Fachhochschule Wiesbaden
Fachbereich Weinbau und Getränketechnologie

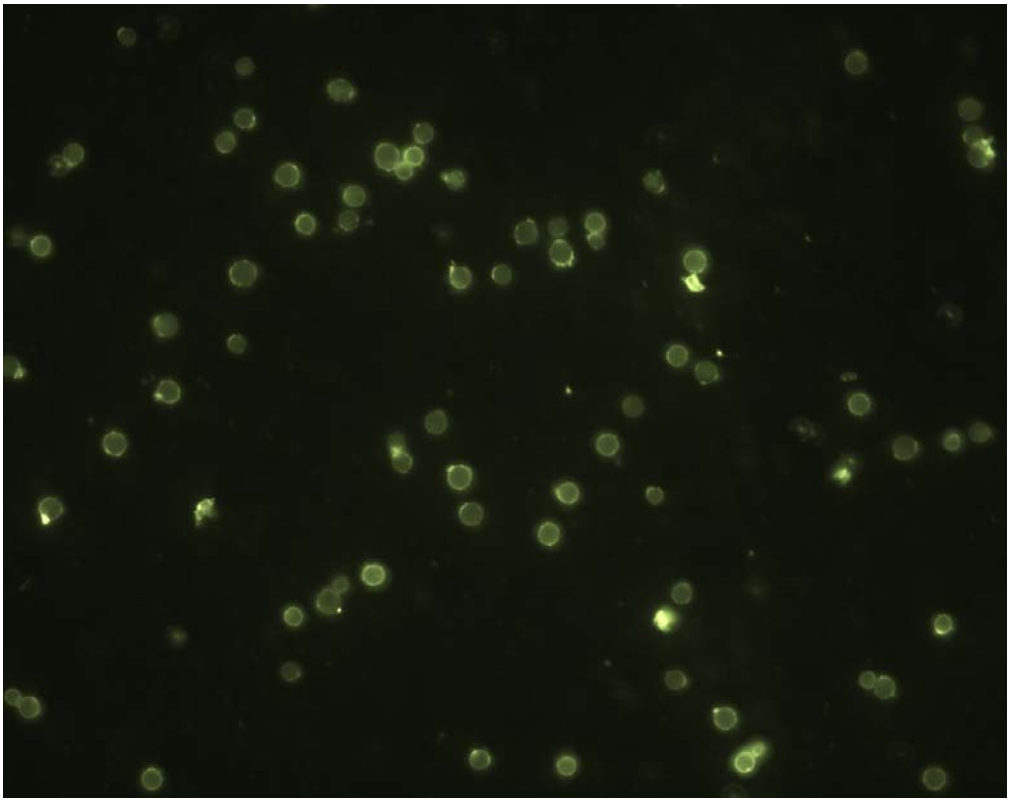
B 60b

Entwicklung von fluoreszenzoptischen Methoden zum Biomonitoring der Betriebshefe

Einbau von BrdU in die DNA, Alterung der Hefezellen (Sproßnarbenfluoreszenz), Zelltod (Autolyse, Apoptose), Reservestoffe (Glykogen, Neutralfette, Trehalose) und simultane Fluorochromierung intrazellulärer Makromoleküle (Neutralfette/Glykogen; DNA/Glykogen)

Projektleiter: Prof. Dr. K.-J. Hutter, Prof. Dr.-Ing. B. Lindemann

Verfasser: Dipl.-Ing. (FH) B. Kuhmann



Gliederung

1. Problemstellung

2. Ausgangssituation – derzeitiger Kenntnisstand

3. Forschungsziel

4. Material und Methoden

4.1 Teil I: Untersuchungen über den Zelltod

4.1.1 Probennahme im Betrieb

4.1.2 Probennahme im Labor

4.1.3 Mikroorganismen

4.1.4 Angewandte Verfahren zur Einleitung der Apoptose bei S. uvarum

4.1.5 Geräte

4.1.6 Färbeprotokolle

4.1.7 Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen

4.1.8 Isolierung der Hefe-DNA

4.1.9 Isolierung der niedermolekularen DNA

4.2 Teil II: Trehalosebestimmung

4.3 Teil III: Simultane Analysen

4.3.1 Simultane Bestimmung des Glykogen-/DNA-Gehaltes mit Propidium Iodid

4.3.2 Simultane Bestimmung des Glykogen-/DNA-Gehaltes mit DAPI

4.3.3 Simultane Bestimmung des Glykogen-/Neutrallipidgehaltes

4.4 Teil IV: Einbau von BrdU in die DNA

4.4.1 Kultivierung der Hefen für den BrdU-Einbau

4.4.2 Färbung der Zellen

4.5 Teil V: Hefealterung

4.5.1 Bestimmung der relativen Sprossnarbenzahl mit Hilfe von WGA-FITC

4.5.2 Proteinaseaktivitätsbestimmung mit dem EnzCheck Assay Kit von Molecular Probes

4.5.3 DNA-. Glykogen- und Trehalosegehaltsbestimmung

5. Ergebnisse

5.1 Teil I: Untersuchungen über den Zelltod

5.1.1 Mikroskopische Untersuchung

5.1.2 Ergebnisse der mit PI gefärbten Hefezellen

5.1.3 Ergebnisse der mit DAPI gefärbten Hefezellen

5.1.4 Ergebnisse der mit H33342 gefärbten Hefezellen

5.1.5 Ergebnisse der mit SR (Sulphorhodamin) 101 gefärbten Hefezellen

5.1.6 Mikroskopische Aufnahmen der Glykogenfärbung

5.1.7 Molekularbiologische Untersuchung

5.1.8 Flußzytometrische Untersuchung

5.2 Teil II: Trehalosebestimmung

5.3 Teil III: Simultane Bestimmungen

5.4 Teil IV: Einbau von BrdU in die DNA

5.5 Teil V: Hefealterung

6. Diskussion

7. Literaturverzeichnis

1. Problemstellung

Die Kontrolle der zylindrokonischen Gärung durch schnelle online Methoden wie der zytometrischen Analytik, der elektronischen Zellzahl- und Zellvolumenbestimmung oder der PCR, um nur einige dieser Möglichkeiten zu benennen, wird im Zuge der Konzentration deutscher Brauereien durch den selbstmörderischen Verdrängungswettbewerb eine immer wichtigere Notwendigkeit werden. Die Globalisierung auf dem europäischen Markt wird die Notwendigkeit der Einbeziehung effizienter Kontroll-Methoden noch beschleunigen. So ist es nicht verwunderlich, dass die EBC neben der Qualität folgende weitere Schwerpunkte wie die Beständigkeit, die Kosten, die Entwicklung und die Kontrolle des Gärprozesses als die vordringlichsten Aufgaben für die Zukunft postuliert. Die z.Z. üblichen indirekten Kontrollmethoden sind ineffizient und sagen nichts über den physiologischen Zustand der Betriebshefe aus, so dass Analysemethoden über die Physiologie zwingend entwickelt werden müssen. Die Kontrolle des physiologischen Zustandes der Betriebshefe von der Reinkultur über die Herführung bis zur Hefelagerung muss daher zukünftig Priorität besitzen. Ein Beispiel innovativer Kontrolle soll die Abb. 1 zeigen, in der die empirische Kontrolle der offenen Gärung den entsprechenden Zellzyklusanalysen der geschlossenen ZKG-Vergärung gegenübergestellt ist, so dass letzterer transparent geworden ist.

(In der Vergangenheit wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens B60 eine Reihe von Möglichkeiten erarbeitet, die Einblick über den physiologischen Zustand der Hefezellen geben. Die Reservestoffe, Glykogen und Neutrallipide, verlaufen während des Gärprozesses oszillierend. Im Zusammenhang mit der Bestimmung der Zellzyklusphasen weiß man jetzt, das in den intensiven Wachstumsphasen der Zellvermehrung ein hoher Glykogengehalt eher hinderlich ist. Als Konsequenz führte die Eichbaum Brauereien AG das

Eintankverfahren ein und stimulierte das Zeug vor dem Drauflassen in einem separaten Biotank.

Gegen Ende der Gärung muss die Hefezelle wieder Glykogen und Neutrallipide einlagern, um sich gegen die ungünstigen Wachstumsbedingungen bei der Hefeeinlagerung zu schützen. Bezüglich der Hefelagerung wurde konsequent eine konstante Lagertemperatur von 4°C eingehalten. Die Becks Brauerei schaffte sich zur optimalen und schnellen Kühlung ihrer Betriebshefe auf 3-4°C einen Hefekühler an.

Die Erkenntnisse über die Reservestoffe sind bisher nur auf Glykogen und Neutrallipide beschränkt worden. Ein weiterer Reservestoff ist die Trehalose, die auch von verschiedenen Autoren als Stressprotektant bezeichnet wird. Dieses Disaccharid eröffnet möglicherweise weitere wichtige Erkenntnisse über die Betriebshefe, z.B. in welchen Stadien des Prozesses Trehalose eingebaut bzw. abgebaut wird. Methoden zur Bestimmung des physiologischen Zustandes sind mit den bisher entwickelten Parametern (Glykogen, Neutrallipide, 3-ß-Hydroxysterole, tot-lebend-Status) bei weitem nicht ausgeschöpft, so das eine Vielzahl von Problemen noch offen bleiben.

In der Fortsetzung unserer Bemühungen wären dabei folgende Fragestellungen zu klären:

1. Ist der Trehalosegehalt mit fluoreszenzoptischen Methoden nachweisbar?

2. Welche Zellen von polyklonalen UG- und OG-Betriebshefen beginnen als erste, DNA zu synthetisieren, wie lange dauert ihre Zellvermehrungsphase und wann gehen diese Zellen in Gärung über?

3. Zur Kontrolle des Alterungs- und Inaktivierungsprozesses bis hin zum Absterben der Betriebshefe gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine differenzierten und verlässlichen Nachweisverfahren. In vielen Situationen eines großtechnischen Prozessverlaufes ist aber wichtig nur junge, dynamische Zellen zu inokulieren bzw. zu ernten oder die Population so zu stimulieren, dass eine derartige Dynamik garantiert werden kann. Die steriotype Bezeichnung des

Sterbens wird bei der Hefe von den Braueren als Autolyse bezeichnet. Es gibt aber sicherlich unterschiedliche Arten des Sterbens. Handelt es sich im Sinne der Säugetierzellen, um einen programmierten Zelltod (Apoptose), ein Programm, das von der einzelnen Zelle gestartet wird, oder aber ist das Sterben auf eine Membranschädigung, im Sinne eines Defektes zurückzuführen?

4. Eine Inaktivierung der Zellen vollzieht sich sicherlich bei Zellen, die häufig gesprosst haben. Viele Sprossnarben auf der Zellmembran führen dazu, dass die Stoffaufnahme dieser Zellen gestört ist. Sind diese Sprossnarben durch eine entsprechend Färbemethode anfärbbar und können sie mit Hilfe eines Flußzytometers quantitativ erfasst werden?

Zu all diesen Fragestellungen müssen Methoden entwickelt und getestet werden, um die Erkenntnisse in die Praxis zu übertragen. Dazu gehört ebenso die Entwicklung von simultanen Analysemethode, etwa die gleichzeitige Anfärbung des DNA+Glykogengehaltes, Neutrallipid-+Glykogengehaltes oder Bestimmung des Zellvolumens+ Glykogengehaltes jeweils in der einzelnen Zelle. Simultane Bestimmungen machen die Aussagen noch effizienter und schneller.

2. Ausgangssituation – derzeitiger Kenntnisstand

Für die Entwicklung der Brauindustrie in der Zukunft hat der derzeitige Präsident der EBC auf dem Symposium Yeast Physiology - A new era of opportunity folgende Forschungsschwerpunkte benannt, die die europäische Brauindustrie in der Zukunft bearbeiten sollte:

1. Quality
2. Consistancy
3. Cost
4. Control
5. Development

Die Zukunftsstrategie der EBC muß nicht zwingend für die deutsche Brauindustrie gelten. Jedoch erscheint es ratsam im Zeichen drohender Konzentration und damit verbundener globaler Strategien in der Brauindustrie schon aus Wettbewerbsgründen auch Forschung zu betreiben, um auf die zukünftigen Probleme reagieren zu können. Schwierigkeiten wird es sicher geben im Zusammenhang mit einer anderen Rohstoffzusammensetzung, mit high gravity brewing, mit hohen Zuckerkonzentrationen oder immobilized yeast fermentation. **Darüber hinaus verbleibt sowohl für die europäischen als auch für die deutschen Brauer das Kernproblem, wie kontrolliere ich den Gärprozeß.**

Die Kontrolle der Hefe von der Reinkultur bis zur Filtration ist seit Jahren Ziel unserer Untersuchungen. So dass wir bezüglich des Schwerpunktes **Control** auf die Fragestellungen:

a) yeast viability and vitality
b) yeast stress marker
c) yeast performance markers
d) yeast management
e) yeast fermentation modelling

durch unsere Aktivitäten auf dem Gebiet der fluoreszenzoptischen Kontrolle der Gärung ein effizientes Verfahren an der Hand haben und auf diese Fragen sicherlich eine Antwort finden werden.

a) Untersuchungen zur klonalen Zusammensetzung von Betriebshefen mit Hilfe des Einbaus von BrdU in die DNA und flußzytometrischen Analysen

Der Anteil proliferierender/ nicht-proliferierender Zellen in einer Population ist für viele Fragestellungen in der Biologie, in der Medizin und natürlich in der Biotechnologie von entscheidender Bedeutung. In der Krebstherapie ist es wichtig festzustellen, in welcher Zellzyklusphase Chemotherapeutika auf die schnell wachsenden Tumorzellen und normal wachsende Zellen wirken. Mit herkömmlichen DNA-Analysen kann diese Differenzierung nicht geklärt werden.

Bei Säugetierzellen hat man in der Vergangenheit folgende Lösung verfolgt. BrdU (Bromdesoxyuridine) wird als Thymidinanalogon eingesetzt, um die DNA-Syntheserate zu verfolgen. Das BrdU wird an Stelle des Thymidins in die DNA eingebaut. Es hat die gleiche Effizienz wie Thymidin. Der Vorteil ist, daß es kaum toxisch auf Säugetierzellen wirkt.

Die DNA kann man mit spezifischen Fluorochromen anfärben, z.B. mit Hilfe der Bisbenzimide H33258 und H33342. Dies sind AT-spezifische Fluoreszenzfarbstoffe, die präferenziell an Adenin-Thymidin-Regionen der Doppelhelix anlagert werden. Durch die Färbung kann der Einbau von BrdU nachgewiesen werden. Zellen, die DNA synthetisieren und BrdU inkorporiert haben, fluoreszieren nach Färbung mit H 33258 relativ schwach gegenüber Zellen, die kein BrdU eingebaut haben. BrdU bewirkt nämlich ein Quenching der Fluoreszenz. Bei der Auswertung starker und schwacher

Fluoreszenzlichtsignale kann man in der Population synthetisierende Zellen (Zellen, die BrdU eingebaut haben) von nicht synthetisierenden Zellen unterscheiden.

Dieser flußzytometrische Nachweis zur Proliferationsaktivität könnte auch auf biotechnische Probleme bei Betriebshefen mit unterschiedlicher klonaler Zusammensetzung angewendet werden. In der Vergangenheit haben die DNA-Analysen unter- und obergäriger Hefen gezeigt, daß UG-Hefen einen „diploiden“, die OG-Hefen einen „polyploiden“ Status besitzen.

α) Proliferationsaktivität der OG-Hefen

Bei den OG-Hefen stößt die Auswertung der Zellzyklusphasen allerdings auf große Schwierigkeiten, da keine Zuordnung der Zellzyklusphasen wegen der Überlappung vieler peaks durchgeführt werden kann. Da aber offenkundig der Start der Zellvermehrung und späterer Gärung der einzelnen Klone zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt, waren wir schon lange auf der Suche nach einer effizienten Methode, die aktiv proliferierende Zellen von nicht aktiv proliferierenden Zellen zu differenzieren.

β) Proliferationsaktivität der UG-Hefen

Wenn man das Fluoreszenz- und Streulichtsignal einer UG-Population betrachtet, so haben die Histogramme selten einen cv (Variations-Koeffizient) unter 10%. Das lässt darauf schließen, dass die UG-Hefestämme aus Klonen bestehen, deren Zellen unterschiedliche DNA-Gehalte besitzen. Es sind also keine rein „diploiden“ Hefen sondern vermutlich aneuploide Hefen. Unterschiedliche klonale Verhältnisse dieser Populationen lassen vermuten, daß auch hier Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einen Zellzyklus starten. In unserem speziellen Fall heißt dies, dass es Zellen in der Population gibt, die unterschiedlich schnell BrdU eingebaut haben und durch den Quenching-Effekt von den übrigen Zellen differenziert und gezählt werden können.

Diese Untersuchungen würden einmal Erkenntnisse über die klonalen Verhältnisse in der Population bringen, zum anderen aufzeigen, welche Zellen innerhalb der Adaptionsphase als erste mit den gegebenen Nährsubstratzusammensetzungen, pH-Werten, Temperaturveränderungen etc. klar kommen.

Im Hinblick auf eine Beurteilung der Dynamik der Vergärung (Proliferations-/Fermentationsaktivität) eines Hefestammes, einer geplanten Umstrukturierung des Hefemanagements und der Verwendung neuer Rohstoffe ist dieses Wissen von Bedeutung.

Neben der Messung des Quenching-Effekts gibt es eine Reihe von spezifischen Antikörpern gegen BrdU (anti-BrdU-antibody) mit denen man die proliferierenden Zellen von den nicht proliferierenden Zellen differenzieren kann. Dies ist als Alternative Methode zu dem o.a. methodischen Ansatz.

Im Verlauf des Forschungsvorhabens sollte entschieden werden, welche Methode praxistauglicher ist und daher empfohlen werden kann. Da im Laufe dieses Forschungsprojektes ein neues Durchflußzytometer angeschafft wurde, welches nicht über eine Quecksilberhöchstdrucklampe verfügt, konnten nur Analysen mit fluoreszierenden Antikörpern durchgeführt werden.

b) Die Alterung von Betriebshefen

Die geschlossene zylindrokonische Vergärung, die seit geraumer Zeit auch von der mittelständisch strukturierten Brauindustrie eingesetzt wird, macht es notwendig, den physiologischen Zustand der Zellen schnell und effizient bestimmen zu können. Dabei spielt der Alterungsprozess eine große Rolle. Nur junge dynamische Zellen garantieren eine störungsfreie Vergärung. Wir wollen mit Hilfe der Proteinaseaktivitätsbestimmung und des Sprossnarbennachweises das Alter der Population ermitteln.

Streiblova und Beran berichteten 1963 über die Anfärbung der Sproßnarben bei *Saccharomyces cerevisiae* und der Septen bei *Schizosaccharomyces pombe* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Primulin. Dieses Fluorochrom färbt die Membran nativer Zellen gelblich/grün an, während tote Zellen eine Totalfluoreszenz zeigen. Dieser Tatbestand beruht darauf, dass Primulin von der Molekülgröße nicht in der Lage ist, die Zellwand lebender Zellen zu passieren und so Polysaccharide auf der Zellmembran schwach anfärbt (Streiblova und Beran (1963), Streiblova et al. (1966), Graham (1970), Duffus et al. (1984)). Membrangeschädigte Zellen nehmen dieses Fluorochrom auf und färben das gesamte Zytoplasma an.

Mit Hilfe von WGA-FITC (wheat germ agglutinin, fluorescein conjugate) soll in Hefepopulationen die Verteilung intensiv fluoreszierender Hefezellen von schwach fluoreszierenden unterschieden werden. Erhält man Häufigkeitsverteilungen mit intensiven Fluoreszenzlichtsignalen, kann man darauf schließen, dass es viele alte (Mehrfachsprosser) und tote Hefezellen in der Population vorliegen. Eine relativ schwache Fluoreszenz deutet auf eine junge, dynamische Population hin.

WGA gehört zu den Lektinen (Weizen-Lektin). Lektine sind Glykoproteine, die mit einer hohen Spezifität an Kohlenhydratreste in Glykoproteinen und anderen Biomolekülen binden.

Die Spross- und Geburtsnarben bestehen aus kraterähnlichen Chitin-Ringen, die nicht mehr elastisch genug sind, um in diesen Bereichen Zucker- und Gasaustausch zu gewährleisten. Je höher die Anzahl der Sprossnarben ist, desto geringer wird die verbleibende Zelloberfläche, durch die Gase und Zuckermoleküle transportiert werden können. (Streiblova und Beran, 1963). Mit dem Fluoreszenzfarbstoff WGA-FITC können präferenziell chitinhaltige Regionen auf der Hefezelloberfläche angefärbt werden (Hodgson et al., 1999).

Dieses Färbeverfahren soll genutzt werden, um Mehrfachsprosser (bzw. tote Zellen) von jungen dynamischen Zellen anhand stärkerer bzw. schwacher Fluoreszenzintensitäten zu differenzieren.

Die Rolle der Proteolyse im Leben der Organismen wurde viele Jahre nicht berücksichtigt. Jedoch haben die Forschungen der letzten Jahre erwiesen, dass die Proteolyse entscheidend für das Leben einer Zelle ist. Sie ist ein ze
ntraler Mechanismus der posttranslationalen Kontrolle von zellulären Funktionen.

Proteinasen, auch Endopeptidasen genannt, sind proteolytische Enzyme, die sich chemisch dadurch kennzeichnen, dass sie ihr Substrat (eine Aminosäurekette bzw. ein Eiweißmolekül) unter Anlagerung von Wasser an genau definierten Stellen zwischen zwei bestimmten Aminosäuren spalten. Proteolytische Enzyme werden, da sie Peptidbindungen hydrolytisch spalten, auch Peptidasen oder Peptidhydrolasen genannt. Die Spezifität einer Peptidase wird durch die Aminosäure bestimmt, die die zu spaltende Peptidbindung flankieren. Dazu muss gewährleistet sein, dass die Aminosäurekette mit den entsprechenden Aminosäuren an das aktive Zentrum der Protease angelagert werden kann.

Dieser Parameter soll Auskunft geben, ob intrazellulär Proteinase A eingelagert oder abgebaut worden ist. Sobald in der Hefepopulation ein starkes Fluoreszenzsignal nachweisbar wird, bedeutet das, dass der Anteil toter (apoptotischer) Zellen in der Population angestiegen ist und die einzelnen Zellen Proteolyse durchführen.

Proteinase A hat außerdem durch die Spaltung von schaumaktiven Polypeptiden einen starken Einfluss auf die Schaumeigenschaften des fertigen Bieres. Dieser Tatbestand ist biotechnologisch von großem Interesse für die Bierherstellung in Deutschland.

c) Flußzytometrische Analysen zur Bestimmung der Reservestoffgehalte (Glykogen, Neutrallipide, Trehalose) der Betriebshefen

Bei vielen Organismen werden unter bestimmten Wachstumsbedingungen intrazellulär Speicher- und Reservestoffe (Glykogen, Neutrallipide, Trehalose,) eingelagert.

Höhere Organismen schützen sich dadurch bei potentiellem Brennstoffmangel durch die Polymerisation überschüssiger Glukose, um sie in Form von Glukanen (d.s. Glukose-Polysaccharide mit hoher molarer Masse zu speichern.

Das in Hefen gespeicherte Glykogen ist aus α-1.6-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten aufgebaut und in der Struktur dem Amylopektin ähnlich.
Die Speicher- und Reservestoffe werden von den Zellen unterschiedlich verwertet:

Glykogen:

Glykogen ist weniger energiereich und wird offensichtlich schneller mobilisiert als Fett. Hinzu kommt, daß die Fettsäure-Reste der Neutrallipide nicht anaerob metabolisiert werden können. Das würde bedeuten, dass die Betriebshefen in der Gärung und Nachgärung unter anaeroben Bedingungen keinen Neutrallipidverlust haben, wohl aber ein Glykogenabbau stattfindet.

Dies konnte in vielen untersuchten Gärprozessen mit Hilfe der fluoreszenzoptischen Analytik bestätigt werden.

Glykogen reichert sich bei Nähstoffzufuhr in der Hefezelle an und wird im Hungerzustand wieder abgebaut. Ein hoher Glykogengehalt wird mit einer hohen Vitalität der Hefezellen assoziiert. Dies bedeutet aber nicht, dass hoher Glykogengehalt gleichbedeutend ist mit hoher Proliferationsaktivität.

Daher kommt der Hefe während der Lagerung, Zellvermehrung und Gärung eine dem Mechanismus des Glykogenabbaus bzw. der Glykogeneinlagerung

besondere Bedeutung zu, mit welchen Geschwindigkeiten diese Prozesse ablaufen und wie sie quasi online kontrolliert werden können.

Neutrallipide:

Neutrallipide sind Reservestoffe, die in der Hefe bei Stresssituationen gebildet werden. Sie übernehmen Schutzfunktionen gegen Äthanol, Temperaturen, Infektionen durch Bakterien usw. So bedeutet das Bereithalten eines Fettsäurepools im Stressfall erhöhte Widerstandsfähigkeit der Zelle gegen Äthanol- und hohe Zuckerkonzentrationen.

Lipide sind also effiziente Stoffwechsel-Energiespeicher bei Säugetierzellen. Sie liefern im Vergleich zu einer gleichen Menge an hydratisiertem Glykogen das sechsfache an Energie.

Trehalose:

Im 19. Jahrhundert wurde der Zucker Trehalose in Europa unter dem Begirff *Trehala Manna* bekannt. Trehalose ist ein Disaccharid, das in nicht-reduziertem Zustand vorliegt. Es besitzt einen süßen Geschmack. Dieses Disaccharid wurde bisher in Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen, Insekten und anderen Vertebraten nachgewiesen. In Mikroorganismen, besonders in ihren Überdauerungsformen, den Sporen, findet man häufig eine Akkumulation der Trehalose.
In Wirbeltieren konnte α,α-Trehalose nicht gefunden werden (Schmutz, 1988).

Küenzi und Fiechter (1972) fanden eine Erhöhung der Trehalosekonzentration bei begrenztem Glucoseangebot während der kontinuierlichen Kultivierung.
Lillie und Pringle (1980) differenzierten dieses Ergebnis. Kurz vor der Erschöpfung der Glucose war zunächst eine Erhöhung des Glykogengehaltes und später nach Verbrauch der Glucose eine Trehaloseakkumulation festzustellen. Bei ungünstigen Wachstumsbedingungen, wenn die Glucose

verbraucht ist, verstoffwechseln die Hefezellen zunächst das gespeicherte Glykogen. Anschließend wird laut Lillie und Pringle (1980) Trehalose mobilisiert. Gleichzeitig sterben viele Hefezellen ab. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass der Trehalose eher eine Schutzfunktion zukommt als der Einlagerung eines zusätzlichen Reservestoffes, den die Zelle in ungünstiger Wachstumssituation mit Kohlenhydraten mobilisieren kann.
Das Vorhandensein von Trehalose in Hefezellen wurde daher in den frühen Untersuchungen als Reservestoff gewertet. Erst Thevelein et al. (1984) bezeichneten das Kohlenhydrat als Stressprotektant für das Cytosol der Hefezellen. Man hatte festgestellt, dass nach Hitzebehandlung bei 45°C eine Anhäufung von Trehalose nachzuweisen ist (Hottiger et al., 1987). Bei nachfolgenden Hitzestresssituationen wurden die Zellen durch akkumulierte Trehalose in den Zellen geschützt. Bei diesem Temperaturstress musste im Nährmedium allerdings Glukose vorhanden sein.

Attfield (1987) betonte, dass Trehalose nicht nur als Protektant während eines Hitzestresses, sondern auch zum Schutz der Membran vor Austrocknung bzw. beim Einfrieren angereichert wird.
Neves et al. (1991) betrachteten Trehalose einmal als Reservestoff für den frühen Zeitpunkt der Reifung, z.B. bei *Neurospora crassa*, zum anderen als Protektant bei der Erhitzung, der Austrocknung und pH Verschiebungen. Darüber hinaus werteten sie die Trehaloseakkumulation als Schutz gegen die Inhibierung anderer Umweltstresssituationen wie Einwirkungen von organischen Lösungen, von Oxidantien und bei Schwermetallintoxikationen. Für Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* schließen sie aber Trehalose als Kohlenstoffquelle und Reservestoff aus, betonen aber die Schutzfunktion des Disaccharids bei Hitze- und anderer umweltbedingter Stressfaktoren. Das Phänomen des Schutzes durch Trehalose ist reversibel, da Trehalose schnell abgebaut wird, sobald die Zellen wieder unter zellphysiologischen Bedingungen wachsen können.

Slaughter und Normura (1992) untersuchten die Speicherung von Kohlenhydraten und Reservestoffen unter verschiedenen extremen Wachstumsbedingungen an *Saccharomyces cerevisiae* und kamen zu dem Schluss, dass Glycogen- und Trehalosegehalte Hinweise auf die Viability geben.

Schwerpunktmäßig soll eine fluoreszenzoptische Färbemethode entwickelt werden, um Trehalose flußzytometrisch zu bestimmen. Alternativ werden wir eine konventionelle Trehalose-Bestimmung durchführen.

d) Untersuchungen über den Zelltod von Hefezellen

In der Biologie kennt man bezüglich des Zelltods die Begriffe Apoptose und Nekrose.

Man bezeichnet die Apoptose auch als programmierten Zelltod oder als Suizid-Programm, bei dem die betroffene Zelle eine Reihe biochemischer Ereignisse aktiviert, die dann unwiderruflich zu ihrer totalen physischen Zerstörung führen.
Im Gegensatz zur Apoptose wird bei der Nekrose, die Zelle durch mechanische Einwirkung und/oder durch chemische Noxen nachhaltig geschädigt.

Das charakteristische Merkmal der Apoptose ist die Aktivierung von Endonukleasen, die die DNA schneiden. In solchen Zellen ist kein morphologisch intakter Zellkern mehr nachzuweisen, so dass nur noch DNA Fragmente (apoptotic bodies, micronuclei) nachzuweisen sind. Dies drückt sich natürlich in einer veränderten Anfärbbarkeit der DNA aus (d.h. schwache Fluoreszenzlichtsignale). Der Effektor für diese Art von Zelltod sind Gene, die das Apoptose-Programm initiieren. Während die Apoptose ein aktiver Prozess ist, der von der einzelnen Zelle ausgeht, ist die Nekrose ein passiver degenerativer Prozess, der sich dadurch auszeichnet, dass die Plasmamembran beschädigt ist und die Protein-Fluoreszenz relativ gering ist. Eine DNA-

Degradation im Sinne einer Fragmentierung ist nicht nachweisbar. Mit der Nekrose geht meist ein entzündlicher Prozess einher, der die Zellen in der Umgebung dieser Zelle befallen hat.

Da bei apoptotischen Zellen die Plasmamembran noch intakt ist, bei nekrotischen Zellen jedoch geschädigt, müsste man mit zwei Fluorochromen in einer unfixierten Population, Zellen erfassen können, die einen Farbstoff über die intakte Membran aufnehmen können und solche, die den zweiten Farbstoff nur aufnehmen können, wenn ihre Membran vorher, wie bei den nekrotischen Zellen, geschädigt ist. Das Bisbenzimid H33342 wäre ein Fluorochrom, das von nativen Zellen aufgenommen wird. Propidium Jodid als das zweite Fluorochrom, das nur von Membrangeschädigten Zellen aufgenommen werden kann.

Die Ergebnisse, die für Säugetierzellen beschrieben wurden, müssen nicht auf Hefezellen übertragbar sein. Allerdings sprechen einige Beobachtung dafür, dass der Zelltod bei Hefen ähnlich verläuft wie bei Säugetierzellen nachgewiesen. Wir kennen bei Hefezellen die DNA-Fragmentierung und die Membranschädigung, d.h. man müsste mit einer entsprechenden Doppelfluorochromierung die apoptotischen Zellen von den autolysierenden (nekrotischen) Zellen differenzieren können.

In Gärprozessen verschiedener Brauereien soll die Zunahme und Abnahme der Apoptose bzw. Membranschädigung untersucht werden (Eine weitere Fragestellung: haben die Hefepumpen einen schädigenden Einfluss beim Umpumpen auf die einzelnen Hefezellen, kann in diesem Zusammenhang beobachtet werden).

e) Entwicklung simultaner Analysemethoden zur Bestimmung

α) DNA/Glykogengehalt

β) Neutrallipide/Glykogengehalt

χ) Zellvolumen/Glykogengehalt

Simultane Analysen haben den Vorteil, daß innerhalb kürzester Zeit eine Aussage über zwei intrazelluläre Makromoleeküle vorliegt. Die erste simultane Färbung wurde von Göhde und Dittrich beschrieben. In dieser Arbeit wurde gleichzeitig der DNA-Gehalt und der Protein-Gehalt beschrieben.

Wir wollen für Hefezellen verschiedene simultane Bestimmungen entwickeln:

α) den DNA-Gehalt mit dem Fluorochrom DAPI und den Glykogengehalt mit dem Fluorochrom Acriflavin.

β) den Neutrallipidgehalt mit dem Fluorochrom Nilrot und dem Glykogengehalt mit dem Fluorochrom Acriflavin.

χ) Mit Hilfe des Vorwärtsstreulicht-Parameters wollen wir die Zellgröße mit dem Glykogengehalt, das mit Acriflavin angefärbt wird, korrelieren

3. Forschungsziel

Die Entwicklung flußzytometrischer Analysen, um den physiologischen Zustand der Betriebshefe in ZKG-Vergärungen kontrollieren zu können, ist die primäre Zielsetzung unserer Bemühungen. Wir konnten im vorangegangenen Forschungsvorhaben B 60 wichtige Erkenntnisse zu diesem Thema u.a. über den Neutrallipid- und Glykogengehalt der Betriebshefe gewinnen.

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend, soll die Entwicklung fluoreszenzoptischer, im Brauereilabor problemlos reproduzierbarer Methoden und deren Adaption an die Praxisbedingungen verstärkt durchgeführt werden.

Die zu entwickelnden Verfahren zur Messung des Trehalosegehaltes sowie Bestimmungen zur simultanen Analyse verschiedener intrazellulärer Moleküle, zum fluoreszenzoptischen Alterungsnachweis und neue Methoden die Differenzierungsmöglichkeiten der Zellzyklusphasen und des Zelltodes erlauben, erweitern und ergänzen die bisher gewonnenen Kenntnisse über die Physiologie der Betriebshefe.

Dadurch wird gewährleistet unseren Wissenschafts-Vorsprung auf diesem Gebiet auch international zu halten. Dies ist das Anliegen unseres Forschungsauftrages.

4. Material und Methoden

4.1 Teil I: Untersuchungen über den Zelltod

4.1.1 Probennahme im Betrieb

An den ZKG's (zylindrokonischen Gärtanks) befinden sich am Übergang vom konischen zum zylindrischen Teil Probenahmestellen. Diese Probenahmestellen im Tank sind über Rohrleitungen mit dem Zwickel verbunden. Je nach hydraulischer Einstellung (Pumpe) zwickelt man eine Bier- oder Hefeprobe.

Vor der Probennahme erfolgte ein kurzer Vorlauf, der verworfen wurde. Die Hefeprobe wurde in ein sauberes Falcon-Röhrchen mit 30 ml vorgelegter, steriler PBS (nativ-Probe) oder zur Fixierung in vorgelegte 70%iges Ethanol (auf 30 ml Ethanol circa 5 ml Probe) gezwickelt. Bei zuviel Hefe reicht die Alkoholmenge zur Fixierung nicht aus.

Wenn die Probe "muffig" riecht, die Zellen sich "verklumpt" unter dem Mikroskop darstellen oder die Messung keine eindeutigen Zellzyklusphasen ergibt, ist dies auf unsachgemäße Probenahme zurück zu führen. Zum Beispiel wurde dann eine zu große Hefemenge zum Ethanol gegeben, oder der Alkohol war nicht 70%ig.

4.1.2 Probennahme im Labor

Für Messungen, die eine native Hefeprobe erforderten, wurden 0,5 ml der Hefesuspension mittels einer sterilen Pipette direkt in ein Zentrifugenglas pipettiert.

Für Messungen, die eine fixierte Probe erforderten, wurden 2,5 ml der Hefesuspension mittels einer sterilen Pipette in 5 ml vorgelegtes 70%iges Ethanol gegeben. Die 2,5 ml Probe wurden nur über Eintauchen der Glaspipette in die Suspension (ohne Peleusball) gezogen.

Native Proben werden sofort nach Probenahme gefärbt und gemessen.

Zur vollständigen Fixierung müssen die Proben vor der Färbung für mindestens 4 Stunden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

4.1.3 Mikroorganismen

Hefestämme

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Saccharomyces uvarum*

4.1.4 Angewandte Verfahren zur Einleitung der Apoptose bei *Saccharomyces uvarum*

Neben speziellen Chemikalien lösen auch UV-Bestrahlung, Hitzeschock und H_2O_2 bei tierischen Zellen Apoptose aus. Diese Behandlungsarten wurden auch als Stimuli der Apoptose für die *Saccharomyces uvarum* gewählt. Verschiedene Hefesuspensionen wurden mit und ohne Zugabe von Malzextrakt bei Zimmertemperatur (RT, 20-22°C) und bei 37°C, gelagert.

Aliquote von Hefesuspensionen wurden wie folgt behandelt:

(1) Lagerung bei 27° C mit Malzextraktzugabe
(2) Lagerung bei RT ohne Zugabe von Malzextrakt
(3) Lagerung bei RT mit Malzextraktzugabe (und Belüftung)
(4) Einwirkung von UV-Licht (30 Minuten direkte Sonneneinstrahlung)
(5) Einwirkung von UV-Licht (30 Minuten UV Leuchtstoffröhre)
(6) Einwirkung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
(7) Hitze- und Kälteschock (°C)

Die ersten Versuchsanordnungen (1-3), bei denen die Hefen bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert wurden, sollen zeigen, ob die Hefezellen im Laufe der Lagerung (Alterung) auch ohne Stimuli Apoptoseerscheinungen aufweisen.

Die Stimulation der Apoptose mittels UV-Licht erfolgte mittels direkter Sonneneinstrahlung, sowie der Bestrahlung mit einer UV-Leuchtstoffröhre für je 30 Minuten pro Versuchsansatz.

Weitere Versuche wurden mittels unterschiedlichen Wasserstoffperoxyd-konzentrationen stimuliert. Diese Tests wurden mit der fluoreszenz-mikroskopischen Tot-Lebend-Zellzahlbestimmung (FDA-/PI) kombiniert um einen Eindruck für die Schädigung der Populationen zu erhalten.

Bei den Temperaturschockversuchen wurden die Suspensionen wie folgt für eine Zeitdauer von 1 Minute erwärmt bzw. abgekühlt.

- 20 °C → 50 °C
- 20 °C → 70 °C
- 20 °C → -18 °C
- 37 °C → -18 °C
- 4 °C → 50 °C

Die Hefesuspensionen wurden mit Ethanol fixiert und mikroskopisch, molekularbiologisch und flußzytometrisch untersucht.

4.1.5 Geräte

- Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop, Firma Hund, Wetzlar
- Flußzytometer PAS, partec GmbH
- Analysenwaage, Mettler
- pH-Meter, 761 Calimatic, Knick, Berlin
- Zentrifuge, Heraeus-Christ GmbH, Osterode
- Ultraschallbad, Bransonik 220
- Schüttelwasserbad, GFLmbH, Burgwedel
- Waage, Sartorius GmbH, Göttingen

4.1.6 Färbeprotokolle

4.1.6.1 DNA-Gehalt (Zellzyklus) mit Propidium Iodid (bzw. DAPI)

Für die Zellzyklusanalysen wurde der DNA-Gehalt der Hefezellen mit Propidium Iodid (bzw. DAPI) gefärbt. Die Färbung wurde wie ausführlich in dem Färbeprotokoll von Hutter und Eipel (1978) beschrieben, mit kleinen Modifikationen durchgeführt.

Färbung mit DAPI (4'-6'-Diamidino-2 Phenylindol · 2 HCl)

DAPI-Gebrauchslösung: 1 µg DAPI / ml Tris-Puffer pH 7,2

DAPI ist ein Farbstoffmolekül aus der Farbstoffklasse der Phenylindole. DAPI lagert sich spezifisch in die große Grube der Doppelhelix, und hier bevorzugt an AT-Bereiche an. Die optimale Anregung erfolgt bei λ = 360 nm (HBO-Lampe).

Benötigte Materialien:

- Laborwecker
- Zentrifuge
- Vortex-Gerät
- Zentrifugengläser
- Fluoreszenzmikroskop
- Objektträger, Abdeckglas
- Analysenwaage
- Wasserbad (37°C)
- Ribonuklease (1mg RNase/ml PBS pH 7,2)
- PBS-Puffer pH 7,2
- Propdiumiodid (7 mg PI/100 ml Tris Puffer, pH 7,5)

Phosphatgepufferte Saline-Puffer (PBS)

- 40,0 g Natriumchlorid p.A. (NaCl)
- 1,0 g Kaliumchlorid p.A. (KCl)
- 7,2 g Di-Natriumhydrogenphosphat-2Hydrat p.A. $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$)
- 1,0 g Kaliumdihydrogenphosphat p.A.
- in 4,9 l dest.H_2O lösen, pH mit HCl auf 7,2 einstellen und auf 5 l mit H_2O auffüllen

Durchführung:

- 1 ml der ethanolischen Hefesuspension in 5 ml PBS-Puffer waschen
- 10 Min. bei 1.000 U/min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Waschschritt mit PBS wiederholen

- Hefepellet in 1 ml vorgewärmter RNase-Lösung (37°C) resuspendieren und möglichst genau 1 Stunde im Wasserbad bei 37°C inkubieren;
- Stoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 5 ml kalter PBS-Lösung
- zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 10 ml PBS-Lösung waschen
- zentrifugieren und Niederschlag in 2 ml PBS resuspendieren.
- Zugabe von 200 µl PI-Lösung (bzw. 20 µl 1:3 verd. DAPI Lösung, Partec)
- Gefärbte Proben für mindestens 1 Stunde kühl stellen, besser über Nacht

4.1.6.2 Bestimmung des Glykogengehalts mit Acriflavin

Robert Feulgen entdeckte 1924 ein Verfahren zur Anfärbug des Zellkerns in tierischen und pflanzlichen Zellen mit Fuchsin. Dabei wird der Gehalt an DNA mit fuchsinschwefliger Säure stöchiometrisch angefärbt. Auf dieser Basis bestimmte Prenna (1976) den DNA-Gehalt von Säugetierzellen mit Acriflavin. Zum fluoreszenzoptischen Nachweis des DNA-Gehaltes von *S. cerevisiae* setzte Hutter (1975) erstmals Acriflavin ein. Sie beruht auf der Darstellung von zwei dichtgelagerten Aldehydgruppen mit der fuchsinschwefligen Säure. Ihre Spezifität liegt in der gezielten Hydrolyse von Kohlenhydraten mit Hilfe der Perjodsäure, wobei 1,2-Glycolgruppen in Aldehydgruppen umgewandelt werden. Der Vorteil der Perjodsäure liegt darin, dass die Reakion bei der Bildung der Aldehyde endet und nicht durch weitere Oxidation Carboxylgruppen entstehen.

Durchführung:

Herstellung Acriflavin-Lösung

- 10 ml HCl konz. werden mit H_2O dest. auf 100 ml aufgefüllt (langsam, Wasser vorlegen!)
- 0,5 g Acriflavin werden in 15 ml der verdünnten HCl bei Raumtemperatur gelöst
- 0,5 g $K_2S_2O_5$ in 85 ml H_2O dest. lösen und zur salzsauren Acriflavinlösung geben
- 24 Stunden später wird zu dieser Lösung 300 mg Aktivkohle gegeben und 2 Minuten
  kräftig geschüttelt und sofort über Faltenfilter in eine Schliffstopfenflasche filtriert.
- Die Lösung kühl und dunkel aufbewahren

Färbung der Hefen

- 1 ml der ethanolischen Hefesuspension in 9 ml PBS-Puffer waschen
- 10 Min. bei 1.000 U/min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Waschschritt mit PBS wiederholen
- Pellet mit 1 ml Periodsäure (0,5%ig) aufnehmen, gut mischen und 10 Minuten einwirken lassen
- mit 9 ml PBS-Puffer 2 mal waschen
- Zugabe von 1ml Schiff'schem Reagenz (1:100 mit PBS verdünnt) Einwirkzeit: 1 Stunde bei Raumtemperatur, im Dunkeln

- mindestens 2 mal mit 9 ml PBS waschen (→ mikroskopische Kontrolle, die umgebende Flüssigkeit sollte kaum gefärbt sein, um hohes Untergrundrauschen zu vermeiden)
- Falls nötig über ein Polyamidsieb (50µm Maschenweite) filtrieren

4.1.6.3 Neutrallipide

Benötigte Materialien:

Zentrifuge	Nilrotlösung (1mg/ml Aceton)
Vortex Gerät	Stoppuhr
Zentifugengläser	Fluoreszenzmikroskop
PBS-Puffer pH 7,2	Pipette 20 µl

Durchführung:

- 1ml de ethanolischen Hefesuspension in 9ml PBS-Puffer waschen
- 10 Min. bei 1.000 U/min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Waschschritt wiederholen
- Pellet in 1 ml PBS aufnehmen
- Zugabe von 1 Tropfen (20 ul) Nilrotlösung
- Messung nach genau 30 Minuten Einwirkzeit bei RT im Dunkeln (daher zeitlich versetzte Färbung der einzelnen Proben)

Kontrolle der Färbung im Fluoreszenzmikroskop (488nm), gold-gelb fluoreszierende Lipidtröpfchen unterschiedlicher Größe.

4.1.7 Durchführung der molekularbiologische Untersuchungen: Gelelektrophorese und DNA-Isolierung

Bei der Apoptose die DNA durch eine spezifische Endonuklease in ca. 200 bp lange Stücke geschnitten. Zum Apoptosenachweis wird die genomische DNA der Hefen isoliert und anschließend in einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Gelelektrophorese trennt die DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit. Bei Apoptosezellen wird ein leiterähnliches Muster im Agarosegel erwartet. Das Ziel der durchgeführten Gelelektrophorese war, diese sog. DNA-Ladder zu erhalten. Dabei entsteht ein leiterähnliches Muster, wobei jede Sprosse einem der circa 200 bp langen Fragmenten (apoptotische DNA-Fragmente) entspricht. Bei Nekrosezellen entsteht eine anstelle des leiterähnlichen Musters nur eine Schmierspur im Gel.

Herstellen des Agarosegels

Agarosemenge (%)	Effektiver Bereich zur Trennung linearer DNA-Fragmente (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tab.4.1.7: Empfohlene Agarosekonzentration für die Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe

- Entsprechende Menge an Agarose abwiegen
- Zugabe des TAE-Puffers

- Lösung in der Mikrowelle zum Kochen bringen, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind (Agarose ist dann vollständig gelöst).
- Wenn wenig Probenmenge vorliegt, der Agarose evtl. 10 µl EtBr (1,0 µg/ml EtBr) zugeben.
- Die Agarose unter fließendem Wasser abkühlen und anschließend in das Elektrophoreseschiffchen gießen. Nach ca. 10 min ist das Gel erstarrt.

Zur Auftrennung der apoptotischen Hefe-DNA wird ein 2 %-iges Agarosegel verwendet.

Durchführung der Gelelektrophorese

- Zu 8 µl der isolierten DNA werden 2 µl Bromphenolblau gegeben. Je nach Kammergröße werden zwischen 10 und 30 µl Probe in die durch den Kamm erzeugten Wells einpipettiert.
- Zusätzlich wird ein DNA-Größenmarker aufgetragen
- Nach dem Auftragen der Proben wird die Elektrophoresekammer geschlossen.
- Die Elektrophorese wird bei 100 V (bzw. bei 50 V) durchgeführt.
- Das Gel sollte so lange laufen, bis der blaue Farbmarker mindestens die Hälfte der Laufstrecke erreicht hat.
- Nach dem Lauf wird das Gel zum Anfärben der DNA-Fragmente 15 min in TAE mit 1,0 µg/ml EtBr inkubiert.
- Das gefärbte Gel wird abschließend auf einen UV-Transilluminator gelegt und bei 312 nm fotografieren.

Die Gele wurden mit dem Programm "Multi-Analyst" der Firma Biorad aufgenommen und bearbeitet.

4.1.8 Isolierung der Hefe-DNA

Zur Isolierung und Reinigung der Hefe-DNA wurden zwei verschiedene Kits eingesetzt. Zum einen war dies der DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen, Hilden und der Yeast DNA Kit der Firma Peqlab, Erlangen.

DNeasy Tissue Kit (Fa. Qiagen, Hilden)

Der erste Schritt der DNA-Isolierung ist die enzymatische Lyse der Hefezellwand mit Lyticase oder Zymolase. (In unseren Versuchen wurde Lyticase eingesetzt). Durch die Lyticasebehandlung werden Sphäroplasten erhalten, bei denen noch Teile der Zellwand vorhanden sind. Allerdings ist die Zellmembran jetzt durchlässig für die weitere Enzyme, die für die DNA-Isolierung eingesetzt werden. So ist der nachfolgende Schritt eine vollständige Gewebe- und Proteindigestion mittels Proteinase K. Da außerdem RNA-freie genomische DNA erhalten werden soll, gibt man noch RNase A zu.

Durchführung

Die hier aufgeführten Puffer, die Minisäulen und die Probensammelröhrchen sind bereits im DNeasy Tissue Kit enthalten.

Herstellung der Sphäroplasten mittels Lyticase

- Zellernte (max 5 * 10^7 Zellen) durch Zentrifugieren; 10 min bei 7500 rpm
- Zellpellet in 600 µl Sorbitol-Puffer resuspendieren
- 200 U Lyticase zufügen und über Nacht bei 30 °C inkubieren
- 5 min bei 5000 * g zentrifugieren

- Mikroskopische Kontrolle der Sphäroplastenbildung

Protein- und RNA-Digestion

- Zellen in 180 µl ATL-Puffer1 resuspendieren
- 20 µl Proteinase K zugeben, vortexen und ca. 1 h im Thermoblock unter schütteln bei 55 °C inkubieren.
    - 4 µl RNase A (100 mg/ml, 7000 Units/ml) zugeben, durch vortexen mischen und 2 min bei Raumtemperatur inkubieren.
        - 15 sec. Vortexen.
- 200 µl AL-Puffer zur Probe geben, gründlich mischen und 10 min bei 70 °C inkubieren.

(Probe und AL-Puffer müssen sofort gründlich gemischt werden, um eine homogene Lösung zu erhalten)

DNA-Präzipitation und Reinigung

- 200 µl Ethanol (96-100%) zugeben und gründlich mischen (es kann die gefällte DNA als weißer Niederschlag erkennbar sein)
- Eine DNeasy mini Säule in ein 2 ml collection tube stellen und die Suspension in die DNeasy mini Säule pipettieren
- 1min bei 8000 rpm zentrifugieren. (Eluat – Durchfluß - verwerfen)
- Sammeltube wechseln und 500 µl AW 1-Puffer zugeben. Anschließend 1min bei 8000 rpm zentrifugieren. (Eluat - verwerfen)
- DNeasy mini Säule in ein neues 2 ml Sammeltube stellen, 500 µl AW 2-Puffer zugeben und 3 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugieren, um die Dneasy-Membran zu trocknen. (Eluat verwerfen)
- DNeasy mini Säule in ein 1,5 oder 2 ml Tube stellen und 100 µl AE-Puffer direkt auf die DNeasy-Membran pipettieren. 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und dann 1min mit 8000rpm zentrifugieren, um die DNA zu eluieren.

- Das Elutionsschritt wiederholen

Obwohl sehr sorgfältig gearbeitet wurde und bereits die Vorschrift für maximale DNA-Ausbeute eingesetzt wurde, lag die Ausbeute mit dem DNeasy Tissue Kit für die Gelelektrophorese zu niedrig. Nach einer Marktrecherche wurde ein speziell, für die Hefe-DNA entwickelter, DNA-Isolierungskit (Yeast DNA Kit der Firma Peqlab) gefunden und in einer weiteren Versuchsreihe eingesetzt.

Yeast DNA Kit (Fa. Peqlab, Erlangen)

Für die Isolierung sollen maximal $6 \cdot 10^7$ Zellen, die sich in der log-Phase befinden eingesetzt werden. Der Einsatz einer höheren Zellzahl als $6 \cdot 10^7$ steigert die Ausbeute nicht, sondern kann sich sogar negativ auf die Quantität der zu isolierenden DNA auswirken .

Durchführung:

Das Prinzip und Ablauf der Durchführung entspricht dem DNeasy Tissue Kit

1) Zellwandverdau

- Maximal 3 ml der nativen Zellen für 10 min bei 4000 x g abzentrifugieren.
- Überstand vollständig abnehmen und verwerfen.
- Anschließend das Zellpellet in 500 µl Sorbitol-Puffer resuspendieren und 200 – 300 U Lyticase zupipettieren.
- Dieser Ansatz, zur Herstellung von Sphäroplasten, 30 min bei 30°C inkubieren. (In unsererm Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, da selbst nach 2 Stunden die Ausbeute an Sphäroplasten noch zu gering war)
- Mikroskopische Kontrolle der Sphäroplasten
- Die Sphäroplasten durch Zentrifugation für 4 min bei 4000 x g pelletieren. Den Überstand vollständig abpipettieren und verwerfen.

2) Sphäroplastenlyse

- Das Sphäroplastenpellet in 200 µl YL-Puffer aufnehmen.
- 25 µl Proteinase K (15 mg/ml) zugeben und durch vortexen sorgfältig mischen.
- Diesen Ansatz 1 Stunde bei 55 °C in einem Schütthelthermoblock inkubieren.

3) RNA-Verdau

- 20 µl RNase A (25 mg/ml) zupipettieren, und die RNA für 2 min bei Raumtemperatur verdauen lassen.

4) Laden und Binden

- Lysat mit 200 µl YDL-Puffer versetzen, durch vortexen mischen.
- Ansatz 10 min bei 70 °C inkubieren.
- 220 µl absolutes Ethanol zugeben, gründlich Vortexen.
- 800 µl Probe auf die Zentrifugensäule laden, 1 min bei 8000 x g zentrifugieren.
- Säulendurchfluss verwerfen, Säule wieder in das bereits verwendete Sammel-Tube stecken.
- Restliche Probe auf die Säule laden. Nochmals 1 min bei 8000 x g zentrifugieren.

5) Waschen

- Säule in ein neues Sammel-Tube stecken, 750 µl DNA-Waschpuffer auf die Säule pipettieren. 1 min bei 8000 x g zentrifugieren. Säulendurchfluss und altes Sammel-Tube verwerfen.
- Den vorherigen Schritt wiederholen

6) Trocknen

- Zentrifugensäule 2 min bei 10000 x g vollständig trocknen.

7) Elution

- Zentrifugensäule in ein 1,5 ml Tube stecken und 50 µl auf 70 °C vorgewärmten Elutionspuffer auf die Säulenmatrix pipettieren. Die Säule im Tube für 1 min bei 70 °C inkubieren. Anschließend 1 min bei 8000 x g zentrifugieren.
- Elution mit weiteren 50 µl, auf 70 °C vorgewärmten, Elutionspuffer wiederholen.

Eine Aufkonzentrierung der DNA war hier nicht nötig, da deutlich sichtbare Banden erhalten wurden.

Die Probe ca. 10 min bei 65 °C inkubieren, damit der Alkohol vollständig verdampft. Wird dies nicht gemacht, diffundiert die Probe nach dem Auftragen aus den Wells.

Die gewonnene DNA wird anschließend mit Bromphenolblau gefärbt und auf ein 1-2%-iges Agarosegel aufgetragen.

4.1.9 Isolierung niedermolekularer DNA

Eine große DNA-Menge in Apoptosezellen ist von niedermolekularem Gewicht und es wird angenommen, dass diese niedermolekulare DNA aus den Zellen diffundiert, wenn die Zellen zuvor mit Ethanol fixiert wurden. Diese DNA-Fragmente, in der Größe von Nukleosomen liegt in PBS-Puffer vor, wenn die fixierten Zellen für länger als 5 min in 24-37°C suspendiert werden (Darzynkiewicz et.al, 1992).

Um auch diese, für Apoptose typische, niedermolekulare DNA nachzuweisen, wurde diese zusätzlich wie folgt isoliert.

Durchführung der Isolierung der niedermolekularen DNA

- Die mit 70 %-igem Ethanol fixierten Zellen 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Ethanol vom Zellpellet vorsichtig abdekantieren
- Zur Ethanolentfernung Zellpellet ca. 10 min bei 65 °C trocknen lassen
- Apoptotische Zellen für 30 min bei 37°C in wenig PBS suspendieren
- Suspension 20 min bei 14000 rpm zentrifugieren
- Den Überstand, der die niedermolekulare DNA enthält, abdekantieren
- Mit Bromphenolblau färben (2 µl Bromphenolblau auf 8 µl Probe)
- Auf das Elektrophoresegel auftragen und bei 100 V (bzw. 50 V) Auftrennung) laufen lassen

4.2 Teil II: Trehalosebestimmung

a) Trehalose-Analytik mit der Dionex-Anlage:

Die Probenaufbereitung für die HPLC-Methode war die gleiche wie für die flußzytometrische Analyse. Die Zellen wurden in 70%iger Äthanollösung fixiert und in dieser Suspension weiter verarbeitet. Die HPLC Analysen wurden insgesamt zweimal wiederholt.
Die Analyse der Proben erfolgte mit einer Dionex-Anlage, d.h. die Analyse von Kohlenhydraten wurde durch Ionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion durchgeführt. Bei diesem Prinzip werden die sauren Kohlenhydratmoleküle deprotoniert (Eluent ist z.B. NaOH), anschließend über eine Ionenaustauschersäule chromatographiert und dann elektrochemisch (gepulste Amperometrie) detektiert.
Als Säule wurde eine Carbopac, PA 10, 4 mm, verwendet. Eluent: Wasser/1M NaOH = 50/50 isochratisch; Aufgabenmenge: 25 µl der jeweiligen Lösungen.

b) Flußzytometrische Trehalose-Analyse mit dem Lectin Concanavalin A (ConA-FITC):

Der Trehalosegehalt wurde mit einem Lektin-Fluorochrom-Konjugat, ConA FITC, nachgewiesen. Lektine sind pflanzliche Mitogene, die an bestimmte Rezeptoren der Hefezelloberfläche binden. ConA bindet präferenziell an Rezeptoren für Glukose und Mannose. Durch Konjugation an einen Fluoreszenzmarker erhält man geeignete Sonden zur Lokalisation von Glykokonjugaten in Zellen oder an Zelloberflächen.

Fixation:

Hefezellen wurden über Nacht in 3.7% Paraformaldehyd-Lösung bei 4° C fixiert. Vor der Färbung wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Anschließend in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert.

Färbung der Zellen:

Stock solution: 1mg Con A-FITC in 1ml steriler PBS lösen.

Gebrauchslösung: 10 µl aus der stock solution pro ml Zellsuspension, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend im PAS bei 488 nm analysieren. Die Emission des Fluoreceins wurde bei 525 nm gemessen.

c) Flußzytometer:

Für die fluoreszenzoptische Detektion wurde ein Flußzytometer der Fa. Partec GmbH, Münster, verwendet. Dieses System ist mit einer HBO 100 und einem Argon-Ionen Laser ausgerüstet.

d) Versuchsabluf:

Hefezellen waren bei 3° C gelagert worden. Diese Zellen stammten aus der 4. Führung und wurden in 28° C vorgewärmte sterile Würze inokuliert. Die Probenahme erfolgte kurz nach der Inokulation (a), nach 3.5 Stunden Kultivierung bei 28° C (b), kurz nach der Temperaturerhöhung auf 40° (c) und schließlich nach der Abkühlung auf die ursprüngliche Wachstumstemperatur

4.3 Teil III: Simultane Analysen

4.3.1 Simultane Bestimmung des Glykogen-/DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid

Benötigte Materialien (siehe Kapitel 4.1.6.1 und 4.1.6.2)

- 1 ml der ethanolischen Hefesuspension in 9 ml PBS-Puffer waschen
- 10 Min. bei 1.000 U/min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Waschschritt mit PBS wiederholen
- RNA'se Verdau (1 mg RNAse /ml PBS) pro Probe 1 ml dieser Lösung Exakt 1 Stunde bei 37° C inkubieren
- Verdau mit 9 ml kaltem PBS abstoppen
- 10 Min. bei 1.000 U/min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Wiederholung des Waschschrittes
- Pro Probe 1 ml 0,5%iger Perjodsäure in PBS zugeben 10 Minuten einwirken lassen, dann mit 9 ml PBS waschen
- Zugabe von 1 ml Fuchsin-Reagenz (1:10 in PBS verdünnt) und für 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 mal mit PBS waschen
- Zum Pellet 250 µl PI-Lösung zugeben und für mind. 30 Minuten bei 8° C, im Dunkeln einwirken lassen

4.3.2 Simultane Bestimmung des Glykogen-/DNA-Gehaltes mit DAPI

Benötigte Materialien (siehe Kapitel 4.1.6.1 und 4.1.6.2)

Durchführung:

- 1 ml der ethanolischen Hefesuspension in 9 ml PBS-Puffer waschen
- 10 Min. bei 1.000 U/min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Waschschritt mit PBS wiederholen
- Pro Probe 1 ml 0,5%iger Perjodsäure in PBS zugeben 10 Minuten einwirken lassen, dann mit 9 ml PBS waschen
- Zugabe von 1 ml Fuchsin-Reagenz (1:10 in PBS verdünnt) und für 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
- 3 mal mit PBS waschen
- Zum Pellet 20 µl DAPI-Lösung (1:3 verdünnt) zugeben und für 15 Minuten bei 8° C, im Dunkeln einwirken lassen

4.3.3 Simultane Bestimmung des Glykogen-/Neutrallipid-Gehaltes

Benötigte Materialien (siehe Kapitel 4.1.6.2 und 4.1.6.3)

Durchführung:

- fixierte Hefeproben in PBS waschen
- Pellet in 1 ml PBS resuspendieren
- pro Probe Zugabe von 1 ml 0,5%iger Perjodsäure in PBS
- nach 10 Minuten Einwirkzeit mit PBS waschen
- Zugabe von 1 ml Fuchsin-Reagenz (1:10 in PBS verdünnt)

- 60 Minuten Inkubation (im Dunkeln)
- mindestens 2 mal mit PBS waschen $\rightarrow$ mikroskopische Kontrolle
- Zugabe von 1 Tropfen (aus 10 µl Pipette) Nilrot
  ! Alle Proben sollten gleiche Einwirkzeit von 30 Minuten haben, daher zeitlich versetzte Färbung
- Messung nach 30 Minuten bei RT im Dunkeln

Kontrolle der Färbung im Fluoreszenzmikroskop (λ = 488 nm) $\rightarrow$ gold-gelb fluoreszierende Lipidtröpfchen unterschiedlicher Größe und grüne Glykogen-kompartimente.

4.4 Teil IV: Einbau von BrdU in die DNA

4.4.1 Kultivierung der Hefen für den BrdU-Einbau

Die Hefezellen wurden bei 28°C in Würze und in Anwesenheit von BrdU kultiviert. Pro 100 ml Würze wurde 1* 10^{-5} M BrdU hinzugegeben. Die Probenahme erfolgte analog zu 4.1.2. Die Färbungen wurden ausschließlich an fixierten Probenmaterial (2ml Hefesuspension in 70% Ethanol) durchgeführt.

4.4.2 Färbung der Zellen

Benötigte Materialien:

- 1 * 10^{-5} M BrdU
- 70 % Ethanol
- Wasch-Puffer: PBS + 0.5% BSA
- Denaturierungs-Lösung: 2M HCL (muss frisch hergestellt werden)
- Natriumtetraborat ($Na_2B_4O_7$): 0.1M
- RNAse-Lösung (37 °C): 1mg/ml in PBS
- Verdünnungs-Puffer: PBS + 0.5% BSA + 0.5% Tween®-80
- anti-BrdU-FITC: 5µl in 95µl Verdünnungs-Puffer
- Propidium Iodid (PI): 200µl in 2ml PBS

Färbung der Zellen:

- Zellen 10 min. bei 400 x g zentrifugieren
  Überstand verwerfen
- 1ml Wasch-Puffer zugeben
  10 min. zentrifugieren
  Überstand verwerfen
- Pellet in 1ml Denaturierungs-Lösung resuspendieren
  gut mischen
  20 min. bei Raumtemperatur inkubieren (gelegentlich mischen)

10 min. zentrifugieren
Überstand verwerfen

- 1ml Wasch-Puffer zugeben
  gut mischen
  10 min. zentrifugieren
  Überstand verwerfen
- Pellet in 0.5ml 0.1M Natriumborat resuspendieren (pH 8.5)
  2 min. bei RT inkubieren
- 1ml Wasch-Puffer zugeben
  gut mischen
  10 min. zentrifugieren
  Überstand verwerfen
- Pellet in 1ml vorgewärmter RNAse-Lösung resuspendieren
  möglichst genau 1 Stunde im Wasserbad bei 37 °C inkubieren
  Zugabe von 5ml kaltem PBS zum Stoppen der Enzymreaktion
  10 min. zentrifugieren
  Überstand verwerfen
- Antikörper in Verdünnungs-Puffer verdünnen
  Pellet in verdünntem Antikörper resuspendieren
  30 min. bei RT lichtgeschützt inkubieren
- 1ml Wasch-Puffer zugeben
  gut mischen
  10 min. zentrifugieren
  Überstand verwerfen
- PI in PBS verdünnen
  Pellet in verdünntem PI resuspendieren
  30 min. bei RT lichtgeschützt inkubieren
- Zellen bei 488 nm im Flußzytometer analysieren

4.5 Teil V: Hefealterung

Das Altern bei Hefen, die sich von Geburt an vegetativ im Gärprozess vermehren, wird durch eine Erhöhung der Sprossnarbenzahl auf der Zelloberfläche sichtbar, ist ein Schritt in der Evolution der Bierhefen, der nächste Schritt wäre der Zelltod. Mit Hilfe der Bestimmung der relativen Sprossnarbenzahl und der Proteinaseaktivität sollen Aussagen das Alter einer Hefepopulation getroffen werden. Die Proteinase ist verantwortlich für den Proteinabbau und wird im Brauerjargon oft als Synonym für Autolyseprozesse verwendet.

4.5.1 Bestimmung der relativen Sprossnarbenzahl mit Hilfe von Wheat germ agglutination Fluoresceinisothiocyanat (WGA-FITC)

Mit Hilfe von WGA-FITC (wheat germ agglutinin, fluorescein conjugate) soll in Hefepopulationen die Verteilung intensiv fluoreszierender Hefezellen von schwach fluoreszierenden unterschieden werden. Erhält man Häufigkeitsverteilungen mit intensiven Fluoreszenzlichtsignalen, kann man darauf schließen, dass viele alte (Mehrfachsprosser) und tote Hefezellen in der Population vorliegen. Eine relativ schwache Fluoreszenz deutet auf eine junge, dynamische Population hin.
WGA gehört zu den Lektinen (Weizen-Lektin). Lektine sind Glykoproteine, die mit einer hohen Spezifität an Kohlenhydratreste in Glykoproteinen und anderen Biomolekülen binden.

Benötigte Materialien:

- PBS-Puffer pH 7,2
- WGA-FITC (wheat germ agglutinin, fluorescein conjugate), 1mg WGA-FITC / 1ml PBS

Färbeprotokoll:

- 1ml der fixierten Hefezellen 10min bei 1400 rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 5ml PBS aufnehmen und waschen
- Anschließend 10min bei 1400rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet in 1ml PBS resuspendieren
- Zugabe von 30µl WGA-FITC, anschließend vortexen
- 1 Stunde im Dunkel bei 28°C inkubieren
- für 10 min bei 1400rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet in 2ml PBS resuspendieren
- Kontrolle der Färbung im Fluoreszenzmikroskop (λ = 488nm), Sprossnarben stellen sich als kreisrunde, kräftig gelb-grün fluoreszierende Ringwülste dar, die Zellmembran schwach grünlich

4.5.2 Proteinaseaktivitätsbestimmung mit dem EnzCheck Protease Assay Kit von Molecular Probes

Dieser Kit beinhaltet Casein-Derivate, die mit dem grün fluoreszierenden BODIPY-FL markiert sind, wodurch ein Quenching des Substrats resultiert. Durch Protease katalysierte Hydrolyse werden Peptide, die mit dem Farbstoff markiert sind, freigesetzt. Dadurch resultiert eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

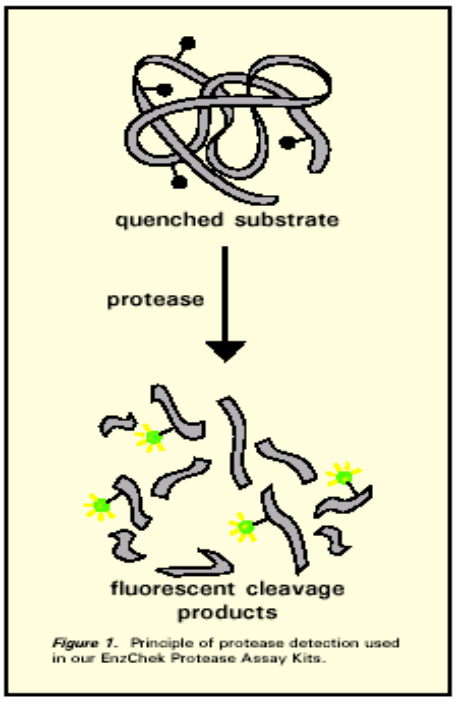
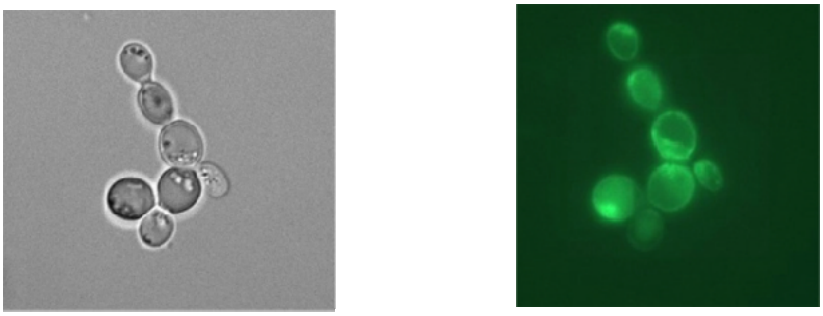


Abb. 4.5.1: Prinzip des EnzCheck Protease Assay Kit



a) b)

Abb. 4.5.2 a) Hellfeldaufnahme von *S. uvarum*; b) Proteinasefärbung an *S. uvarum*

Färbeprotokoll:

Kit beinhaltet:

- BODIPY FL casein (enthält jeweils 200µg Substrat)

- 20 X Verdauungs-Puffer (200mM, pH 7,8)

Sonstige benötigte Materialien:

- deionisiertes Wasser (dH_2O)
- PBS (nur für BODIPY FL)
- Verdauungspuffer pH 7,8 (geeignet für Enzyme mit Aktivitäts-Optimum von pH 7,4 – 8, ansonsten geeigneten Puffer herstellen)
- Cipzyme L (Novo Nordisk)

Vorbereitung der Lösungen:

- Herstellen einer 1mg/ml BODIPLY FL Casein Stocklösung durch Zugabe von 0,2ml PBS in ein Vial, das das Substrat enthält. Gut mischen, bis alles vollständig aufgelöst ist.

- Ansetzen eines 1 X Verdauungs-Puffers. Hierfür 2,5ml des 20 X Puffer mit dH_2O auf 50ml auffüllen.

- Herstellung einer Gebrauchslösung. Hierzu 0,2ml der in1.1 hergestellten Stocklösung in 19,8ml des in 1.2 hergestellten 1 X Puffers geben.

Proben-Analyse

- Um Proteinase-Aktivität in einer Probe zu bestimmen, gewaschene fixierte Probe in 1ml 1 X Puffer und 1ml

Gebrauchslösung geben. Außerdem 10µl Cipzyme L hinzugeben.

- Inkubation für 1 Stunde im Dunkeln

- Detektion im Flußzytometer.

4.5.3 DNA-, Glykogen- und Trehalosegehaltsbestimmung

Diese Protokolle sind Kapitel 4.1.6.1, 4.1.6.2 und 4.2 zu entnehmen.

5. Ergebnisse

5.1 Teil I: Zelltoduntersuchungen (Apoptose)

5.1.1 Mikroskopische Untersuchung

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte durch Anfärbung der DNA bzw. durch die Anfärbung der Mikrokerne mit den Fluoreszenzfarbstoffen PI, DAPI, H 33342. Charakteristische mikroskopische Aufnahmen wurden beispielhaft als Abbildungen eingefügt.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Typ h 500 (12,5 x 100) der Fa. Hund, Wetzlar und einem Olympus BX-60 F5 (26,5 X 100) mit Olympus U-CAD-2 –Kamera.

5.1.2 Ergebnisse der mit Propidiumiodid gefärbten Hefezellen

Nach einer Einwirkungszeit des Farbstoffes von mindestens einer Stunde bei 8°C wurden die gefärbten Hefen mikroskopiert.

Lagerung der Hefe in Malzextrakt bei 27 °C:

Nach 9 Tagen Lagerung waren zum ersten Mal apoptotische Zellen erkennbar bereits 1 Woche später traten erstmalig Bläschen ("membrane blebbing") auf. Nach weiteren 5 Tagen waren DNS-Anhäufungen zu sehen (Abb.1 a und b). Mit fortschreitender Alterung wurden die apoptotischen Zellen und Mikrokerne wieder weniger, die Zellkerne kleiner. Die DNS-Anhäufung dagegen nahmen zu. Nach 37 Tagen waren nur noch wenige intakte Zellen vorhanden, diese Zellen waren komplett rot gefärbt, also tot.

Nachfolgende Abbildung (Abb. 5.1.2 a und b) zeigt mikroskopische Aufnahmen der oben beschriebenen DNA-Anhäufung.

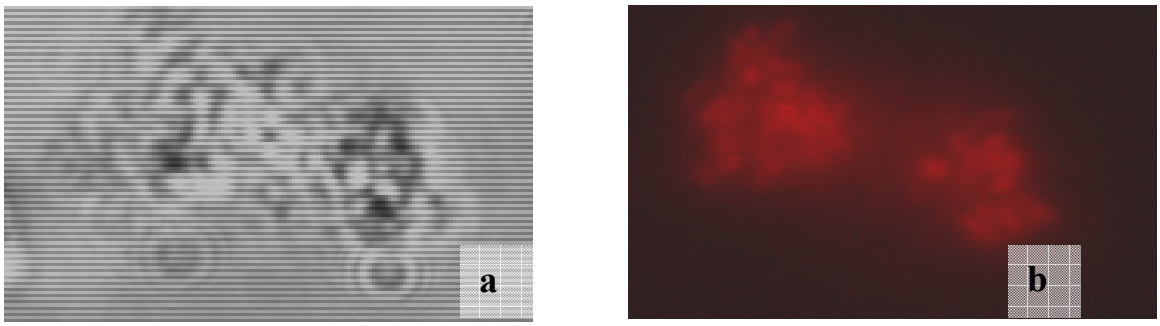


Abb. 5.1.2 a. Durchlichtmikroskopische Aufnahme der "DNA-Anhäufung" b. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der "DNA-Anhäufung (λ = 488nm)

Mit dem Mikroskop der Firma Hundt ließen sich die Bläschen an den Membranen sehr gut erkennen, leider waren diese im Olympusmikroskop so schlecht zu sehen, dass keine Aufnahmen gemacht werden konnten.

Lagerung der Hefe bei Raumtemperatur in Malzextrakt:

Wie bei den Hefen in ME bei 27°C sind nach 9 Tagen erstmals apoptotische Zellen und sehr wenig Mikrokerne zu sehen gewesen. Nach 23 Tagen konnte man bei einzelnen Zellen deutlich Bläschen an der Zellmembran sehen ("membrane blebbing"). Auch bei der Raumtemperaturlagerung lag zunächst eine Zunahme der apoptotischen Zellen vor und die Zellkerne wurden kleiner. Gegen Ende hin wurden die apoptotischen Zellen etwas weniger. Hier traten keine DNS-Anhäufungen auf.

Lagerung der Hefe bei Raumtemperatur ohne Malzextraktgabe

Verlauf analog "Hefen in Malzextrakt bei Raumtemperatur". Ab dem 28. Tag lassen sich die Zellen nicht mehr anfärben, allerdings waren im Hellfeld viele Bläschen zu sehen.

Mikroskopische Auswertung der unterschiedlich gelagerten Hefen

Lagerung mit / bzw. ohne Zugabe von Malzextrakt

Alter der Hefe (Tage)	Hefe in Malzextrakt bei 27°C	Hefe in Malzextrakt bei RT	Hefe ohne Malzextrakt bei RT
1	3 * MK	----------	----------
2	Sehr wenige MK	----------	----------
3	2 * MK	Keine MK	Keine MK
7	----------	----------	----------
8	----------	Sehr wenig MK	Wenige MK u. apoptotische Zellen
9	Apoptotische Zellen	Teilweise apoptotische Zellen	Wenige MK u. apoptotische Zellen
10	----------	Vereinzelt apoptotische Zellen	Mehrere apoptotische Zellen u. deutlich getrennte MK
13	Apoptotische Zellen u. 2*MK	Apoptotische Zellen u. 3*MK	MK
14	Wenig apopt. Zellen u. MK	Einige apopt. Zellen, sehr wenig MK	Apopt. Zellen
15	Wenig apopt. Zellen, vereinzelt MK, viele Bläschen	Apopt.Zellen, sehr wenig MK	Wenig apopt.Zellen, vereinzelt MK

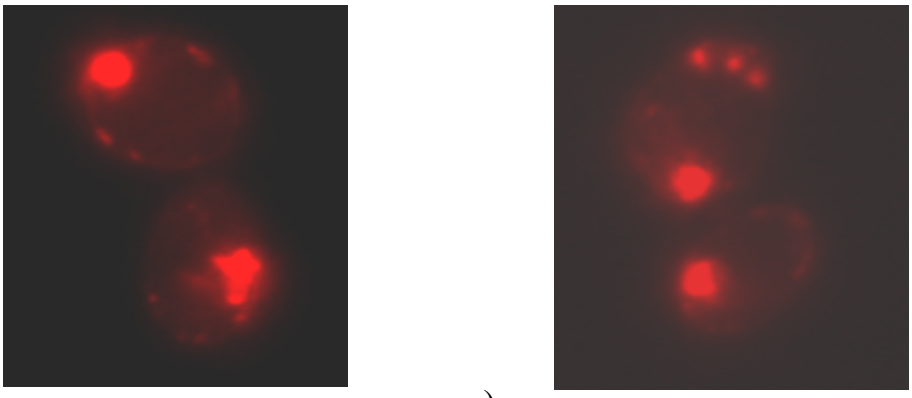
16 (Siehe Abb. 3)	Wenig apopt.Zellen, 3*MK, mini ZK, sehr vereinzelt Bläschen	Apopt. Zellen, wenig MK	Apopt Zellen, wenig MK, sehr kleine Zellkerne
17 (Siehe Abb. 4)	Apopt. Zellen, keine MK, Bläschen	Teilw. Apopt. Zellen, sehr wenig MK, mini ZK	Apopt. Zellen, keine MK, sehr kleine ZK

Tab. 5.1.2.1 a Mikroskopische Auswertung der Hefealterung

Alter der Hefe (Tage)	**Hefe in Malzextrakt bei 27°C**	**Hefe in Malzextrakt bei RT**	**Hefe ohne Malzextrakt bei RT**
23	Wenig apopt. Zellen, keine MK, mini ZK (wenig), sehr viel DNS-Anhäufung	Apopt.Zellen, einige MK, ZK nicht so klein	Apopt.Zellen, kaum MK,
28	Wenig apopt.Zellen, keine MK, teilw. Mini ZK, teilw. sehr kleine Zellen, sehr viel DNS-Anhäufung	Apopt. Zellen, teilw.MK, ZK nicht so klein,	keine Färbung! Hellfeld: viele Bläschen
29	Wenig apopt.Zellen, keine MK, teilw. sehr kleine Zellen, sehr viel DNS-Anhäufung	Apopt.Zellen, keine MK,	Keine Färbung!
30	Wenig apopt. Zellen, keine MK, teilw. mini ZK sehr viel DNS-Anhäufung	Teilw. apopt. Zellen, 2* MK, teilw. kleine ZK	Keine Färbung !
36	Keine apopt. Zellen, keine MK, wenig Zellen mit ZK, kaum noch Zellen, sehr viel DNS-Anhäufung (viel mehr als Zellen)	Teilw. apopt. Zellen, keine MK, teilw. mini ZK,	Keine Färbung ! Hellfeld: teilw. Bläschen, Zellen größtenteils nicht defekt
37	Keine apopt. Zellen, keine MK, kaum noch Zellen mit ZK, sehr viel DNS-Anhäufung (viel mehr als Zellen)	Teilw. apopt. Zellen, keine MK, teilw. mini ZK,	Keine Färbung ! Hellfeld: teilw. Bläschen, Zellen größtenteils nicht defekt

Tab. 5.1.2.1 b Mikroskopische Auswertung der Hefealterung

Die folgenden Abbildungen (5.1.2.1) zeigen Aufnahmen der Hefepopulation am 16. und 17. Tag der Hefealterung



a) b)

Abb. 5.1.2.1: a)Fluoreszenzoptische Aufnahme der 16 Tage alten Hefepopulation; b) Aufnahme der 17 Tage alten Population

Die Hefezelle links oben im Bild zeigt einen intakten Zellkern, bei der Zelle rechts zeigt sich deutlich die Destrukturierung, welche durch die drei Mikrokerne repräsentiert wird.

Bestimmung der toten und lebenden Zellen			
Alter der Hefe (Tage)	**Hefe in Malzextrakt bei 27°C**	**Hefe in Malzextrakt bei RT**	**Hefe ohne Malzextrakt bei RT**
1. Tag	96 % lebende, intakte Zellen	96 % lebende, intakte Zellen	96 % lebende, intakte Zellen
37. Tag	Nur noch wenig Zellen vorhanden, 100 % tote Zellen, viel DNS-Anhäufung	15 % lebende Zellen	70 % lebende Zellen

Tab. 5.1.2.2 Tot-/Lebendzellzahl am Beginn und Ende der Lagerung

Die nachfolgende Abbildung (Abb.5.1.2.2) zeigt eine apoptotische Hefezelle (deutlich sind die gefärbten Zellfragmente erkennbar) und eine tote Hefezelle (die Zellwand ist bereits destrukturiert, die Zelle ist ganz gefärbt).

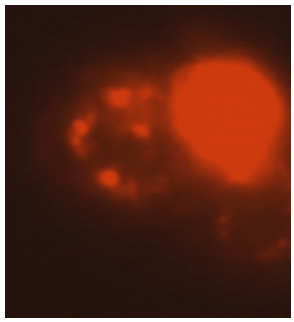


Abb. 5.1.2.2 Mit PI gefärbte apoptotische (links) und tote (rechts) Hefezelle

Abbildung 5.1.2.3 zeigt die Simultanfärbung FDA und PI zur Tot-Lebend-Differenzierung. Da bei dieser Bestimmung kein RNA'se Verdau durchgeführt wurde zeigen sich tote Zellen als komplett rot gefärbt.

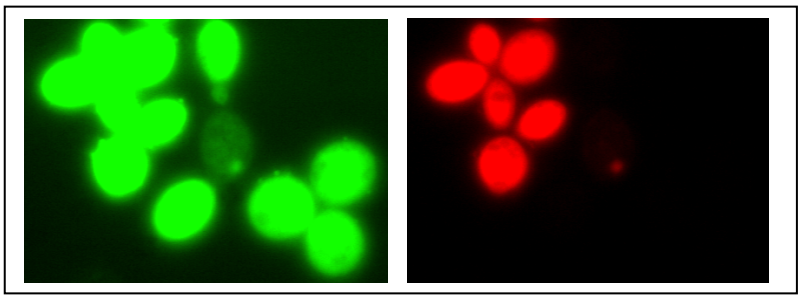
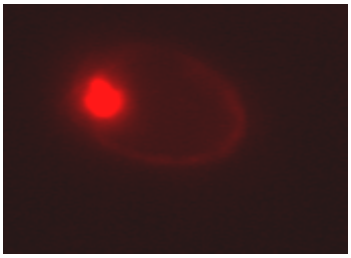
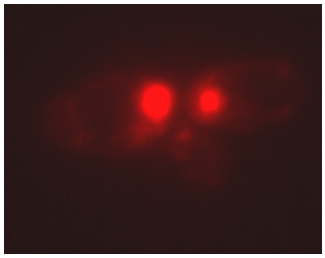


Abb. 5.1.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Tot-/Lebend-Differenzierung

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 5.1.2.4) dokumentiert die Veränderungen einer Hefepopulation bei Lagerung in Malzextrakt über einen Zeitraum von 34 Tagen.

Alter in Tagen	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Hefepopulation die in Malzextrakt gelagert wurde λ= 488 nm	
0		

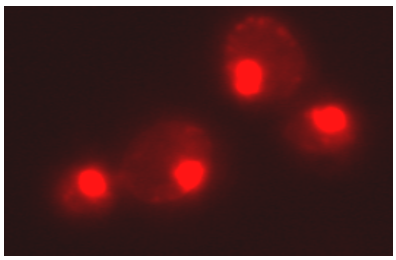
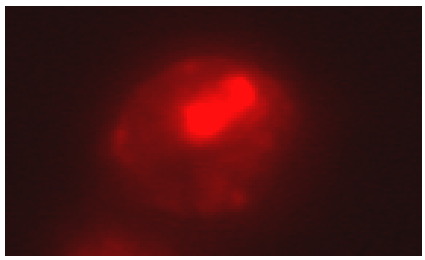
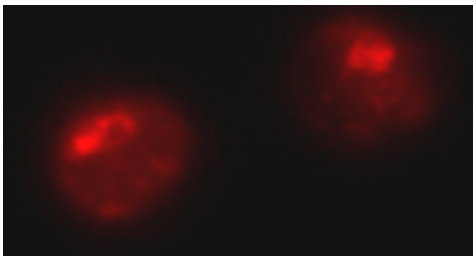
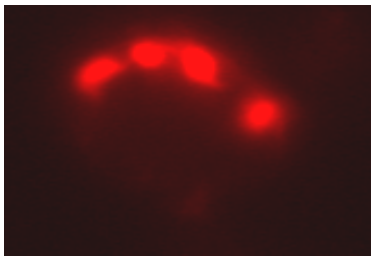
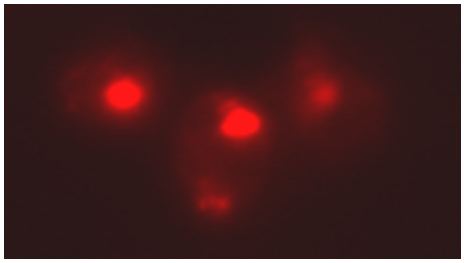
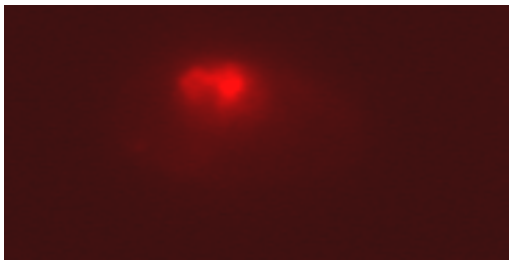
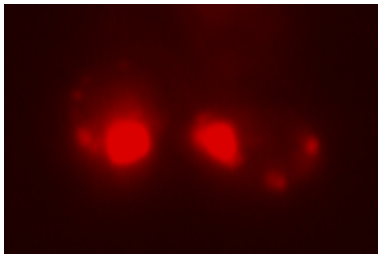
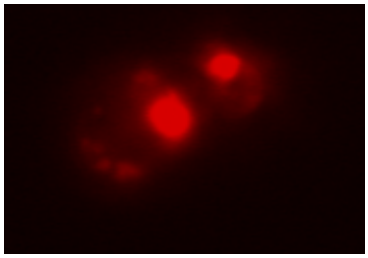
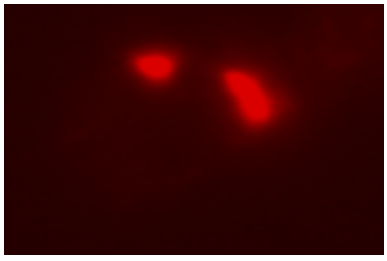
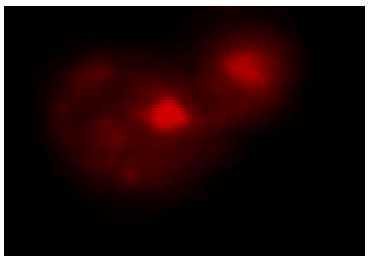
3		
6		
17		
21		
28		

Abb. 5.1.2.4 Dokumentation der Hefealterung

Die Bilder zeigen deutlich die für Apoptose typische Destrukturierung der Zellkerne.

Mit UV-Licht bestrahlte Hefepopulationen

Die UV-bestrahlten Hefen wurden ohne weitere Zugabe von Malzextrakt gelagert um zu vermeiden, dass nicht geschädigte Zellen erneut proliferieren und so das Ergebnis verfälschen.

Bereits nach einer Woche sind DNA-Anhäufungen im Mikroskop erkennbar. Diese DNA-Anhäufungen nehmen im Verlauf von 14 Tagen deutlich zu, d.h. die Zellwand der Hefen destrukturiert sich. Nach 23 Tagen waren kaum noch apoptotische Zellen erkennbar, sondern nur noch "mini Zellkerne" (keine Mikrokerne, sondern kleiner werdende Zellkerne bei sonst gleichgroßen Hefezellen), viele *scheinbar* defekte Zellen und sehr viel DNA-Fragmente. Wahrscheinlich unterlag die Zellpopulation dem Autolyseprozess.

UV-bestrahlte Zellen (Sterilbank) Anteil apoptotischer Zellen							
Alter der Zellen [d]	8	11	14	17	22	25	31
Apoptotische Zellen [%]	7	6	19	31	20	53	47

Tab. 5. 1.2.3: Auswertung der UV-behandelten Zellen [Apoptotische Zellen in %]

Tabelle 5.1.2.4 Mikroskopische Auswertung der UV-behandelten Zellen

Alter (Tage)	UV - Sonne	UV- Sterilbank
11	Teilw. apopt. Zellen, teilw. MK, Bläschen	Wenig apopt. Zellen, wenig MK (1* mit ca. 6 MK)
12	Wenig apopt. Zellen, wenig MK, viele Bläschen	Wenig apopt. Zellen, keine MK
13	Wenig apopt.Zellen, 2*MK, kleine ZK	Sehr wenig apopt. Zellen, keine MK, sehr kleine Zellkerne
14	Wenig apopt.Zellen, keine MK, teilw. mini ZK	Sehr wenig apopt. Zellen, keine MK, sehr kleine Zellkerne
17	Teilw. apopt. Zellen, wenig MK (deutlich), teilw. kleine ZK, DNS-Anhäufung	Teilw. apopt. Zellen, einige MK, teilw. mini ZK, vereinzelt Bläschen, DNS-Anhäufung
18	Teilw. apopt. Zellen, teiw. MK, teilw. nur diff. ZK	Apopt. Zellen, wenig MK, kleine ZK
19	Apopt. Zellen, keine MK, kleine ZK	Teilw. apopt. Zellen, wenig MK, DNS-Anhäufung
20	Wenig apopt. Zellen, kaum MK, teilw. sehr kleine ZK, Bläschen, DNS-Anhäufung (wenig)	Wenig apopt.Zellen, keine MK, DNS-Anhäufung
25	Wenig apopt.Zellen, keine MK, teilw. sehr kleine ZK, DNS-Anhäufung	Teilw. apopt.Zellen, wenig MK, kleine ZK, DNS-Anhäufung

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen UV-behandelte Hefen am 17. (Abb. 5.1.2.5) und am 25. Tag (Abb. 5.1.2.6) nach Bestrahlung.

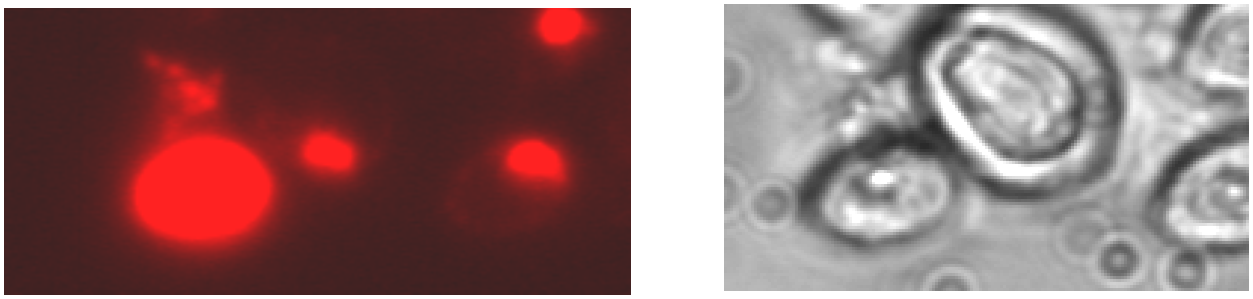


Abb. 5.1.2.5 UV behandelte Hefezellen nach 17 Tagen

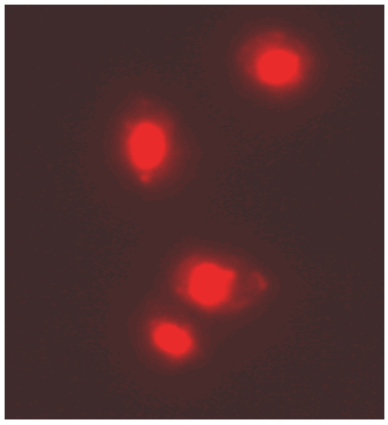


Abb. 5.1.2.6 UV behandelte Hefezellen nach 25 Tagen

Mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelte Hefepopulationen

Laut Literatur induziert die Einwirkung von H_2O_2 bei tierischen Zellen Apoptose. Über eingesetzte H_2O_2-Konzentrationen fand sich in den Quellen keine Angabe.

Daher wurde im ersten Ansatz 17%-iges H_2O_2 auf die Hefen gegeben. Nach ca.15 min wurde mittels FDA-/PI die Tot-Lebend-Zellzahl bestimmt. Es fanden sich 100 % tote Hefen. In weitern Ansätzen wurden H_2O_2-Konzentrationen von 0,5%, 1%, 1,5%, 2,5%, 4% und 5% eingesetzt. Auch bei diesen niedrigen Konzentrationen war nach 2 Stunden nahezu die Hälfte der Zellen abgestorben.

Anscheinend besitzen Saccharomyces cerevisiae eine sehr niedrige Toleranz gegenüber H_2O_2. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden keine weiteren Versuche mit H_2O_2 durchgeführt.

Mit Hitze- bzw. Käl. 1 Minute folgenden **teschock behandelte Hefepopulationen**

Hefesuspensionen wurden für ca. 1 Minute folgenden Temperaturdifferenzen ausgesetzt.

20 °C → 50 °C
20 °C → 70 °C
20 °C → -18 °C
37 °C → -18 °C
4 °C → 50 °C

Nach ca. 8 Tagen waren apoptotische Zellen im Mikroskop erkennbar. Auch fanden sich bei einigen Zellen die charakteristischen Ausstülpungen (Bläschen) der Zellwand. Nach ca. drei Wochen waren regelmäßig DNS-Anhäufungen vorhanden. Mit zunehmendem Alter wurden die Zellkerne erkennbar kleiner oder wurden teilweise mit PI nicht mehr angefärbt.

Die Zunahme an apoptotischen Zellen über einen Zeitraum von 25 Tagen verlief bei den - mit unterschiedlichen Temperaturen behandelten - Hefen sehr ähnlich.
Für die Darstellung des Verlaufs wurde repräsentativ die Zunahme an apoptotischen Zellen bei der Temperaturdifferenz (37°C → -18°C) gewählt.
Nach 25 Tagen sind fast keine intakten Zellen mehr vorhanden. Es sind hauptsächlich autolysierende Zellen und Zelltrümmer zu sehen (siehe Abb. 5.9). Daher wurde im Diagramm der 25. Tag nicht einbezogen.

Zunahme an Apoptosezellen bei temperaturschockbehandelten Hefen (37°C → -18°C)

Alter der Zellen [d]	1	7	11	14	16	22	25
Apopt. Zellen[%]	1,4	8	6	9	15	14	--

Tab. 5.1.2.5: Auswertung der mit Temperaturschock behandelten Zellen [%]

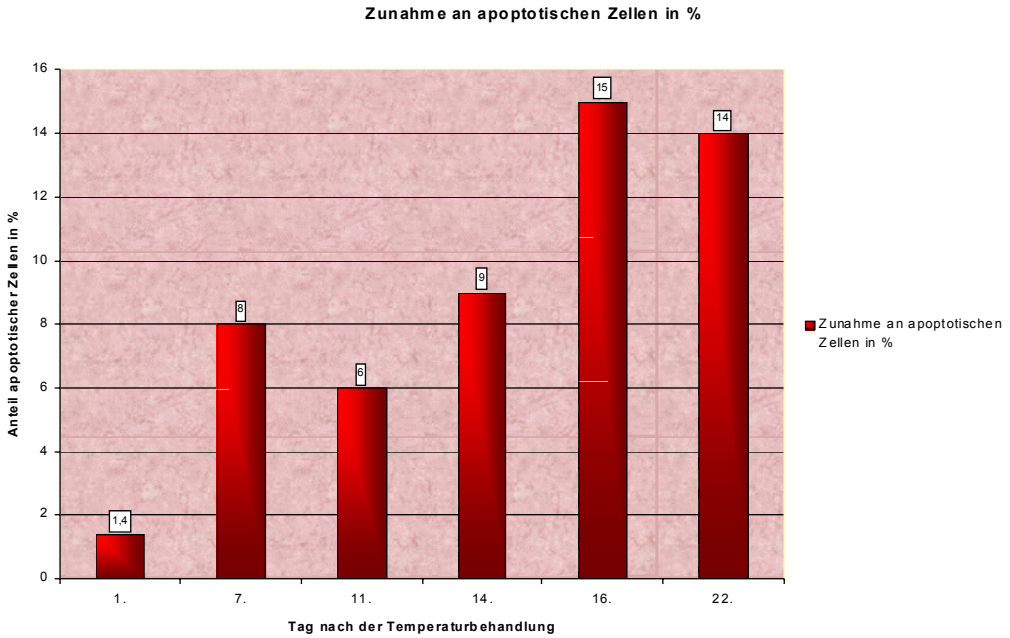


Diagramm 5.1.2.1 Zunahme an apoptotischen Hefezellen nach Kältebehandlung

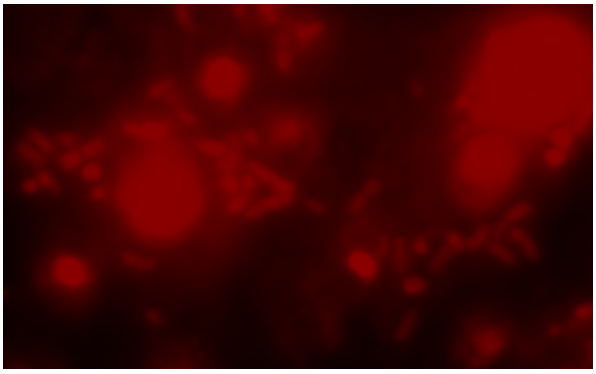
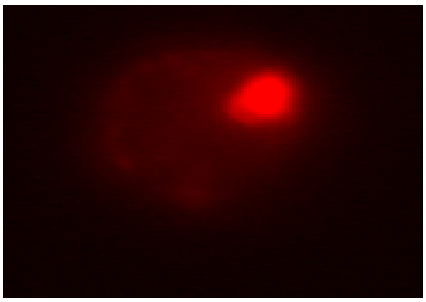
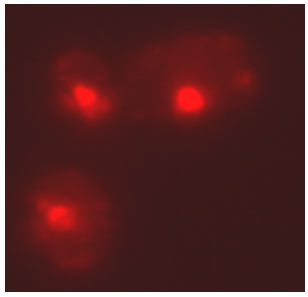
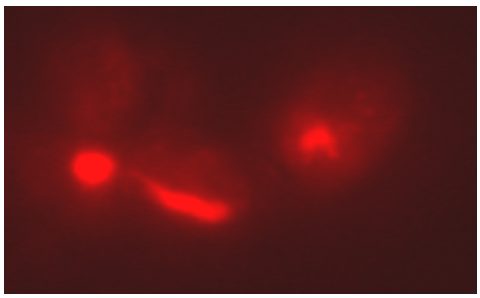
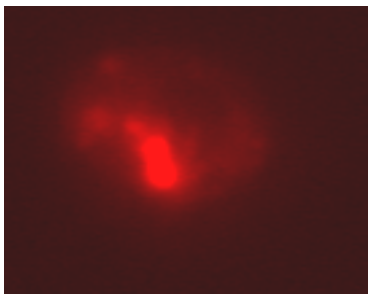
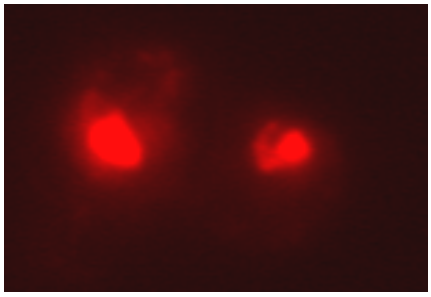
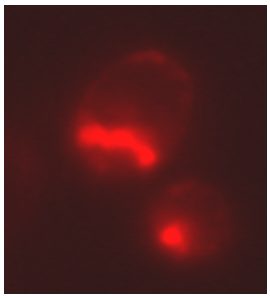
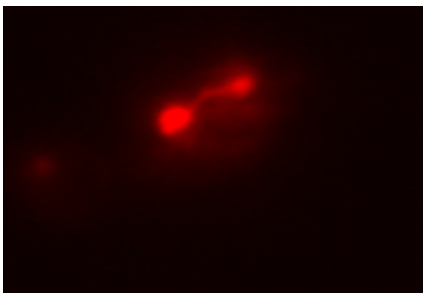
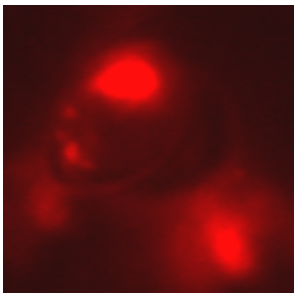


Abb. 5.1.2.7Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme am 25. Tag nach der Temperaturbehandlung

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 5.1.2.8) dokumentiert die Veränderungen einer Hefepopulation die einem Hitzeschock (4°C → 70°C) unterzogen wurde.

Alter in Tagen	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Hefepopulation die einem Hitzeschock (4°C → 70°C) unterzogen wurde (λ= 488 nm)	
0		
3		
6		
11		

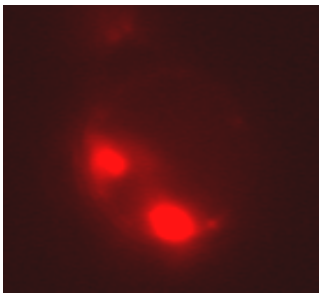
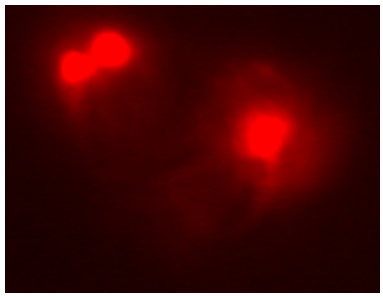
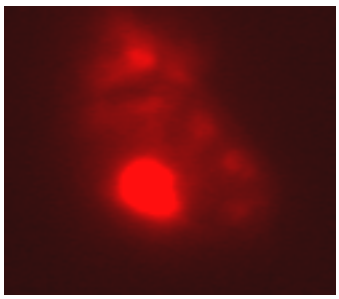
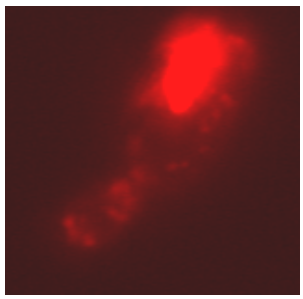
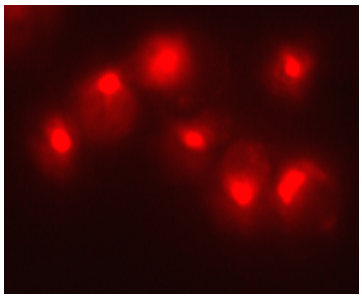
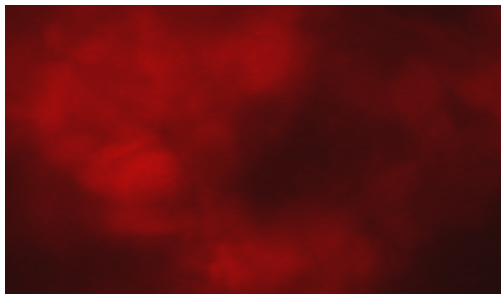
21		
28		
34		

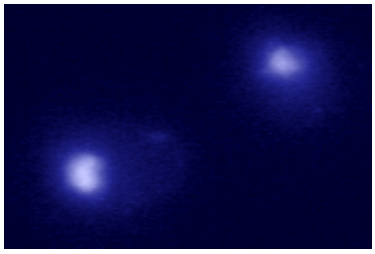
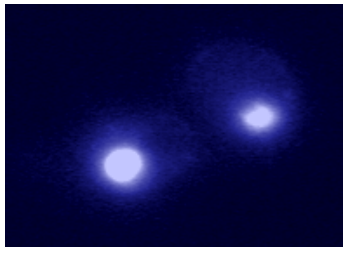
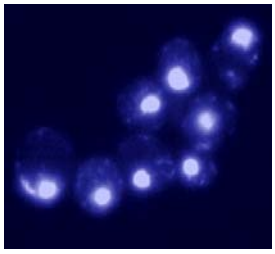
Abb. 5.1.2.8 Veränderung der Zellen nach Temperaturbehandlung

5.1.3 Ergebnisse der mit DAPI gefärbten Hefezellen

Apoptosezellen

DAPI-Färbungen wurden nur bei den mit temperaturdifferenzbehandelten Hefen durchgeführt. Diese zweite Färbemethode sollte neben PI bei den flußzytometrischen Messungen zum Einsatz kommen.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 5.1.3.1) dokumentiert die Veränderungen der Hefepopulation die einem Hitzeschock (4°C → 70°C) unterzogen wurde.

Alter in Tagen	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Hefepopulation die einem Hitzeschock (4°C → 70°C) unterzogen wurde (λ= 360 nm)
0	
3	
6	

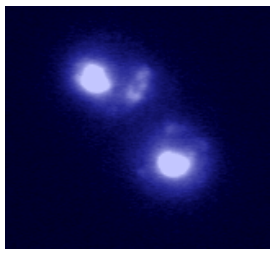
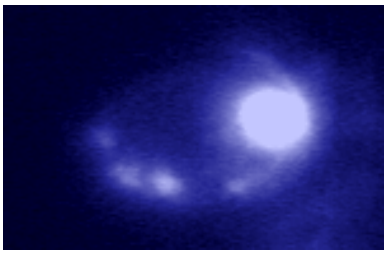
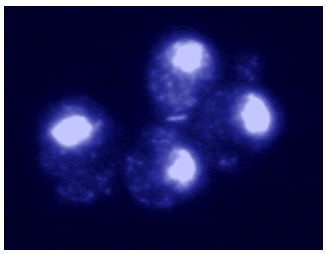
11	
21	
28	

Abb. 5.1.3.1 Veränderung der Zellen nach Temperaturbehandlung

Nekrosezellen

Um einen Vergleich zum Ergebnis der Apoptose-Ansätze zu haben, wurde versucht Nekrose einzuleiten.

Die untersuchte Hefesuspension wurde für 15 Min zur Nekroseeinleitung von 20°C auf 70°C erhitzt (Abb. 5.1.3.3).

Im Gegensatz zur Apoptose wird bei nekrotischen Prozessen die Plasmamembran der Zelle beschädigt, da bei der Nekrose kein Abschnüren der Zellwand ("membrane blebbing") vorkommt, sondern die nekrotische Zelle irreversibel

anschwillt und zerreißt. Auch erfolgt bei der Nekrose keine Fragmentierung des Zellkerns.

Die Abb. 5.1.3.3 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme einer Nekrosezelle (Alberts et. al., 1999). Deutlich ist sind die austretenden Zellinhaltsstoffe zu erkennen.

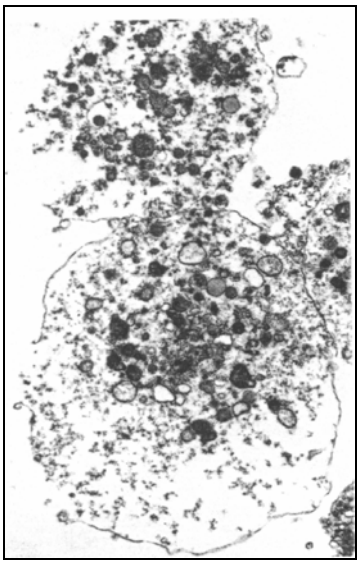


Abb. 5.1.3.2 Nekrosezelle (Elektronenmikroskopaufnahme)

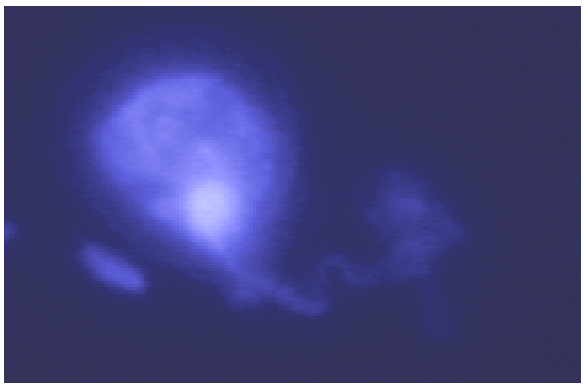


Abb. 5.1.3.3 DAPI-gefärbte Nekrosezelle
Fluoreszenzmikroskopaufnahme)

Auch bei der mit DAPI-gefärbten Nekrosezelle ist die defekte Zellwand mit den austretenden Zellinhaltsstoffen gut zu erkennen.

5.1.4 Ergebnisse der mit H 33342 gefärbten Hefezellen

Auch H 33342 färbt die DNA spezifisch an (Abb. 5.1.4.1). Mittels Simultanfärbungen (PI und H33342) kann zwischen Apoptose- und Nekrosezellen unterschieden werden. Dazu wird unfixiertes Material gefärbt. Propidiumiodid permeiert nur in tote Zellen (bzw. in die nekrotischen Zellen, deren Zellwand destrukturiert ist). Die Nekrose- bzw. Autolysezellen sind nach PI-Färbung rot gefärbt. Die H 33342-Färbung lässt die vitalen Zellen durch die blaue Fluoreszenz erkennen. Durch H 33342-Färbung werden die "viable" Zellen und die Apoptosezellen blau angefärbt. Apoptotische Zellen fluoreszieren schwächer als intakte. Dadurch ist eine Differenzierung möglich [Darzynkiewicz et.al, 1992].

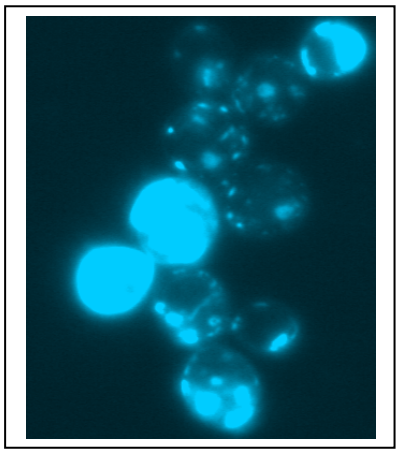


Abb. 5.1.4.1 Apoptosezellen mit H 33342 gefärbt

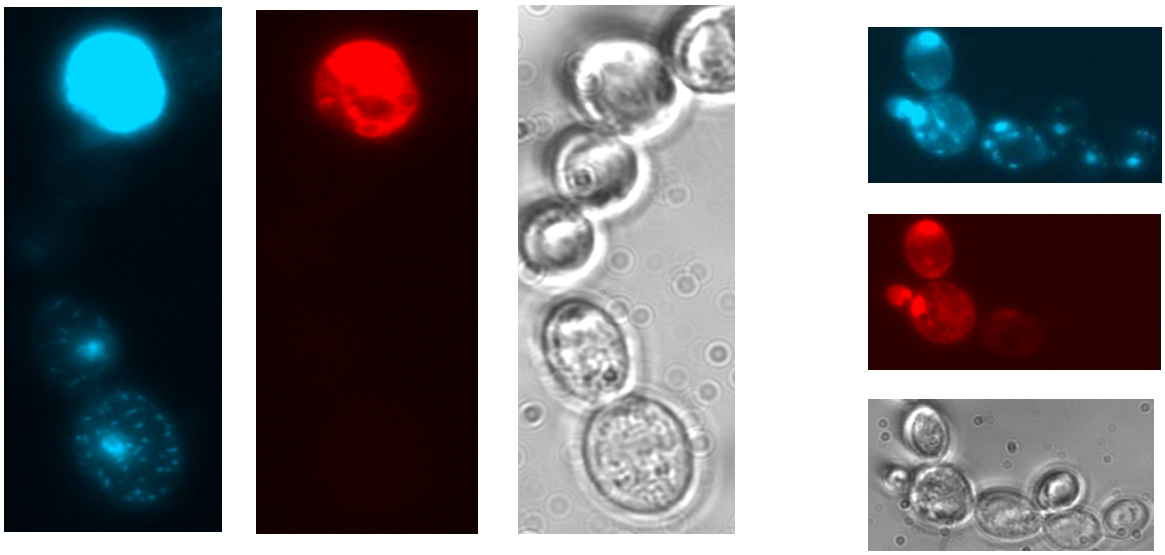


Abb. 5.1.4.2 Apoptosezellen simultan gefärbt

Die Zellen zeigen eindeutig die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Zellen mit PI und H 33342. Bei den Aufnahmen links (a) ist eine tote Zelle vorhanden (rote Zelle Bild in der Mitte).

Auch die blaue H 33342-Färbung (blaue Fluoreszenz, Bild links) färbt diese Zelle komplett an. Die Zellen im Bild unten stellen "viable cells" dar

5.1.5 Ergebnisse der SR (Sulphorhodamin) 101 gefärbten Hefezellen

SR 101 ist ein keratinspezifisches, proteinanfärbendes Fluorochrom.

Die untersuchte Hefesuspension wurde für 2 Min zur Apoptoseeinleitung von 20°C auf 70°C erhitzt. Ansatz (b) zur Herstellung von Nekrosezellen: 20°C → 70°C, für 15 min

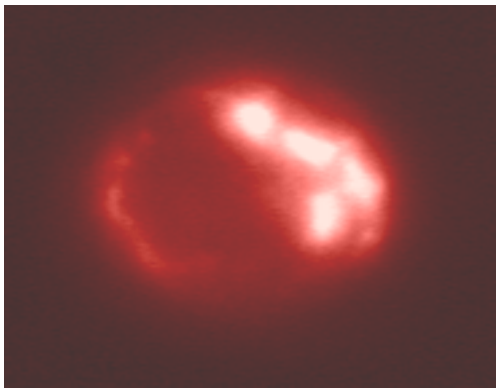


Abb. 5.1.5.1 SR 101 gefärbte apoptotische Hefezelle

Die Abbildung 5.1.5.1 zeigt eine mit SR 101 gefärbte apoptotische Hefezelle.

5.1.6 Mikroskopische Aufnahmen der Glykogenfärbung

Nachfolgend werden Aufnahmen gezeigt, die während dieses Forschungsprojektes entstanden sind. In Abbildung 5.1.6.1 ist die typische stark fluoreszierende Glykogenfärbung mit Acriflavin dargestellt.

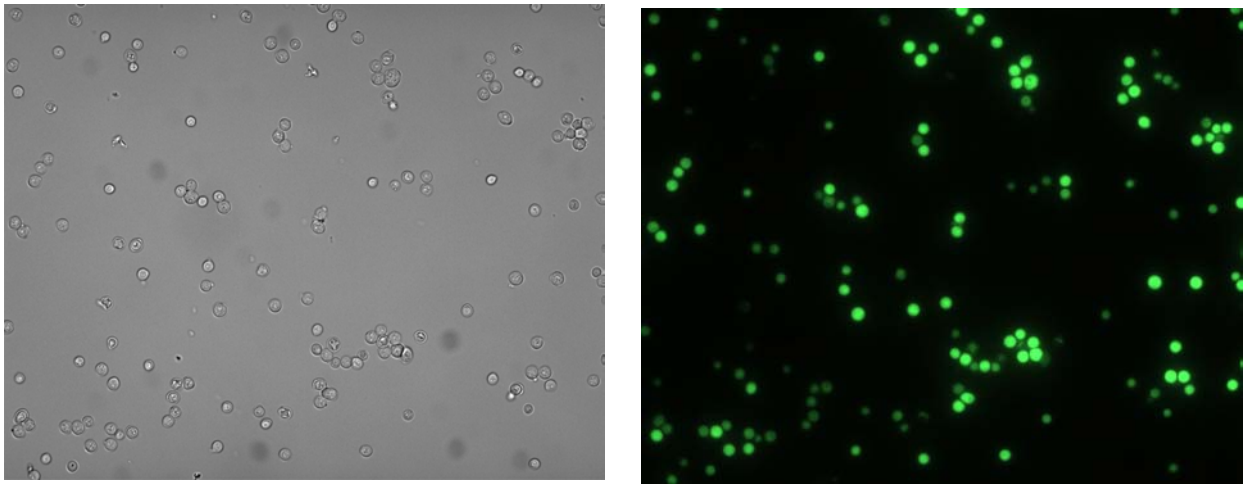


Abb. 5.1.6.1 links Hefezellen im Hellfeld; rechts mit Acriflavin gefärbte Hefezellen

5.1.7 Molekularbiologische Untersuchung

Die genomische DNA wurde isoliert, gereinigt und mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Mit apoptotischer DNA von Säugetierzellen (circa 200 bp lange DNA-Fragmente) eine sog. DNA-ladder. Bei Nekrosezellen entsteht eine Schmierspur im Gel anstelle des leiterähnlichen Musters.

Als erstes wurde mittels Lyticase die Hefezellwand enzymatisch abgebaut. Dadurch entstehen in iso- oder hypotonischer Lösung die kugelig geformten Sphäroplasten (Abb. 5.1.7.1) welche für die Proteinase K und die RNase zugängig sind.

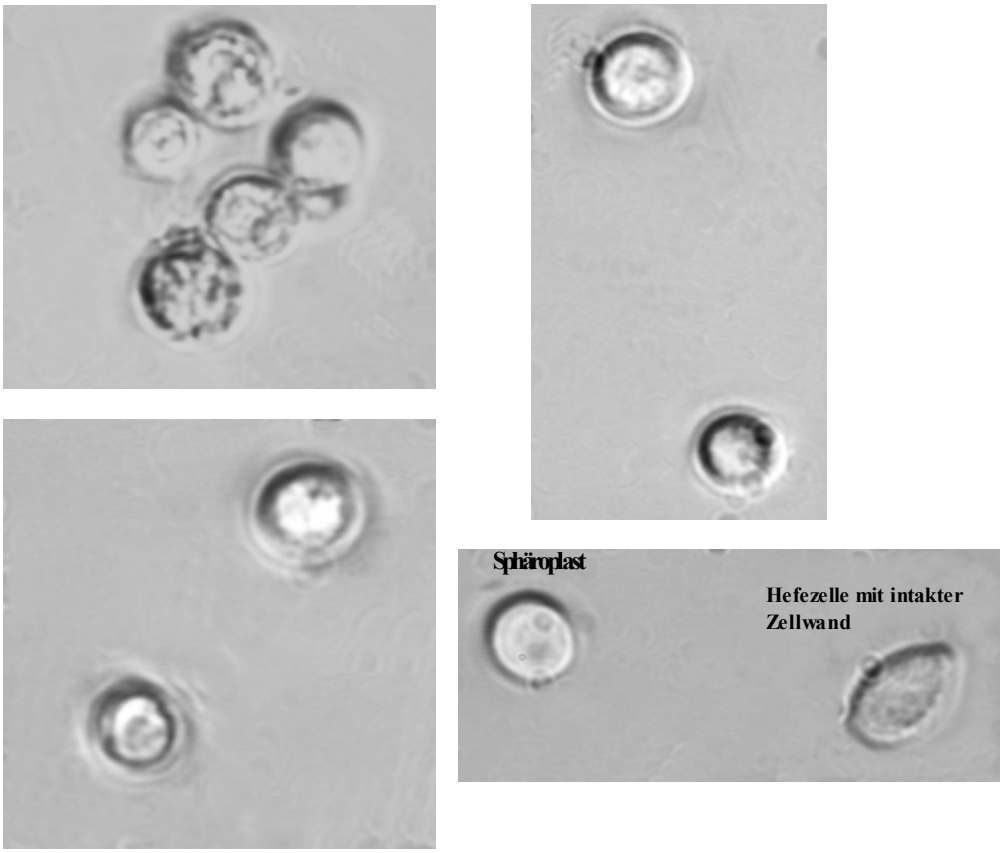


Abb. 5.1.7.1 Mikroskopische Aufnahmen der Sphäroplasten

Die in dem ersten Gel eingesetzte Hefe (Laborinterne Hefe-Nr. 281) zeigte nach Hitzebehandlung im Fluoreszenzmikroskop (DAPI-Färbung) deutliche Defragmentierung der DNA und auch Mikrokerne (Abb. 5.1.7.2).

DNA-Färbung der hitzebehandelten Hefe 281

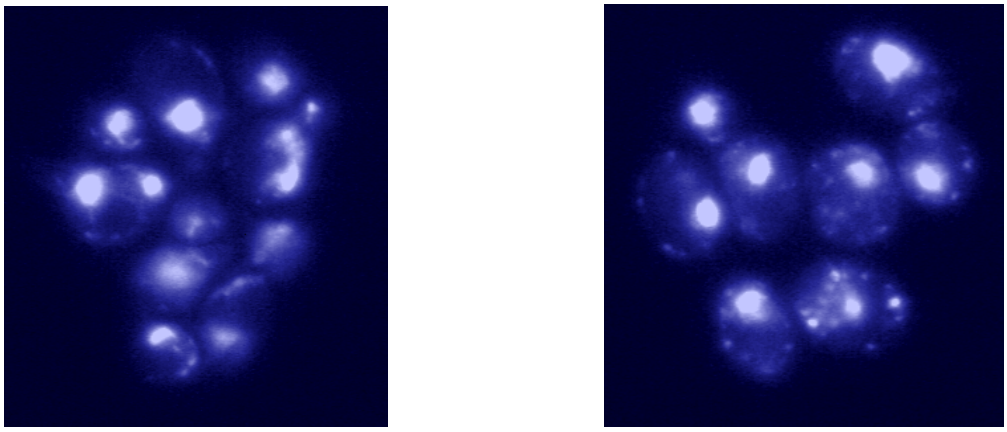
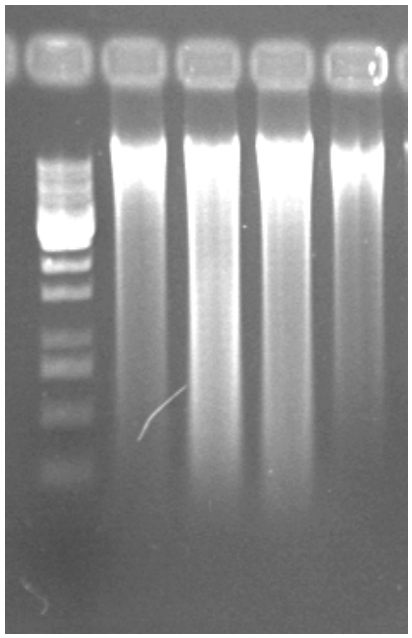


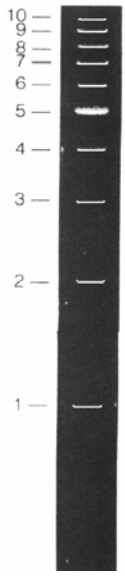
Abb. 5.1.7.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Hefe 281

Gelelektrophorese der Hefe Nr. 281 (Isolierungskit Qiagen)

Bande 1: 1 kb-Marker
Bande 2: 281/2
Bande 3: 281/4
Bande 4: 281/5
Bande 5: 281/6



1 kb-Leiter



Bande: 1 2 3 4 5

Abb. 5.1.7.3 Banden der Gelelektrophorese der Hefe 281

Aufgrund der mikroskopischen Untersuchung wurde bei die eingesetzten Hefe eine DNA-Ladder im Gel erwartet. Statt dessen zeigten sich Schmierspuren im Gel, die mehr auf Autolysezellen hindeuten.

Die Abb. 5.1.7.3 zeigt ein Gel bei der eine weitere hitzebehandelte Hefe eingesetzt wurde (Laborinterne Hefe-Nr. 272). Die Isolierung der DNA erfolgte Bei Hefe 272 mit dem Kit der Firma Peqlab. Die Abb. 5.1.7.4 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der eingesetzten, mit DAPI-gefärbten Probe.

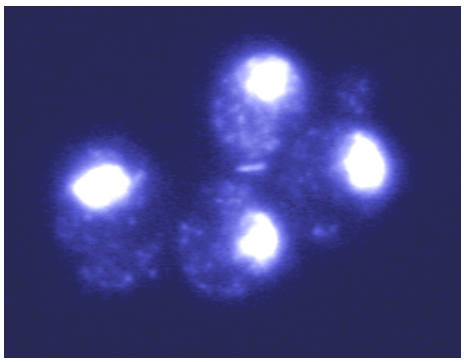


Abb. 5.1.7.4 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Hefe 272

Die hitzebehandelte Hefe 272 zeigt deutlich DNA-Veränderungen.

Gelelektrophorese der Hefen 272 und 281

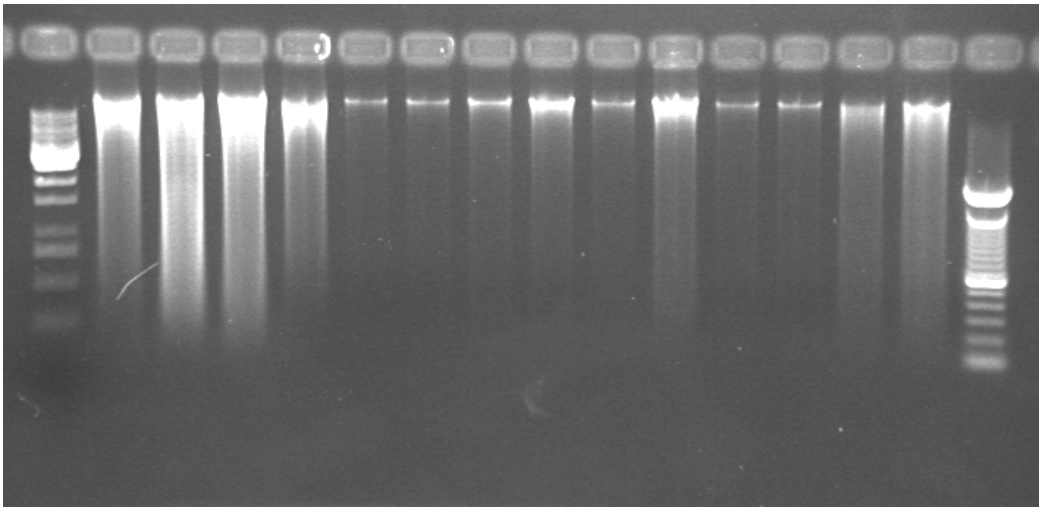


Abb. 5.1.7.5 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Hefe 272

Bande Nr.:	Hefe	Bande Nr.:	Hefe	Bande Nr.:	Hefe	Bande Nr.:	Hefe
1	281/0	**6**	272/0	**11**	272/6	**16**	100 bp
2	281/2	**7**	272/1	**12**	281/2		
3	281/4	**8**	272/2	**13**	281/3		
4	281/5	**9**	272/3	**14**	281/4		
5	281/6	**10**	272/4	**15**	281/5		

Tab. 5.1.7.1 Banden der Gelelektrophorese der Hefen 272 und 281

Mit keiner Proben wird eine DNA-Ladder erhalten. Bei den Proben der Banden 6 bis 15 könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass zu wenig DNA in der aufgetragenen Probe enthalten ist, um die niedermolekulare DNA im Gel sichtbar zu machen. Da aber bei den Banden 2 bis 5 auch keine Ladder zu sehen ist, obwohl offensichtlich genügend DNA vorlag, handelt es sich hier entweder nicht um Apoptose oder die Isolierungsprozedur muss für *Saccharomyces cerevisiae* Hefen weiter modifiziert werden, so kann z.B. bei der Sphäroplasten-herstellung anstelle von Lycitase das Enzym Zymolase eingesetzt werden.

5.1.8 Flußzytometrische Untersuchungen

Die flußzytometrische Untersuchungen erfolgten hauptsächlich mit dem Particle Analysing System (PAS) der Firma Partec, Münster durchgeführt. Bei dem PAS- Gerät sind Excitations- und Emissionslicht parallel angeordnet (axiale Messanordnung).

Einige Messungen erfolgten mit dem Epics-Profile II-Flußzytometer der Firma Coulter Electronics, Krefeld. Dieses besitzt das orthogonale Messprinzip, also eine rechtwinklige Anordnung von Excitations- und Emissionslicht.

Tierische Apoptosezellen zeigen im Histogramm vor dem G_1-Peak einen sog. "sub G_1-Peak". Für die flußzytometrischen Untersuchung wurden nur Hefepopulationen eingesetzt, die bei der mikroskopischen Kontrolle
eindeutig als "apoptotische Zellen" eingestuft wurden. Diese wurden mit PI, DAPI und H 33342 angefärbt (Färbeprotokolle siehe 4.2.1, 4.2.3 und 4.2.4.) und anschließend mit unterschiedlichen Einstellungen und Anregungen (Laser bzw. HBO-Lampe) am Flußzytometer gemessen.

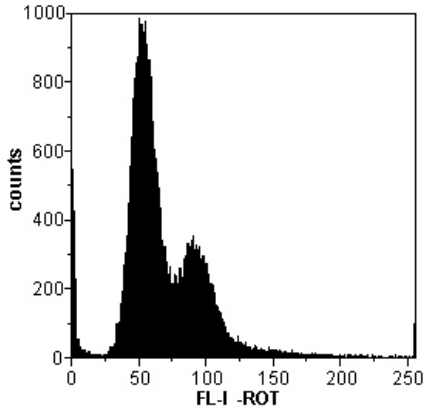


Abb. 5.1.8.1 Histogramm einer nicht-behandelten Hefepopulation (G_1-/G_2-Phase), PAS

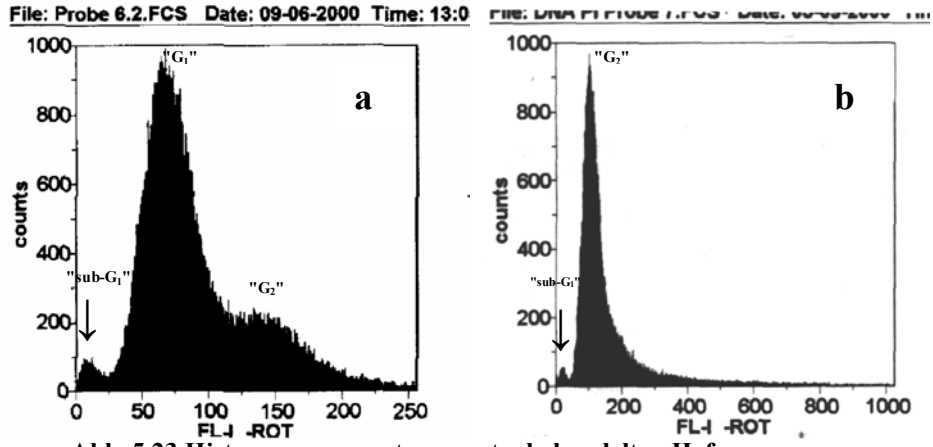


Abb. 5.23 Histogramme von temperaturbehandelten Hefen
a. G_1-/G_2-Phase, PAS
b. G_2-Phase, PAS

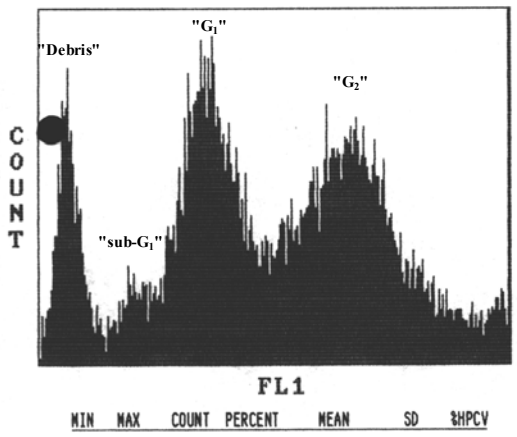


Abb. 5.1.8.2 Histogramm einer temperaturbehandelten Hefe, Profile II

Am Anfang des Histogramms ist der G_1-Peak. Vor diesen ist oft ein schmaler Peak, der Zelldebris beinhaltet. Der charakteristische sub-G_1-Peak (Abb. 5.23 und 5.24)

konnte nur bei der Färbung mit PI gemessen werden. Allerdings war dieser sub-G_1-Peak – auch bei der PI-Färbung - nicht in allen Fällen detektierbar. PI-gefärbten Proben müssen mit einer relativ hohen Verstärkung gemessen werden, woraus eine schlechtere Auflösung resultiert. Dies könnte ein möglicher Grund für die "Nicht-Messbarkeit" des sub-G_1-Peaks sein.

5.2 Teil II: Fluoreszenzoptischer Nachweis des Trehalosegehaltes

In der Brauereiliteratur wird in den letzten Jahren immer häufiger über Streßfaktoren bei Hefen der Gattung *Saccharomyces* während der Herführung, Proliferation, Lagerung und der anaeroben Gärung berichtet. Es ist daher von Bedeutung in welchem Stadium ihres Zellzyklus die Hefe unter Streßsituationen Trehalose als Protektivum bildet. Es fehlt bisher an Nachweismethoden, die Trehalosekonzentration (möglichst on-line) zu bestimmen, um Modellierungen des Prozesses bzw. des Hefemanagements durchführen zu können.
Ziel dieser Untersuchungen war, das Spektrum der physiologischen Analysen durch eine schnelle, direkte fluoreszenzoptische Detektion der Trehalose zu erweitern.

HPLC-Analyse des Trehalosegehaltes nach Temperaturerhöhung:

Die Trehalose-Analytik der Hefeproben wurde mit einer Dionex-Anlage durchgeführt. Eine Zuordnung der Signale erfolgte bisher nur für den peak der Trehalose. Die Retentionszeit für Trehalose betrug ca. 2.2 Minuten. In der Abb. 1a-d war der Trehalose-peak identisch mit der Bezeichnung 2. Nach der Inokulation (Abb. 5.2.1a) und kurz vor der Erwärmung der Population (Abb. 5.2.1b) auf 40° C zeigte der Trehalose-peak ein einheitliches Signal. Nach der Erwärmung auf 40° C stieg die peak-Höhe auf den doppelten Wert an. Eine Stunde nach der Erwärmung bei der Abkühlung der Suspension wieder auf 28° C war keine Trehalose mehr nachzuweisen.

Trehalose Akkumulation nach Hitzebehandlung
HPLC-Analyse

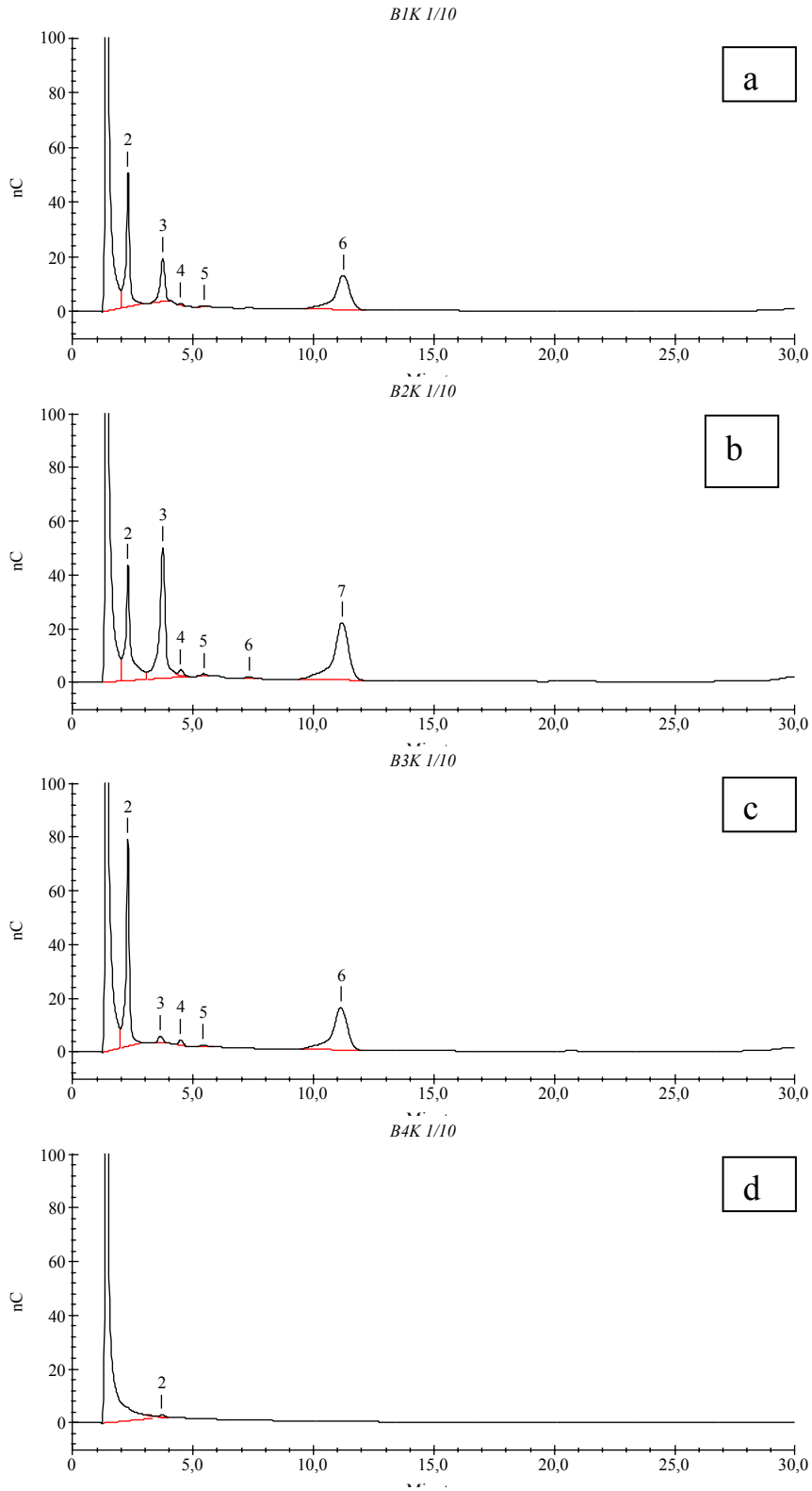
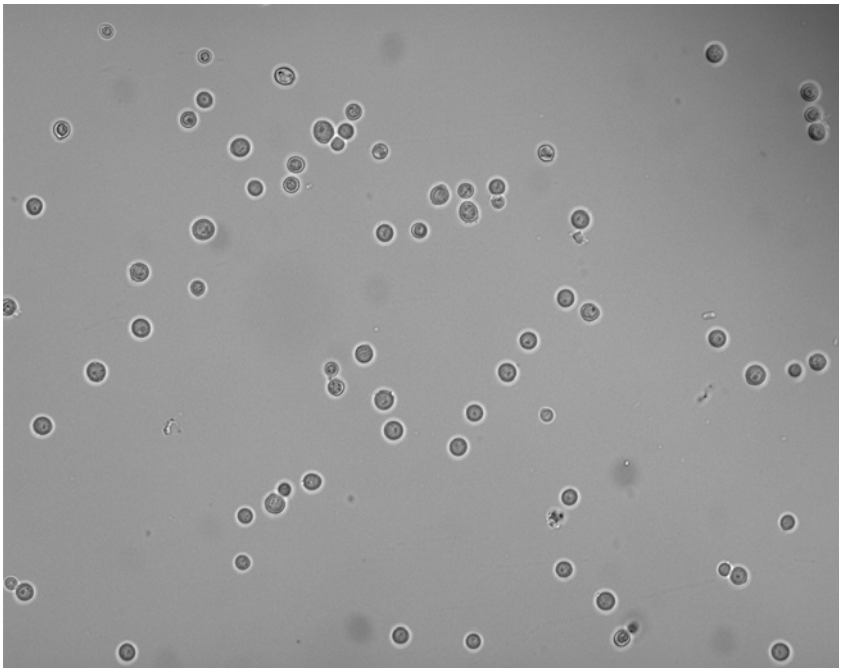
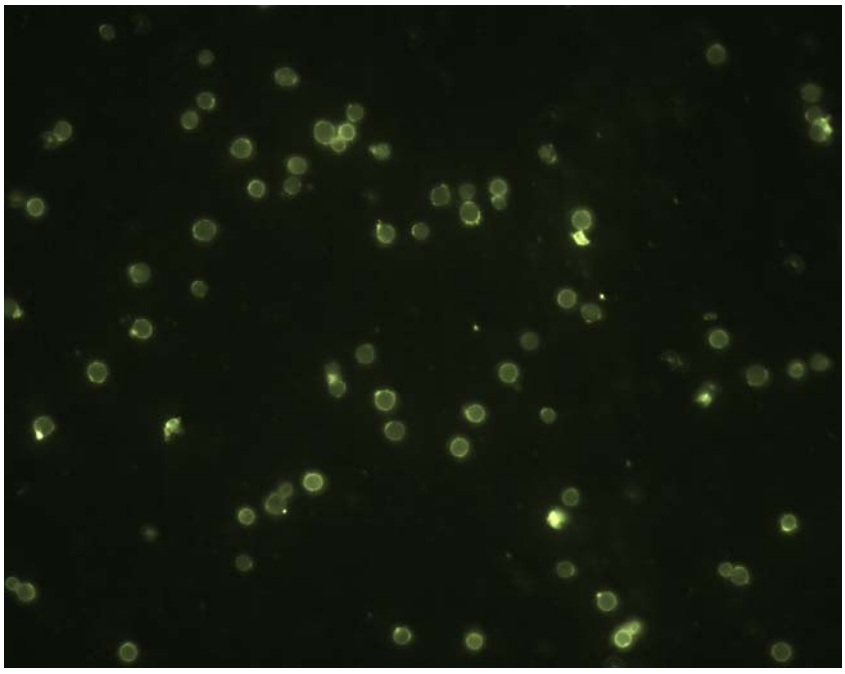


Abb. 5.2.1: a) Hefezellen zum Zeitpunkt der Inokulation, b) Zellen nach 3.5 Stunden Kultivierung bei 28° C, c) Hefen nach Temperaturerhöhung auf 40° C, d) Zellen nach Abkühlung der Würze auf 28° C.

Fluoreszenzoptische Trehalosegehalts-Bestimmung nach Temperaturerhöhung



a)



b)

Abb. 5.2.2 a) Hefezellen im Hellfeld; b) mit Con A-FITC gefärbte Hefezellen

Nach Hitzebehandlung der Würze auf 40° C kann sowohl mit der HPLC- als auch mit der fluoreszenzoptischen Analytik eine Trehaloseakkumulation nachgewiesen werden:

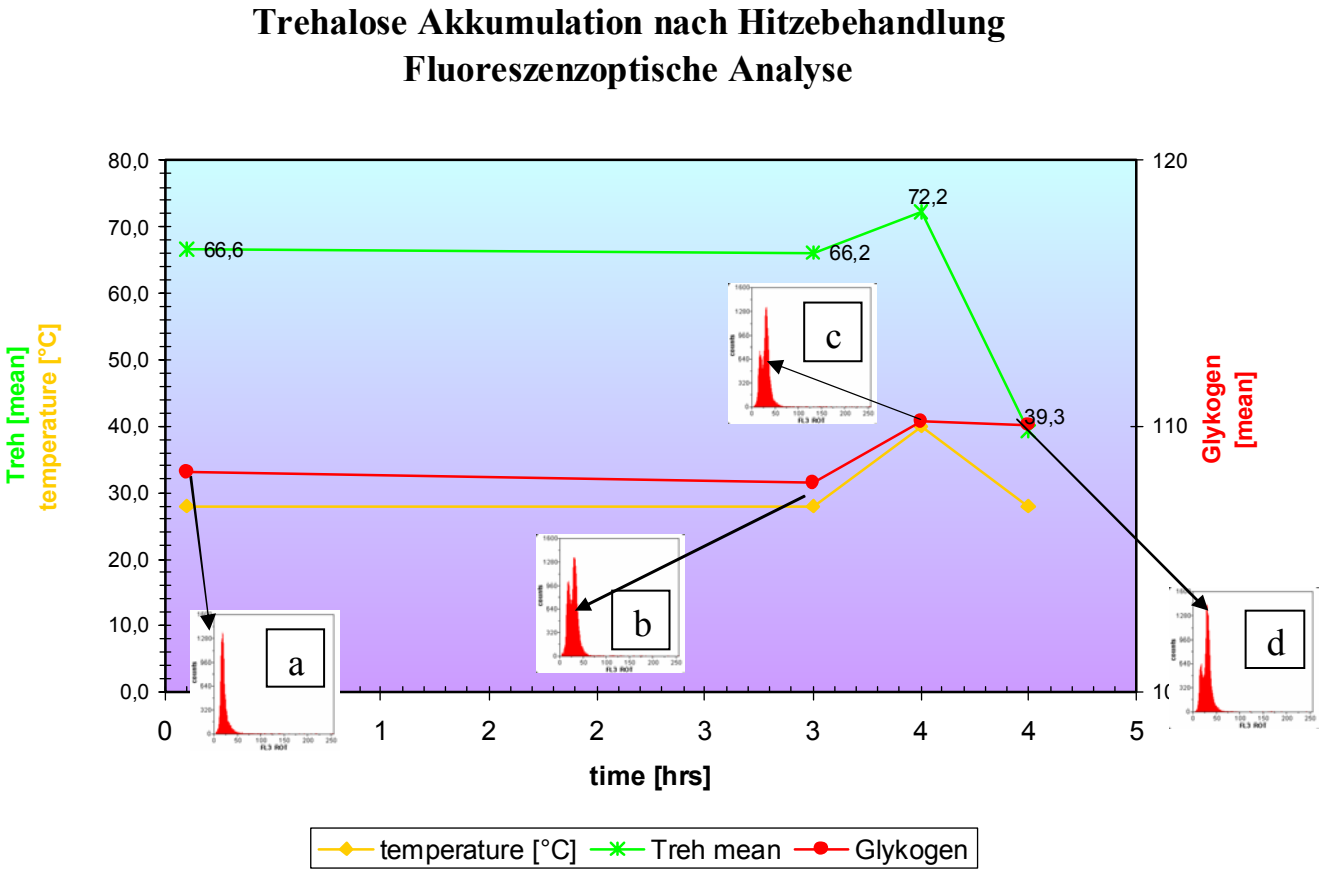


Abb. 5.2.3: **Der Zellzyklus der Hefezellen:** a) Zellen aus der Hefelagerung in der G_0-/G_1-Phase, b) – c) Hefezellen in der exponentiellen G_2-+M-Phase. **Der Trehalosegehalt (rel. Fluoreszenzintensität pro Hefezelle):** a) 66.6 F.I., b) 66.2 F.I., c) 72.2 F.I., d) 39.3 F.I.

DNA-Gehalt pro Hefezelle:

Da die Hefezellen aus der Hefelagerung bei 3° C in 28° C warme Würze inokuliert wurden, zeigte die Häufigkeitsverteilung der Abb. 5.2.3 in a) zunächst das typische Bild einer quieszenten Population. Die Zellen besitzen einheitlich niedrigen DNA-Gehalt (2 n) einer untergärigen Hefepopulation.

Im Verlauf der Kultivierung gelangen immer mehr Zellen in die G_2- + M-Phase (Abb. 5.2.3 in b).

Zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung von 40° C deutet bei der DNA-Gehalts-Bestimmung nichts darauf hin, daß der physiologische Zustand der Hefezellen sich verändert hat. Die intensive G_2- + M-Phase hält unvermindert in Abb. 5.2.3 in c) an.
Auch nach der Temperaturabsenkung findet man eine stark ausgeprägte exponentielle Wachstumsphase.

Glykogengehalt pro Hefezelle:
Zum Zeitpunkt der Inokulation und der 3.5 stündigen Kultivierung bleibt die relative Fluoreszenzintensität des Glykogengehaltes konstant. Glykogen wird aber sofort eingelagert, sobald die Temperatur auf 40° C erhöht wurde. Nach der Temperaturreduzierung durch Eiswürfel auf 28° C bleibt der Glykogengehalt weiterhin erhöht.

Trehalosegehalt pro Hefezelle:
In der Abb. 5.2.3 war der größte Teil der Zellen zum Zeitpunkt der Inokulation proliferationsinaktiv, d.h. die Trehalose in den Zellen war sicherlich bei der Kühlung des Jungbieres am Ende der Hauptgärung eingelagert worden. Da die Zellen in der 4. Führung bei 3° C aufbewahrt wurden, bestand kein Anlaß für die quieszenten Zellen, die Trehalose abzubauen. Bei 28° C beginnen sich die Zellen in den 3.5 Stunden Kultivierung an die Nährsubstratbedingungen zu adaptieren. Da das Inokulat als dickbreiiger Satz gegeben wurde, befindet sich ein großer Teil der Zellen auch weiterhin in der proliferationsinaktiven Phase (viable but not culturable). Sobald die Temperatur in der Population auf 40° C angehoben wurde, lagerten die proliferationsaktiven Zellen sofort Trehalose ein. Diese Akkumulation der Trehalose wurde aber ebenso schnell wieder rückgängig gemacht, nachdem die Zellen wieder bei Normaltemperatur kultiviert wurden.

5.3 Teil III: Simultane Bestimmungen

Die simultane Bestimmung mehrere Parameter in einer Probe bietet große Vorteile. Zum einen wird nahezu die Hälfte an Arbeits- und Zeitaufwand bei Färbe- und Messprozedur gespart - hinzu kommt die geringere Puffermenge und die geringeren Energiekosten z.B. für die Zentrifugation, etc.. Zum anderen werden die intrazellulären Gehalte an ein und derselben Hefepopulation gemessen.

Simultane Färbungen Glykogen / DNA-Gehalt wurden an Betriebshefe-populationen sowohl mit Propidiumiodid, als auch mit DAPI durchgeführt. Beide Färbeverfahren zeigten im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine gute Unterscheidung von Zellkern (bei PI-Anfärbung und λ = 488 nm Anregung die rote Fluoreszenz des Zellkerns, bei DAPI und λ = 360 nm Anregung die blauweiße Fluoreszenz des Zellkerns) und Glykogeneinlagerungen. Auch wurde zur Bestimmung des DNA-Gehaltes eine modifizierte Feulgen-Färbung versucht (λ = 488 nm, grün-gelbe Fluoreszenz des Zellkerns).

Ferner wurde der Gehalt an den intrazellulären Reservestoffen Glykogen und Neutrallipide simultan gefärbt und gemessen.

Simultane Bestimmungen des Glykogen-/DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid

Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

Einzelfärbungen

1. PI-Färbung (DNA-Gehalt) als "Kontrollfärbung"
2. Acriflavin-Färbung (Glykogen-Gehalt)

Simultanfärbung

3. Simultan-Färbung (DNA/PI // Glykogen/Acriflavin)

Es wurde zuerst die RNase-Digestion und anschließend die Periodsäureoxidation durchgeführt.

Danach wurde mit Feulgen-Acriflavin-Reagenz gefärbt und gewaschen. Anschließend wurde PI zupipettiert und für 1 h bei 8°C einwirken gelassen.

Beispielhaft wurden zwei proliferierende Hefepopulationen dargestellt

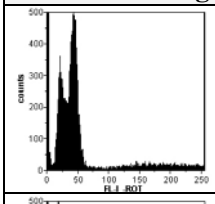
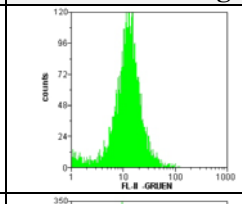
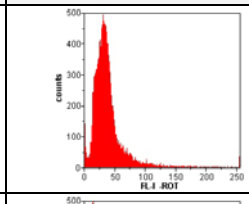
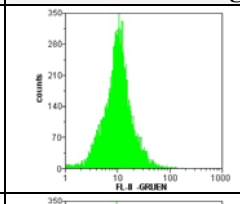
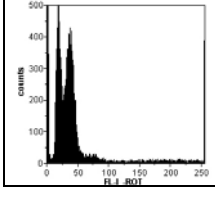
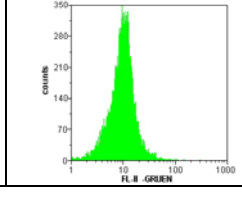
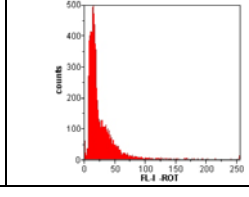
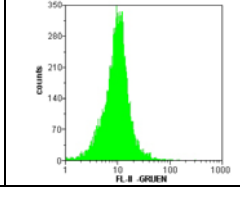
DNA-Gehalt mit PI Einzelmessung	Glykogen-Gehalt mit Acriflavin Einzelmessung	DNA-Gehalt mit PI Simultanmessung	Glykogen-Gehalt mit Acriflavin Simultanmessung
			
			

Abb.Nr. 5.3.1 Simultane Bestimmung Glykogen- und DNA-Gehalt mittels PI

Bei der Doppelfluorochromierung stellte sich der DNA-Peak deutlich anders dar. Die G_1-/G_2-Phase ließ sich nicht mehr erkennen.

Der Glykogenpeak veränderte sich kaum.

Simultane Bestimmungen des Glykogen-/DNA-Gehaltes mit DAPI

Färbungen

Beispielhaft wurden Betriebshefeproben ausgewählt, die sich in einer proliferationsaktiven Phase ($G1$-/G_2) befand, diese werden in den Diagrammen mit Hefe I und Hefe II bezeichnet.

Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

Einzelfärbungen

1. PI-Färbung (DNA-Gehalt) als "Kontrollfärbung"
2. DAPI-Färbung (DNA-Gehalt)
3. Acriflavin-Färbung (Glykogen-Gehalt)

Simultanfärbung

4. Simultan-Färbung (DNA/DAPI // Glykogen/Acriflavin)

Anmerkung zu den Färbungen:

Glykogenfärbung

Nach Vorversuchen wurde das Schiff'Reagenz 1: 500 statt 1: 100 verdünnt um "Farbübersprechen" zu reduzieren. Auch mit dieser Verdünnung wurde eine optimale Färbung erreicht (mikroskopische Kontrolle).

DNA-Färbung

Eine Färbung mit 20 µl 1:3 verdünnten DAPI (Fa. Partec) und einer Einwirkzeit von 15 Minuten zeigte mikroskopisch eine sehr gute DNA-Färbung. Mehr Farbstoff oder längere Einwirkzeiten erwiesen sich als nicht erforderlich.

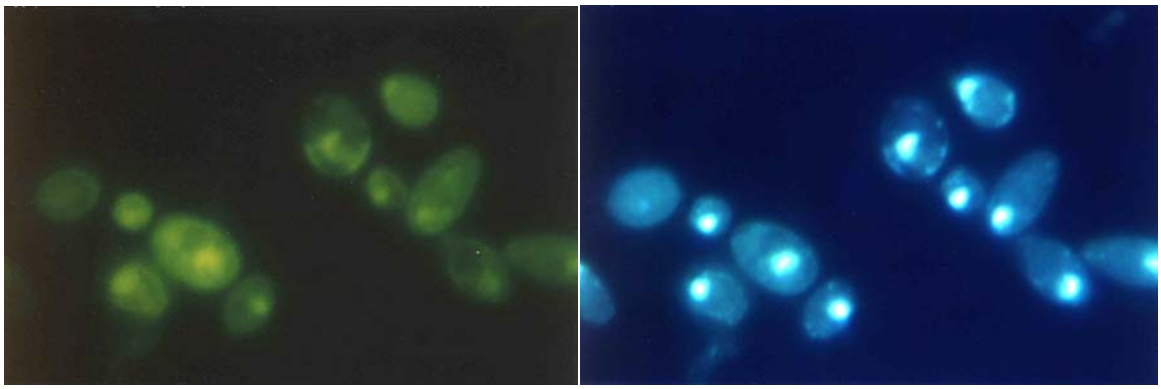


Abb. 5.3.2 Simultanfärbung Glykogen/DNA; links Glykogenfärbung; rechts DNA-Färbung mit DAPI

Ergebnisse der Einzel- und Simultanfärbungen (DAPI und Acriflavin)

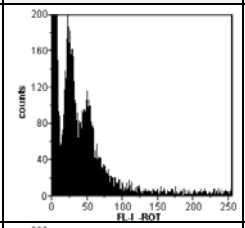
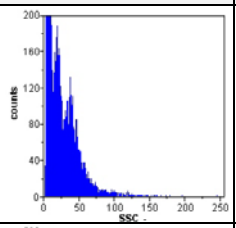
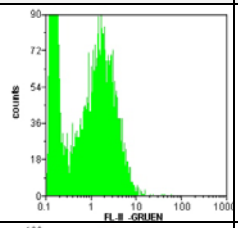
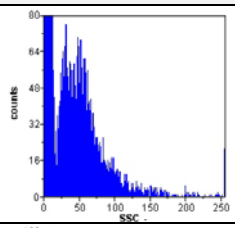
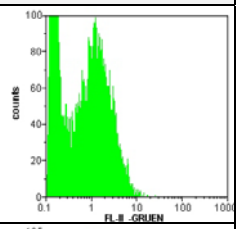
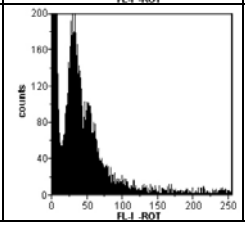
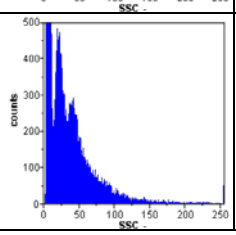
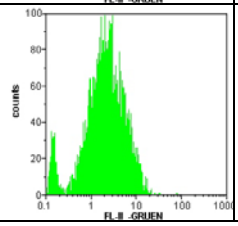
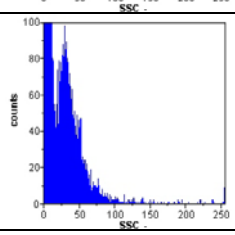
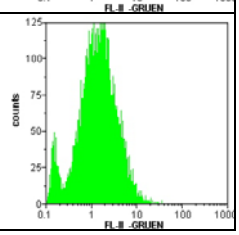
Probe	DNA-Gehalt mit PI	DNA-Gehalt mit DAPI	Glykogen-gehalt mit Acriflavin	DNA/DAPI Simultan-bestimmung	Glykogen Simultan-bestimmung
Hefe I					
Hefe II					

Abb. 5.3.3 Simultane Bestimmung Glykogen- und DNA-Gehalt mit DAPI

Die Einzelfärbungen des DNA-Gehaltes mit DAPI und PI zeigten gleiche Resultate. Die PI-Färbung wurde nur als "Kontrollfärbung" durchgeführt. Bei der Simultanfärbung DAPI-/Acriflavin veränderte sich der DNA-Peak. Der Peak wurde leicht nach rechts verschoben, und die Auflösung wurde schlechter.

Der Glykogenpeak hingegen bleib bei der Doppelfluorochromierung nahezu gleich.

Beeinflusst das modifizierte Färbeverfahren der Simultanfärbung die DNA-Färbung mittels DAPI?

Bei der Simultanfärbung mit DAPI und Acriflavin ist ein Periodsäureschritt enthalten. Die Periodsäure hydrolysiert die Kohlenhydrate, wobei 1,2-Glycolgruppen in Aldehydgruppen umgewandelt werden. Die Oxidation endet bei der Aldehydbildung, es werden keine Carboxylgruppen gebildet.

Um zu prüfen, dass der veränderte Peak nicht nur auf Farbübersprechen zurückzuführen ist, wurde die Färbung bis auf die Acriflavinzugabe analog durchgeführt.

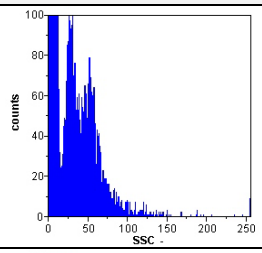
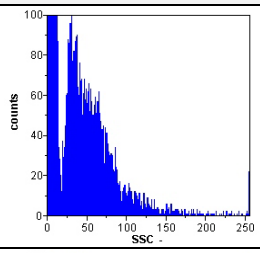
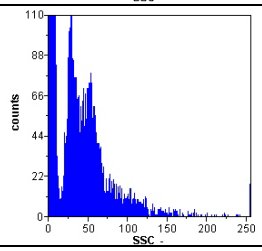
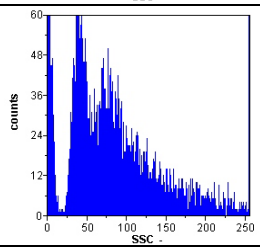
Probe	DNA-Gehalt mit DAPI ohne Periodsäureschritt	DNA-Gehalt mit DAPI nach Periodsäureschritt
Hefe I		
Hefe II		

Abb. 5.3.4 DAPI-Färbung - ohne und mit Periodsäureoxidation -

Vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass nach der Periodsäurebehandlung der Hefe, DAPI die doppelsträngige DNA nicht mehr optimal anfärbt

Wie stark beeinflusst Farbübersprechen die Simultanfärbung ?

Um zu klären wie stark Farbübersprechen die Simultanfärbung beeinflusst wurden Proben getrennt gefärbt und zusammengegeben. Es wurden nur Proben in der G1-/G2-Phase eingesetzt, da hier die Veränderungen am Peak am deutlichsten zu erkennen sind.

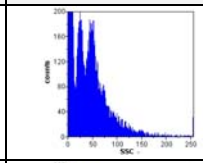
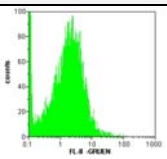
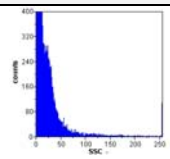
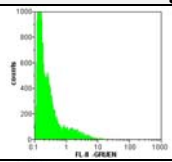
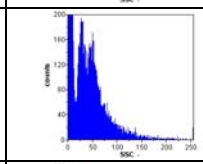
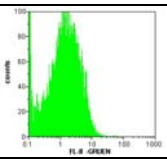
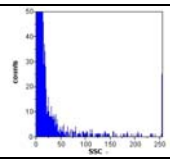
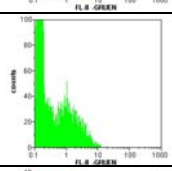
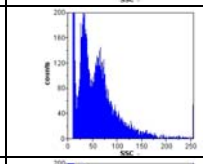
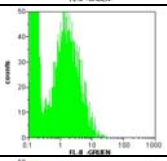
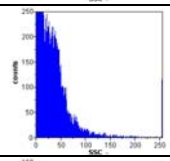
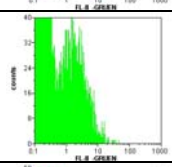
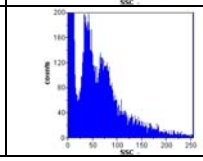
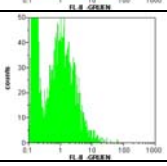
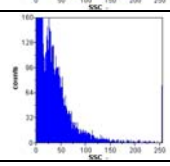
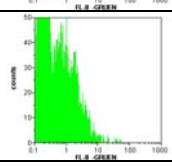
Probe	DNA-Gehalt mit DAPI	Glykogengehalt mit Acriflavin	DNA* Simultan-bestimmung	Glykogen* Simultan-bestimmung
Hefe I				
Hefe II				
Hefe III				
Hefe IV				

Abb. 5.3.5 Messung zusammenpipettierter – getrennt gefärbter – Proben

* Die gefärbten Proben wurden zusammenpipettiert und sofort gemessen.

Sämtliche Proben der Einzelfärbung waren gut messbar.

Nach dem Zusammengeben der Proben wurde der jeweilige Parameter bei unveränderter Einstellung gemessen. Keine der Simultanfärbungen ergab ein Ergebnis, das mit der Einzelfärbung zu vergleichen war.

Weitere Simultanfärbungen

Die modifizierte Feulgenfärbung zur Bestimmung des DNA-Gehaltes sollte als Alternative zur Doppelfluochromierung DNA-Gehalt (DAPI)/Neutrallipide (Nilrot) eingesetzt werden. Damit könnte diese Simultanbestimmungen auch an Geräten durchgeführt werden, die nicht über eine zweite Anregungsquelle im Bereich von $\lambda = 360$ nm (HBO-Lampe) verfügen.

Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

1. Feulgen (DNA-Gehalt)
2. DAPI-Färbung (DNA-Gehalt)
3. Acriflavin-Färbung (Glykogen-Gehalt)
4. Nilrot-Färbung (Neutrallipid-Gehalt)
5. Simultan-Färbungen
    a. (Glykogen/Acriflavin // Neutrallipide/Nilrot)
    b. (DNA/Feulgen // Neutrallipide/Nilrot)
    c. (DNA /DAPI // Neutrallipide/Nilrot)

Für die Glykogen- bzw. (DNA-)Färbung wurden erneut verschiedene Verdünnungsstufen der neu angesetzten Schiff'schen Lösung zur Färbung eingesetzt. Nach mikroskopischer Auswertung wurde eine Verdünnung von 1: 250 (20 µl Farbstofflösung in 5 ml PBS) eingesetzt.

Vergleich Feulgen (Acriflavin)- mit DAPI-Färbung

Diese Feulgenfärbung wurde von uns erstmalig für die Versuche durchgeführt.

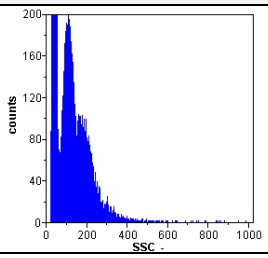
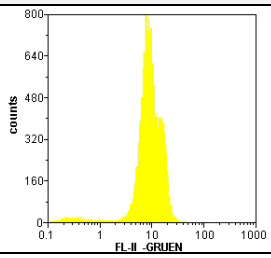
Probe	DNA-Gehalt mit DAPI	DNA-Gehalt mit Acriflavin
Betriebshefe (Anstellen)		

Abb. 5.3.6 Vergleich DNA-Gehaltsfärbungen mit DAPI und modifizierter Feulgenreagenz

Das Ergebnis der beiden Färbungen (die Peakform) ist identisch.

Einzel- und Simultanfärbung unterschiedlicher Parameter

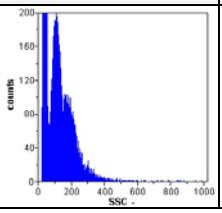
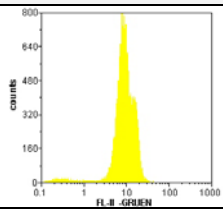
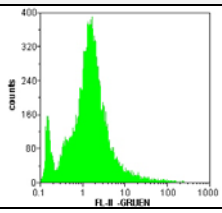
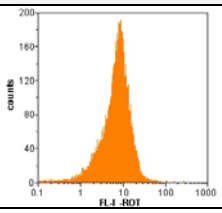
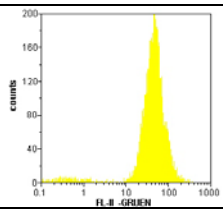
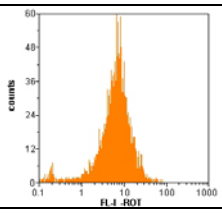
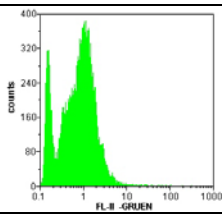
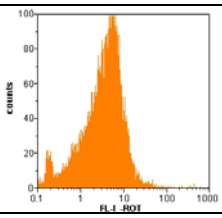
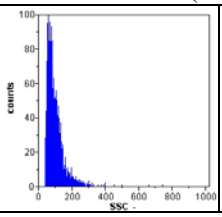
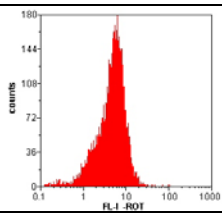
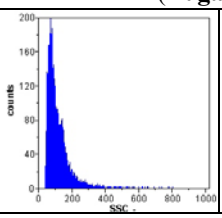
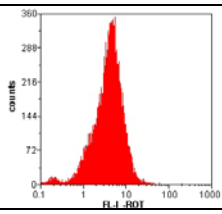
Probe	DNA-Gehalt mit DAPI	DNA-Gehalt mit Acriflavin	Glykogen-Gehalt mit Acriflavin	Neutrallipid-Gehalt mit Nilrot
Betriebs-hefe Färbung I				
Simultanmessung DNA (Acriflavin)- und Neutrallipidgehalt **(Zugabe von Nilrot nach Beenden der Acriflavinfärbung)**				
Betriebs-hefe Färbung II				
Simultanmessung Glykogen- und Neutrallipidgehalt **(Zugabe von Nilrot nach Beenden der PAS-Acriflavinfärbung)**				
Betriebs-hefe Färbung III				
* Simultanmessung DNA (DAPI)- und Neutrallipidgehalt **(Zugabe von Nilrot nach DAPI-Messung)**				
Betriebs-hefe Färbung IV				
Simultanmessung DNA (DAPI)- und Neutrallipidgehalt **(Zugabe von Nilrot direkt auf DAPI pipettiert)**				
Betriebs-hefe Färbung V				

Abb.5.3.7 Verschiedene Simultanbestimmungen

Die Simultanbestimmung DNA/DAPI // Neutrallipide wurde zum einen so durchgeführt, dass die Nilrotlösung sofort nach Zugabe von DAPI-Lösung

zupipettiert wurde und zum anderen, dass zuerst die DAPI-Färbung und Messung erfolgte und dann auf diese Probe Nilrotlösung gegeben wurde.

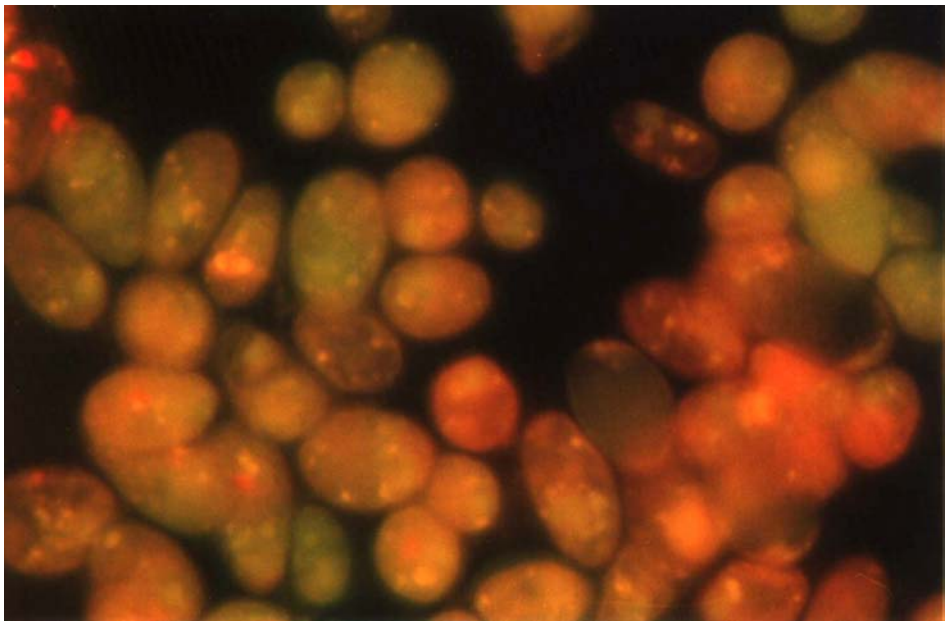


Abb. 5.3.8 Simultanfärbung Glykogen – Neutrallipide

Färbung I Einzelfärbung der unterschiedlichen Parameter

Die Messungen stellten sich in erwarteter Weise dar. Das Peakmaximum des Glykogengehaltpeaks liegt bei 1,5 und das des Neutrallipidgehaltes bei 6.

Färbung II Simultanfärbung DNA/Feulgen und Neutrallipide/Nilrot

Die Peakform des DNA-Peaks zeigte sich bei der Doppelfluorochromierung deutlich weniger ausgeprägt und war nach rechts verschoben.

Das Maximum des Neutrallipidpeaks hat sich nach leicht rechts verschoben (Peakmaximum 7).

Färbung III Simultanfärbung Glykogen/Acriflavin und Neutrallipide/ Nilrot

Das Maximum des Glykogenpeaks verschob sich leicht nach links (Peakmaximum 1). Der Neutrallipidpeaks blieb gleich (Peakmaximum 6).

Färbung IV Simultanfärbung DNA/DAPI und Neutrallipide/ Nilrot

a.) Erst wurde DAPI gefärbt, 15 Minuten einwirken gelassen und gemessen. Dann wurde auf die "Messprobe" 1 Tropfen Nilrot pipettiert und nach genau 30 Minuten Einwirkzeit gemessen.

Der DNA-Peak war hier deutlich verändert und die "Peak-Schulter" kaum noch ausgeprägt. Der Neutrallipidpeak lag auch hier bei 6.

b.) **Hier** wurde direkt nach der DAPI-Zugabe Nilrot zupipettiert und nach genau 30 Minuten Einwirkzeit gemessen.

Das Ergebnis unterscheidet sich kaum von dem vorherigen (4 a). Der DNA-Peak war hier deutlich verändert und die "Peak-Schulter" kaum noch ausgeprägt. Der Neutrallipidpeak lag auch hier bei 6.

Es kann somit Nilrot sofort nach DAPI pipettiert werden.

Fazit:

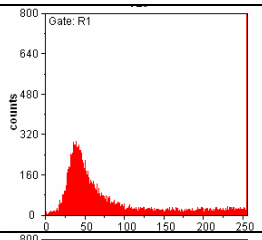
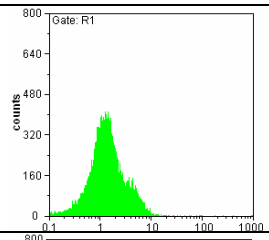
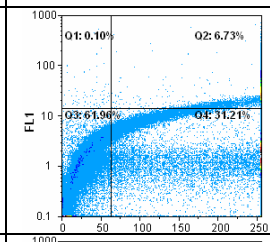
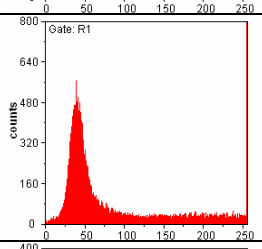
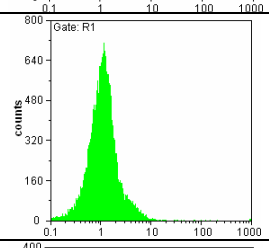
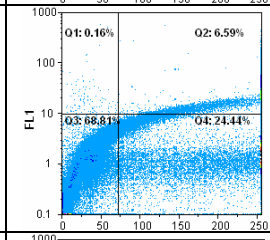
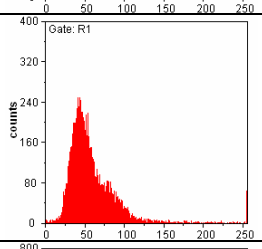
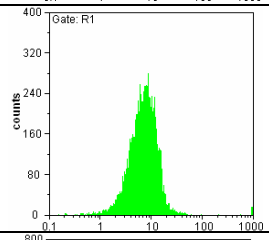
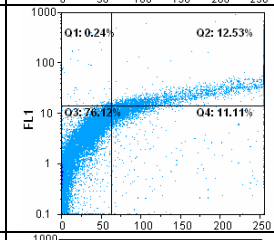
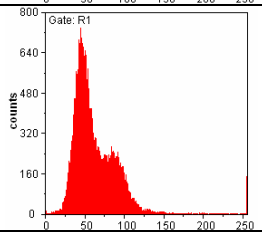
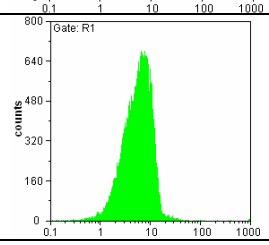
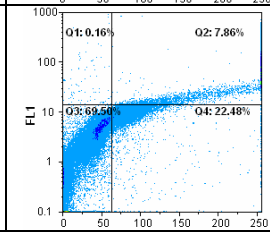
Alle Doppelfluochromierungen – Ausnahme: Glykogen-/Neutrallipidfärbung – verändern die Peakform derart, dass eine schlechtere Auflösung resultiert.

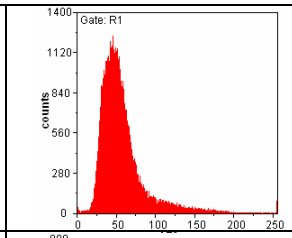
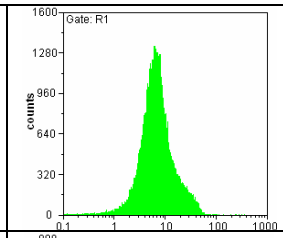
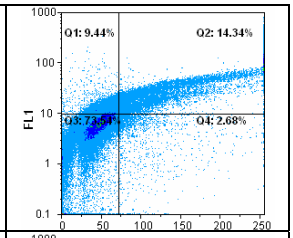
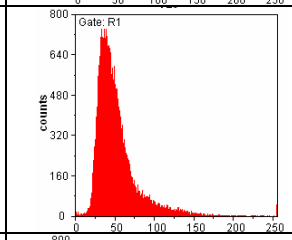
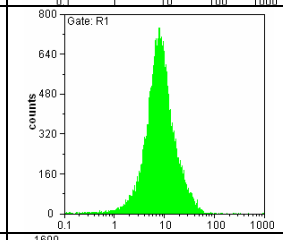
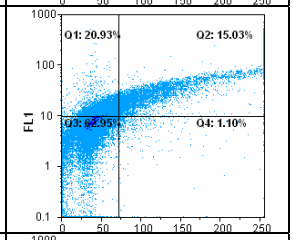
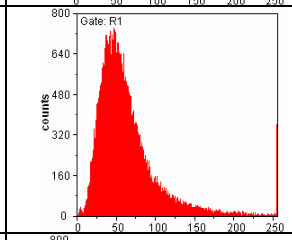
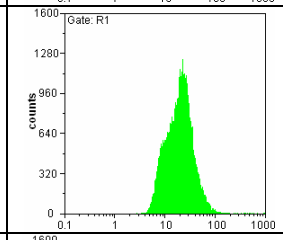
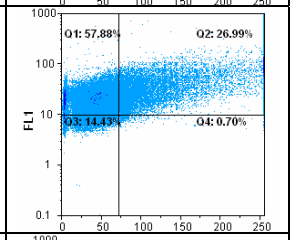
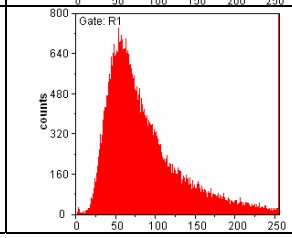
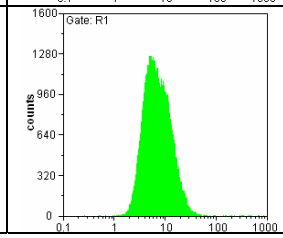
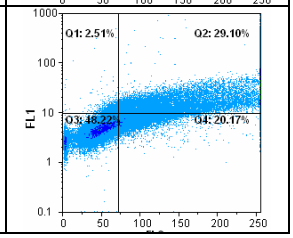
Ergebnisse Teil IV: Einbau von BrdU in die DNA

Da unser Labor nicht mehr das PAS Flußzytometer besitzt, sondern nun mit dem CyFlow Blue Gerät der Firma partec arbeitet, konnte nur eine Variante der BrdU-Färbung durchgeführt werden. Das CyFlow Blue ist nicht mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe ausgestattet und kann daher nicht für Färbungen im UV-Bereich (Bisbenzimide H33258 und H33342) verwendet werden. Der Einbau von BrdU in die DNA wurde daher mit einem fluoreszierenden Antikörper (anti-BrdU Alexa Fluor 488 conjugate von Molecular Probes) kontrolliert.

Die Färbungen wurden nach dem in Kapitel beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Ergebnisse der Doppelfärbung sind einerseits als Dot Blot (x-Achse PI, y-Achse Anti-BrdU) andererseits als Histogramm der jeweiligen PI und Anti-BrdU Färbung dargestellt.
Parallel wurde eine Negativkontrolle (ohne BrdU-Einbau) angefärbt.

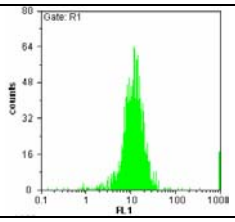
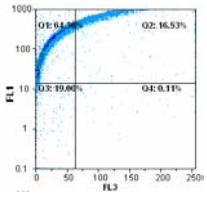
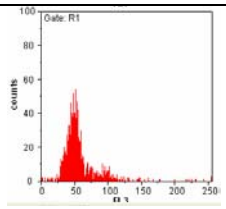
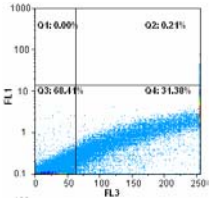
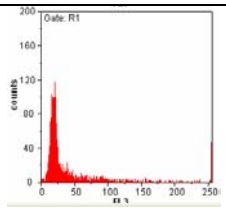
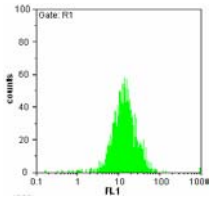
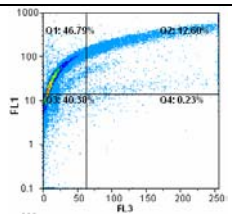
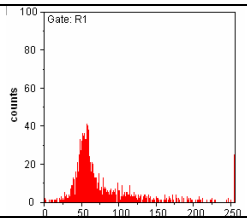
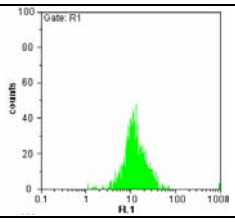
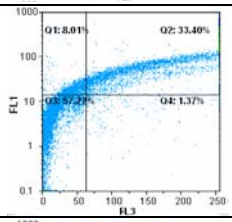
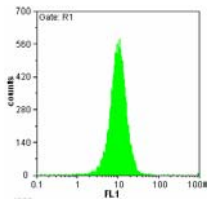
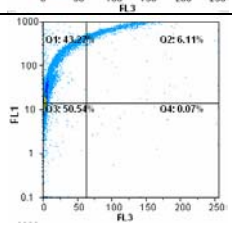
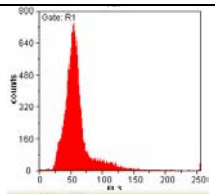
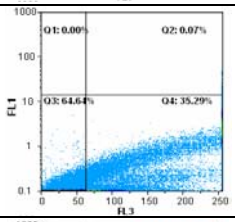
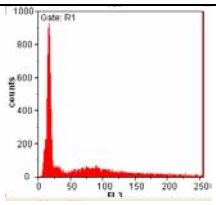
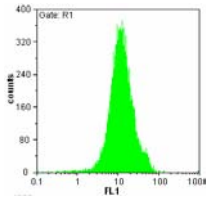
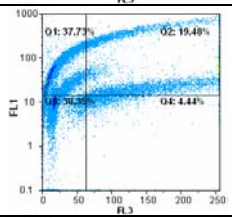
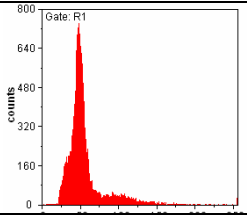
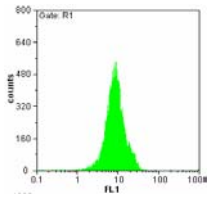
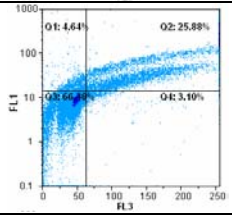
In der Tabelle Nr. 5.4.1 sind die Ergebnisse des ersten Versuchs dargestellt. Anhand der PI-Färbung erkennt man, dass die Proliferation der Hefezellen nach drei Stunden beginnt. In der Dot Blot Darstellung sind keine gravierenden Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und dem BrdU-Einbau zu erkennen. In den Histogrammen der BrdU-Färbung ist eine leichte stärkere Fluoreszenz der Negativkontrolle ersichtlich. Dies enspricht aber nicht den erwarteten Ergebnissen, da hier keine Bindungsstellen für den Antikörper vorhanden sind, müsste hier die Fluoreszenz eigentlich geringer sein. Möglicherweise handelt es sich um ungebundenen Antikörper, der nicht weggewaschen wurde.

	PI	Anti-BrdU	
00h_neg			
00h_pos			
03h_neg			
03h_pos			

20h_neg			
20h_pos			
22h_neg			
22h_pos			

Tab.Nr. 5.4.1

In einem weiteren Versuch wurden einmal die PI- und die Anti-BrdU Färbungen einzeln durchgeführt und gemessen. Anschließend wurde zur Kontrolle, die beiden Einzelfärbungen zusammengemischt und im Flußzytometer gemessen. Parallel dazu wurden die Färbungen simultan durchgeführt und gemessen. Die hierzu erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. Nr. 5.4.2 dargestellt.

	PI	Anti-BrdU	Dot Blot
Anti-BrdU_08h_neg			
PI_08h_neg			
mix_08h_neg			
combi_08h_neg			
Anti-BrdU_08h_pos			
PI_08h_pos			
mix_08h_pos			
combi_08h_pos			

Tab. Nr. 5.4.2

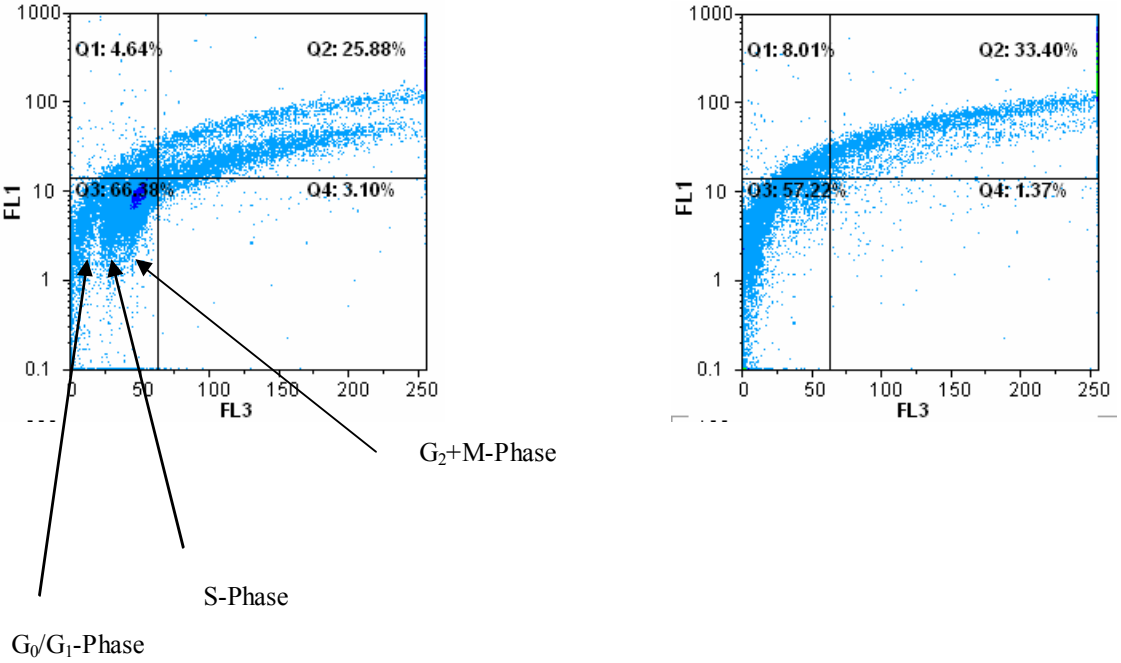


Abb.Nr. 5.5.1 links: BrdU-Einbau; rechts: Negativkontrolle

In der Abbildung Nr. 5.5.1 ist der Dot Blot des BrdU-Einbaus der Negativkontrolle gegenübergestellt. Die Pfeile zeigen die Lokalisation der G0/G1-, S- und G2 + M-Phase Zellen. Der Dot Blot verdeutlicht aber auch, daß eine scharfe Trennung der Zellen in die einzelnen Phasen nicht möglich ist. Auch konnte dieses Ergebnis in weiteren Versuchen nicht bestätigt werden. Da unser Labor nicht mehr über das PAS Flußzytometer mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe verfügt, konnte auch nicht überprüft werden, ob die Variante mit den Bisbenzimiden funktioniert, oder ob ein Einbau von BrdU in Hefen überhaupt möglich ist.

Teil 5: Hefealterung

Mit Hilfe der relativen Sprossnarbenzahl und der Messung verschiedener intrazellulärer Makromoleküle kann eine Aussage über das Alter einer Hefepopulation getroffen werden.

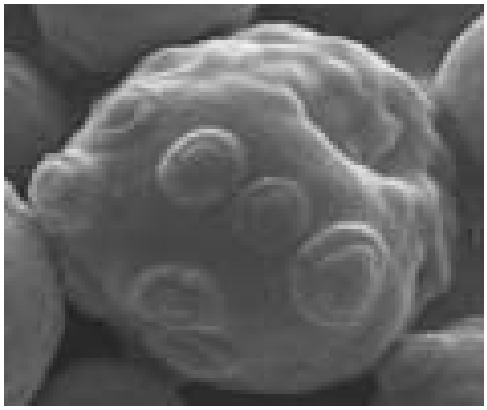


Abb. 5.5.1 : elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle mit Sprossnarben

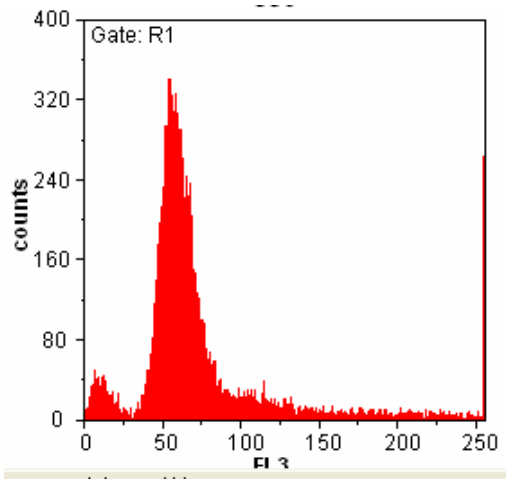
Für die Bestimmung der Alterung einer Hefepopulation wurde einerseits eine Hefe im Labormaßstab andererseits eine Vergärung im Industriemaßstab untersucht. Neben der relativen Sprossnarbenzahl wurde auch der DNA-, Glykogen-, Trehalose- und Proteinasegehalt bestimmt. Dieser physiologische Marker soll Auskunft geben, ob intrazellulär Proteinase A eingelagert oder abgebaut worden ist. Sobald in der Hefepopulation ein starkes Fluoreszenzsignal nachweisbar wird, bedeutet das, dass der Anteil toter (apoptotischer) Zellen in der Population angestiegen ist und die einzelnen Zellen Proteolyse durchführen. Proteinase A hat außerdem durch die Spaltung von schaumaktiven Polypeptiden einen starken Einfluss auf die Schaumeigenschaften des fertigen Bieres. Dieser Tatbestand ist biotechnologisch von großem Interesse für die Bierherstellung in Deutschland.

Labormaßstab

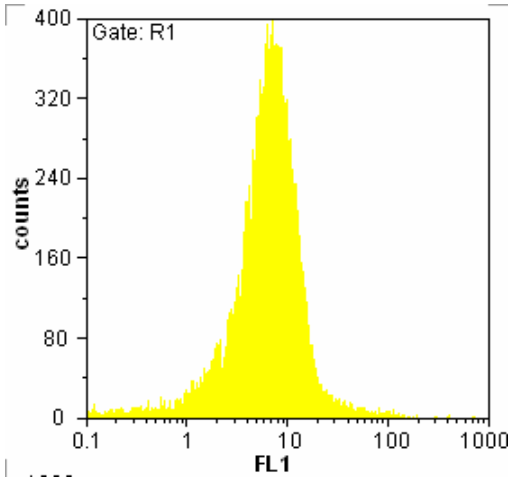
Nachfolgend werden die Ergebnisse der Vergärung im Labormaßstab dargestellt.

Inokulation

DNA-Gehalt

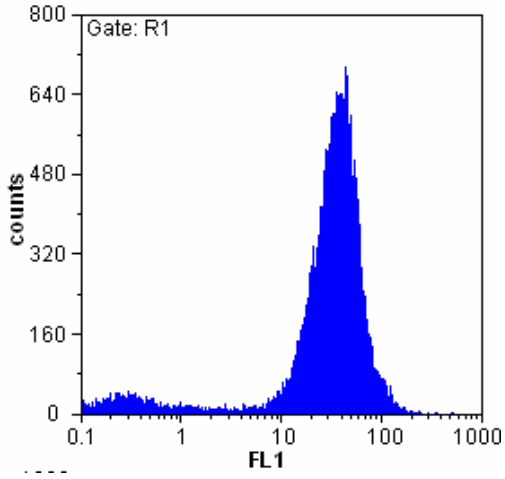


Proteinase



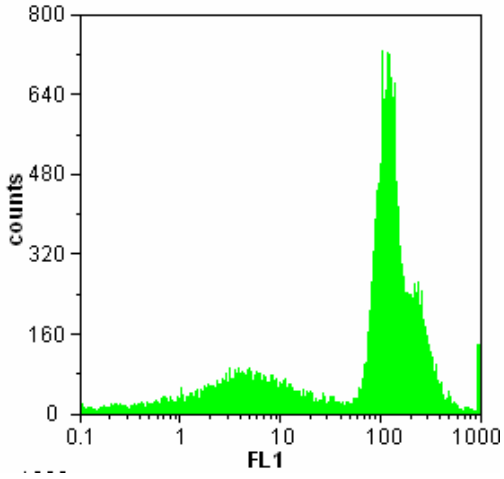
P-Max.: 7,2

Glykogen



Peak-Maximum: 39,2

Trehalose



Peak-Maximum: 199,7

Abb.Nr. 5.5.2

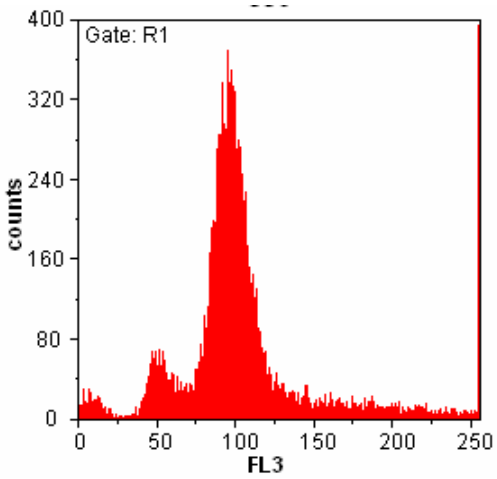
In dem Histogramm der DNA-Gehaltsbestimmung sieht man gelagerte Hefezellen, die aus der quieszenten Wachstumsphase bei 28°C in Würze inokuliert worden sind. Bei der gelagerten Hefe sind sicherlich tote Hefen inokuliert worden bzw. sterben nach der Inokulation ab. Die proteolytischen Enzyme bleiben zunächst inaktiv.

Anhand des relativ hohen Glykogengehalts (Peak-Maximum = 39,2), sieht man, dass die Zellen vor der Lagerung Reservestoffe akkumuliert haben. Der Trehalosegehalt ist zu Beginn der Inokulation ebenfalls sehr hoch. Dies ist auch darauf zurück zuführen, dass Zellen zu Beginn des Zellzyklusses in eine Stresssituation geraten.

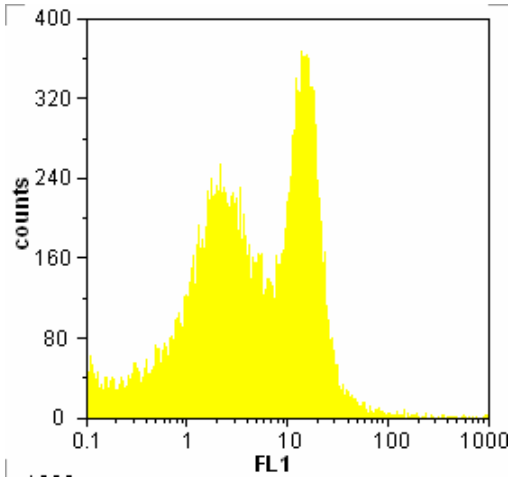
In den nachfolgenden Abbildungen sind die Histogramme der untergärigen Hefe nach 3-stündiger Inkubation dargestellt.

Nach 3 Stunden

DNA-Gehalt



Proteinase



P1: 2,5 P2: 14,9

Abb.Nr. 5.5.3

Nach drei Stunden haben die Hefezellen angeschoben, sie befinden sich überwiegend in der G_2 + Mitose-Phase (88,83%). Nur 6,82 % sind in der G_0/G_1-Phase und 4,36 % befinden sich in der Synthesephase.

Der Proteinasegehalt ist angestiegen. Die zwei Fraktionen der Population deuten an, dass der zweite Peak aus Zellen besteht mit einer hohen Proteinaseaktivität bestehen. Vermutlich sind dies Zellen, die eine hohe Bereitschaft zum proteolytischen Abbau (Autolyse) besitzen.

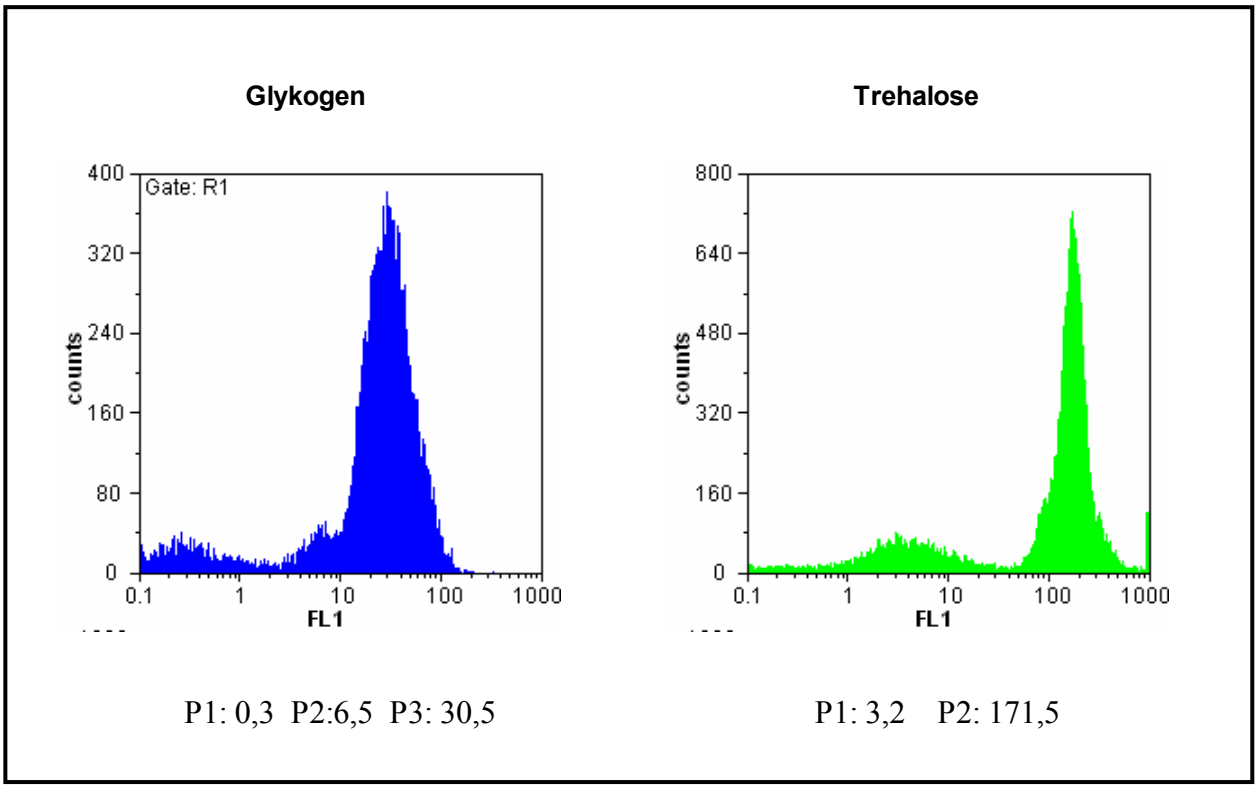


Abb. 5.5.4

In der Anschiebephase wird immer noch Glykogen metabolisiert, daher resultiert die Abnahme des Glykogengehaltes. Aufgrund der hohen Temperaturen ist es zu einer starken Proliferation gekommen. Dies hat bei den ruhenden Hefezellen zu einer Stressreaktion geführt, was am hohen Trehalosegehalt (Peak 2 = 171,5) verdeutlicht wird. Der erste Peak zeigt Zellen mit sehr geringen Trehalosegehalten, dies könnten alte Zellen sein, die keinen Stress mehr empfinden.

Nach 5 Stunden

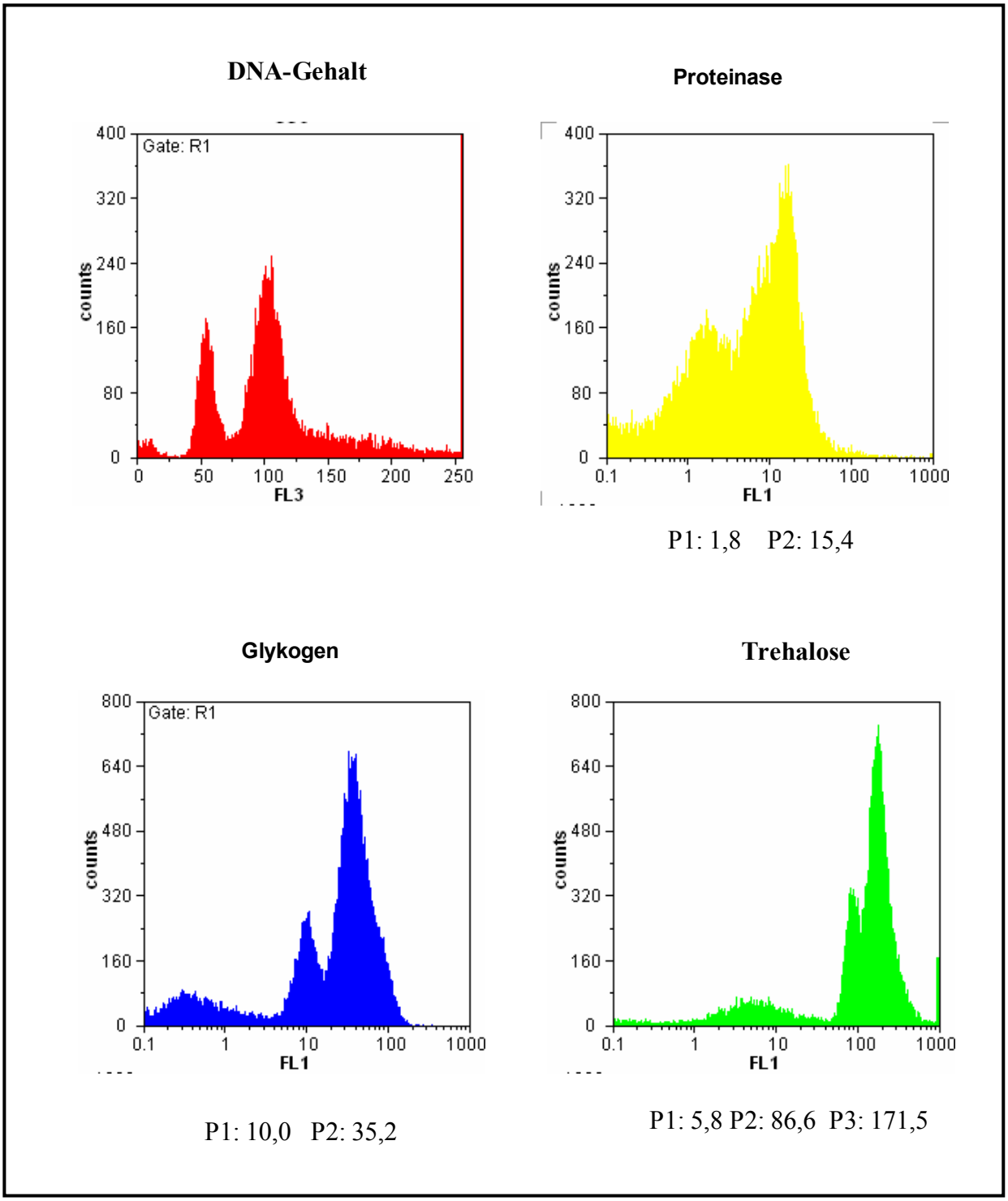


Abb.Nr. 5.5.5

Nach fünf Stunden haben die Hefezellen immer noch eine starke Proliferationsaktivität (55,15 % befinden sich in der G_2 + Mitose-Phase, 29,90% in der G_0/G_1-Phase und 14,95 % in der Synthesephase). Es ist weiterhin eine

starke Proteinaseaktivität zu beobachten, um die toten Zellen zu eliminieren. In der exponentiellen Wachstumsphase wird Glykogen eingebaut. Im Trehalosehistogramm sind drei Fraktionen an Zellen mit unterschiedlichen Trehalosegehalten vertreten. Der erste Peak steht für Zellen, die keinen Stress mehr empfinden. Unter dem zweiten Peak rekrutieren sich Zellen, die dabei sind, sich an die hohen Temperaturen und alle anderen Bedingungen zu „gewöhnen“. Ihr Stressempfinden wird langsam geringer. Hefezellen die sich immer noch in einer starken Stresssituation befinden, werden durch den dritten Peak dargestellt.

Nach 14 Tagen

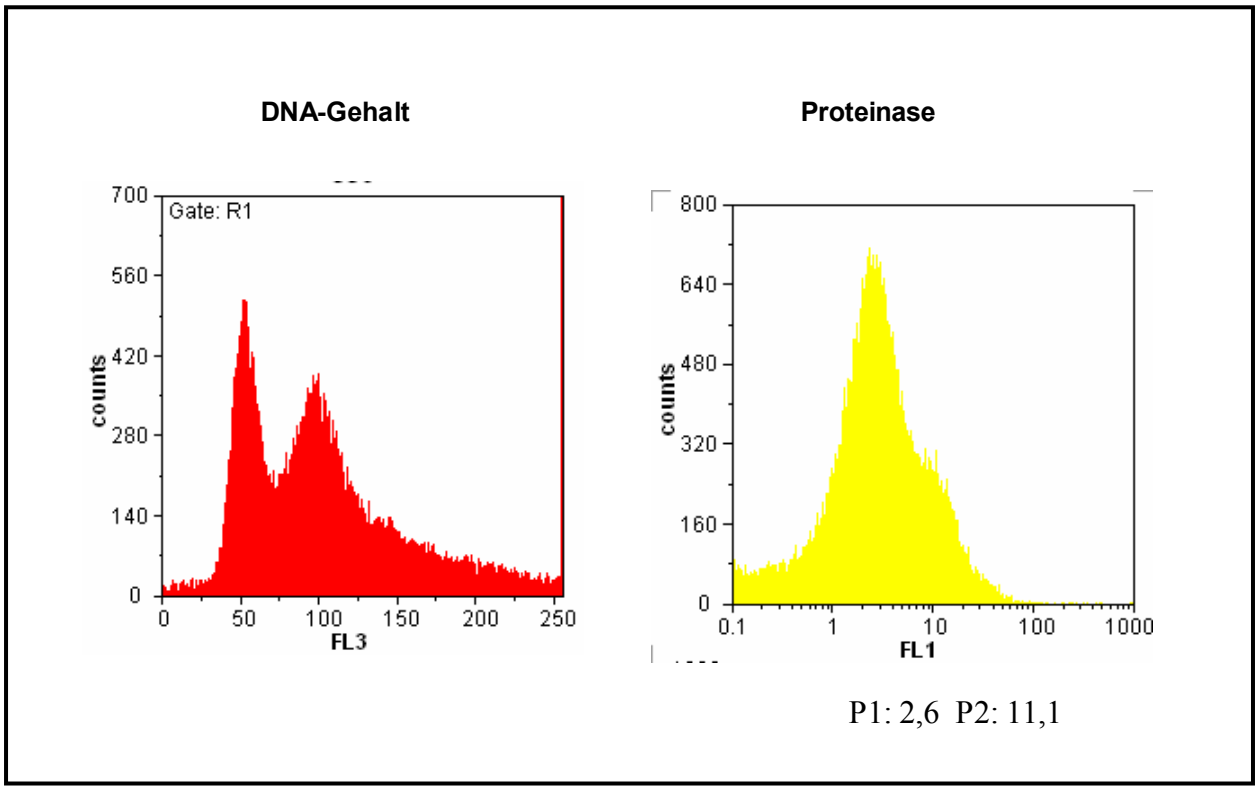


Abb. 5.5.6

Aufgrund der stetigen Sauerstoffzufuhr führen die Hefezellen weiterhin eine Notproliferation durch. Die Schulter im Proteinasepeak zeigt erhöhte Proteinasegehalte, was darauf schließen lässt, dass einige Zellen abgestorben sind.

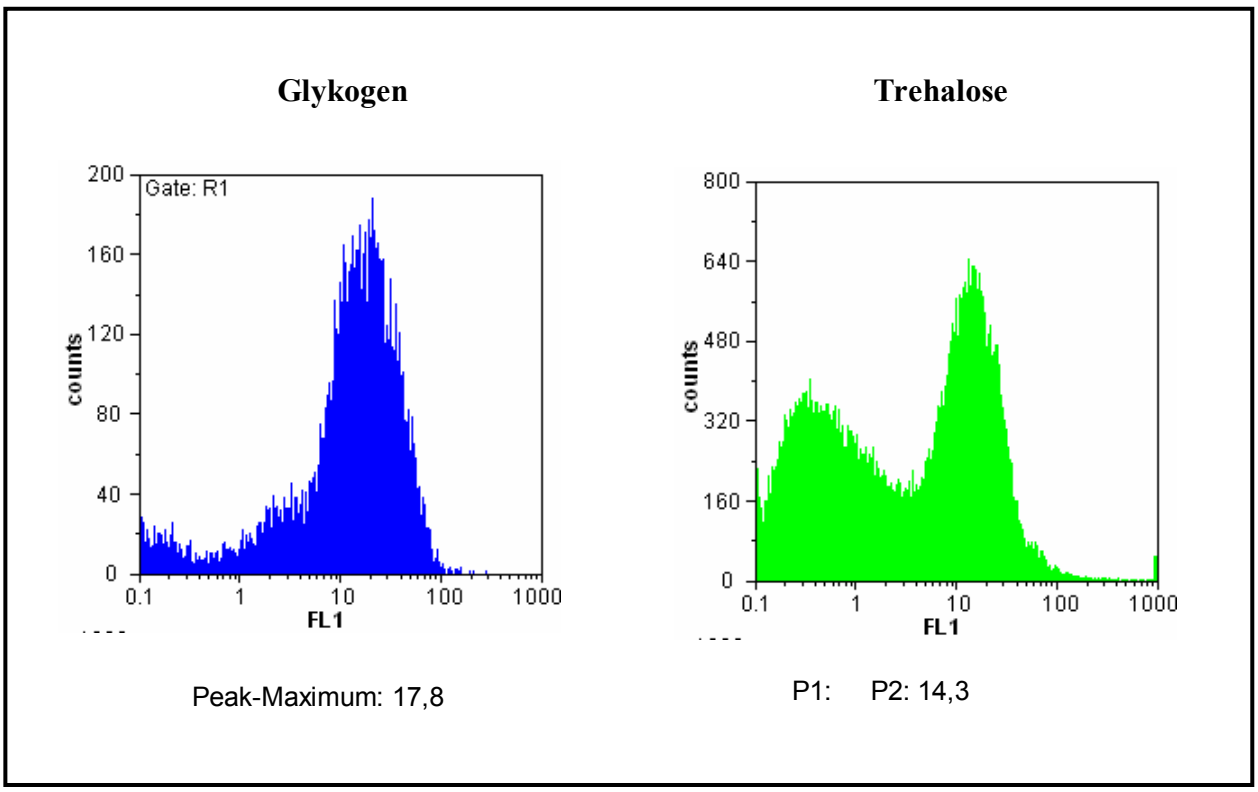


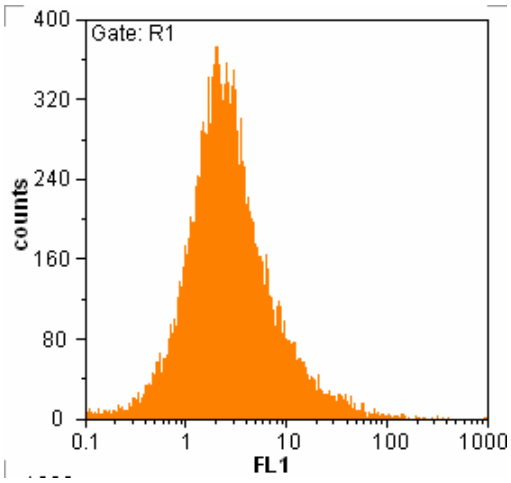
Abb.Nr. 5.5.7

Anhand des Peak-Maximums des Glykogengehalts, erkennt man, dass dieser stark abgenommen hat. Dies liegt daran, dass die Zellen immer noch eine Proliferation durchführen und somit nicht in der Lage sind Glykogen zu bilden, stattdessen wird Glykogen intrazellulär abgebaut. Im Trehalosehistogramm sind zwei Peaks mit relativ geringen Trehalosegehalten zu erkennen. Ebenso wie Glykogen, ist auch Trehalose verstoffwechselt worden. Die Zellen befinden sich nicht mehr in einer Stresssituation.

Sprossnarben

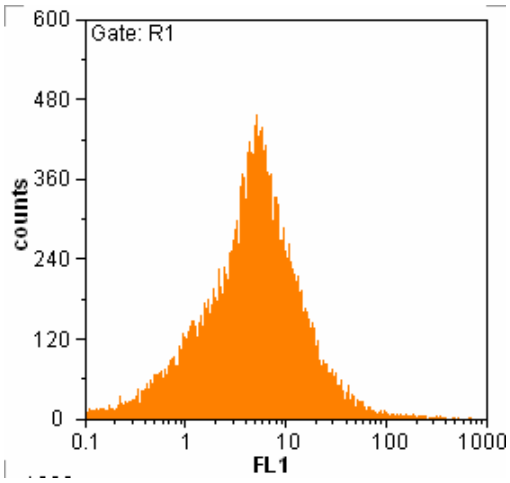
Sprossnarben

Inokulation



Peak-Maximum: 2,1

Nach 3 Stunden



Peak-Maximum: 5,2

Abb.Nr. 5.5.8

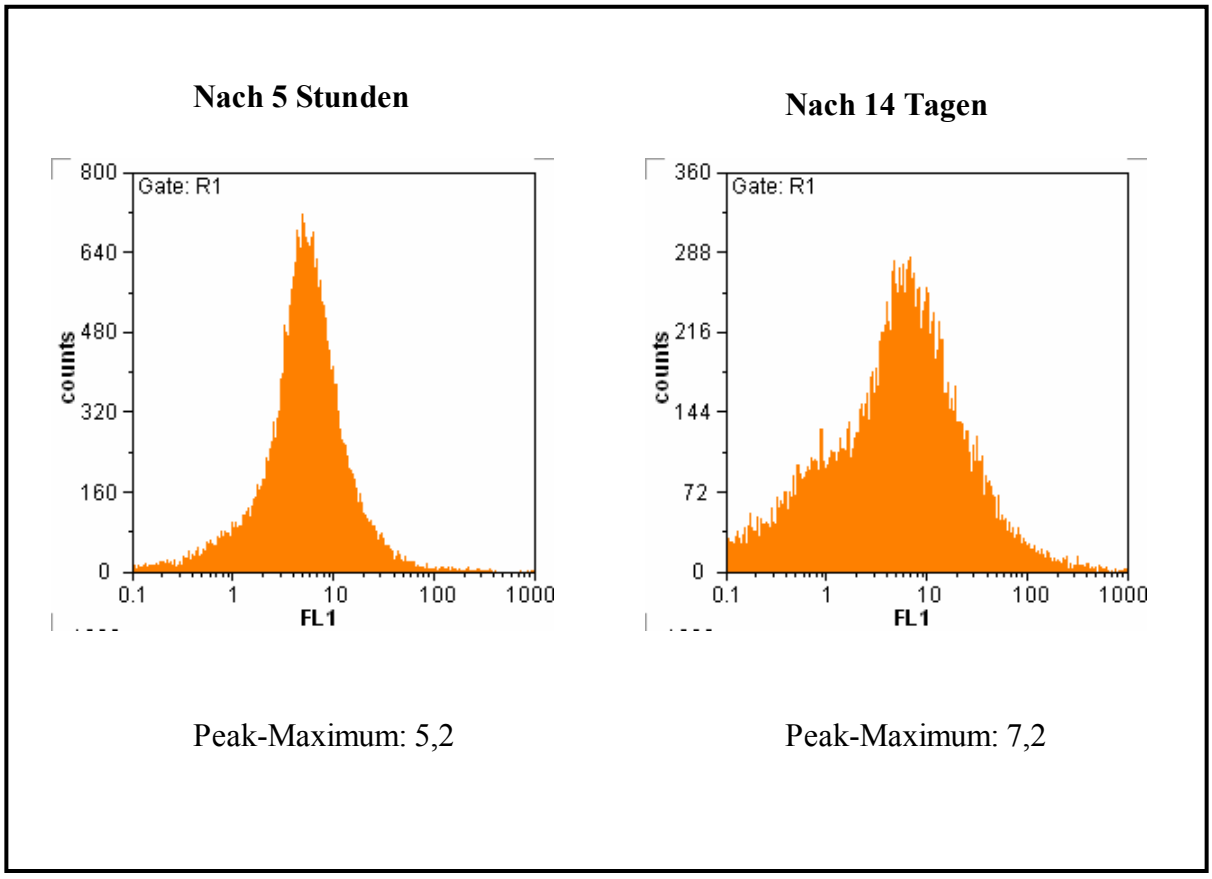


Abb.Nr. 5.5.9

Wie man anhand der Peak-Maxima der Fluoreszenzlichtsignale der Häufigkeitsverteilungen sieht, handelt es sich zu Beginn um eine junge Population. Nach 3 bzw. 5 Stunden hat sich die Fluoreszenzintensität verdoppelt. Nach 14 Tagen hat das Fluoreszenzlichtsignal sein Maximum (7,2) erreicht. Da die Fluoreszenzintensität aber trotzdem nicht stark gestiegen ist, kann man davon ausgehen, dass es sich nach 14 Tagen immer noch um eine vitale Population handelt.

Nachfolgend wird der Verlauf der Proteinaseaktivität der Sprossnarbenbildung gegenübergestellt.

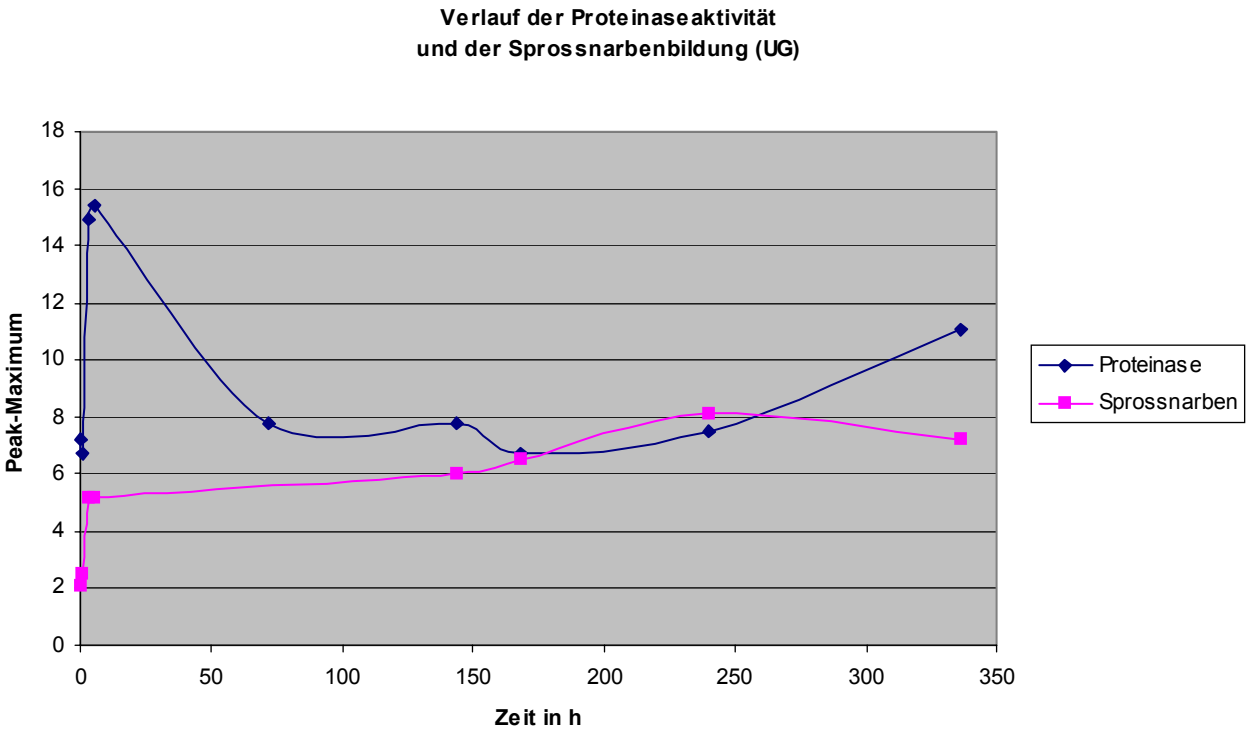


Diagramm Nr. 5.5.1

Wie man in Diagramm erkennt, steigen die Proteinaseaktivität sowie die Sprossnarbenbildung zu Beginn gleichzeitig stark an. Während die Fluoreszenzintensitäten der Sprossnarben im weiteren Verlauf ziemlich konstant bleiben, der Proteinasegehalt sinkt nach 72 Stunden, bleibt im weiteren Verlauf aber auch konstant. Zum Ende steigen beide Kurven wieder leicht an. Dieser relativ simultane Verlauf dieser beiden Kurven, bestätigt die Richtigkeit der Ergebnisse der einzelnen Messungen.

Industrieller Maßstab

Bei dieser Versuchsreihe erfolgte die Probenentnahme alle 24 Stunden. Bei dieser untergärigen Hefe wurden DNA-, Glykogen- und Trehalosegehalte, sowie die Proteinaseaktivität in der Zelle und in der Suspension bestimmt. Daneben wurde die Sprossnarben- und Proteinasebildung gemessen.

DNA-Gehalt

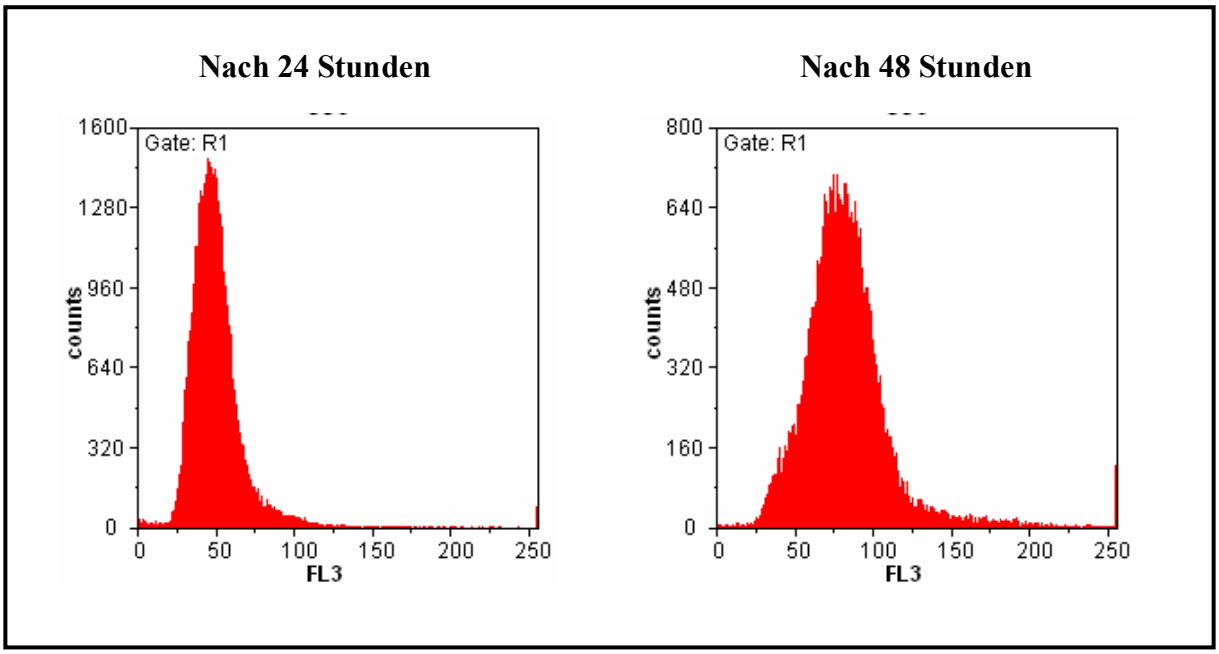


Abb.Nr. 5.5.10

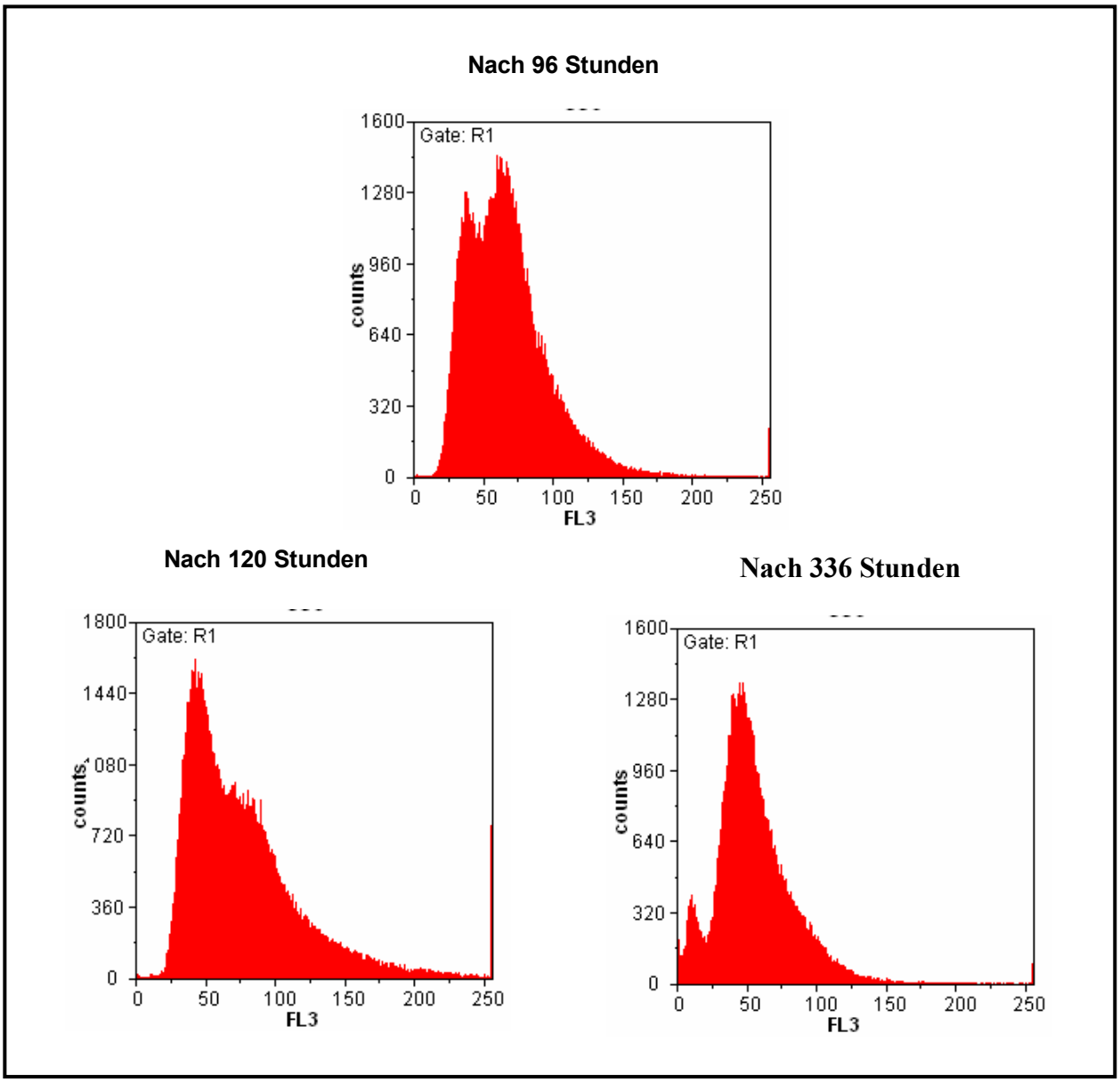
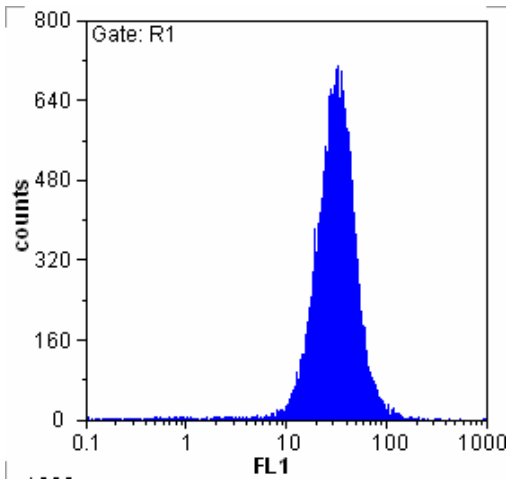


Abb.Nr. 5.5.11

Nach 24 Stunden befinden sich die Hefezellen noch in der G_0/G_1-Phase. Nach 48 Stunden ist der größte Teil der Population in der G_2 + M-Phase. Am vierten Tag ist die Proliferation etwas zurückgegangen. Nach 120 Stunden kehren die Hefezellen wieder in die G_0/G_1-Phase zurück. Nach 14 Tagen befindet sich der Hauptteil der Population in der G_0/G_1-Phase. Der kleine Vorpeak repräsentiert einen Anteil an toter bzw. apoptotischer Zellen.

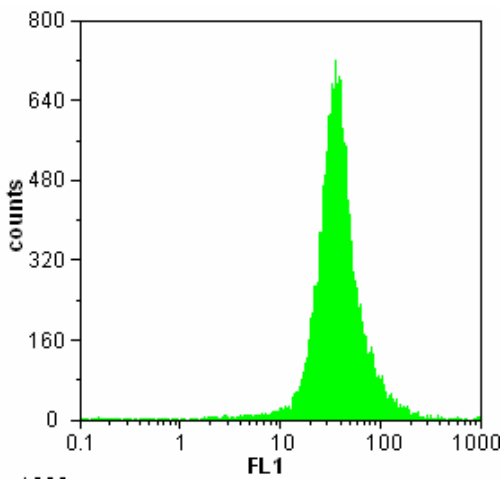
Nach 24 Stunden

Glykogen



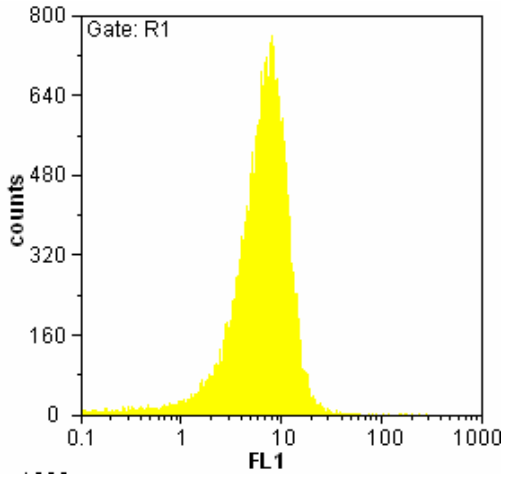
Peak-Maximum: 32,8

Trehalose



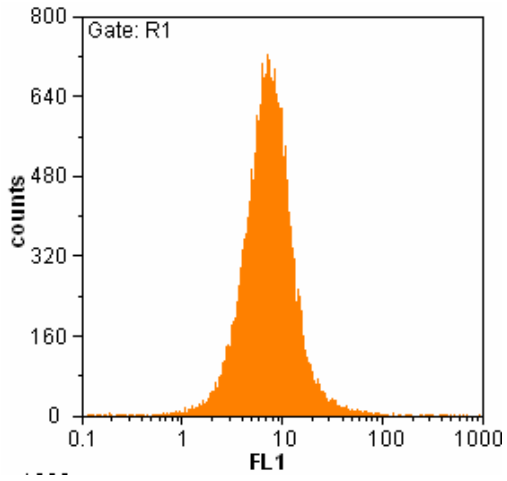
Peak-Maximum: 37,9

Proteinase



Peak-Maximum: 8,1

Sprossnarben



Peak-Maximum: 7,5

Abb.Nr. 5.5.12

Zu Beginn ist der Glykogen- sowie der Trehalosegehalt der Zellen relativ hoch. Nach 24 Stunden ist die Proteinaseaktivität, sowie die Sprossnarbenbildung noch gering.

Nach 48 Stunden

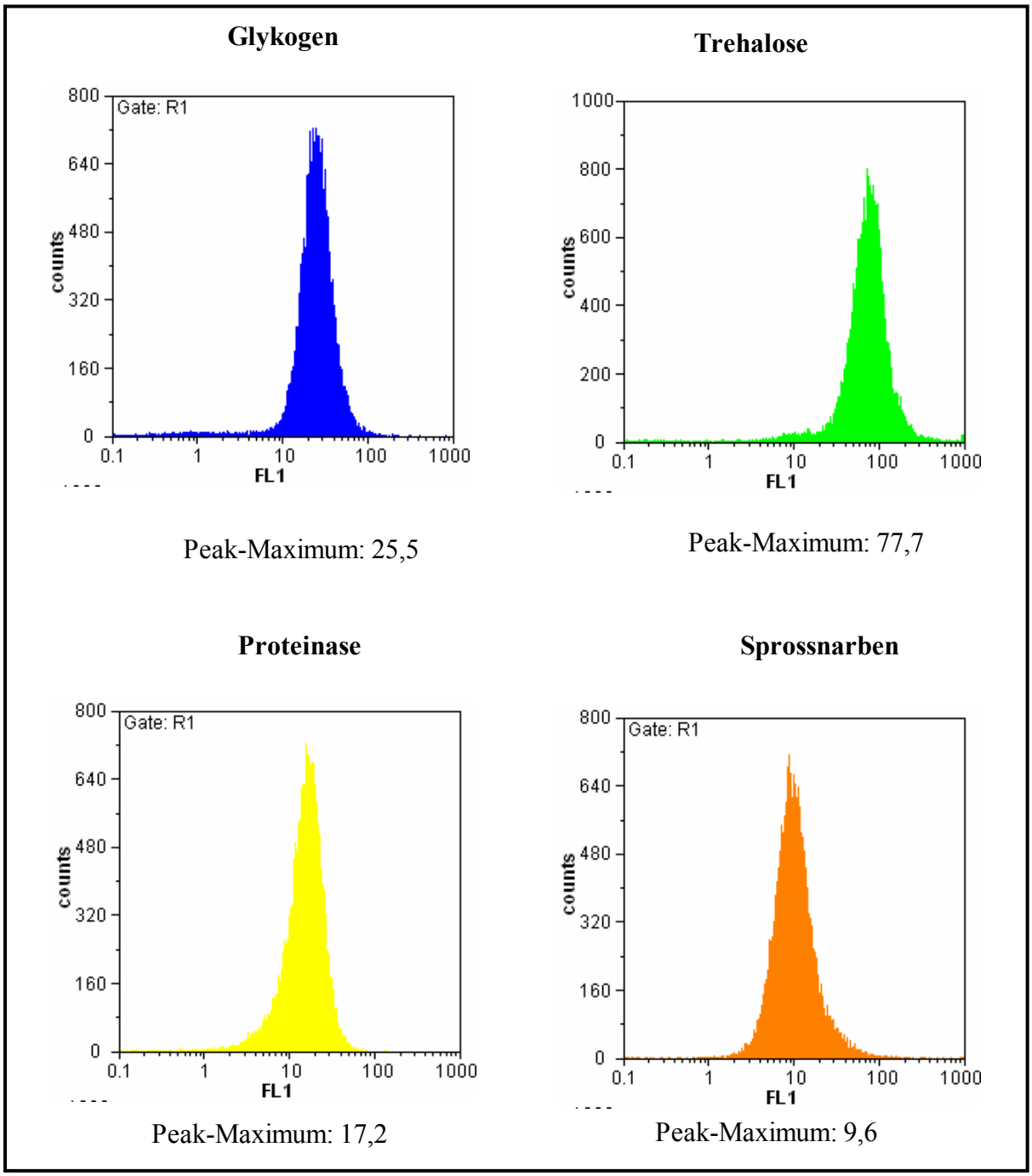


Abb.Nr. 5.5.13

Nach 48 Stunden ist der Glykogengehalt gesunken, was bedeutet, dass Glykogen metabolisiert wurde. Anhand des hohen Trehalosepeaks (Peak-Maximum: 77,7)

erkennt man, dass sich die Zellen in einer Stresssituation befinden. Ebenso ist die Proteinaseaktivität stark gestiegen. Abgestorbene Zellen in der Population werden proteolytisch abgebaut. Die Intensität der Sprossnarbenfärbung ist leicht erhöht, der Anteil an Mehrfachsprosser bzw. toter Zellen ist gestiegen.

Nach 72 Stunden

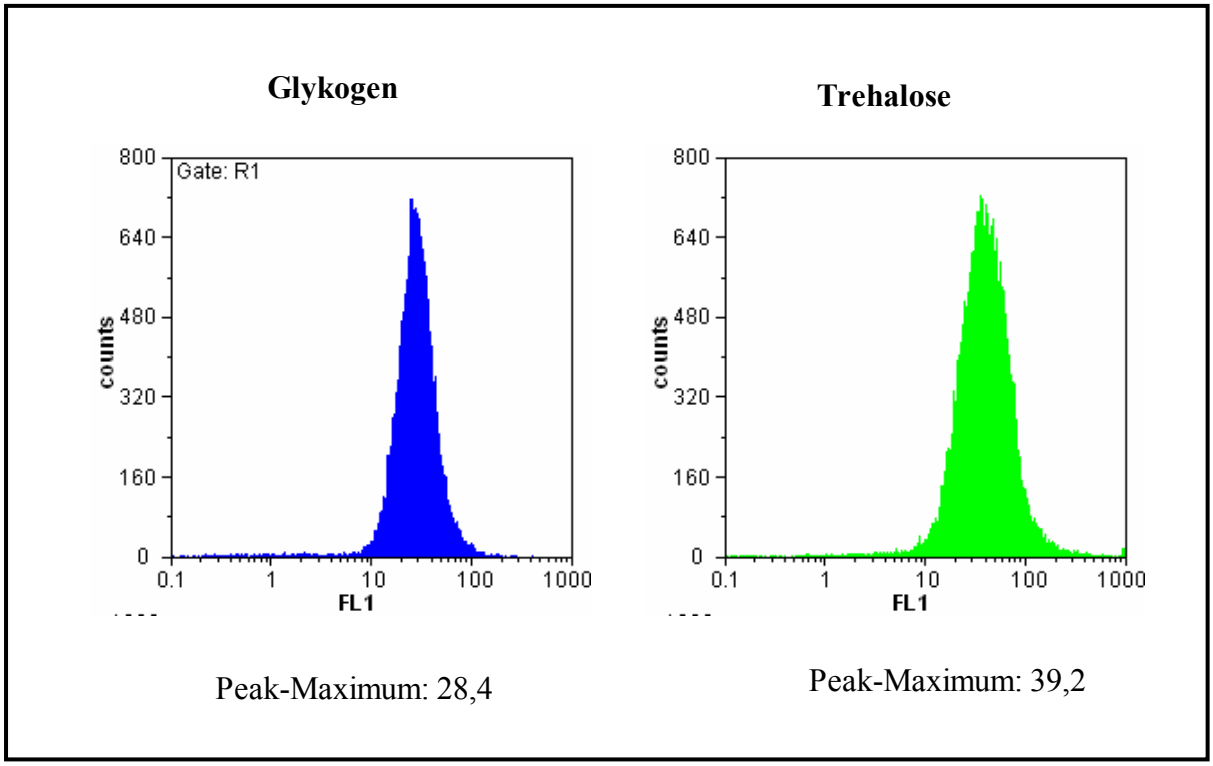


Abb.Nr. 5.5.14

Nach 72 Stunden ist der Glykogengehalt weiterhin gering, die Zellen sind nicht in der Lage Glykogen einzulagern. Die Trehalose wird metabolisiert, deswegen hat der Trehalosegehalt stark abgenommen.

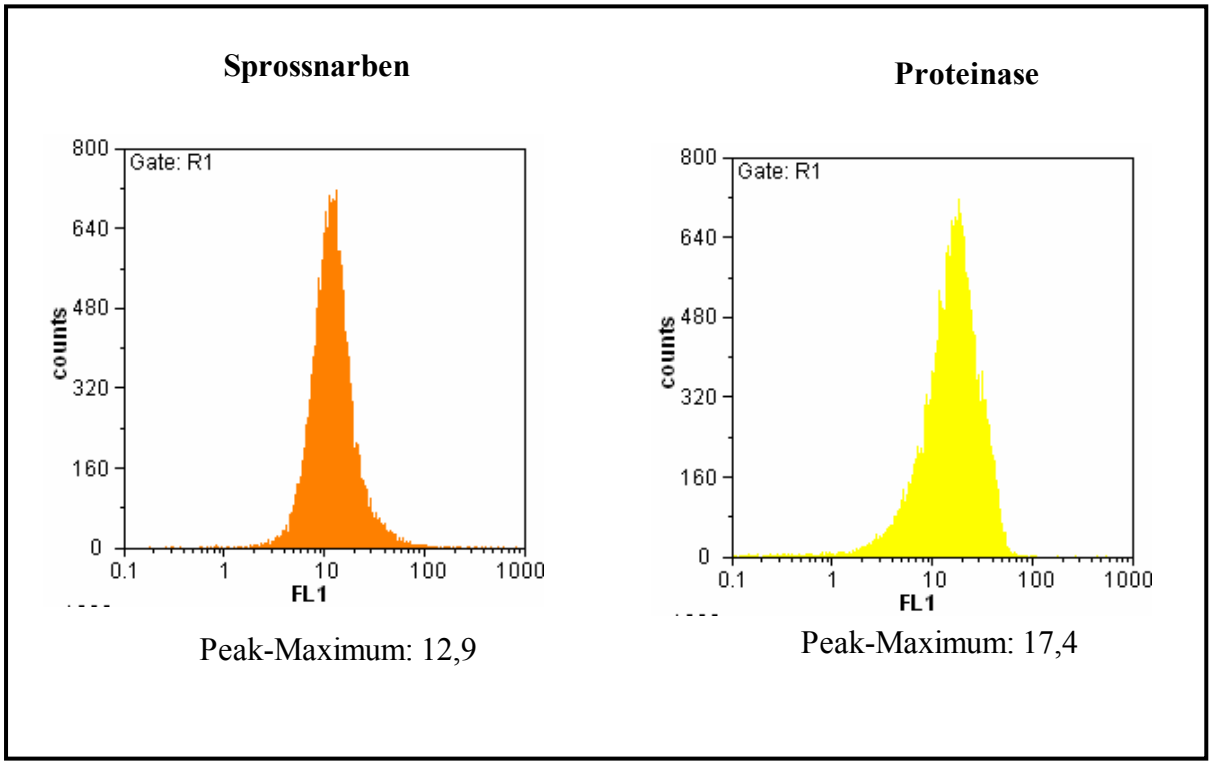
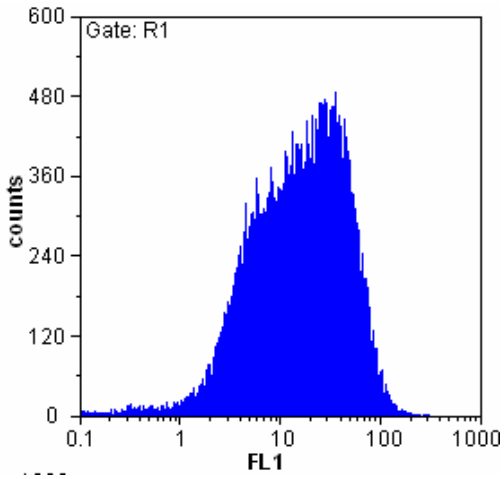


Abb.Nr. 5.5.15

Nach 72 Stunden ist die Fluoreszenz der Sprossnarbenfärbung stark gestiegen. Der Proteinasegehalt ist weiterhin sehr hoch. In der Population sind viele Mehrfachsprosser bzw. tote Zellen enthalten. Die Proteinasen eliminieren diese toten Zellen in der Population.

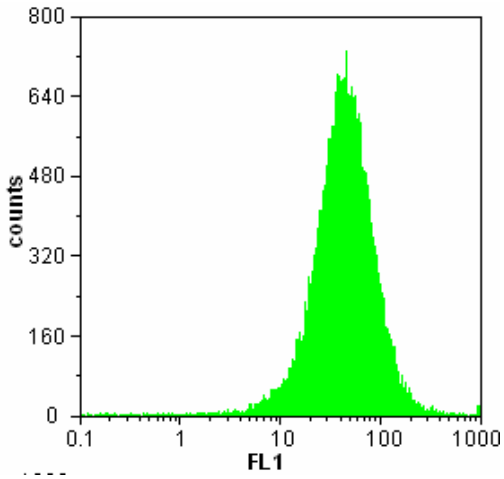
Nach 14 Tagen

Glykogen



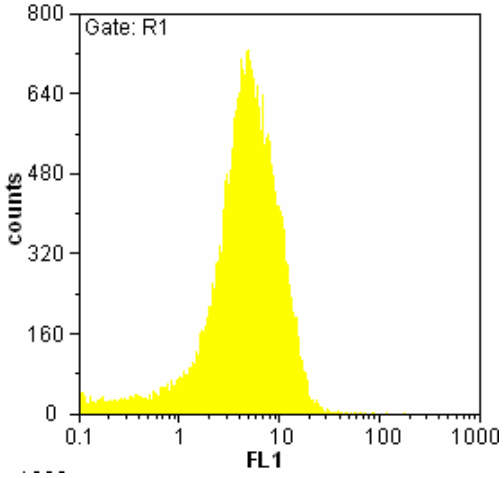
Peak-Maximum: 31,6
Schulter: 6,3

Trehalose



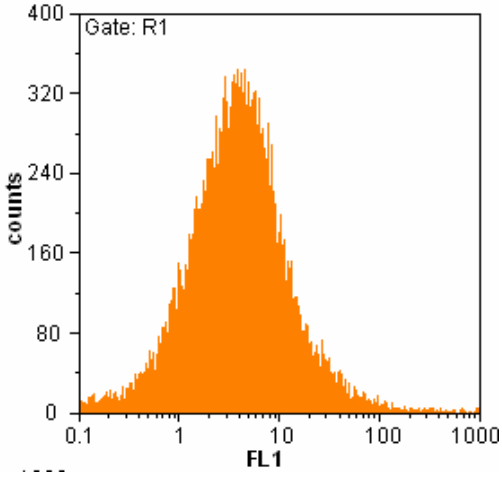
Peak-Maximum: 43,7

Proteinase



Peak-Maximum: 5,6

Sprossnarben



Peak-Maximum: 4,2

Abb.Nr. 5.5.16

Nach 14 Tagen sind Zellen mit geringen Glykogengehalten, was durch die Schulter im Peak symbolisiert wird, und Zellen mit höheren Glykogengehalten (Peak-Maximum: 30,6) enthalten. Die Zellen konnten im weiteren Verlauf

wieder etwas Glykogen einlagern. Der Trehalosegehalt ist im weiteren Verlauf wieder gestiegen. Die Proteinaseaktivität ist ebenfalls wie die Sprossnarbenbildung zurückgegangen. Anscheinend sind die meisten toten Zellen eliminiert worden, so dass die Population überwiegend aus jungen, vitalen Zellen besteht.

Im nachfolgenden Diagramm ist der Verlauf der Proteinaseaktivität sowie der Sprossnarbenbildung dargestellt. Hierbei stellt die x-Achse die Zeit in Stunden und die y-Achse die jeweiligen Peak-Maxima der Fluoreszenzintensität dar.

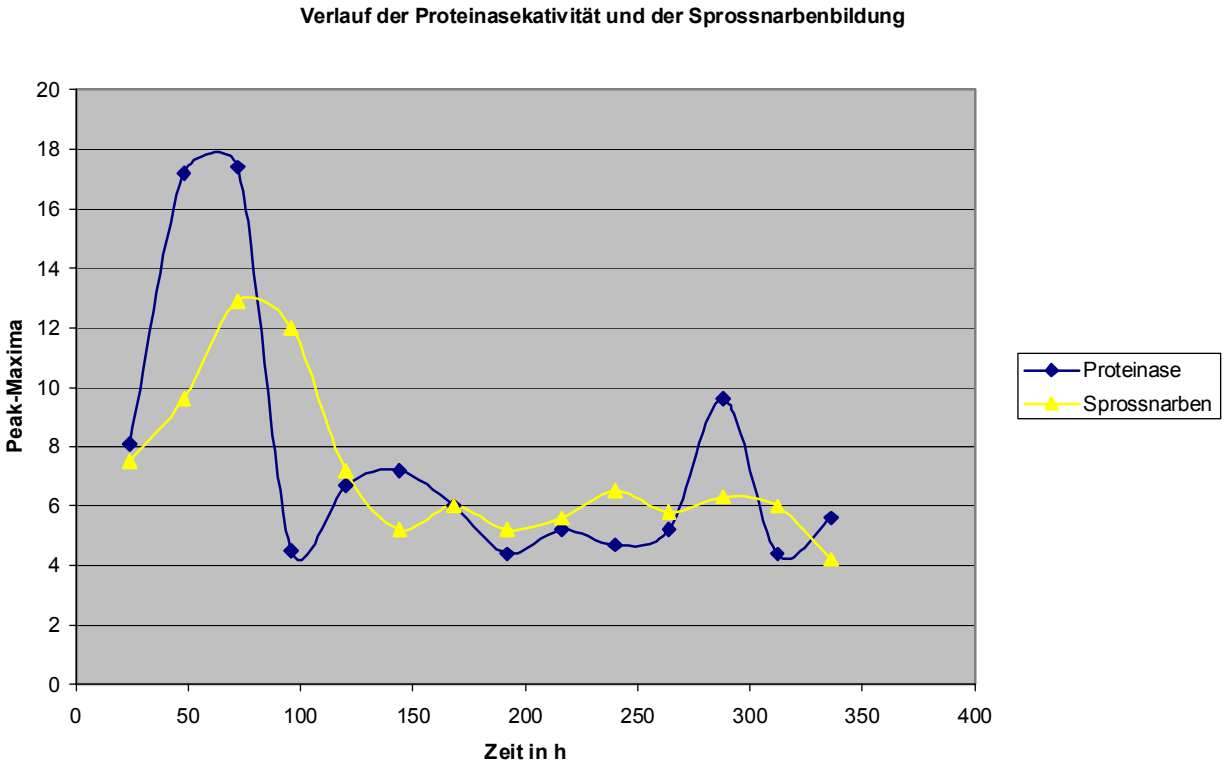


Diagramm Nr. 5.5.2

Wie man in Diagramm 5.5.2 erkennen kann, steigen beide Kurven zu Beginn sprungartig an. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich viele Mehrfachsprosser und abgestorbene Zellen in der Population. Der Proteinasegehalt ist deswegen so hoch, um die toten Zellen zu eliminieren. Nach kurzer Zeit fallen beide Kurven

wieder ab und verlaufen etwa ab dem fünften Tag gleichbleibend niedrig. Die toten Zellen sind überwiegend proteolytisch abgebaut. Zum Ende hin steigt der Proteinasegehalt der Zellen leicht an.

6. Diskussion

Apoptotische Zellen weisen ein typisches mikroskopisches Bild auf. Zum einen kommt es bei apoptotischen Zellen zum sog. "membrane blebbing". Dabei werden in einem frühen Stadium der Apoptose Bläschen von der Zellmembran abgeschnürt, welche in einem späteren Stadium abgeworfen werden. Im Durchlicht wurden die behandelten Zellen auf membrane blebbing untersucht. Die Ausstülpungen konnten bei den meisten Proben bestätigt werden.

Neben den morphologischen Veränderungen kommt es bei Apoptosezellen zu einer Fragmentierung der Kern-DNA, sogenannte "apoptotic bodies", die sich mit den DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen anfärben lassen. Bei den Untersuchungen wurden die DNA-spezifischen Fluorochrome PI, DAPI und H33342 verwendet.

Nach den mikroskopischen Befunden lag bei den mit

- Hitze- und Kälteschock
- UV-Licht
- Wasserstoffperoxid

behandelten Hefepopulationen Apoptose vor. Unter dem Mikroskop waren die bezeichnenden Ausstülpungen der Zellmembran und die typischen Mikrokerne der Kern-DNA zu beobachten. Im Vergleich zu Aufnahmen apoptotischer Säugetierzellen mit den "apoptotischen" Hefezellen, lässt sich zusätzlich schließen, dass es sich auch bei den verwendeten *Saccharomyces uvarum*-Hefen ebenfalls um eine Art der Apoptose handelt.

Bei der Apoptose schneidet eine spezifische Endonuklease die DNA in etwa 180 bis 200 bp lange Stücke. Dieser zusätzliche Nachweis sollte bestätigen, dass es sich bei den untersuchten Hefeproben um Apoptosezellen handelt. Die kurzen DNA-Stücke sollten durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des Enzyms Lyticase wurden Spheroplasten (Zellen ohne Zellwand) hergestellt. Die DNA wurde nach RNA- und Proteindigestion aus der Zelle extrahiert und gereinigt. Die Gelelektrophorese trennt die DNA-Fragmente, aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit, im elektrischen Feld auf. Das Ziel der durchgeführten Gelelektrophorese war, eine sog. DNA-Ladder zu erhalten, wie sie bei apoptotischen Säugetierzellen gefunden wird.
Es entsteht ein leiterähnliches Muster. Jede Sprosse entspricht circa 200 bp bzw. einem vielfachen dieser Fragmentlänge.

Laut Literatur lässt sich die Apoptose nur in ihrem frühen Stadium im Elektrophoresegel in Form einer DNA-Ladder nachweisen. Im späteren Stadium erhält man, wie bei der Nekrose, eine Schmierspur im Gel.

Die elektrophoretische Untersuchung der apoptotischen Hefezellen erwies sich als diffizil. Eine Hauptschwierigkeit bestand darin, überhaupt DNA-Banden im Gel zu detektieren. Dazu wurden verschiedene, auf dem Markt erhältliche DNA-Kits verwendet.

Nach Auswahl eines geeigneten Kits (Yeast DNA-Kit der Firma Peqlab) wurde in einigen Gelen statt der erwartenden DNA-Ladder eine Schmierspur erhalten. Die Ursache dieser Schmierspur könnte sein, dass

1. das kurze Stadium der DNA-Ladderbildung verpasst wurde.
2. das Enzym Lyticase nicht optimal geeignet ist, um Spheroplasten zu bilden

3. Mit höherer Geschwindigkeit zentrifugiert werden muss, damit die niedermolekularen Hefe-DNA-Fragmente sedimentiert werden können.

Laut Literatur gehen die niedermolekularen Fragmente bereits verloren, wenn die Zellsuspension länger als 5 min bei 24-37 °C in PBS-Puffer inkubiert wird. Daher wäre

4. zu prüfen, ob beim Reinigungsprozess der DNA bereits niedermolekulare DNA-Fragmente aus der Zelle diffundieren und verloren gehen.

Zur flußzytometrischen Untersuchung wurden die Zellen mit PI, DAPI, bzw. H 33342 angefärbt.
Bei dem Fluoreszenzfarbstoff PI handelt es sich um einen DNA-spezifischen, interkalierenden Farbstoff. DAPI und Hoechst 33342 lagern sich an AT-reiche Regionen der DNA an.

Bei der Messung apoptotischer Zellen wird ein sog. sub-G_1-Peak erwartet. Dieser liegt direkt vor dem G_1-Peak und kann bei tierischen Zellen gemessen werden kann (Siehe Abb. 3.11)

Zur flußzytometrischen Untersuchung wurden Hefepopulationen eingesetzt, die im mikroskopischen Bild eindeutig "apoptotisch" aussahen. Diese wurden mit den bereits beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt und anschließend mit unterschiedlichen Einstellungen am Flußzytometer gemessen.

Der charakteristische sub-G_1-Peak (siehe Abb. 6.1) der apoptotischen Zellen wurde andeutungsweise mit dem eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff PI detektiert. Allerdings konnte dies nicht in allen Fällen nachgewiesen werden. Eine

mögliche Ursache dafür ist, dass die PI-gefärbten Proben mit einer relativ hohen Verstärkung gemessen werden müssen. Daraus resultiert eine schlechtere Auflösung des Histogramms.

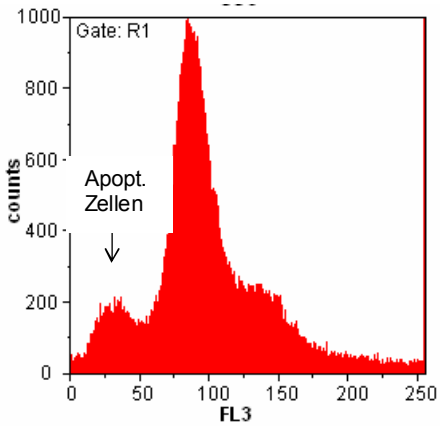


Abb.Nr. 6.1 DNA-Histogramm mit apoptotischen Zellen

Mit der DAPI-Färbung wurden keine Histogramme mit einem sub-G_1-Peak erzielt. Hier gilt das gleiche wie bei der PI-Färbung. Die Apoptoseuntersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* muss daher weiter optimiert werden; um den sub-G_1-Peak reproduzierbar nachzuweisen. Diese Optimierung könnte durch Änderungen am Flußzytometer (z.B. Filterkombination, optische Bank) und durch Modifikation des Färbeverfahrens erzielt werden.

Zu dieser Problematik sind auf jeden Fall weiterführende Untersuchungen durchzuführen.

Die Ergebnisse der Doppelfluorochromierungen DNA-Gehalt / Glykogen erzielten mit beiden DNA-Farbstoffen (PI und DAPI) stets ein anderes Resultat als die Einzelfärbung.

Bei geringen Fluoreszenzlichtausbeuten ist die spektrale Differenzierung nicht mehr sensitiv genug. Durch Modifikation der Messtechnik z.B. durch Änderungen der Filterkombinationen könnte z.B. eine bessere Auflösung der Peaks im Histogramm erreicht werden, bzw. Farbübersprechen gefiltert werden. Optische Einheiten, wie z.B. Filter sind teuer und konnten mit den bewilligten Mitteln nicht gekauft werden.

Zum Anderen kann die Färbetechnik noch verbessert werden. Zum Beispiel könnten andere DNA-Fluorochrome eingesetzt werden, deren Emissionsmaxima in einem entfernteren Bereich der Glykogenfärbung liegt, um eine bessere Differenzierung der Färbungen zu erreichen.

Eine Temperaturerhöhung während exponentiell wachsender Hefepopulation bewirkte eine sofortige Trehaloseakkumulation der Hefezellen, die parallel mit der HPLC- und der fluoreszenzoptischen Analyse nachgewiesen wurde. Die Aussage verschiedener Autoren konnte zumindest in dem Punkt bestätigt werden, dass *Saccharomyces*-Hefen bei Erhöhung der Temperatur auf 40° C einen Anstieg des Trehalosegehaltes innerhalb kürzester Zeit erfahren. Diese physiologische Veränderung einzelner Hefezellen während der kurzzeitigen Erhitzung kann mit der Zellzyklusanalyse nicht direkt erfasst werden. Offensichtlich handelt es sich um einen Schutzmechanismus der Zelle, der dieser Stresssituation durch die Bildung von Proteinen begegnet. In der Literatur werden diese Proteine auch als Heat Shock Proteins (HSP) bezeichnet. Die HSP´s werden durch mehrere Gene aktiviert (Knippers, 1997).

Bei *Escherichia coli* werden 20 verschiedene Proteine synthetisiert, sobald die Wachstumstemperatur auf 45° C erhöht wird. Der starke Anstieg dieser Proteine wird aber sehr schnell wieder reduziert, wenn die Ausgangstemperatur von 30° C wieder erreicht wird. Solche Reaktionen finden nicht nur bei Temperaturerhöhungen, sondern auch bei Erhöhung des pH-Wertes, der Osmolarität, von UV-Strahlen, bei Ethanol-Zunahme und nach Schwermetallintoxikationen statt.

Der Hitzestress bewirkt nicht nur die Bildung von HSP´s, sondern führt auch zu einer Retardierung des Zellzyklusses (Knippers, 1997). In der Zellzyklusanalyse konnte diese Annahme in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden, da die Häufigkeitsverteilungen ein ausgeprägtes, exponentielles Wachstum zeigten. Allerdings ist zu vermuten, dass nach der Mitose, die Zellen zunächst in der G_1-Phase verharren, bis die normale Wachstumstemperatur wieder eingestellt ist. Dies deutet durch die Untersuchungen der Altersstruktur mit Hilfe der Sprossnarben-Fluoreszenz hin. Sprossende Zellen beenden in Stresssituationen ihren Zellzyklus. In der Population liegen danach eine Vielzahl von jungen Hefezellen vor.

Die Stressantwort der Hefezellen auf Temperaturerhöhung bewirkt sicherlich eine Stabilisierung der Membran und eine Akkumulation von Glykogen und Trehalose. Während die Trehalose sofort nach Temperaturreduzierung wieder abgebaut wird, nimmt der Glykogenabbau offensichtlich längere Zeit in Anspruch.

Die vorliegenden Untersuchungen haben deutlich gezeigt, dass die Zellzyklusanalyse alleine nicht ausreicht, um die physiologischen Veränderungen in einzelnen Hefezellen anzuzeigen. Die einzelne Zelle dieser niederen Eukaryonten unterliegen ähnlich den Säugetierzellen einem Schutzmechanismus gegen äußere Einflüsse bzw. Stresssituationen. Da im Brauprozess Situationen wie Temperaturerhöhung oder Kühlung des Bieres gesteuert werden, Veränderungen des pH-Wertes und Zunahme des Ethanolgehaltes aufgrund der Stoffwechselaktivität der Hefe erfolgen, kann dies natürlich zu einer permanenten Stressbelastung für die Hefezellen führen, d.h. da Gärung natürlicherweise Stress für die Hefezellen bedeutet, ist es wichtig beim Hefemanagement eine Minimierung zusätzlicher Stressbelastung zu erzielen oder die Stressbelastung so zu gestalten, dass eine Reproduzierbarkeit der Stressbelastung herrscht, um immer gleiche Bedingungen für eine erneute Führung zu gewährleisten. Sicherlich spielt hier die Altersstruktur eine wesentliche Rolle. Spekulativ werden junge, dynamische Zellen mit flexiblen Membranen sicherlich Stresssituationen ohne Beeinträchtigungen überstehen, während ältere Hefezellen mit starren Zellmembranen und geringerer Proliferationsaktivität eventuell keinen weiteren Zellzyklus starten, statt dessen die Apoptose bzw. den Zelltod durchführen.

Es gibt einige wichtige intrazelluläre Parameter, die auf das Wachstum und die Physiologie der Hefen großen Einfluss nehmen. Dazu zählt der DNA-Gehalt der Hefezellen. Durch die Zellzyklusanalysen konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die ZKG-Vergärung transparent zu machen ist. Zu jedem Zeitpunkt des Prozessablaufes stehen dem Produktionsleiter Informationen über die aktuelle Wachstumsphase zur Verfügung. Die Herführung, die Zeuggabe und das Drauflassen wurden bisher empirisch durchgeführt. Das hatte zur Folge, dass die Gärung einmal besser und einmal schlechter verlief. Die flußzytometrischen Untersuchungen der Vergangenheit haben aber auch gezeigt, dass der Zellzyklus nicht alleine ausreicht, um die Gärstörungen zu beschreiben. Hier gaben die physiologischen Parameter, wie Glykogen-, Trehalose-, Neutrallipid- oder 3ß-Hydroxysterolgehalt von Hefezellen aufschlussreiche Informationen.

Die bisher üblichen in den Betriebskontrollen verwendeten konventiellen Methoden sind alle indirekt und man versuchte daraus Rückschlüsse auf den Zustand der Hefe während des Brauprozesses zu schließen. Zu diesen indirekten Methoden gehören z. B. die pH-Messung, Bestimmung des Diacetylgehaltes, Zunahme des CO_2- und Alkohohlgehaltes, Veränderungen des Extraktgehaltes oder Temperaturmessungen. Diese Methoden sind jedoch alle unzulänglich, da sie keine Aussagen über den zellphysiologischen Zustand der Hefe liefern.
Zustandsermittlungen der einzelnen Zelle können nur mit fluoreszenzoptischen Analysenmethoden geliefert werden. Dazu gehört neben der Mikroskopie die Flußzytometrie, welche den Vorteil besitzt, dass hohe Anzahlen von Zellen innerhalb von Sekunden analysiert werden können. Daneben können mit der Flußzytometrie eine Vielzahl von Parameter analysiert werden, die eine direkte Aussage über den Zustand der Hefe zulassen Da mit Hilfe der Flußzytometrie die Gärung direkt überwacht wird, kann man direkt in den Prozess eingreifen und auf mögliche Probleme reagieren. Wie z. B. durch Würzegabe,

Drauflassrythmus, Belüftung oder Herausnahme der Hefe, ist es möglich direkt Einfluss auf den Zustand der Brauhefe zu nehmen. Im Hinblick auf zukunftsorientierte Technologien, wie z. B. die Immobilisierung von Hefe, ist das Wachstum der Hefe und ihr zellphysiologischer Zustand von noch größerer Bedeutung. Deshalb ist es wichtig, direkte Kenntnisse über die einzelne Hefezelle während der Gärung zu erhalten.

Eine wichtige Rolle bei der Prozessüberwachung spielt die Altersstruktur der Hefe, denn nur eine vitale Population mit einer positiven Altersstruktur garantiert einen störungsfreien Ablauf der Gärung. Hinsichtlich des Begriffes der Alterung bei Organ- und Gewebezellen höherer Eukaryonten findet sich folgende Definition für das Altern: „ Bei der Alterung treten psychische und physische Veränderungsprozesse der Rückbildungsphase ein.“ Berücksichtigt man nur die physischen Veränderungen, so treten Folgen wie die Erschlaffung der Haut, Abnahme der Leistungsfähigkeit aller Organe und Organsysteme, reduzierte Regenerationsfähigkeit usw. auf. Bei niederen Eukaryonten, wie den Bierhefen, gibt es ähnliche Veränderungen auf der Zelloberfläche (Smart, 1999). Es ist ferner bekannt, dass die Leistungsfähigkeit älterer, häufig gesprosster Hefezellen bezüglich ihrer Proliferation und Gäraktivität sehr eingeschränkt ist. Mit dem Lektin WGA-FITC haben wir einen Farbstoff gefunden, mit dem sich leicht und schnell die Sprossnarben einer Hefezelle anfärben und flusszytometrisch analysieren lassen.

Das Altern bei Hefen, die sich von Geburt an vegetativ im Gärprozess vermehren, wird durch eine Erhöhung der Sprossnarbenzahl auf der Zelloberfläche sichtbar, ist ein Schritt in der Evolution der Bierhefen, der nächste Schritt wäre der Zelltod.

Über die physiologischen Parameter kann man ablesen, ob eine Population zu einer erneuten Führung verwendet werden kann. Ein extrem niedriger Glykogen- und Trehalosegehalt dokumentiert, dass die Hefepopulation der

Stresssituation einer neuen Führung nicht mehr ausgesetzt werden kann, ohne das es zu erheblichen Gärstörungen kommt.

Die Proteolyse hat eine vielschichtige Bedeutung bezüglich der intrazellulären Makromoleküle und ihren verschiedenen Funktionen. Die Proteinase zeichnet verantwortlich für den Proteinabbau und wird im Brauerjargon oft als Synonym für Autolyseprozesse verwendet. Die Proteinase der *Saccharomyces*-Hefen ist in den Vakuolen lokalisiert.
Proteinase ist ein physiologischer Parameter, der Aussagen über den Zelltod machen könnte. Aus der Literatur weiß man, dass proteolytische Enzyme an der Autolyse beteiligt sind (Rondueles and Wolf, 1988). Bisher hatte man dem Begriff der Autolyse und auch dem Zustand wenig Bedeutung beigemessen. Der Praktiker wusste wohl aus Erfahrung, dass ein hoher Prozentsatz an autolysierenden Zellen zu einem unangenehmen Geschmack führt, so dass solche Biere hinsichtlich ihrer Qualität als mindere Biere eingestuft werden. Ferner war ein Anstieg des Proteinasegehaltes im Bier mit einer Schauminstabilität korreliert. Dies bedeutete gleichfalls eine schlechte Bierqualität.

Mit Hilfe der fluoreszenzoptischen Proteinaseaktivitätsbestimmung kann jetzt intrazellulär ein erhöhter Proteinasegehalt nachgewiesen werden. Offensichtlich stellt die Zelle ein höheres Potential von diesem Enzym bereit, um die Denaturierung der Proteine durchführen zu können.
Für den Praktiker wäre dies ein Signal technologisch zu reagieren. Die offensichtlich erschöpfte Hefe müsste aus dem Tank genommen werden, um Autolysegeschmack und Schauminstabilität beim filtrierten und abgefüllten Bier zu vermeiden.

7 Literaturverzeichnis

[1] Annemüller, G.: Probleme der Hefetechnologie bei der Gärung und Reifung von Bier in zylindrokonischen Gärtanks, Lebensmittelindustrie 28, 2, 549-555 (1981)

[2] Litzenburger, K.: Erfahrungen aus der Betriebsberatung, Brauwelt 133, 16, 659-668 (1993)

[3] Narziß, L.: Abriß der Bierbrauerei, 5. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart (1980)

[4] Hutter, K.-J., Bissinger, C., Neidlinger, S., Lindemann, B., Klinkler, H.: Biomonitoring der Betriebshefen in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren.
V. Mitt.: Nachweis von Kontaminationen, Brauwiss. 49, 11/12, 320-324 (1996)

[5] Hutter, K.-J.: Die DNS- und Proteinsynthese von *Saccharomyces cerevisiae* in unterschiedlichen Wachstumsphasen, Brauwiss. 31, 71-74 (1978)

[6] Hutter, K.-J.: Anwendungsmöglichkeiten der Durchflußzytometrie für brauereibiologische Fragestellungen, I. Meßmethodik, Brauwiss. 31, 250-253 (1978)

[7] Hutter, K.-J., Lindemann, B., Hafner, M.: Biomonitoring der Betriebshefen in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren. II. Mitt.: Transparenz der ZKG-Gärung, Brauwiss. 49, 3/4, 104-110 (1996)

[8] Hutter, K.-J.: Biomonitoring der Betriebshefen, Brauwelt 136, 40/41, 1902-1908 (1996)

[9] Hutter, K.-J., Müller S: Prozeßoptimierung von Reinzucht- und Anstellverfahren mittels Flußzytometrie in sächsischen Brauereien, Brauwiss. 52, 3/4, 40-48 (1999)

[10] Hutter, K.-J.: Schnellbestimmungen zur Tot-Lebend-Analyse von Hefezellen In: Brauwelt, Nr. 7/8(1992)

[11] Rotman, B., Papermaster, B.W.: Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters, Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A. 55, 134-141(1966)

[12] Gharton, G., Olsson, I., Dahlqvist, A.: Determination of the glycogen content in single neutrophil leucocytes using micromodel of leucocytes glycogen, J. Histochem. Cytochem. 23, 1, 59-64 (1975)

[13] Mayer, D., Stöhr, M., Lange, L.: Quantitative Analysen von DNA, RNA, Protein und Glykogen in isolierten Rattenhepatocyten nach Auftrennung in Metizamid-Dichtgradienten, Cytobiologie 15, 321-334 (1977)

[14] S. Müller und K.-J. Hutter, Prozessoptimierung von Reinzucht- und Anstellverfahren mittels Flußzytometrie in sächsischen Brauereien, Monatsschrift für Brauwissenschaft Heft 3/4, 1999, S. 40-48

[15] Linz, F.: Untersuchungen von Fermentationsproben mit einem Laser-Durchflußzytometer Diplomarbeit, Universität Hannover (1987)

[16] Linz, F. : Durchflußzytometrie zur Prozeßbeobachtung in der Biotechnologie
Dissertation, Universität Hannover, Fak. Chem.(1989)

[17] Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F.: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, Cytometry 13, 795-808 (1992)

[18] Darzynkiewicz, Z., Xun Li: Analysis of cell death by flow cytometry (Zeitschrift unbekannt)

[19] Hutter, K.-J.: Zellkinetische Analysen an Hefen und Bakterien mit Hilfe der Flußzytometrie, Monatsschrift für Brauwissenschaft 46, Heft 12, 444-450 (1993)

[20] Dittrich, W., Göhde, W.: Impulscytophotometrie bei Einzelzellen in Suspensionen, Z. Naturforschung 24, 360-361. (1969)

[21] Amshoff, C.: Wenn Zellen sterben, Bioforum, Heft 9/99,544-547, GIT Verlag

[22] Hafner: Biotechnologisches Seminar (1998)

[23] Hafner: Biotechnologisches Seminar (1999)

[24] DKFZ: Broschüre

[25] Alberts et al.: Molekularbiologie der Zelle, VCH, (1995)

[26] Hoffmann, Thomas: Der programmierte Zelltod, Spektrum Akademischer Verlag

[27] Mau, H., Fellenberg, J., Nedel, S.: Internet, ok-forschung.uni-hd.de

[27] Fritzsching, B.: Der programmierte Zelltod, Studies (1998)

[28] Goffeau A.,Barrell B., Bussey H.: Life with 6000 Genes (1996)

[29] Remor, M.: Hefemanagement – Zellphysiologische Kontrolle der Betriebshefen mit flußzytometrischen Analysen, Diplomarbeit, FHT Mannheim

[30] Rose, Harrision: Industrielle Mikrobiologie (1969)

[31] Handbook Molecular Probes (1998)

[32] Darzynkiewicz et.al.:Features of Apoptotic Cells measured by flow cytometry, Cytometrie 13,795-808. 1992

[33] Alberts et al.: Molekularbiologie der Zelle, VCH, (1999)

[34] Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis, Springer (1998)

[35] Sambrook et al., (1989)

[36] Knippers: Molekulare Zellbiologie (1985)

[37] Attfield, Trehalose accumulates in *S. cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response, FEBS Lett. 225, 1, 2, 259 – 263 (1987)

[38] Hottiger, T. et al. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in S. cerevisiae cells subjected to temperatur shifts, FEBS Lett. 220, 1, 113 – 115 (1987)

[39] K.-J. Hutter M. Herber, B. Lindemann, Biomonitoring der Betriebshefen in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren, Monatsschrift für Brauwissenschaft, Heft 5/6, 1995, S. 184-190

[40] Stephan E. Brey, James H. Bryce, Vincent J. Higgins, Peter J. Rogers, Graham G. Stewart, Heriot-Watt University, Expression, activation and secretion of yeast proteases – minimizing their impact on beer foam and stability

[41] Pas Suarez Rendueles und Dieter H. Wolf, Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a cenral mechanism of post-translational control in the eukaryote cell, FEMS Microbiology Reviews 54, 1988

[42] Kuhmann, B., Untersuchungen über die physiologischen Veränderungen der Hefe während der Bierherstellung unter besonderer Berücksichtigung der Hefeproteolyse, Diplomarbeit 2003, Fachhochschule Mannheim

[42] K.-J. Hutter, Flußzytometrische Analysen zur Gärfähigkeit verschiedener Hefen, Brauwelt Nr. 44/45, 1993, S.2246-2253