Interaktionen mit der abiotischen Umwelt und anderen biologischen Einheiten. Diese Wechselwirkungen können dabei direkt aus der Evolution adaptiver Antworten auf Selektionsdrücke entstanden sein, aber auch indirekt aus pleiotropen Effekten resultieren, und Merkmale betreffen, die nicht direkt unter Selektion standen. Im Großen und Ganzen können biologische Wechselwirkungen zwischen zwei Individuen (oder Populationen oder Arten) alle möglichen Kombinationen von positiven, negativen und neutralen Fitness-Effekten beinhalten und sie können intra- oder interspezifisch sein. Die vorliegende Doktorarbeit untersucht dabei zwei Kategorien von Evolutionsprozessen, welche auf biotische Wechselwirkungen zurückzuführen sind, nämlich i) der indirekten (nicht-adaptiven) Evolution von Fitness-Asymmetrien, die sich aus sozialen Interaktionen zwischen sich unabhängig entwickelter Abstammungslinien der gleichen Bakterienarten ergeben, und ii) die direkte Evolution adaptiver Antworten zweier verschiedener Bakterienarten – einem Räuber- und einem Beuteorganismus – in Reaktion auf deren gegenseitige, langfristige Exposition in derselben Umwelt, in welcher die Beuteorganismen zum Wachstum auf abiotische Nährstoffe und die Räuber wiederum auf das Konsumieren der Beute angewiesen waren.

Bei Bakterien nehmen einige vorteilhafte Interaktionen innerhalb derselben Art die Gestalt von Eusozialität an, indem einzelne Zellen miteinander in Wechselwirkung treten, um Prozesse auszuführen, die die Koordination und Zusammenarbeit vieler einzelner Individuen erfordern. Die durch Hunger induzierte, vielzellige Fruchtkörperentwicklung des Bakteriums *Myxococcus xanthus* ist hierfür ein Beispiel. Bei diesem Prozess scheint eine extreme Form von Altruismus eine tragende Rolle zu spielen, und weil ein großer Prozentsatz der beteiligten Zellen während des Prozesses der Fruchtkörperbildung und Sporenproduktion absterben, ist diese Eigenschaft anfällig für soziale Ausbeutung. Denn genetisch unterschiedliche Genotypen können selbst bei identischer Fruchtkörperentwicklungskompetenz, vereinzelt mit Fitness-Asymmetrien reagieren, wenn sie gemeinsam in der gleichen sozialen Gruppe vorkommen. Dies führt letztlich dazu, dass einer der koevolvierenden Genotypen

überproportional mehr Sporen im Fruchtkörper bilden kann als die anderen. Das erste Kapitel meiner Arbeit befasst sich mit einem solchen kooperativen Prozess und dabei zeige ich auf, dass Variation in Merkmalen die mit multizellulärer Entwicklung in Zusammenhang stehen, einschließlich der relativen Fitness selbst, indirekt entstehen können, selbst wenn die Selektion nicht direkt auf das untersuchte Merkmal einwirkt (zum Beispiel die Entwicklungskompetenz). Desweiteren kann ich demonstrieren, dass Variation in einem dieser Merkmale, die Entwicklungsgeschwindigkeit, keine Vorhersage über den Ausgang eines paarweisen Entwicklungs-Versuchs mit zwei Konkurrenten ähnlicher Entwicklungskompetenz erlaubt, obwohl eine zuverlässige Prognose aus theoretischen Erwägungen erwartbar wäre.

Antagonistisches Verhalten kann in interspezifischen Interaktionen beobachtet werden, vor allem während der Prädation, also wenn ein Lebewesen ein anderes aktiv tötet und sich von ihm ernährt. Räuberische Bakterien kommen zahlreichen terrestrischen und aquatischen Lebensräumen vor, in denen sie tödlichen Frassdruck auf ihre Beute ausüben, zu denen auch Bakterien und andere eukaryontische Mikroorganismen zählen. Räuber-Beute-Interaktionen haben tiefgreifende evolutionäre Konsequenzen für Beuteorganismen und obwohl räuberische Bakterien aus verschiedenen Lebensräumen bekannt sind, ist praktisch nichts über deren direkten evolutionäre Auswirkung auf ihre Beute bekannt. Die größte Herausforderung für das Studium dieses Wirkzusammenhangs ist die Schwierigkeit, die Umweltfaktoren im Experiment so zu gestalten, dass es zu wiederholten Wechselwirkungen zwischen den räuberischen Bakterien und ihrer Beute kommt kann, und so tiefgreifende evolutionäre Auswirkungen haben kann. Der zweite Teil meiner Arbeit stellt sich dieser Herausforderung und präsentiert Umweltbedingungen, die dazu geeignet sind, langfristige evolutionäre Wechselwirkungen zwischen *M. xanthus* und dessen Beuteorganismen zu studieren. In Kapitel 2 beschreibe ich dabei die experimentelle Koevolution einer Räuber-Beute-Interaktion unter den oben genannten Rahmenbedingungen, wobei ich den Räuber mit einem seiner typischen Beuteorganismen, *Escherichia coli*, für 25 Zyklen oder ~200 Generationen in insgesamt 12 Wiederholungsbehandlungen koevolvierte. In diesen war dabei die stabile Aufrechterhaltung von Räuber- und Beute-Populationen bis zum Ende des Experiments sichergestellt. Nach den ~ 200 Generationen hatten die mit dem Räuber koevolvierten Beute-Populationen eine höhere Fitness als die (gegenüber dem Räuber

naïven) Kontrollpopulationen, wenn Sie experimentell in Gegenwart des Räubers miteinander konkurrierten.

In den nachfolgenden Kapiteln habe ich die Reaktion der Beutepopulationen auf den kontinuierlich ausgeübten Fraßdruck des Räubers eingehend untersucht. In Kapitel 3 beschreibe ich eine adaptive phänotypische Reaktion in den Beute-Populationen. Nach Ende von 18 Koevolutionszyklen, waren in 10 der 12 Populationen solche Zelllinien nachweisbar, die extrazelluläre Polysaccharide herstellen, und auf Agar-Platten mukoide Kolonien produzieren. Dahingegen wies praktisch keine der sechs Kontrollpopulationen mukoide Kolonien auf. Mukoide Kolonien hielten dem Fraßdruck insgesamt besser stand, wurden aber nur dann positiv selektiert, wenn dieser Druck hinreichend stark war. Damit kann *M. xanthus* durch Prädation augenscheinlich die Diversität innerhalb der Beute-Population Aufrecht erhalten.

In Kapitel 4 beschreibe ich die adaptive Antwort der Beutepopulationen auf genetischer Ebene, wozu ich die ganzen Genome von jeweils drei Klonen pro Population sequenzierte, die am Ende des Experiments aus allen Koevolutions- und Kontroll-Linien isoliert wurden. Die koevolvierten Populationen fixierten insgesamt mehr Mutationen als die Kontroll-Linien. Außerdem, konnte ich stark konvergente Sequenzevolution in *ompT*, nachweisen, einem Gen, das für eine äußere Membran-Protease kodiert und zuvor als Virulenzfaktor in uropathogenen *E. coli* beschrieben wurde. Mittels einer Kombination aus paarweisen Konkurrenz-Assays und einer Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode (Freq-Seq), stellte ich fest, dass die Deletion von *ompT* in der Gegenwart des Räubers einen signifikanten selektiven Vorteil mit sich bringt.

Zusammengenommen erweitere ich in dieser Doktorarbeit das Verständnis über Auswirkungen bakterieller Wechselwirkungen, innerhalb und zwischen verschiedenen Bakterienarten, auf evolutionäre Prozesse. Innerhalb einer Spezies kann die Selektion von peripheren Merkmalen (hier das Ausschwärmen auf einer festen Oberfläche) indirekte Folgen auf die Diversität sozialer Merkmale haben und Fitness Asymmetrien hervorbringen, welche erst bei direkten Wechselwirkungen entstehen. Als Folge von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bakterienarten präsentiert diese Arbeit erstmals sowohl ein phänotypisches Merkmal als auch Gene,

welche durch direkte Selektion, aufgrund langfristiger Wechselbeziehungen zwischen *M. xanthus* und dessen Beute, geprägt wurden.

## Abstract

The evolution of biological lineages is a net product of their interactions with both the abiotic environment and other biological entities. These interactions can result in direct evolution of adaptive responses to selective pressures as well as indirect pleiotropic effects on traits other than those under direct selection. Broadly speaking, biological interactions between two individuals (or populations or species) can involve all possible combinations of positive, negative and zero effects on fitness across both directions of the interaction and they can be intra- or interspecific. This thesis examines two categories of biotic-interaction evolution, namely i) the indirect (i.e. non-adaptive) evolution of fitness asymmetries arising from social interaction between independently evolved lineages of the same bacterial species and ii) the direct evolution of adaptive responses by two distinct bacterial species – one predator and one prey – to long-term exposure to one another in an environment in which the prey consume abiotic growth substrates whereas the predators consume only the prey.

Some bacteria physically interact with each other to achieve tasks that require coordination and cooperation of multiple individuals. One such example is starvation-induced multicellular fruiting body development in the bacterium *Myxococcus xanthus*. Development in *M. xanthus* appears to involve an extreme form of altruism in which a large percentage of participating cells die during the process of fruiting body formation and spore production, putatively to the benefit of surviving cells, thus making this social trait prone to exploitation. Genetically divergent genotypes of *M. xanthus* that exhibit equal developmental proficiency alone sometimes show asymmetric fitness responses to being mixed in the same social group, which results in one genotype making disproportionately more spores than the other during codevelopment. The first chapter of my thesis deals with this cooperative process and here I can show that variation in development-related traits, including relative fitness itself, can arise indirectly when selection is not on the focal trait (i.e. development). Further, variation in one of those traits, namely developmental speed, is shown to not be predictive of the outcome of direct developmental competition between two competitors of otherwise similar developmental performance, despite theoretical reasons why such a predictive relationship might have been the case.

Predation is the most predominant interspecific antagonistic interaction in nature and involves one organism actively killing and consuming another as food. Predator-prey interactions generate profound evolutionary outcomes in the interacting species. Predatory bacteria are found in all kinds of terrestrial and aquatic habitats where they exert lethal pressure on their prey species, which can include bacteria and other eukaryotic microbial species. Even though predatory bacteria have been reported from many habitats, knowledge about their direct evolutionary effects on prey is severely lacking. The main challenge in studying the evolutionary impacts of predatory bacteria comes from the difficulty of designing an environment that allows repeated interactions between predatory bacteria and their prey, which can generate profound evolutionary outcomes. The second part of my thesis takes this challenge and presents an environment that can be used to study long-term evolutionary interactions between *M. xanthus* and its prey species. In chapter 2, I describe an experimental coevolution of predator-prey interactions in this environment. I coevolved the predator with one of its prey species, *Escherichia coli*, for 25 cycles or ~200 prey generations in 12 replicate treatments with stable maintenance of both predator and prey populations until the end of the experiment in all the replicates. After ~200 generations of coevolving with predator, prey populations were fitter than the control populations (naïve to the predator) when competed in the presence of the predator.

I then studied prey responses to continual predation pressure in subsequent chapters. In chapter 3, I describe an adaptive phenotypic response in the prey populations. At the end of 18 cycles of coevolution, 10 out of the 12 replicate populations showed the presence of cells that make extracellular polysaccharides and thus make mucoid colonies on an agar plate. Only one of the six control populations had any mucoid colonies at all and in that one population there were extremely few. The mucoids were found to be better at thwarting predation but appear to be selectively favoured only when the pressure from the predator was sufficiently high. Thus *M. xanthus* predation seem to maintain diversity in prey populations.

In chapter 4, I describe adaptive response of prey populations at the level of genes after sequencing the whole genomes of three terminal clones from each of the coevolved and control treatments. Coevolved populations fixed higher numbers of

mutations than control populations. Moreover, I detected highly convergent sequence evolution at *ompT*, which codes for an outer membrane protease that has been previously identified as a virulence factor in uropathogenic *E. coli*. Relying on a combination of competition assays and a high-throughput sequencing method (Freq-Seq), I found that deletion of *ompT* confers a significant selective benefit in the presence of the predator.

Taken together, the thesis advances our understanding of the evolutionary implications of bacterial interactions both at the intraspecific and interspecific level. At the intraspecific level, diversity in social traits and interaction-specific fitness asymmetry can emerge as an indirect result of selection on something else (in this case swarming outward on a solid surface). At the interspecific level, these studies have revealed for the first time both a phenotypic trait and genes that come under direct selection as a result of prolonged evolutionary interaction between *M. xanthus* and its prey.