

K. Rassmann und S. Leibhard

Hochauflösende Klassifizierung von Hefestämmen mit genetischen Methoden

Mikrosatelliten-Typisierung von *Saccharomyces cerevisiae* und *carlsbergensis* Stämmen

Durch eine neuartige molekularbiologische Analyse variabler Genorte im Genom, die sogenannte Mikrosatelliten-Typisierung, können erstmals Brauerei-Kulturstämme schnell und zuverlässig genotypisch identifiziert werden. Dies kann von entscheidender Bedeutung bei der primären Auswahl eines bestimmten Stammes sein, aber auch als Kontrollinstrument bei der Kultivierung, der Reisolierung von Reinkulturen oder der Pflege von Stammsammlungen dienen.

BC 02 Mikrobiologie

(Descriptor: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, genetische Klassifizierung, Mikrosatelliten, RAPD PCR, Inter-LINE PCR).

Descriptors: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, genetic classification, micro-satellite, RAPD PCR, inter-line PCR).

1 Einführung

Die zuverlässige Identifizierung von Hefearten und -stämmen ist nicht nur eine Grundvoraussetzung für ihre taxonomische Klassifizierung, sie spielt auch in verschiedenen Bereichen der angewandten Biotechnologie, wie z.B. dem Brauereiwesen, eine große Rolle. Die Qualität des Bieres wird maßgeblich geprägt durch die gezielte Auswahl eines bestimmten Hefestammes, der z. B. durch die Gärdauer und die Bildung von charakteristischen Gärungsnebenprodukten den Biercharakter entscheidend beeinflusst.

Bisher wird zur Klassifizierung der einzelnen Hefestämme eine Reihe an Merkmalen herangezogen, wie zum Beispiel die Morphologie der Zellen, ihre sexuellen und vegetativen Reproduktionsformen, vor allem aber ihre stoffwechselphysiologischen Eigenschaften (z.B. die Vergärungsrate bestimmter Zucker, Bestimmung der Diacetylabbaurate). Diese mit den klassischen, mikroskopischen oder physiologischen Methoden aufzeigbaren Eigenschaften basieren allerdings auf der Beschaffenheit nur einiger weniger genetischer Marker. Tatsächlich bleiben daher in der klassischen Analyse viele genetische Unterschiede zwischen den Stämmen verborgen. Dies kann zu Verwechslungen von Stammkulturen führen, die sich zwar anhand physiologischer Tests nicht unterscheiden lassen, deren genetische Identität jedoch verschie-

den ist. Berücksichtigt man außerdem, daß stoffwechselphysiologische Klassifikationsverfahren nicht immer eindeutig und oft sehr arbeits- bzw. zeitintensiv sind, was die kontinuierliche und routinemäßige Überprüfung von Stammkulturen erschwert, dann zeichnet sich deutlich der Bedarf nach einem neuen, verfeinerten Verfahren zur Identifizierung von Hefestämmen ab.

Dieses Verfahren sollte idealerweise folgende Kriterien erfüllen:

- Es entdeckt genetische Variabilität in verschiedenen Bereichen des Hefegenoms, nicht nur in den Genorten der bekannten phänotypischen Merkmale.
- Es ist hochauflösend, das heißt also, es können auch nah verwandte Stämme unterschieden werden.
- Es läßt sich schnell und problemlos durchführen.
- Die Ergebnisse sind standardisierbar und reproduzierbar, das heißt sie können computergestützt erfaßt und zwischen verschiedenen Labors verglichen werden.

Ein relativ neues, molekularbiologisches Verfahren, das potentiell diesen Anforderungen genügen kann, ist das 1989 entwickelte „Mikrosatelliten-Fingerprinting“, auch „Mikrosatelliten-Typisierung“ genannt (1, 2, 3). Wir haben diese zunächst für das Säuger-genom entwickelte Methode für Hefen adaptiert und können zeigen, daß sie alle obengenannten Kriterien erfüllt.

2 Die Methode der Mikrosatelliten-Typisierung

Mikrosatelliten sind Genorte, die sich anhand ihrer sehr einfach aufgebauten DNS Sequenz erkennen lassen. Sie bestehen aus einem kurzen DNS Motiv (also einer kurzen Abfolge an Nukleotiden, z.B. Guanin-Adenin [= GA] oder Cytosin-Thymin-Guanin [= CTG]), welches bis zu hundertmal hintereinander wiederholt sein kann. Solche Mikrosatelliten-Genorte unterliegen einer hohen Mutationsrate. Dabei handelt es sich allerdings nicht um sogenannte Punktmutationen, also den Austausch einzelner Nukleotide. Stattdessen gehen hier ganze Wiederholungseinheiten verloren oder werden hinzugewonnen. Der Mikrosatellit besteht also auf einmal statt aus z.B. 15 Wiederholungen aus 11 oder aus 17 Einheiten, er wird einfach kürzer oder länger.

Solche Längenveränderungen im Genom können mit unseren heutigen molekularbiologischen Techniken schnell und reproduzierbar erfaßt werden. Mit Hilfe der PCR Technologie (z.B. 4) lassen sich Mikrosatelliten-Genorte gezielt aus dem gesamten Genom herausholen und vermehren. Trägt man das PCR-Produkt, also das vermehrte DNS-Fragment mit dem Mikrosatelliten, anschließend auf ein hochauflösendes Polyacrylamid-Gel auf, so läßt sich die Länge des Fragments auf das Basenpaar genau bestimmen. Untersucht man nun den selben Mikrosatelliten-Genort bei verschiedenen Individuen oder Stämmen, so findet man oft Längenunterschiede der PCR-Fragmente, je nachdem wieviele Kopien an Mikrosatelliten-Wiederholungseinheiten sie enthalten.

Bei Wirbeltieren finden sich über das ganze Genom verteilt viele Kopien des gleichen Mikrosatelliten Typs (im Fall von Dinukleotid-Motiven wie z.B. CA an die 10^5 Kopien). Um ein funktionierendes Mikrosatelliten-Fingerprinting-System für eine neue Art zu entwickeln, müssen diese Genorte (oder Loci) aber erst gefunden und charakterisiert werden. Das bedeutet in den meisten Fällen das Klonieren und Sequenzieren der Mikrosatelliten-Marker (z.B. 5), ein relativ aufwendiges und zeitraubendes molekularbiologisches Verfahren. Das Hefe-Genom ist ungleich einfacher als das Genom der Vertebraten (=Wirbeltiere), enthält daher aber auch einen weitaus geringeren Anteil an repetitiven DNS-Sequenzen wie den Mikrosatelliten. Ein Vorteil besteht dagegen darin, daß die DNS-Sequenz des gesamten *Saccharomyces*-Genoms und damit auch die Genorte aller Mikrosatelliten bekannt sind. Letztere können also schnell gezielt auf ihre Variabilität und Stammspezifität hin untersucht werden, ohne langwierige Klonier- und Sequenzierarbeiten.

Die Mikrosatelliten-Typisierung findet daher seit kurzem auch bei Hefen und Pilzen aus dem medizinischen Sektor Anwendung. So entstand erstmals die Möglichkeit, eng verwandte Isolate von *Aspergillus fumigatus*, dem Hauptverursacher der invasiven Aspergillose, voneinander zu unterscheiden, um die Ausbreitungsmechanismen dieser meist letal verlaufenden Infektionskrankheit besser zu verstehen (6). Analog ist mit diesem neuen Verfahren auch die Typisierung von *Candida*-Hefen möglich (7), die beim Menschen schwer therapierbare und langwierige Pilzinfektionen, die sogenannten Mykosen, verursachen können. Auch hier besteht daher ein großes Interesse an einem empfindlichen und genauen Nachweisverfahren, das die stammspezifische Zuordnung der Krankheitserreger erlaubt. Aufgrund der guten Erfolge, die die Mikrosatelliten-Typisierung bei den medizinisch-relevanten, humanpathogenen Hefen erzielte, lag es nahe, dieses neue Verfahren auch an die Bedürfnisse der Lebensmittelbranche zu adaptieren.

3 Die Mikrosatelliten-Typisierung bei Bierhefen

Um die Mikrosatelliten-Klassifikation von typischen brauereirelevanten Hefestämmen zu testen, wurden uns 24 Kulturen von der Doemens Lehranstalten (München), zur Verfügung gestellt, darunter auch einige ihrer wichtigsten und gebräuchlichsten Kulturstämmen. Aus Übernachtskulturen dieser Stämme (ca. 1 ml Kultur, 12 h bei 30 °C gewachsen) wurde mittels eines schnellen Präparationsverfahrens (ca. 2 Std.) die DNS freigesetzt, die dann direkt für die Mikrosatelliten-Analyse eingesetzt werden konnte. Die Ergebnisse der Typisierung an sechs verschiedenen Genorten sind in Tabelle 1 aufgelistet. Es zeigt sich, daß sich anhand der genetischen Klassifikation untergärige von obergärigen Hefen klar unterscheiden lassen. Hierzu reicht meist sogar das Ergebnis eines einzelnen Locus aus (mit Ausnahme des Locus 4, der die

Längenvariante 185 für alle untergärigen aber auch für die Klasse I der obergärigen Hefen zeigt; siehe Tabelle 1).

Innerhalb der obergärigen Hefen weisen fast alle Loci eine hohe Variabilität auf. Es treten an jedem Locus drei bis fünf verschiedene Mikrosatelliten-Varianten auf, wodurch sich insgesamt sechs Klassen an obergärigen Hefen unterscheiden lassen (Klassen F – K, siehe Tabelle 1). Doppelproben eines Stamms (DM 19 und DM 23, die beide dem Stamm 365 von Doemens entsprechen) fallen dabei eindeutig in dieselbe Klasse und bestätigen so die Reproduzierbarkeit der Mikrosatelliten-Typisierung.

Die untergärigen Hefen scheinen dagegen weitaus weniger variabel zu sein, was für die enge, genetische Verwandtschaft von *S. carlsbergensis* spricht. Die ersten vier Loci zeigen hier keine Variabilität, aber Locus 5 und 6 erlaubten dennoch die Unterscheidung in fünf distinkte Klassen (Klassen A – E, siehe Tabelle 1).

4 Vorteile gegenüber bisherigen Klassifikations-Methoden

Die Vorteile einer molekularbiologischen Klassifizierung von Kulturstämmen der Bierherstellung liegen vor allem in der Schnelligkeit der Methode sowie ihrer Empfindlichkeit, d.h. der hohen Auflösung der genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Hefenstämmen. Im Gegensatz dazu sind konventionelle Analyseverfahren meist sehr aufwendig und langwierig und die Differenzierung der Bierhefestämme, vor allem der untergärigen, muß anhand einiger weniger stoffwechselphysiologischer Eigenschaften erfolgen, letztendlich also anhand der Beschaffenheit nur weniger genetischer Marker. Es bleiben daher in der klassischen Analyse viele genetische Unterschiede zwischen den Stämmen verborgen.

Aber selbst molekularbiologische Verfahren stießen bisher bei den untergärigen Hefen an die Grenzen ihres Auflösungsvermögens. Dies ist begründet in der hohen genetischen Uniformität der Art *S. carlsbergensis* (8). Die heute im Brauereiwesen gängigen untergärigen Kulturstämmen sind eng miteinander verwandt und stammen vermutlich großteils vom „Carlsberg Lager Stamm Nr. 1“ ab, den J. C. Hansen im Jahre 1883 erstmals isolierte und beschrieb (9). Entwicklungsgeschichtlich betrachtet ist die Art *S. carlsbergensis* jung und durch Zellfusion von *S. cerevisiae* und *S. monacensis* entstanden (10). Den heutigen Stämmen von *S. carlsbergensis* stand also nur sehr wenig Zeit zur Verfügung, neue Mutationen in ihrem Erbgut anzusammeln. Die genetischen Unterschiede zwischen den Stämmen sind demzufolge sehr gering und es ist ausgesprochen schwierig, sie aufzuspüren und nachzuweisen. Es verwundert deshalb kaum, daß in den letzten Jahren weder die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) oder die Analyse von RFLPs (11), noch die RAPD-PCR (12) eine zuverlässige Differenzierung und Identifizierung von untergärigen Brauhefen ermöglichten. Auch die von uns entwickelte Methode der Inter-LINE PCR (13), die seit mehreren Jahren erfolgreich zur Genotypisierung verschiedenster Mikroorganismen (Bakterien und Hefen) eingesetzt wird, konnte im Test der Doemens-Hefen zwar eindeutig die untergärigen von den obergärigen unterscheiden, ließ jedoch keine weitere Differenzierung innerhalb der untergärigen zu (vgl. Abbildung 1).

Immerhin konnten aber mit Hilfe der Inter-LINE PCR die acht verschiedenen obergärigen Doemens-Hefen in drei Klassen eingeteilt werden (vgl. Abbildung 1). Bekanntlich ist die Art *S. cerevisiae* evolutionsgeschichtlich älter als *S. carlsbergensis* (9) und besitzt dementsprechend ein heterogeneres Erbgut. Folglich ist es möglich, bestimmte Subspezies und Stämme auch mit den

Tabelle 1 Typisierung von 15		<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>						und neun <i>S. cerevisiae</i>			Stämmen an sechs Mikrosatelliten-Genorten				
STAMM	LOCUS1	LOCUS2	LOCUS3	LOCUS4	LOCUS5	LOCUS6	LOCUS7	LOCUS8	LOCUS9	LOCUS10	LOCUS11	LOCUS12	LOCUS13	LOCUS14	KLASSE
Untergärige Hefen															
DM 1 ¹⁾	103		171		243		185			236		195	201		A
DM 2	103		171		243		185			234		195	201		B
DM 3	103		171		243		185			234		195	201		B
DM 4	103		171		243		185			236		201			C
DM 5	103		171		243		185			236		195	201		A
DM 6	103		171		243		185			234		195	201		B
DM 7	103		171		243		185			234		195	201		B
DM 8	103		171		243		185			236		195	201		A
DM 9	103		171		243		185			234		195			D
DM 10	103		171		243		185			234		195	201		B
DM 11 ¹⁾	103		171		243		185			236		195	201		A
DM 12	103		171		243		185			234		195	201		B
DM 13	103		171		243		185			236		195	201		A
DM 14	103		171		243		185			234		203			E
DM 15	103		171		243		185			234		203			E
Obergärige Hefen															
DM 16	103	107	171	177	237	243	183	185		220	230	183	187	191	F
DM 17	103	107	171	177	237	243	183	185		220	232	183	191	203	G
DM 18	99		169		262		183	185	187	220	222	183	191	199	H
DM 19 ²⁾	105	111	169		243	245	185			220		175	183		I
DM 20	105	111	169		243	245	185			220		175	183		I
DM 21	99		169		262		187			220		183	191	199	J
DM 22	99		169		260	262	179	183	187	218	220	183	191	199	K
DM 23 ²⁾	105	111	169		243	245	185			220		175	183		I
DM 24	99		169		260	262	179	183	187	218	220	183	191	199	K

Typisierung von 15 *Saccharomyces carlsbergensis* (DM 1 bis DM 15) und neun *S. cerevisiae* (DM 16 bis DM 24) Stämmen an sechs Mikrosatelliten-Genorten. Die Genorte zeigen jeweils ein bis drei sogenannte ‚Allele‘, also Mikrosatelliten-Varianten unterschiedlicher Länge. Wildtypstämme von *Saccharomyces* sind normalerweise diploid, d.h. sie besitzen zwei Chromosomensätze. Damit tragen sie auch in der Regel zwei Kopien eines bestimmten Mikrosatelliten-Genortes, die in ihrer Länge entweder gleich oder unterschiedlich sein können. Das Genom von Bierhefen ist jedoch komplexer aufgebaut. Sie besitzen oft sogenannte ‚polyploide‘ oder ‚aneuploide‘ Chromosomensätze, wobei eine Hefezelle mehr als zwei vollständige Chromosomensätze hat (Polyploidie) oder wenigstens einzelne Chromosomen vermehrt auftreten können (Aneuploidie). Dies erklärt das Auftreten von drei unterschiedlichen Mikrosatelliten-Varianten wie z.B. bei Locus 4 und Locus 6. Um die Reproduzierbarkeit der Klassifikation zu testen wurden uns die Hefeprouben ohne Stammbezeichnung von Doemens überlassen. Die anschließende Zuordnung der genetischen Ergebnisse zu den Stammbezeichnungen zeigt die Zuverlässigkeit der Methode: untergärige und obergärige Hefen können eindeutig voneinander unterschieden werden und Doppelproben gleicher Stämme zeigen dasselbe genetische Muster.

¹⁾DM 1 und DM 11 entsprechen beide dem untergärigen Hefestamm 308 und ²⁾DM 19 und DM 23 dem obergärigen Stamm 365 von Doemens.

bisherigen molekularbiologischen Verfahren zu unterscheiden. Es ist allerdings bemerkenswert, daß die acht obergärigen Hefen nach der Mikrosatelliten-Typisierung sogar in sechs verschiedene Klassen fallen, also in doppelt so viele als mit der Inter-LINE PCR. Die Inter-LINE PCR, wie generell die RAPD-PCR, besitzt offensichtlich ein niedrigeres Auflösungsvermögen als die Mikrosatelliten-Typisierung. Zudem ist die Zuordnung der komplexen Ban-

denmuster zu Mustern von Referenzstämmen oft schwierig und wird manchmal noch durch PCR Artefakte (z.B. durch fehlerhafte Amplifikationen) erschwert. Die Eindeutigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist daher nicht immer gewährleistet. Die Mikrosatelliten-Typisierung ist also nicht nur in ihrem Auflösungsvermögen allen anderen genetischen Verfahren überlegen, sie ist auch die eindeutigere und zuverlässigere Methode.

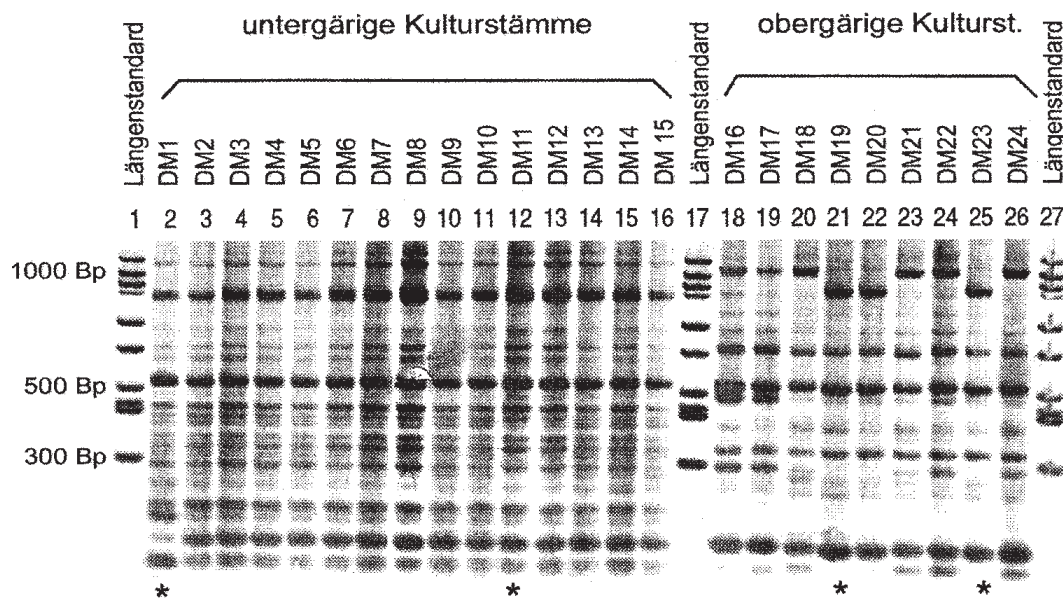


Abb.1 Inter-LINEPCR der 24 Doemens-Hefestämme

Diese von uns entwickelte Methode ist eine Variante der RAPD-PCR und wird seit mehreren Jahren erfolgreich zur Genotypisierung von Mikroorganismen eingesetzt. Mittels dieses Verfahrens konnten die 14 untergärigen Hefen (Spuren 2 – 16) eindeutig von den obergärigen Hefen (Spuren 18 – 26) unterschieden werden, jedoch ergab sich keine weitere Auftrennung innerhalb der untergärigen Stämme. Die obergärigen Stämme ließen sich in drei Klassen (I – III) einteilen (Klasse I: Spuren 18, 19, 24 und 26, Klasse II: Spuren 20 und 23, und Klasse III: Spuren 21, 22 und 25), während die Mikrosatelliten-Typisierung hier sechs Klassen ergab (vgl. Tabelle 1). In den Spuren 2, 12 (DM 1 und DM 11) und 21, 23 (DM 19 und DM 23) sind jeweils die PCR Produkte identischer Hefen (Stamm 308 bzw. Stamm 365, mit * markiert) aufgetrennt. Bei den Spuren 1, 17 und 27 handelt es sich um einen Längenstandard, markante Banden mit 300, 500 und 1000 Bp Länge sind angezeigt.

5 Anwendungsbereiche im Brauereiwesen

Für die neue Technik der Mikrosatelliten-Typisierung sehen wir in der Getränkebranche folgendes Anwendungspotential:

- routinemäßige Überwachung der Kulturstämme durch regelmäßige Überprüfung der genetischen Identität;
- zuverlässige Charakterisierung von Neuisolaten;
- Erfassung unerwünschter Fremdhefen (Kontaminationen);
- Kontrolle der genetischen Stabilität als Indiz für die Gewährleistung der physiologischen Leistungen der Kulturstämme;
- Nachweis von gelungenen Kreuzungen aus verschiedenem genetischen Hintergrund.

Unser mittelfristiges Ziel ist die Erfassung und Genotypisierung aller im deutschsprachigen Raum erhältlichen Kulturstämme zur Bier- und Weinerzeugung. Nach dieser Bestandsaufnahme soll dann eine mögliche Korrelation der genetischen Identität mit produktspezifischen Markern (z.B. Diacetylabbau, Gärleistung, Filtrierbarkeit, Aromaausbildung) untersucht werden. Hierdurch erhoffen wir uns neue Erkenntnisse, die z.B. eine Vorhersage der physiologischen Leistungen eines Neuisolates ermöglichen.

Um diese Ziele umzusetzen, strebt die Forschergruppe eine enge Zusammenarbeit mit der Doemensschule und der TU-Weihenstephan (Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I) an. Mit der

Doemensschule soll demnächst ein Pilotprojekt initiiert werden, an dem sich alle Brauereien beteiligen können.

Danksagung

Wir bedanken uns bei der Wissenschaftlichen Station Münchener Brauereien e.V. für die finanzielle Förderung, bei der Doemensschule (Gräfelfing) für die Bereitstellung von *S. cerevisiae* und *S. carlsbergensis* Stämmen und bei Herrn Professor Back, TU-Weihenstephan, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Frau Prof. Eckardt-Schupp, GSF, Neuherberg und Herrn Professor Tautz, LMU, München, für ihre Unterstützung und Kooperation.

6 Summary

Rassmann, K., and Leibhard, S.: High resolution classification of yeast strains by genetic methods – Micro satellite typification of *saccharomyces cerevisiae* and *carlsbergensis* strains — Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, No. 9/10, 152 – 156, 1999

BC02 Microbiology

By a unique molecular biological analysis method for variable gene locations in genome, the so-called micro satellite typification enables genotypical brewery culture strain identification quickly and reliably for

the first time. This can be of decisive significance in the case of primary selection of a specific strain but also as control instrument for the cultivation, re-isolation of pure cultures or the care of strain collections.

Rassmann, K., et Leibhard, S.: Classement précis des souches de levures avec des méthodes génétiques – Typage par microsatellite de souches de *Saccharomyces cerevisiae* et *carlbergensis* — Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, No. 9/10, 152 – 156, 1999

BC02 Microbiologie

Par de nouvelles méthodes microbiologiques de sites variables génomiques dans le génome, on a pu identifier avec précision et rapidement pour la première fois en utilisant le typage par microsatellite des souches de brasserie. Ce fait est d'importance décisive pour la sélection primaire d'une souche particulière mais également comme instrument de contrôle pour la culture, le réisolement de souches pures ou l'entretien de collection de souches.

7 Literatur

1. Litt, M., und Luty, J.A.: Amer. J. Hum. Gen. 44, 397 – 401, 1989.
2. Tautz, D.: Nucleic Acid Research 17, 6463 – 6471, 1989.
3. Weber, J.L., und May, P.E.: Amer. J. Hum. Gen. 44, 388 – 396, 1989.

4. Leibhard, S., Nickel, A., Back, W., Bohak, I., Smida, J., Hieber, L., und Eckardt-Schupp, F.: Monatsschrift für Brauwissenschaft 48, 7/8, 224 – 231, 1995.
5. Rassmann, K., Schlötterer, C., und Tautz, D.: Electrophoresis 12, 113 – 118, 1991.
6. Bart-Delabesse, E., Humbert, J.F., Delabesse, E., und Bretagne, S.: J. Clin. Microbiol. 36, 2413 – 2418, 1998.
7. Field, D., Eggert, L., Metzgar, D., Rose, R., und Wills, C.: FEMS Immunol. Med. Microbiol. 15, 73 – 79, 1996.
8. Donhauser, S., Brauwelt 135, 7, 274 – 286, 1995.
9. Hansen, J., und Kiellandt-Brandt, M.C.: Gene 140, 33 – 40, 1994.
10. Borsting, C., Hummel, R., Schultz, E.R., Rose, T.M., Pedersen, M. B., Knudsen, J., und Kristiansen, K.: Yeast 15, 1409 – 1421, 1997.
11. Wightman, P., Quain, D.E., und Meaden, P.G.: Letters in Applied Microbiology 22, 90 – 94, 1996.
12. Tompkins, T.A., Stewart, R., Savard, L., Russell, I., und Dowhanick, T. M.: Am. Soc. Brew. Chem. 54, 91 – 96, 1996.
13. Smida, J., Leibhard, S., Nickel, A.M., Eckardt-Schupp, F., und Hieber, L., Genetic Analysis Biomolecular Engineering 13, 95 – 98, 1996.

(Manuskripteingang: 27. Mai 1999)