

## Evolution in Echtzeit: Experimentelle Evolution an Mikroorganismen

### Was ist Evolution?

Lebende Organismen verändern sich durch Evolution. Evolution ist möglich durch genetische Variabilität in Populationen biologischer Einheiten, also zufällig auftretende oder induzierte individuelle Unterschiede in der Information für den Aufbau von Nachkommen. Sie wird getrieben durch natürliche Selektion. Natürliche Selektion wählt aus den vorhandenen genetischen Varianten die am besten angepaßte aus. Eine Variante, die besser an ihre Umwelt angepaßt ist, erzeugt mehr nachkommenerzeugende Nachkommen als der Ausgangstyp und wird diesen auf Dauer verdrängen.

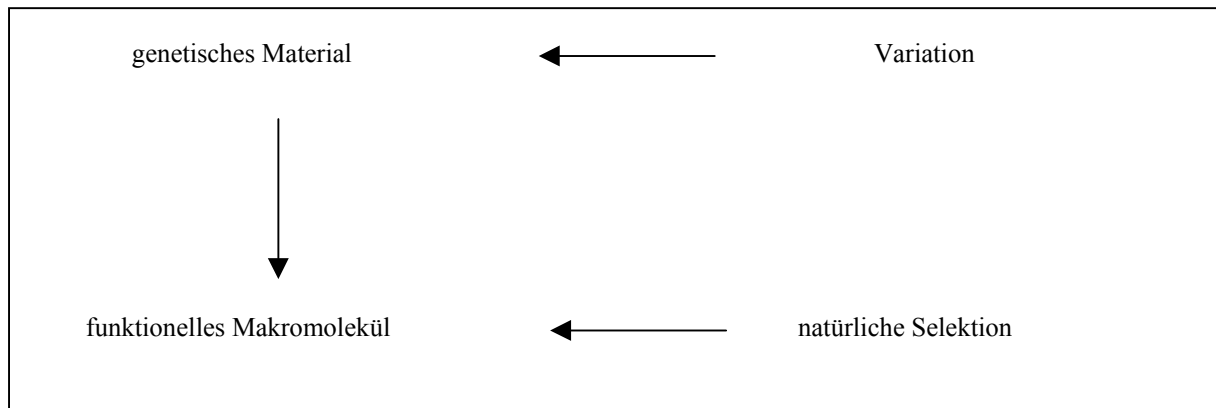


DNA-Modell

Natürliche Selektion schert sich nicht um "Qualität": Diejenigen Lebensformen, die heute auf diesem Planeten existieren, sind deshalb da, weil sie nicht von anderen verdrängt wurden und nicht etwa, weil sie intelligenter, eleganter oder umweltschonendere Lösungen entwickelt hätten. Natürliche Selektion blickt nicht in die Zukunft, sie wirkt im Hier und Jetzt.

Evolution ist ein schneller Prozess. Wer meint, dass die Adaptation einer Population an eine veränderte Umwelt nur langsam und graduell geschehen kann, übersieht, dass die Umwelt sich schnell ändern kann und die Population dann vornehmlich Zeit hätte, auszusterben.

Molekularbiologisch ausgedrückt (Abb. 1) führt genetische Variation zu Änderungen (Mutationen) in der Information für funktionelle Makromoleküle, die in der linearen Abfolge von Nukleinsäurebausteinen gespeichert wird. Die natürliche Selektion testet die Auswirkungen der Veränderung am funktionellen Makromolekül.



### Neodarwinistische Synthese

Alle Lebensformen wurden und werden durch das Spiel von Variabilität und Selektion zustande gebracht. Wir können zur Nutzung lebender Organismen oder der Produkte von Organismen ihre Variabilität steuern und durch zielgerichtete Selektion gewollte Eigenschaften verstärken und ungewollte abschwächen. Eher unbewußt hat sich die Menschheit während eines großen Teils ihrer Kulturgeschichte damit beschäftigt - Zucht und gezielte Verbesserung von Nutzpflanzen, Haustieren, Mikroorganismen.

### Schülerexperiment

Unser Experiment will die Wirkungen von genetischer Variabilität und natürlicher Selektion zeigen. Die neodarwinistische Synthese soll dabei auf der Basis von zuvor im Unterricht behandeltem Stoff - das lac-Operon und die Realisierung der genetischen Information durch Transkription und Translation - erarbeitet werden. Unser Versuch soll auch die Notwendigkeit erklären, morphologische und physiologische Adaptationen, welche im allgemeinen als Modelle zur Demonstration darwinistischer Evolution im Schulunterricht herangezogen werden, auf quantifizierbare Veränderungen in der Struktur funktioneller biochemischer Einheiten zurückzuführen.

Bakterien eignen sich besonders gut zur Durchführung eines Evolutionsexperiments "in Echtzeit": sie können mit kurzen Generationszeiten unter geringem Aufwand asexuell zu großen Populationen herangezogen werden und Varianten in diesen Populationen können leicht biochemisch und genetisch charakterisiert werden. Wir werden für unser Experiment das

traditionelle Modellbakterium der Molekularbiologie, *Escherichia coli*, verwenden.

Wir werden mit drei *E. coli* Stämmen ("Wildtyp", „Ausgangsstamm“ und "Mutator") arbeiten, die sich in der Häufigkeit unterscheiden, mit der in ihrem Genom Mutationen auftreten. Die Mutationsraten sollen quantitativ bestimmt werden. Bakterielle Populationen werden dann einmal solchen Bedingungen ausgesetzt, bei denen nur Varianten mit einer bestimmten Mutation überleben können, während alle "Wildtyp"-Bakterien sterben. In einem zweiten Ansatz wollen wir untersuchen, ob und mit welcher Rate Mutationen in einem Gen auftreten, dessen Produkt nicht der natürlichen Selektion unterliegt ("neutrale" Mutationen) und durch die Kombination der Ergebnisse aus beiden Versuchsteilen die Larmacksche Theorie überprüfen.

Zusammengefasst soll das Experiment zeigen:

1. in Populationen von Organismen treten genetische Variationen auf, die man messen kann;
2. die Rate, mit der genetische Variationen auftreten, ist (u.a.) selbst genetisch bestimmt;
3. genetische Variationen treten auf, egal ob sie die Überlebenswahrscheinlichkeit des betroffenen Individuums erhöhen, senken oder unbeeinflusst lassen;
4. ob eine genetische Veränderung vorteilhaft, nachteilig oder "neutral" ist, entscheidet die natürliche Selektion.

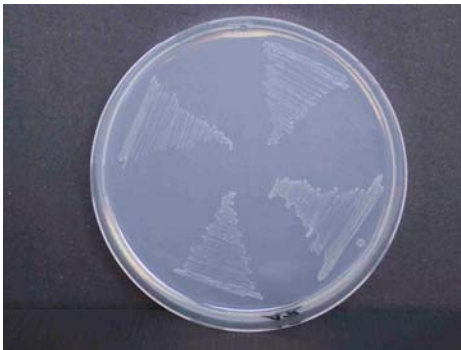
### **Versuchsablauf und Auswertung**

Je zwei SchülerInnen führen gemeinsam den Versuch durch.

#### **1. Material**

*Escherichia coli* Stämme

- Wildtyp K12
- Ausgangsstamm JG 108
- Mutator ES1481, TN5 Mutation in DNA-Reparaturgen



Agarplatte mit ausgestrichenen Bakterien

JG 108 und ES1481 haben eine Amber-Mutation (UAG, Punktmutation die zu Stopkodon führt) im *lacZ* Gen; kodiert für die  $\beta$ -Galaktosidase. Weitere Stopkodons: UAA, UGA.

- LB-Agar-Platten mit 30  $\mu$ M Thymidin (6 pro Gruppe)
- LB-Agar-Platten mit Thymidin und 10  $\mu$ g/ml X-Gal (8 pro Gruppe)
- LB-Agar-Platten mit Thymidin und 50  $\mu$ g/ml Streptomycin (8 pro Gruppe)
- 0,9 % NaCl-Lösung , steril (zum Verdünnen, je eine Flasche pro Gruppe)
- sterile Reagenzgläser (7 pro Gruppe)
- sterile Glaspipetten
- Pipettierhilfen
- 70 % Ethanol, techn.
- Bunsenbrenner, Spatel

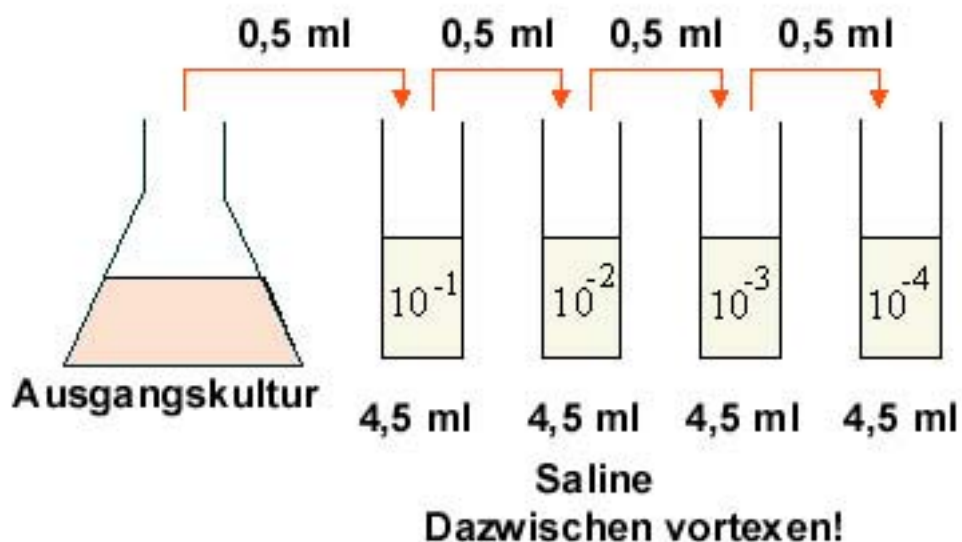
## 2. Durchführung

- Übernachtskulturen der drei Stämme in LB/30 $\mu$ M Thymidin-Medium, je 5 ml
- Verdünnungen der Ausgangssuspension  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  der Stämme K12 und ES1481 mit Hilfe von sterilen Glaspipetten in sterilen Reagenzgläsern
- Verdünnungen der Ausgangssuspension  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  des Stammes JG108 mit Hilfe von sterilen Glaspipetten in sterilen Reagenzgläsern
- dafür in 7 Reagenzgläser je 4,5 ml Saline **STERIL** pipettieren
- **STERIL**: Bunsenbrenner an, alles bereitstellen, EtOH mit Spatel **NICHT** neben das Feuer stellen; Sterile 5 ml Glaspipette aus Pipettenbox entnehmen, kurz durch die Flamme ziehen; Saline-Glas öffnen, Rand kurz am Feuer abflammen, mit Pipettierhilfe 5 ml Saline aufziehen, 0,5 ml ablassen.  
Leeres Reagenzglas öffnen, Rand abflammen, Saline aus Pipette in Glas ablassen, Rand vom Reagenzglas abflammen, Deckel aufsetzen.

- Glaspipette wieder durch das Feuer ziehen, neue Saline aufziehen
- so nacheinander 7 Reagenzgläser füllen
- anschließend aus der Ausgangskultur 0,5 ml Bakteriensuspension in Reagenzglas 1 (beschriftet) **steril** pipettieren

Reagenzglas vortexen oder anders die Suspension mischen

- von diesem Reagenzglas 0,5 ml in Reagenzglas 2 pipettieren, vortexen, etc..
- so fortfahren, bis 7 Reagenzgläser mit Verdünnungen hergestellt sind



### 2.1 Lebend-Zellzahlermittlung beider Stämme

- je 0,1 ml der Verdünnungen  $10^{-5}$  bis  $10^{-7}$  der Stämme K12 und ES1481 werden auf LB/Thy-Agarplatten mit Hilfe eines Drygalskispatels ausplattiert (Spatel in Ethanol stellen, an der Bunsenbrennerflamme sterilisieren) = 6 Platten / Gruppe für beide Stämme

#### Steril arbeiten!

- **Beschriftung der Platten:** Am Rand beschriften, Name, Datum, Stamm, Versuch, Verdünnungsstufe; Lebendzellzahl = LZ

## 2.2 Vergleich Wildtyp mit Mutator-Stamm bei Selektion

- auf je eine Platte mit Antibiotikum werden jeweils 0,1ml der Ausgangskultur vom Mutator ES1481 oder Wildtyp K12 und deren Verdünnungen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  ausplattiert
- Das sind je 4 Platten mit Antibiotikum/Stamm

### Steril arbeiten!

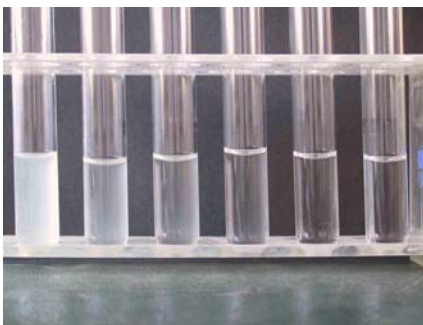
- **Beschriftung der Platten:** am Rand beschriften, Name, Datum, Stamm, Versuch, Verdünnungsstufe; Antibiotikum = AB

## 2.3 Vergleich Wildtyp zu Mutator ohne Selektion, Test der Variation

- auf je eine Platte mit X-Gal werden vom Ausgangsstamm JG108 und ES1481 jeweils 0,1ml der Ausgangskultur und der Verdünnungen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  ausplattiert
- das sind je 4 Platten mit X-Gal/Stamm

### Steril arbeiten!

- **Beschriftung der Platten:** am Rand beschriften, Name, Datum, Stamm, Versuch, Verdünnungsstufe; X-Gal



Bakterienkulturen in Reagenzgläsern, Verdünnungsreihe

## 2.4 Bebrütung der Platten (Inkubation)

Die Platten werden mit zwei kurzen Klebebandstreifen sicher verklebt, so dass sie sich beim Transport nicht öffnen, jedoch genügend Sauerstoff für das Wachstum der Bakterien durch den Deckel gelangt. Die Agarplatten werden bei Zimmertemperatur **über Kopf** für 4-7 Tage inkubiert und anschließend ausgewertet.

## 2.5 Desinfektion der Hände

Vor Verlassen des Labors müssen die Hände mit 70 % Ethanol desinfiziert werden. Dafür ein Spritzer Ethanol auf die Hände geben und gut verreiben. Nach zirka 30 Sekunden müssen die Hände dann mit Seife gewaschen werden.

## 3. Auswertung

Nach Bebrüten der Platten werden die Bakterienkolonien auf den Platten ausgezählt. Per Definition entspricht jede Einzelkolonie

einem Bakterium, dass sich durch Zellteilung nach mehreren Tagen als Kolonie auf der Platte zeigt. Das Auszählen erfolgt in einem vernünftigen Rahmen: Falls auf der Lebendzellzahl Platte bei der  $10^{-5}$  Verdünnung mehr als 1 000 Kolonien sind, ist es nicht mehr möglich, diese vernünftig auszuzählen.

Das Auszählen erfolgt so auch für die Platten mit Antibiotika.

Auf den X-Gal Platten sollen keine Einzelkolonien ausgezählt werden (die es da sowieso nicht gibt; dort gibt es einen Bakterienrasen), sondern geschaut werden, wie viele ganz DUNKELBLAUE Punkte sich zeigen. Achtung: alle Bakterien sind leicht hellblau, wichtig sind aber die dunkelblauen Punkte!

Falls sich zitronengelbe Kolonien auf den Platten zeigen, handelt es sich hierbei um eine Kontamination mit dem häufigsten Luftkeim *Micrococcus luteus*.

#### **4. Vernichtung der Platten**

- Abtöten der Bakterien durch Überschichten der Agarplatten mit jeweils 5 ml 2%-iger **MUCOCIT-T-Lösung**.
- Jede Gruppe erhält 4 ml des Konzentrats zur eigenen Herstellung der 2%-igen Lösung (Verdünnung mit Wasser).
- Über Nacht bei Raumtemperatur das Desinfektionsmittel auf den Platten einwirken lassen.
- Nächster Tag: Abgießen der Desinfektionsmittellösung (Wegspülen unter fließendem Wasser).
- Die Agarplatten in eine undurchsichtige Plastiktüte wickeln und im Hausmüll entsorgen.

#### **5. Berechnungen**

##### **Vorabinformation**

- Größe des *E. coli* Genoms: zirka 4 200 000 Basenpaare ( $4,2 \times 10^6$  bp)
- Anzahl der Bakterien im menschlichen Körper: zirka  $10^{14}$  Bakterien
- Anzahl der Körperzellen im Menschen: zirka  $10^{13}$  Zellen

### 5.1 Lebendzellzahlbestimmung

Bsp.:  $10^{-5}$  Platte: mehr als Tausend Kolonien

$10^{-6}$  Platte: 160 Kolonien

$10^{-7}$  Platte: 24 Kolonien

Statisch vernünftig ist ein Wert über 100 Kolonien

Deshalb wird der Wert von 160 Kolonien genommen

Berechnung der Zellen:

$$160 \times 10^6 = 1,6 \times 10^2 \times 10^6 = 1,6 \times 10^8 \text{ Zellen}$$

Kolonien Verdünnung

Da immer alles auf 1 ml Ausgangskultur gerechnet wird, aber nur 0,1 ml ausplattiert wurden, muss es noch mal mit dem Faktor 10 multipliziert werden.

Somit:  $1,6 \times 10^9$  Zellen/ml

### 5.2 Antibiotika-Resistenz und X-Gal-Test

Ebenfalls auszählen der Kolonien, umrechnen auf Zellen/ml wie oben, errechnen auf wie viele Zellen eine resistente Bakterienzelle kommt.

### 5.3 Berechnung der erhöhten Mutationsfrequenz beim Mutator

#### I.

$$\frac{\text{Anzahl resistente Kolonien [Z/ml] (Mutator)}}{\text{Anzahl resistente Kolonien [Z/ml] (Wildtyp)}} = \text{x-fache Erhöhung der Mutationsfrequenz} = Q$$

#### II.

$$\frac{\text{Anzahl blaue Kolonien/Platte (Mutator)}}{\text{Lebendzellzahl/Platte (Mutator)}} = \text{Wahrscheinlichkeit für die Mutation eines Basenpaares im Genom der Mutators} = P$$

Für den Wildtyp wird keine blaue Kolonie erwartet!

### III.

P

--- = Wahrscheinlichkeit für die Mutation eines Basenpaares im  
Q Wildtyp

#### 5.4 Als Anregungen weitere mögliche Berechnungen

- Wie viele Zellen/Platten vom Wildtyp müsste man untersuchen, um eine blaue Kolonie zu finden?
- Wie viele Antibiotika-resistente Bakterien haben wir in unserem Körper?
- Wie gross muss die Bakterienpopulation vom Wildtyp/Mutator sein, um Doppel/Dreifach/Vierfach-Mutanten zu sehen?

#### 5.5 Zahlenspiele

- Das Gesamtgewicht der Bakterien im menschlichen Körper ist zirka 1 kg. Wieviel wiegt eine Bakterienzelle?
- Wieviele Bakterien schleppt die Weltbevölkerung mit sich herum?
- Wieviele Zellteilungen braucht es (theoretisch) um einen Menschen zu machen?
- Wenn die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer Spectinomycin-Resistenz ebenso hoch wie die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer Streptomycin-Resistenz ist, wie viele doppelresistente Bakterien haben wir dann in unserem Körper?

#### Kontakt

Nadine Mohr  
FU Berlin  
Institut für Biologie/Zoologie  
AG Evolutionsbiologie  
Königin-Luise-Str. 1-3  
14195 Berlin  
Email: [Nwoyda@zedat.fu-berlin.de](mailto:Nwoyda@zedat.fu-berlin.de)

Dr. Barbara Weissenmayer  
FU Berlin  
Institut für Biologie/Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie  
AG Mikrobiologie II  
Königin-Luise-Str. 12-16  
14195 Berlin  
Email: [bweiss@zedat.fu-berlin.de](mailto:bweiss@zedat.fu-berlin.de)