

Abstract

In a natural environment, bacteria live in communities in close proximity. By exchanging DNA in a process called horizontal gene transfer (HGT), bacteria can obtain genetic diversity and speed up their adaptation. However, the fitness effects and barriers to gene transfer on a whole genome level are poorly understood. One prevalent process that mediates HGT in bacteria is transformation, and we will focus on this mechanism throughout the thesis.

In the first part of the thesis, we investigated conditions under which gene transfer could be beneficial. To this end, we set up a high-throughput competition assay and measured the distribution of fitness effects (DFE) of transformation hybrid libraries. We created the hybrids by transforming *Bacillus subtilis* with DNA from *Bacillus vallismortis* and *Bacillus spizizenii* for 2 h. For all hybrids, we measured the selection coefficients under different growth conditions, where we varied nutrient composition, growth temperature and growth phase. For most conditions, we found DFEs with many neutral, and a few large effect beneficial and deleterious transfers. In complex medium, *B. vallismortis* caused larger fitness effects than the more closely related donor species *B. spizizenii*. Comparing the fitness effects of growth conditions, we discovered that multiple transfers had pleiotropic effects. This suggests that cells might benefit from a gene pool shared with other species.

For growth in complex medium, and for most other conditions under examination, we observed beneficial transfers and hypothesized that they would drive adaptation. The sole exception was found for growth in defined medium, where only neutral and deleterious transfers were observed. Based on these findings, we predicted that bacteria would benefit from HGT in complex, but not in defined medium. We confirmed our prediction by performing evolution experiments for about 450 generations in both growth conditions. By sequencing a subset of evolved hybrids, we found evolution to be more repeatable in defined than in complex medium.

We conclude that gene transfer via transformation has the potential to drive adaptation, depending on the growth condition. We find the DFE to have a predictive value that can be tested by employing experimental evolution. In future studies, we will take the experimental design further to test more growth conditions and to elucidate the role of compensatory mutations during adaptation.

In the second project, we developed a replacement accumulation experiment to investigate gene transfer on a whole genome level. For 20 cycles, we transformed *B. subtilis* recipient cells with DNA from donor species of varying genetic distance and accessory genome architecture. Thus, we were able to probe the barriers to gene transfer for a range of different donor species. By applying whole genome sequencing, we were able to detect different types of genetic variations in the final hybrids and discovered replacements to occur in abundance but inhibited for more distant donor species. Replaced segments were found to have a higher sequence identity than the genome-wide average, around 93% for all donor species. About a fourth of all segments were part

of mosaic events, in which donor and recipient alleles alternated. By merging these events, we found an exponential length distributions of segments. The characteristic segment length decreased for more divergent donor species. Over the course of the experiment, we detected DNA replacements to accumulate linearly in time. Transfer rates increased exponentially with increasing sequence identity between recipient and donor and we determined the coefficient as $0.66\%^{-1}$.

We conclude that our replacement accumulating experiment reveals striking differences in the uptake dynamics for DNA of different donor species. In particular, the whole genome transfer rate increased exponentially with increasing sequence identity.

In the third project, we analyzed the gene expression of *Neisseria gonorrhoeae* for different treatments and lifestyles. The pathogen is the causative agent of gonorrhea, which is one of the most prevalent sexually transmitted diseases worldwide. Nevertheless, only few studies have investigated the transcriptome under conditions that are important during infection. Here, we performed two separate studies.

First, we investigated the expression profile of *N. gonorrhoeae* during early biofilm formation and compared it to the planktonic lifestyle. Genetically, gonococci can switch between lifestyles through pilin antigenic variation. We created strains that carried different *pilE* variants from clinical isolates, of which some were able to form colonies and others were deficient. For strains of both types, we obtained RNA-seq data after 10 h of growth. To investigate the transcriptome, we developed an analysis pipeline and improved the annotation of the species. We found strains of different lifestyles to cluster closely in a principle component analysis (PCA). Differences between the lifestyles were pronounced, whereby up to 40% of all genes were differentially regulated. Across all planktonic strains, 20% of genes were similarly up- or down-regulated compared to the colony forming state. In this intersection of genes, a functional enrichment analysis revealed that phage associated proteins were consistently up-regulated in the colony forming cells. The exact role of phages in biofilm formation has not been investigated in *N. gonorrhoeae* and will be a subject of future studies.

In an additional study, we examined the effects of different external stresses on the type 4 pili (T4P) of *N. gonorrhoeae*. We analysed the T4P for two different types of antibiotics and found a decrease in their number and an inhibition of their dynamics. To explain this observation, we performed a whole transcriptome analysis. The differential expression revealed a down-regulation of genes related to the membrane-standing part for the T4P structure. Additionally, metabolic genes were down-regulated, which most likely lowered the energy levels in the cell. We conclude the detected differential expression to explain the decrease in pilus abundance and dynamics.

In this thesis, we have identified the sequence divergence between species as an important barrier to gene transfer, effecting the segment lengths, identities and the whole genome transfer rate. We measured the DFE and, based on this, predicted gene transfer to have a potential for adaptation under specific growth conditions. We proved this to be true by employing an evolution experiment and thus demonstrated the predictive value of DFEs.

Zusammenfassung

In ihrer natürlichen Umgebung leben Bakterien oft in Gemeinschaften zusammen. Indem sie über sogenannten horizontalen Gentransfer DNA von anderen Spezies aufnehmen, vergrößern sie ihre genetische Variabilität und können so ihre Adaptation beschleunigen. Welche Fitnesseffekte dieser Transfer mit sich bringt und welche natürlichen Schranken ihn begrenzen, ist weitestgehend unklar.

Im ersten Teil dieser Arbeit war es unser Ziel, Wachstumsbedingungen für Bakterien zu identifizieren, für die Gentransfer von Vorteil sein könnte. Hierfür entwickelten wir ein Konkurrenzexperiment im Hochdurchsatzverfahren und bestimmten die Verteilung der Fitnesseffekte für eine Stammbibliothek mit Transformationshybriden. Diese Hybride erzeugten wir, indem wir *Bacillus subtilis* mit genomischer DNA von *Bacillus vallismortis* oder *Bacillus spizizenii* transformierten. Anschließend bestimmten wir für verschiedene Bedingungen die Fitnesswerte, unter anderem für variierende Nährstoffquellen, Wachstumsphasen und Temperaturen. Unter den meisten Bedingungen besaß die Verteilung der Fitnesseffekte viele neutrale und wenige extreme Effekte, die entweder einen Fitnessvorteil oder einen Nachteil mit sich brachten. Es ergaben sich pleiotrope Effekte beim Vergleich der Wachstumsbedingungen. Dies führte uns zu der Vermutung, dass Zellen sich bei der Anpassung an neue Bedingungen einen geteilten Genpool zu Nutzen machen.

Bei Wachstum in komplexem Medium, ähnlich wie unter den meisten anderen Bedingungen, fanden wir einige vorteilhafte Transfers und vermuteten, dass diese die bakterielle Adaptation vorantreiben könnten. Ausschließlich in definiertem Medium fanden sich nur neutrale und nachteilige Transfers. Basierend auf diesen Beobachtungen stellten wir die Hypothese auf, dass Gentransfer den Bakterien in komplexem, jedoch nicht in definiertem Medium, zu einem Vorteil verhelfen würde. Wir bestätigten unsere Vorhersage, indem wir ein Evolutionsexperiment über 450 Generationen durchführten.

Abschließend stellen wir fest, dass Gentransfer durch Transformation einen Vorteil für Bakterien haben kann und dass dies stark von den Wachstumsbedingungen abhängt. Außerdem zeigen wir in dieser Studie, dass, auf der Grundlage der Verteilung von Fitnesseffekten, Vorhersagen über evolutionäre Prozesse gemacht werden können.

Im zweiten Projekt entwickelten wir ein Gentransfer-Akkumulationsexperiment, mit dem wir genomweiten Transfer untersuchen konnten. Hierfür transformierten wir *B. subtilis* über 20 Zyklen mit genomischer DNA von Donororganismen, die ein Spektrum an genetischer Distanz zum Rezipienten abdeckten. Wir sequenzierten das ganze Genom aller Transformationshybride und fanden ausgiebigen Gentransfer, der sich für genetisch entferntere Donorspezies verringerte. Für die ersetzten Segmente fand sich, dass sie eine höhere Identität zwischen Donor und Rezipient aufwiesen, als mit dem genomweiten Mittelwert zu erwarten gewesen wäre. Die mittlere Identität der Segmente lag für alle Donorspezies um 93 %. Außerdem fanden wir heraus, dass sich etwa ein Viertel aller Ersetzungen als Mosaik zwischen Donor und Rezipient darstellte. Indem wir die gestückelten Ersetzungen zusammenführten, fanden wir die Längenverteilung

der Segmente, die eine exponentielle Wahrscheinlichkeitsverteilung aufwies. Aus dieser Verteilung gewannen wir die charakteristische Segmentlänge, die mit steigender genetischer Distanz zum Donor abfiel. Da wir Hybride zu zwei Zeitpunkten im Laufe des Experiments sequenzierten, konnten wir einen linearen Anstieg des Gentransfers erfassen. Wir errechneten für jeden Donor die Transferrate und erkannten, dass diese exponentiell, mit einem Koeffizient von $0.66\%^{-1}$, mit der Sequenzidentität zwischen Rezipient und Donor anstieg.

Wir fassen zusammen, dass wir mit dem Gentransfer-Akkumulationsexperiment große Unterschiede für den Einbauprozess zwischen verschiedenen Donorspezies detektieren. Hierbei stellt vor allem die Sequenzidentität des Donors eine Schranke für genomweiten Gentransfer dar, was sich im exponentiellen Zusammenhang beider Größen zeigt.

Für das dritte Projekt dieser Dissertation analysierten wir die Genexpression des pathogenen Organismus *Neisseria gonorrhoeae* unter verschiedenen Bedingungen. Obwohl das untersuchte Bakterium der Verursacher der weltweit verbreiteten Gonorrhö ist, gibt es bislang wenige Transkriptomstudien, die klinisch relevante Umstände in den Fokus nehmen.

In einer ersten Studie untersuchten wir das Expressionsprofil von *N. gonorrhoeae* während der frühen Biofilmbildung im Vergleich zu planktonisch wachsenden Zellen. Die Bakterien sind in der Lage, durch antigenische Variation zwischen beiden Lebensweisen zu wechseln. Indem wir die *pilE* Sequenz von klinischen Isolaten in unseren Laborstamm einfügten, erzeugten wir Stämme, die zur Biofilmbildung in der Lage waren, oder diese Fähigkeit verloren hatten. Für Stämme beider Typen sequenzierten wir das ganze Transkriptom nach 10h Wachstum. Zunächst entwickelten wir Analyseverfahren, um die Daten zu prozessieren. Im Zuge dessen verbesserten wir die Annotation unseres *N. gonorrhoeae* Laborstamms. Wir ermittelten, dass die Proben in einer Hauptkomponentenanalyse entsprechend ihrer Lebensweise clusterten. Wir fanden große Unterschiede zwischen den Lebensweisen, wobei bis zu 40% der Gene signifikant differenziell exprimiert waren. Innerhalb aller planktonischen Stämme waren 20% aller Gene qualitativ gleich exprimiert gegenüber dem Biofilm bildenden Stamm. Dabei waren Gene übermäßig häufig im Biofilm hochreguliert, die für Phagenelemente kodierten. Die Rolle von Phagen in der Bildung von Biofilmen ist wenig erforscht und wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

In einer weiteren Studie untersuchten wir die Effekte verschiedener externer Stressfaktoren auf *N. gonorrhoeae*. Wir fanden heraus, dass eine Behandlung mit zwei verschiedenen Antibiotika die Anzahl der Typ 4 Pili und deren Dynamik verminderte. Wir untersuchten diesen Effekt, indem wir das ganze Transkriptom der Bakterien analysierten. Gene mit metabolischer Funktion waren überdurchschnittlich häufig herunterreguliert, was wir mit einer Absenkung des zellulären Energieniveaus in Zusammenhang brachten. Ebenfalls herunterreguliert waren Gene, die für Teile der Typ 4 Pilus Struktur kodierten. Beide Ergebnisse waren in Einklang mit den beobachteten Veränderungen der Pili.

Insgesamt identifizierten wir die Sequenzidentität zwischen Rezipient und Donor als wesentliche Schranke gegenüber Gentransfer, welche die Länge und Identität der Segmente, sowie deren Transferrate, beeinflusst. Wir zeigten, dass die Verteilung der Fittesteffekte aufschlussreich sein kann, in der Vorhersage evolutionärer Prozesse. Abhängig von den Wachstumsbedingungen kann horizontaler Gentransfer zwischen nah verwandten Spezies die adaptive Evolution beschleunigen.