

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

Entwicklung von PCR-Methoden zur Klassifizierung industriell genutzter Hefen

Andreas Scherer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor – Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Ulrich Kulozik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 30.09.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.02.2003 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II der Technischen Universität München in Weihenstephan in der Zeit von 1996 bis 2001.

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Eberhard Geiger für die Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Gudrun Vogeser für ihre fachlich kompetente und freundschaftliche Betreuung sowie die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Lehrstuhls, insbesondere Herrn Dipl.-Ing. Thomas Schuhbeck, die durch das hervorragende Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft eine angenehme Forschung ermöglichten.

Mein inniger Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung stets in jeder Hinsicht unterstützt haben sowie meiner Frau Marion, die in allen Lebenslagen immer zu mir gestanden hat.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung _____	1
2 Material und Methoden _____	3
2.1 Hefestämme _____	3
2.2 Enzyme _____	4
2.3 Chemikalien, Kits und Hilfsmittel _____	5
2.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen _____	6
2.5 Gele, Gelmaterialien und Membranen _____	8
2.6 Oligonukleotide, DNAs _____	8
2.7 Geräte _____	10
2.8 DNA-Präparation _____	11
2.8.1 Isolierung genomischer DNA _____	11
2.8.2 Isolierung und Amplifikation von PCR-Produkten aus Agarosegelen _____	12
2.8.3 Isolierung und Amplifikation von PCR-Produkten aus Polyacrylamidgelen _____	12
2.8.4 Isolierung und Amplifikation von membranfixierten PCR-Produkten _____	12
2.8.5 Konzentrierung von PCR-Produkten _____	13
2.9 Polymerase Chain Reaction _____	13
2.10 Gelelektrophorese _____	15
2.10.1 Agarosegele _____	15
2.10.2 Horizontale Polyacrylamidgele _____	16
2.10.3 Blotting von DNA _____	17
2.10.3.1 Vacublot _____	17
2.10.3.2 Directblotting _____	18
2.11 Sequenzierung von PCR-Produkten _____	19
2.12 DNA – DNA - Hybridisierungen _____	19
2.12.1 Herstellung von DNA-Sonden _____	19
2.12.2 Hybridisierung membranfixierter DNA _____	20
2.12.3 Detektion DIG- und Biotin-markierter DNA _____	20
2.13 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) _____	21
2.14 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) _____	22
2.15 PCR mit δ Element basierten Primern _____	23
2.16 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) _____	24
2.17 Mikrosatelliten Analyse _____	26
2.17.1 Mikrosatellitenloci aus DNA-Datenbanken _____	27
2.17.2 Isolierung von variablen Mikrosatellitenloci _____	27

2.18	Subtraktive Hybridisierung	28
3	Ergebnisse	33
3.1	SSCP-Analyse ribosomaler DNA	33
3.2	RAPD	35
3.3	PCR mit δ Element basierten Primern	43
3.4	AFLP	47
3.4.1	Fingerprints	47
3.4.2	Isolierung von Markern	50
3.5	Mikrosatelliten Analyse	65
3.5.1	Mikrosatellitenloci aus DNA-Datenbanken	65
3.5.2	Isolierung von variablen Mikrosatellitenloci	75
3.6	Subtraktive Hybridisierung	84
4	Diskussion	92
4.1	SSCP-Analyse ribosomaler DNA	92
4.2	RAPD	93
4.3	PCR mit δ Element basierten Primern	94
4.4	AFLP	95
4.5	Mikrosatelliten Analyse	96
4.6	Subtraktive Hybridisierung	99
5	Schlussfolgerung und Ausblick	101
6	Zusammenfassung	104
7	Summary	106
8	Anhang	108
8.1	Abkürzungsverzeichnis	108
8.2	Abbildungsverzeichnis	109
8.3	Tabellenverzeichnis	111
9	Literaturverzeichnis	113

1 Einleitung

Neben den technologischen Parametern hat auch die Wahl des Hefestammes bei der Bierherstellung einen großen Einfluss auf Charakter und Qualität des Produktes. Besonders die Bildung von sekundären Stoffwechselprodukten, die das Aromaprofil eines Bieres wesentlich beeinflussen, variiert zwischen einzelnen Stämmen. Technologisch sind Eigenschaften wie die Dauer der Angärung, die Gärgeschwindigkeit, der Vergärungsgrad, aber auch die Fähigkeit der Bruchbildung Kriterien bei der Auswahl eines Hefestammes. Um eine gleichbleibende Produktqualität und konstante Produktionsbedingungen zu erhalten, muss der Brauer daher in der Lage sein, die Identität des zu verwendenden Hefestammes jederzeit sicherstellen zu können.

Die klassische Einordnung von Hefen nach physiologischen Eigenschaften wie Verwertung bestimmter Substrate, Wachstum auf Selektivnährmedien oder Zell- und Kolonienmorphologie [Barnett, J. A. 1990] sind in der Regel nicht geeignet, um nahe verwandte Stämme zu unterscheiden.

Da letztendlich alle phänotypischen Eigenschaften eines Organismus in der Erbsubstanz verankert sind, basieren viele Differenzierungsansätze zur Unterscheidung von Arten oder Stämmen unterschiedlicher Gattungen auf der Analyse der DNA. Die DNA-Analytik hat sich mittlerweile auch in der Brauindustrie etabliert. Eine der ersten Methoden in diesem Bereich ist die Pulsfeld-Gelelektrophorese, mit der intakte Chromosomen von Hefestämmen aufgetrennt wurden [Donhauser, S. 1990] und aufgrund deren Größenverteilung Bierhefen auf Stammebene differenziert werden konnten.

Daneben sind Methoden, die auf Restriktionsfragment Längenpolymorphismen basieren, beschrieben. Hierbei wurden entweder genomische oder mitochondriale DNA mit Restriktionsenzymen verdaut und in Agarosegelen [Donhauser, S. 1989] oder Polyacrylamidgelen [Barberio, C. 1994] aufgetrennt. Aufgrund der Bandenmuster repetitiver Sequenzen konnten auch hier stammspezifische Unterschiede zwischen Bierhefen festgestellt werden. In einigen Arbeiten wurde DNA von Hefen nach Restriktionsverdau mit single- oder multilokus-Sonden hybridisiert und auf diese Weise eine Differenzierung erreicht [Pedersen M. B. 1994; Wightman, P. 1995].

Mit der Entdeckung der Polymerase Kettenreaktion (PCR), mit der einzelne Abschnitte eines Genoms gezielt in vitro vervielfältigt werden können, eröffneten sich neue Möglichkeiten zur Organismendifferenzierung. Einige Variationen der PCR wie RAPD oder AFLP, bei denen nach PCR und Elektrophorese art- bzw. stammspezifische Bandenmuster entstehen, haben mittlerweile auch Einzug in die Analytik der Getränke- und Brauindustrie gehalten [Azumi, M. 2001; de Barros Lopes, M. A. 1999; Tornai-Lehoczki, J. 2000; Laidlaw, L. 1996; Tompkins, T. A. 1996; Leibhard, S. 1995; Quesada, M. P. 1995].

Auch für die Analyse von Mikrosatelliten, Wiederholungen kurzer Sequenzmotive, die häufig zur Individuenidentifizierung von Menschen in der Forensik eingesetzt wird [Hsu, C. M. 1999; Ingvarsson, S. 2000], sind erste Anwendungen zur Differenzierung von *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen beschrieben [Hennequin, C. 2001]

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene PCR-Methoden hinsichtlich ihres Potentials verglichen werden, industrielle Hefestämme zu differenzieren bzw. zu klassifizieren. Der Vergleich erfolgte am Beispiel von Bierhefen der Hefebank Weihenstephan sowie einigen anderen Hefestämmen, die teilweise nicht der Art *Saccharomyces cerevisiae* angehörten. Sofern realisierbar sollten Methoden entwickelt bzw. so modifiziert werden, dass einerseits viele Stämme individuell unterschieden werden können, auf der anderen Seite aber auch gröbere Zuordnungen entsprechend des Verwendungszweckes (beispielsweise "Weißbierhefe" o. ä.) möglich sind.

Aspekte, die unter anderem mit berücksichtigt werden sollten, waren ein relativ geringer apparativer Aufwand sowie die einfache Durchführbarkeit der Analysen, so dass diese auch von molekularbiologisch unerfahrenen Nutzern durchgeführt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Hefestämme

Tabelle 1: Untersuchte Hefestämme mit industriellem Verwendungszweck, teilweise mit Karyotyp.
 HW: Hefebank Weihenstephan, L: Stammsammlung am Lehrstuhl f. Technologie d. Brauerei II, TU München, DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande, Karyotypen [Springer, R. 1998]

Stamm	Stamm- sammlung	industrielle Verwendung	weitere Charakterisierung	Karyotyp
34/70	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	A
26	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	B
44	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	C
59	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	D
120	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	D
66	HW	untergärige Bierhefe	Staubhefe	E
69	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	F
71	HW	untergärige Bierhefe	Staubhefe	G
85	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	H
166	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	H
167	HW	untergärige Bierhefe	Staubhefe	H
128	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	K
155	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	L
170	HW	untergärige Bierhefe	Staubhefe	M
70	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	N
114	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	O
88	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	P
107	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	Q
178	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	R
109	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	S
122	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	T
176	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	U
204	HW	untergärige Bierhefe	Staubhefe	/
194	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	/
34/78	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	/
54	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	/
168	HW	untergärige Bierhefe	Bruchhefe	/
SCB 2	L	untergärige Bierhefe	Staubhefe	/
68	HW	obergärige Bierhefe	Weißbier	W
127	HW	obergärige Bierhefe	Weißbier	W1
149	HW	obergärige Bierhefe	Weißbier	W2
205	HW	obergärige Bierhefe	Weißbier	W3
212	HW	obergärige Bierhefe	Weißbier	W4
141	HW	obergärige Bierhefe	Alt / Kölsch	B
148	HW	obergärige Bierhefe	Alt	C
165	HW	obergärige Bierhefe	Alt / Kölsch	D
184	HW	obergärige Bierhefe	Alt	E
174	HW	obergärige Bierhefe	Alt	F

177	HW	obergärige Bierhefe	Alt / Kölsch	G
208	HW	obergärige Bierhefe	Alt	H
210	HW	obergärige Bierhefe	Alt / Ale	I
211	HW	obergärige Bierhefe	Alt / Ale	K
213	HW	obergärige Bierhefe	Alt / Ale	L
175	HW	obergärige Bierhefe	Weißbier	/
Ale CT	L	obergärige Bierhefe	Ale	/
Laureiro	L	Weinhefe	/	/
Epernay	L	Weinhefe	/	/
S. c. ellipsoideus	DSM 70451	Weinhefe	/	/
W 4	L	Brennereihefe	/	/
R II	L	Brennereihefe	/	/
Brett. bruxellensis	DSM 70726	/	/	/
Candida tropicalis	CBS 2317	/	/	/
Debaromyces hansenii	DSM 70244	/	/	/
Hansenula anomala	DSM 70263	/	/	/
Kloek. apiculata	DSM 70285	/	/	/
Pichia membranaefaciens	DSM 70366	/	/	/
Rhodotorula rubra	DSM 70403	/	/	/
S.c. diastaticus A&G	L	/	/	/
S. exiguus	L	/	/	/
S. uvarum beijerinck	L	/	/	/
S.bayanus	DSM 70412	/	/	/
S.pastorianus (früher Typstamm S. monacensis)	DSM 6581	/	/	/
S.pastorianus	DSM 6580	/	/	/
Saccharomyces ludwigii	DSM 70551	/	/	/
Schizosaccharomyces pombe	DSM 70576	/	/	/
Zygosaccharomyces bailii	DSM 70834	/	/	/
Zygosaccharomyces rouxii	DSM 2531	/	/	/

2.2 Enzyme

Uracil-N-Glycosylase, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Mung Bean Nuclease, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

T4 Endonuclease V, Epicentre Technologies, Madison, WI, USA

Taq Polymerase, native, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Restriktionsendonuclease Mse I, New England Biolabs

alle anderen Restriktionsendonucleasen, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.3 Chemikalien, Kits und Hilfsmittel

AG® 501-X8 Resin, Bio Rad, Hercules, USA

Anti-DIG Alkalische Phosphatase-Konjugat, Fab Fragment (1:5000), Roche
Molecular Biochemicals, Mannheim

BCIP (X-Phosphat), 5-Bromo- 4-chloro-3-indolylphosphat (50 mg/ml), Roche
Molecular Biochemicals, Mannheim

Blocking Reagenz, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

BSA, Sigma, Deisenhofen

CIA, Chloroform : Isoamylalkohol = 24 : 1, gesättigt mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0,
Biometra, Göttingen

Dynabeads M-280 Streptavidin, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg

Ethidiumbromid, Sigma, Deisenhofen

Formamid, Sigma, Deisenhofen

LightCycler-DNA Master SYBR Green I, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Mineraloil, Sigma, Deisenhofen

NBT, 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (100 mg/ml), Roche Molecular Biochemicals,
Mannheim

PCR ELISA, DIG-Labeling Kit, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden

Phenol, gesättigt mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, Biometra, Göttingen

Phenol/CIA, Phenol : CIA = 1 : 1, USB, Cleveland, USA

Streptavidin Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:7500), GATC, Konstanz

TEMED, GATC, Konstanz

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck,
Darmstadt, bezogen.

2.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Medien

YPG-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
Pepton	1,0 %
Glukose	2,0 %
Agar-Agar	1,5 % (zur Herstellung fester Nährböden)

Puffer und Lösungen

B&W-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	10,0 mM
NaCl	2,0 M
EDTA	1,0 mM

Blocking-Puffer 10 %

Blockingreagenz	10 % (g/g)
Maleinsäurepuffer	90 % (g/g)

Denaturierungslösung

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Depurinierungslösung

HCl	0,25 N
-----	--------

DISC-Puffer (Rehydratisierungs- und

Elektrodenpuffer)

ETC Elektrophorese-Technik,
Kirchentellinsfurt

EU-Lösung 2x

TrisHCl, pH 7,5	20 mM
BSA	0,2 mg/ml
T4 Endonuclease V	0,4 U/μl
Uracil-N-Glycosilase	0,1 U/μl

Gelladepuffer Agarosegel, 10x

Saccharose	55 %
Bromphenolblau	0,5 %
Na ₂ EDTA, pH 8,0	250 mM

Gelladepuffer Sequenzier-Gel, 2x

Formamid	98 %
Na ₂ EDTA, pH 8,0	5 mM
Bromphenolblau	0,1 %

Harnstoffdiluent f. Sequenziergel 4 %

Harnstoff	84,0 g
10 x TBE	18,7 g
H ₂ O _{dd}	73,4 g

Hybridisierungslösung

SSC	5x
Blockingreagenz	1,0 %
N-Lauroylsarkosin	0,1 %
SDS	0,02 %

Lysepuffer

NaCl	100 mM
Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	2 %
SDS	1 %

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM
NaOH	200 mM
pH 7,5	

Mung-Puffer 3x

Natriumacetat	30 mM
Natriumchlorid	150 mM
Zinkchlorid	3 mM
Triton X 100	0,003 %

Neutralisierungslösung

TrisHCl	1 M
NaCl	2 M
pH 5,0	

PBS-Puffer

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
pH 7,5	

Reaktionspuffer

TrisHCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
pH 9,5	

Sequenziergellösung 4 % (für GATC1500)

GATC-Gel 30 %	6,7 ml
Harnstoffdiluent	43,3 ml

SH-Hybridisierungspuffer 1x

HEPES, pH 7,5	30 mM
EDTA	1,5 mM

SSC-Puffer 20 x

NaCl	3 M
Na-citrat	300 mM
pH 7,0	

TAE-Puffer

Tris-Acetat	40 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
pH 8,0	

TBE-Puffer (10x) f. Sequenziergel(GATC 1500)

Tris	1,27 M
Borsäure	0,42 M
Na ₂ EDTA	24 mM

TBE-Puffer (Agarosegele)

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
Na ₂ EDTA	2 mM

2.5 Gele, Gelmaterialien und Membranen

Polyacrylamid-Gele

Elektrodenstreifen, ETC Elektrophorese-Technik, Kirchentellinsfurt

GATC-Gel 30 %, GATC, Konstanz

PAA Fertiggel Clean 10 %, ETC Elektrophorese-Technik, Kirchentellinsfurt

Agarosen

MethaPhor, FMC BioProducts, Rockland, USA

NuSieve 3:1, FMC BioProducts, Rockland, USA

Seakem LE, FMC BioProducts, Rockland, USA

Nylonmembranen

Direct-Blotting-Membrane, GATC, Konstanz

Nytran NY 12, Schleicher & Schuell, Dassel

2.6 Oligonukleotide, DNAs

DNAs

DNA-Längenstandards III, Digoxigenin-markiert, Roche Molecular Biochemicals,
Mannheim

λ -DNA, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Ultrapure dNTP Set, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

1 kbp-Leiter, Gibco Brl, Gaithersburg, USA

100 bp-Leiter, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG, Ebersberg bzw. von Roth, Karlsruhe (mit R bezeichnet) bezogen.

Tabelle 2: Daten der verwendeten Oligonukleotide mit Zuordnung zum Ergebnisteil.
Keine Angabe zur Annealingtemperatur (/) wenn Oligonukleotid nicht als PCR-Primer verwendet wurde.

Name	Sequenz, 5'-3'Richtung	Annealingtemperatur / °C	verwendet in Kapitel
H550	ggA ggg CAA gTC Tgg Tg	60	3.1
H1200	gAg TTT CCC CgT gTT gAg T	60	
R 360-6 (R)	gCA gCT CAT g	33	3.2
R D-02 (R)	ggA CCC AAC C	33	
LTR 01 r	CCT CgA TgA CAg CTT CTC AT	50	3.3
Ad E 1	CTC gTA gAC TgC gTA CC	56	3.4.1
Ad E 2	AAT Tgg TAC gCA gTC TAC	/	
Ad M 1	gAC gAT gAg TCC TgA g	/	
Ad M 2	TAC TCA ggA CTC CAT	/	
E + 0	gAC TgC gTA CCA ATT C	56	
E + X	gAC TgC gTA CCA ATT CX	56	
M + 0	gAT gAg TCC TgA gTA A	56	
M + X	gAT gAg TCC TgA gTA AX	56	
LCS AP	ACT CTT gCT Tgg ACg AgC TCT	56	3.4.2
Ad LCS	AgA gCT CgT CCA AgC AAg AgT CA	/	
bh e	CAg CCg ggT TCT CCA C	60	
bh m	TCC TTg CCC gTT TAC ACT	60	
bh m 2	gCg TCC ACA gTT TCC ATC	60	
bh e 3	CAA CCC CTg gCA TgA	60	
bh e 4 a5t b	ATC gTg CCg CTA gTT	60	
MS 01	CAg gAC gCT ACC gAA gCT CAA AAg	56	3.5
MS 01r	ACT TTT ggC CAA TTT CTC AAg ATC	56	
MS 02	AgA TAC AgA AgA TAA gAA CgA AAA C	56	
MS 02r	TTA TTg ATg CTT ATC TAT TAT ACC	56	
MS 04 b	ACT CAC gTT ATC Agg CTC ATA g	56	
MS 04 b r	AAA gCA AgC gAC TAg AAC AAC	56	
MS 05	AgA ggT gCA gAC ggA ACA gA	56	
MS 05 r	ACg CAA CCT ACT gCT CgT AAT A	56	
MS 07	gTg TTA Agg AgA Agg AgA TTg AAg	56	
MS 07 r	TAg AAg AAg AAg ATg ATg ATg AgC	56	
UG100E	gAA ATg ACT TTg TTg TCg ATg	60	3.6
UG100M	CAg AAT CTC CgT TTA Tgg TAg A	60	
UG300E	CTC CTT ggC TTg TCg AA	60	
UG300M	ggT TgT TgC TgA AgT TgA gA	60	

2.7 Geräte

PCR

Thermocycler PTC 100, MJ Research, Biozym, Oldendorf
LightCycler, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Elektrophorese

Horizontale Elektrophorese-Einheit HE 33, Hoefer Scientific Instruments, Serva,
Heidelberg

Horizontale Elektrophorese-Einheit GNA 200, Amersham Pharmacia Biotech,
Freiburg

Horizontale Elektrophorese-Einheit LKB 2117 Multiphor II, LKB Produkter AB,
Bromma, Schweden

Spannungsgeber LKB Powersupply 2197, LKB Produkter AB, Bromma, Schweden

Spannungsgeber EPS 600, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

GATC 1500 DNA-Sequencer (Standard-System mit 22 cm x 32 cm Glasplatten),
GATC, Konstanz

Fotografische Auswertung

Sofortbildkamera MP4, Polaroid, Offenbach

Film 667 professional, Polaroid, Offenbach

UV-Beleuchtungsvorrichtung Reprostar, CAMAG, Berlin

Weitere Geräte

Speed Vac Concentrator, Bachhofer, Reutlingen

Eppendorfcentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg

UV-Crosslinker GATC-LINK, GATC, Konstanz

2.8 DNA-Präparation

2.8.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA aus Hefezellen wurde nach einer Modifikation der von Hoffman (1987) beschriebenen Methode isoliert. Alle Schritte, bei denen keine Temperaturen angegeben sind, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Einfüllen von Glaskugeln (\varnothing 0,45 mm) entsprechend einem Volumen von ca. 100 μ l in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß
- Zugabe von 200 μ l Lysepuffer
- Zellmenge, die einer gefüllten Impföse entspricht, im Lysepuffer suspendieren
- Zugabe von 200 μ l Phenol-CIA
- Vortexen, 3 min, 1 600 min^{-1}
- Zugabe von 200 μ l TE, kurz mischen
- Zentrifugieren, 5 min, 13 000 g
- Überführen von 300 μ l Überstand in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß
- Zugabe von 750 μ l Ethanol, mischen
- Zentrifugieren, 2 min, 13 000 g
- Lösung dekantieren und Pellet in Speed Vac Concentrator trocknen
- Pellet in 400 μ l TE-Puffer mit RNase (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) suspendieren
- Inkubieren, 5 min, 37 °C
- Extrahieren mit 400 μ l Phenol-CIA und CIA (Überkopfschütteln, 5 min; zentrifugieren, 5 min, 13 000 g)
- Zugabe von 1/10 Volumen 5 M NaCl u. 2 Volumen Ethanol
- Inkubieren, 15 min
- Zentrifugieren, 15 min, 13 000 g
- Lösung dekantieren und Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol waschen
- Lösung dekantieren und Pellet in Speed Vac Concentrator trocknen
- Aufnehmen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

2.8.2 Isolierung und Amplifikation von PCR-Produkten aus Agarosegelen

- Nach der Elektrophorese und gegebenenfalls einer Nachfärbung mit Ethidiumbromid (vgl. 2.10.1) das DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausschneiden: Volumen des Gelblocks 50 bis max. 100 μ l
- Gelstückchen in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml H_2O_{dd} für 15 min auf 90 °C erhitzen und das Gefäß anschließend vortexen
- Die Gellösung in einer Verdünnung zwischen 1:10 und 1:10000 in eine PCR entsprechend der ersten PCR einsetzen, Zyklenzahl auf 15 bis max. 20 Zyklen verkürzen

2.8.3 Isolierung und Amplifikation von PCR-Produkten aus Polyacrylamidgelen

- Nach der Färbung (vgl. 2.10.2) das Gel trocknen
- DNA-Bande mit einem Skalpell ausschneiden
- Ein ca. 1 mm^2 großes Stück der Bande direkt in einen Reaktionsmix entsprechend der ersten PCR einsetzen
 - Alternativ die DNA-Bande im hydratisierten Gel mit einer Kanüle anritzen
 - Kanüle in einen Reaktionsmix entsprechend der ersten PCR eintauchen und kurz hin und her bewegen
- Die Zyklenzahl entspricht der Ausgangs-PCR

2.8.4 Isolierung und Amplifikation von membranfixierten PCR-Produkten

- Nach der Färbung (vgl. 2.12.3) die Membran trocknen
- DNA-Bande ausschneiden
- Ein ca. 2 mm^2 großes Stück der Bande direkt in eine PCR entsprechend der ersten PCR einsetzen
- Die Zyklenzahl entspricht der Ausgangs-PCR
- Für den Fall, dass nicht ausreichend PCR-Produkt gebildet wurde, ein 5 μ l Aliquot der Reaktion in eine weitere Reaktion einsetzen

2.8.5 Konzentrierung von PCR-Produkten

- Zugabe von 2 Volumenanteilen Ethanol zu 1 Volumenanteil PCR-Reaktion
- Inkubieren, 30 min, RT
- Zentrifugieren, 30 min, 14.000^{-1}
- Lösung dekantieren und Pellet in Speed Vac Concentrator trocknen
- Aufnehmen des Pellets in H_2O_{dd}

2.9 Polymerase Chain Reaction

Die PCR bietet eine Möglichkeit, einzelne Abschnitte der DNA eines Organismus im Reaktionsgefäß gezielt zu vervielfältigen. Der Reaktionsansatz enthält hierzu: DNA, Nucleotide, Primer und (Taq)-Polymerase in einem geeigneten Puffer.

Die natürlicherweise doppelsträngig vorliegende DNA wird durch Erwärmung auf 94 °C in Einzelstränge aufgeschmolzen, die so als Matrize für die Synthese eines komplementären Gegenstranges dienen können.

Bei einer Temperatur zwischen 30 und 60 °C (abhängig von ihrer Länge und Basenzusammensetzung) lagern sich die Primer analog ihrer Sequenz an komplementäre Abschnitte der DNA-Einzelstränge an. Die Polymerase, deren Temperaturoptimum bei ca. 72 °C liegt, erkennt die Primer als Startpunkte und synthetisiert von diesen ausgehend den zum jeweiligen Einzelstrang komplementären Strang; die Nucleotide dienen hierbei als Bausteine.

Die Reaktion läuft automatisiert in Thermocyclern ab, in denen die oben genannten Temperaturen zyklisch durchlaufen werden.

Für die meisten PCRs liefern die in Tabelle 3 bis Tabelle 6 angegebenen Reaktionsbedingungen gute Ergebnisse. Wenn keine gesonderten Angaben gemacht werden, wurden die Reaktionen unter diesen Standardbedingungen durchgeführt.

PTC 100

Tabelle 3: Standardzusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer	1-fach
dNTP's	200 μ M
Vorwärts-Primer	300 nM
Rückwärts-Primer	300 nM
Vorwärts-Primer (interne Amplifikationskontrolle, optional)	100 nM
Rückwärts-Primer (interne Amplifikationskontrolle, optional))	100 nM
MgCl ₂	1,5 mM
Taq Polymerase	0,025 U/ μ l

Tabelle 4: Standardtemperaturprofil PCR. T_A: Annealingtemperatur (vgl. Tabelle 2).

Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklenzahl
94	2,0	1
94	0,5	
T _A	0,5	36
72	1,5	
72	5,0	1

LightCycler

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes LightCycler; Detektionsformat SYBR-Green.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
LightCycler-DNA Master SYBR Green I	1-fach
Vorwärts-Primer	300 nM
Rückwärts-Primer	300 nM
MgCl ₂	4,0 mM

Tabelle 6: Temperaturprofil und Datenaufnahme LightCycler-PCR; Detektionsformat SYBR-Green.

Temperatur/ °C	Zeit/ sec	Heiz bzw. Kühlrate/ °C/s	Zyklenzahl	Analysemodus	Signalauf- nahme
95	30	20	1	none	/
95	0	20			/
63	5	20	35	quantification	/
72	10	20			single
95	0	20			/
65	15	20	1	meltingcurve	cont
95	0	0,1			
40	30	20	1	none	/

2.10 Gelelektrophorese

2.10.1 Agarosegele

Die Herstellung der Agarosegele erfolgte nach der jeweiligen Herstellerangabe.

Die verwendeten Gelvolumina sind Tabelle 7 zu entnehmen:

Tabelle 7: Gelvolumina für die verwendeten Elektrophoresekammern.

Kammer	Volumen
GNA 200	150 ml
Hoefer HE 33	25 ml

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Gelladepuffer (10 x) versetzt.

Die im Gel enthaltene DNA wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid visualisiert. Der Farbstoff wurde in der Regel dem Gel- sowie dem Laufpuffer in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt, so dass er sich während dem Elektrophoreselauf in die DNA einlagern konnte und diese im UV-Licht direkt nach der Elektrophorese sichtbar war.

Da jedoch Ethidiumbromid das Laufverhalten von DNA-Molekülen in der Elektrophorese beeinflusst und eine verschlechterte Auflösung bewirkt [Sambrook, J. 1989; FMC], wurden die Agarosegele teilweise erst nachträglich für 30 min in einer wässrigen Lösung von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt.

2.10.2 Horizontale Polyacrylamidgele

Vorbereitung und Laufbedingungen

Ein Fertiggel (Clean) wurde für 1h im Gel-Pool in DISC-Rehydratisierungspuffer unter ständiger Bewegung rehydratisiert.

Das gequollene Gel wurde zusammen mit den in Elektrodenpuffer getränkten Elektrodenstreifen gemäß den Herstellerangaben in die Elektrophoresekammer LKB 2117 eingebracht.

Die Laufbedingungen sind untenstehender Tabelle 8 zu entnehmen:

Tabelle 8: Laufbedingungen horizontale Elektrophorese von Polyacrylamidgelen.
Die angegebenen Werte stellen die einzustellenden Maximalwerte dar.
* Einstellen ist der dreifache Wert des sich aktuell während der Phase 1 ergebenden Wertes.

Phase	Spannung/ V	Stromstärke/ mA	Leistung/ W	Laufzeit/ min	Temperatur/ °C
1	100	10	5	30	14
2	600	aktuell Phase 1 x 3 *	15	120	14

Färbung

DNA in Polyacrylamidgelen wird in der Regel mit einer Silberfärbemethode sichtbar gemacht. Bei dieser Methode werden organische Verbindungen (wie DNA) oxidiert, so dass sich Silberionen anlagern können. Diese Silberionen werden anschließend mit Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert und sind als Braun-/Schwarzfärbung zu erkennen.

Nachfolgende Tabelle 9 gibt die einzelnen Schritte der Färbemethode nach Budowle, B. (1991) wieder:

Tabelle 9: Färbeschritte Silberfärbung nach Budowle.

Schritt	Reagenzien	Konz./%	Zeit/min
Fixierung/Oxidation	HNO ₃	1,0	3
Waschen	dd H ₂ O		0,5
Silbern	AgNO ₃	0,2	20
Spülen	dd H ₂ O		0,5
Entwicklung	Na ₂ CO ₃	3,0	5-12
	Formaldehyd	0,037	(visuelle Kontrolle)
Stoppen	Essigsäure	10,0	10
Konservieren	Glyzerin	5,0	10

- Der Färbevorgang fand bei Raumtemperatur statt.
- Die Flüssigkeitsmengen waren so bemessen, dass das Gel in der Färbeschale frei beweglich war.
- Die einmal gewählte Menge wurde in jedem Schritt beibehalten.

2.10.3 Blotten von DNA

Beim Blotten von DNA wird diese auf eine Nitrocellulose oder Nylonmembran übertragen und durch Hitzebehandlung oder UV-Bestrahlung auf dieser fixiert. Die gebundene DNA kann mit DNA-Sonden hybridisiert werden, die anschließend durch Anfärben sichtbar gemacht werden.

2.10.3.1 Vacublot

Zur Übertragung von in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Membranen wurde der Vacublot eingesetzt. Hierbei wird die DNA im Gegensatz zum klassischen Southern Blot anstelle von Kapillarkräften durch Anlegen eines Vakuums auf die Membran transferiert.

Die VacuGene-Kammer wurde nach Herstellervorschrift zusammengesetzt und die DNA bei einem Unterdruck von 50 mm H₂O auf eine Nylonmembran (Nytran NY 12) geblottet:

- Gel mit Depurinierungslösung überschichten, Einwirkzeit 4 min
- Lösung durch Denaturierungslösung ersetzen, Einwirkzeit 3 min
- Lösung durch Neutralisierungslösung ersetzen, Einwirkzeit 3 min
- Lösung entfernen und Kammer mit H₂O fluten, bis das Gel überschichtet ist, Einwirkzeit 30 min
- Membran trocknen lassen
- DNA unter UV-Licht (GATC-LINK) 1 min fixieren

2.10.3.2 Directblotting

Das GATC 1500-System ist eine Kombination von vertikaler Elektrophorese und Blottingapparatur. Die DNA wird in einem 0,19 mm dicken Gel in vertikaler Richtung aufgetrennt und beim Auslaufen aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Direct-Blotting-Membrane), die in direktem Kontakt im rechten Winkel an den Glasplatten vorbei transportiert wird, übertragen:

- Gießen eines 4 %igen denaturierenden Polyacrylamidgels nach Herstellerangaben
- Vorlauf, 45 min, ohne Proben, zur Temperierung des Gels
- Denaturieren der Proben, 2 min, 90 °C
- Auftragen der Proben
- Probeneinlauf, 10 min
- Gellauf
- Start des Membrantransports (nach ca. 50 min), wenn die Bromphenolblaufront ca. 2 cm von der Gelunterkante entfernt ist
- Membran trocknen lassen
- DNA unter UV-Licht (GATC-LINK) 1 min fixieren

Tabelle 10: Elektrophoresebedingungen und Membrantransport GATC 1500.

Elektrophorese (Einstellungen am Spannungsgeber)	Spannung / V	Stromstärke / mA	Leistung / W	Zeit / min
Vorlauf	1900	19	30	30
Probeneinlauf	500	15	30	10
Gellauf	1900	15	30	180
Blotting				
Membranlänge	40 cm			
Geschwindigkeit	19 cm/h			
Membrantransport				

2.11 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die PCR-Amplifikate wurden in einem Agarosegel (Seakem LE, TAE-Puffer; 6 V/cm; 45 min; Hoefer, RT) aufgetrennt und das zu sequenzierende Fragment aus diesem ausgeschnitten. Nach der Reinigung mit einem QIAquick Gel Extraction Kit wurde die Konzentration des DNA-Fragments mit H_2O_{dd} auf 10 ng/ μ l eingestellt.

Als Sequenzierprimer dienten immer die Primer der dem Produkt zugrundeliegenden PCR.

Die Sequenzierreaktion und deren Analyse wurden als Auftrag an die GATC AG, Konstanz vergeben. In der Regel wurde die Sequenz beider Stränge ermittelt.

2.12 DNA – DNA - Hybridisierungen

2.12.1 Herstellung von DNA-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sonden wurden mit der PCR hergestellt und mit Biotin oder Digoxigenin nicht-radioaktiv markiert.

Für die Biotin-Markierung wurden 5'-Biotin-markierte Primer entsprechend den unmarkierten Primern in die Reaktion eingesetzt.

Für die DIG-Markierung wurde der PCR ELISA, DIG Labeling Kit der Firma Roche nach Herstellervorschrift verwendet.

2.12.2 Hybridisierung membranfixierter DNA

Auf Membranen erfolgte die Hybridisierung von DNA mit DIG- bzw. Biotin- markierten DNA-Sonden im wesentlichen nach dem Protokoll des DIG Nucleic Acid Detection Kit der Firma Roche, Mannheim. Die Inkubation erfolgte unter ständiger Rotation in einem 300 ml-Schraubdeckelgefäß. Die Mengenangaben beziehen sich auf 100 cm² Membranfläche:

- Membran mit 20 ml Hybridisierungslösung prähybridisieren, 68 °C, 1h
- Sonde denaturieren, 95 °C, 5 min
- Membran mit 2,5 ml Hybridisierungslösung und 100 ng Sonde hybridisieren, 68 °C, 12 h
- Membran zweimal waschen mit je 50 ml 2 x SSC / 0,1 % SDS, RT, 5 min
- Membran zweimal waschen mit je 50 ml 0,1 x SSC / 0,1 % SDS, 68 °C, 15 min

2.12.3 Detektion DIG- und Biotin-markierter DNA

Die Detektion von DIG- bzw. Biotin- markierter DNA basierte auf dem Protokoll des DIG Nucleic Acid Detection Kit der Firma Roche, Mannheim. Die Inkubation erfolgte unter ständiger Rotation in einem 300 ml-Schraubdeckelgefäß bei Raumtemperatur. Die Mengenangaben beziehen sich auf 100 cm² Membranfläche. Die Angaben in Klammern gelten für die Direct-Blotting-Membrane, die in einem speziellen Gefäß der Fa. GATC gefärbt wurde:

- Membran mit 100 (150) ml Maleinsäurepuffer waschen, 5 min
- Mit 80 ml 1,5 % Blocking-Puffer (in Maleinsäurepuffer) inkubieren, 45 min
- Alkalische Phosphatase-Konjugat in 20 ml 1,5 % Blocking-Puffer (in Maleinsäurepuffer) verdünnen:
Streptavidin Alkalische Phosphatase-Konjugat: 1:7500
oder Anti-DIG Alkalische Phosphatase-Konjugat, Fab Fragment: 1:5000
- Mit verdünnter Alkalische Phosphatase-Konjugat-Lösung inkubieren, 30 min
- Dreimal waschen mit 100 (150) ml Maleinsäurepuffer, 10 min
- Membran mit 20 (150) ml Reaktionspuffer equilibrieren, 2 (5) min

- Mit 10 (20) ml Färbelösung (Reaktionspuffer mit je 30 µl NBT- und BCIP-Lösung je 10 ml Puffer) inkubieren, bis die gewünschten Banden klar erkennbar sind
- Stoppen der Reaktion durch Waschen mit 100 (150) ml TE-Puffer

2.13 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Theorie

In Agarosegelen erfolgt die Auftrennung von doppelsträngiger DNA ausschließlich nach ihrer Größe. Somit können Sequenzunterschiede zwischen zwei gleich langen DNA-Fragmenten nicht dargestellt werden.

In der SSCP werden DNA-Fragmente nach Hitzedenaturierung (d.h. als Einzelstränge) unter nicht-denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamid-Gel getrennt; die Einzelstränge falten sich dabei entsprechend ihrer DNA-Sequenz. Zusätzlich zur Größe kann so nach der sequenzabhängigen Faltungsform der Einzelstränge unterschieden werden, da unterschiedliche Sequenzen Konformations- und somit Mobilitätsdifferenzen während der Elektrophorese bedingen [Spinardi, 1991].

Durchführung

Die PCR erfolgte unter Standardbedingungen mit 5 ng genomischer DNA in einer 50 µl-Reaktion.

2 µl des PCR-Ansatzes wurden mit 6 µl DISC-Rehydratisierungspuffer und 3 µl Formamid versetzt und 5 min auf 80 °C erhitzt, wodurch die DNA-Fragmente einzelsträngig vorlagen.

Die Proben wurden anschließend im Eisbad abgeschreckt, um eine Rehybridisierung zu verhindern, und unmittelbar auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde unmittelbar nach dem Auftragen der Proben gestartet.

2.14 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Theorie

In der RAPD werden mit Primern, von denen lediglich die Sequenz, nicht deren Bindeort auf der DNA bekannt ist, Fragmente verschiedener Größe und Zahl vervielfältigt. Das Reaktionsgemisch einer RAPD-PCR enthält einen einzigen Primer, der theoretisch an beide Einzelstränge binden kann. RAPD-Primer haben in der Regel eine Länge von 10 Nucleotiden beliebiger Sequenz. Der GC-Gehalt des Primers sollte in etwa dem der zu amplifizierenden DNA entsprechen, da so eine maximale Wahrscheinlichkeit für Sequenzübereinstimmungen, d.h. für Bindestellen des Primers, besteht.

Bindet der Primer an beiden Einzelsträngen der zu untersuchenden DNA in einem Abstand unter 5000 bp, kann ein PCR-Produkt gebildet werden.

Durchführung

5 ng genomischer DNA in einer 50 µl-Reaktion

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsmixes bei der RAPD-PCR.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer	1-fach
dNTP's	200 µM
Primer	900 nM
MgCl ₂	1,5 mM
Taq Polymerase	0,025 U/µl

Tabelle 12: Temperaturprofil der RAPD-PCR.

Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklenzahl
94	2,0	1
94	0,5	
33	0,5	36
72	1,5	
72	5,0	1

2.15 PCR mit δ Element basierten Primern

Theorie

δ Elemente sind direkt wiederholte DNA-Sequenzen von ca. 300 bp Länge, die das TY1 Retrotransposon flankieren. Diese Elemente liegen im Hefegenom in sehr großer Kopienzahl entweder als Teil von TY1 oder isoliert vor, wobei sie in bestimmten genomischen Regionen konzentriert vorkommen [Ness, F. 1993]. Die hier verwendete Methode basiert im wesentlichen auf Ness, F. (1993). Hierbei werden mit Primern, die ihre Bindestellen auf den δ Elementen haben, DNA-Bereiche vervielfältigt, die sich zwischen zwei δ Elementen befinden. Je nachdem wie viele - und in welchem Abstand zueinander- δ Elemente im Genom eines Hefestammes vorkommen, werden Fragmente verschiedener Anzahl und Größe amplifiziert. Im Gegensatz zu Ness wurde hier mit nur einem Primer anstelle von zweien gearbeitet, so dass theoretisch nur Abschnitte, die zwischen einem auf dem Watson- und einem auf dem Crick-Strang kodierten δ Element liegen, amplifiziert werden.

Durchführung

5 ng genomischer DNA in einer 50 μ l-Reaktion

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsmixes bei der PCR mit δ Element basierten Primern.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer	1-fach
dNTP's	200 μ M
Primer	900 nM
MgCl ₂	1,5 mM
Taq Polymerase	0,025 U/ μ l

Tabelle 14: Temperaturprofil PCR mit δ Element basierten Primern.

Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklenzahl
94	2,0	1
94	0,5	
50	0,5	36
72	1,5	
72	5,0	1

2.16 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Theorie

Die AFLP ist eine Technik, die, 1995 von Vos, P. entwickelt, im wesentlichen aus drei Schritten besteht:

- Restriktionsverdau von DNA mit zwei verschiedenen Enzymen und Ligation von restriktionsstellenspezifischen Adaptern
- Amplifikation einer Teilmenge der Fragmente mit auf den Adaptersequenzen basierenden Primern
- Auftrennung der Amplifikate in einem hochauflösenden (Sequenzier-) Gel

Als Restriktionsenzyme werden ein selten schneidendes Enzym (hier EcoR I mit einer Erkennungssequenzlänge von 6bp) und ein häufig schneidendes Enzym (hier Mse I mit einer Erkennungssequenzlänge von 4bp) verwendet. Auf diese Weise liegen nach der Ligation der Adapter drei Fragmenttypen vor: Fragmente mit Eco-Adaptoren auf beiden Seiten (Eco-Eco), Fragmente mit Mse-Adaptoren auf beiden Seiten (Mse-Mse) und Fragmente mit zwei unterschiedlichen Adaptern an jedem Ende (Eco-Mse).

Die Fragmenttypen lassen sich unterschiedlich gut vervielfältigen: Eco-Eco-Fragmente sind gegenüber den anderen vor allem aufgrund ihrer Länge, Mse-Mse-Fragmente wahrscheinlich aufgrund eines Stem-Loops, der wegen des invertierten Repeats der Primerbindestelle entsteht, schlechter amplifizierbar. Bevorzugt gebildet werden PCR-Produkte mit zwei unterschiedlichen Primerbindestellen, so dass letztendlich nur ein relativ kleiner Teil der Restriktionsfragmente vervielfältigt wird.

Die Primer bestehen aus einem zum Adapter komplementären Teil, einem zur Erkennungssequenz des Enzyms komplementären Abschnitt sowie aus 1 bis 3 weiteren Nucleotiden am 3'-Ende, die in den unbekanntem Teil des Restriktionsfragments ragen. Durch die Anzahl der zusätzlichen Nucleotide kann die Zahl der vervielfältigten Fragmente beeinflusst werden, so dass die Methode grundsätzlich für Genome unterschiedlicher Größe und Komplexität verwendet werden kann. Zur späteren Detektion der AFLP-Produkte ist einer der beiden Primer markiert. In Abhängigkeit vom verwendeten Gerät kann die Markierung mit Radionucleotiden, Fluoreszenzfarbstoffen, Biotin oder Digoxigenin erfolgen.

Durchführung

Restriktion und Ligation (ReLi)

- Restriktionsverdau von 500 ng Hefe-DNA mit jeweils 5 U EcoR I und Mse I, Reaktionsvolumen: 30 µl, Reaktionspuffer: Mse I, 37 °C, 5 h
- Zugabe von 10 µl Adapter-Mix (vgl. Tabelle 15)
- Inkubation 20 °C, 10 h

Tabelle 15: Zusammensetzung Adaptermix. Ad: Adapter (vgl. Tabelle 2).

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer Mse I	1-fach
Ad E 1	0,5 µM
Ad E 2	0,5 µM
Ad M 1	5,0 µM
Ad M 2	5,0 µM
ATP	1 mM
T4 DNA-Ligase	1 U

Pre-Amplifikation (Pre)

- Verdünnung ReLi 1:5 mit H₂O_{dd}
- 5 µl in eine 20µl-Reaktion einsetzen
-

Tabelle 16: Zusammensetzung Reaktionsmix Pre-Amplifikation.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer	1-fach
dNTP's	200 µM
EcoR I-Primer	300 nM
Mse I-Primer	300 nM
MgCl ₂	1,5 mM
Taq Polymerase	0,025 U/µl

Tabelle 17: Temperaturprofil Pre-Amplifikation.

Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklenzahl
94	0,5	
56	1,0	20
72	1,0	

Amplifikation (Amp)

- Verdünnung Pre 1:10 mit H₂O_{dd}
- 5 µl in eine 20µl-Reaktion einsetzen

Tabelle 18: Zusammensetzung Reaktionsmix Amplifikation.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer	1-fach
dNTP's	200 µM
EcoR I-Primer (markiert)	100 nM
Mse I-Primer	300 nM
MgCl ₂	1,5 mM
Taq Polymerase	0,025 U/µl

Tabelle 19: Temperaturprofil Amplifikation.

Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklenzahl
94	0,5	
65 – 0,7/Zyklus	0,5	13
72	1,0	
94	0,5	
56	0,5	23
72	1,0	

Elektrophorese

- Zugabe eines gleichen Volumens Sequenzier-Gelladepuffer zum Reaktionsmix
- Elektrophorese und Detektion der Fragmente wie unter 2.10.3.2 und 2.12.3

2.17 Mikrosatelliten Analyse

Innerhalb eines Genoms sich unmittelbar in hoher Zahl wiederholende Mono-, Di-, Tri- oder Tetra-Nukleotidmotive werden als Mikrosatelliten bezeichnet. Die Zahl der Wiederholungen innerhalb eines Satelliten und damit seine Länge kann zwischen einzelnen Hefestämmen variieren. Wird mit Primern, die einen Satelliten flankieren, dieser in einer PCR amplifiziert, können diese Längenvariationen aufgezeigt werden. Die Informationen über die Sequenzen der flankierenden Regionen für die Konstruktion der Primer können beispielsweise, sofern diese für den zu

analysierenden Organismus vorhanden sind, aus Datenbanken gewonnen werden. Alternativ müssen solche Genorte von der DNA des Zielorganismus isoliert werden.

2.17.1 Mikrosatellitenloci aus DNA-Datenbanken

Mit dem Programm PatMatch wurde die Saccharomyces Genome Database (SGD) [Cherry, J. M. 1999] nach Di- und Tri-Nukleotidmotiven durchsucht.

Für Wiederholungen >10 bei Tri- und >15 bei Di-Nukleotidmotiven wurden aus den unmittelbar angrenzenden DNA-Bereichen Primer abgeleitet.

2.17.2 Isolierung von variablen Mikrosatellitenloci

Die Isolierung von Mikrosatellitenloci wurde nach einem auf der von Refseth 1997 beschriebenen Methode basierenden Protokoll durchgeführt. Hierbei werden mit PCR-Adaptoren versehene Restriktionsfragmente mit Biotin-markierten Oligonukleotiden, deren Sequenz dem gesuchten Mikrosatelliten entspricht, hybridisiert. Diese so markierten Fragmente werden mittels Streptavidin beschichteter Magnetpartikel aus dem Gemisch gefischt und in einer PCR vervielfältigt. Die PCR-Produkte werden kloniert und weiter analysiert. Im Unterschied zur beschriebenen Methode wurde anstelle des Restriktionsverdau eine AFLP-Preamplifikation verwendet und die Produkte der abschließenden PCR nicht kloniert, sondern in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, um so direkt variable Loci isolieren zu können.

- 10 µl Dynabeads (M-280 Streptavidin) waschen mit 100 µl B&W-Puffer
- Inkubieren in 100 µl PBS-Puffer, 10 min, RT
- Waschen mit 6x SSC-Puffer, 3 mal
- Konzentrierung von fünf vereinigten 20 µl Preamplifikationsreaktionen (siehe 2.16) entsprechend 2.8.5
- Aufnehmen des Pellets in 50 µl H₂O_{dd}
- Zugabe von 20 µl 5´-Biotin markiertem Oligonukleotid (10 ng/µl)
- Zugabe von 30 µl SSC
- Inkubieren, 10 min, 95 °C

- Inkubieren, 60 min, 40 °C
- Zugabe zu vorbehandelten Dynabeads (s.o.)
- Inkubieren, 15 min, RT
- Waschen mit 2x SSC, 3 mal
- Waschen mit 1x SSC, 3 mal
- Eluieren mit 50 µl H₂O, 5 min, 90 °C, 2 mal
- Eluat in PCR einsetzen

2.18 Subtraktive Hybridisierung

Theorie

Ziel einer subtraktiven Hybridisierung ist die Isolierung von DNA Bereichen, die Sequenzunterschiede zwischen zwei DNA-Fragmentmengen unterschiedlicher Herkunft (beispielsweise genomische DNA zweier Bakterien- oder Hefestämme oder auch cDNAs aus unterschiedlichen menschlichen Gewebstypen) aufweisen.

Die DNAs werden in der Regel mit Restriktionsenzymen geschnitten und miteinander hybridisiert. Die Fragmentmenge, die gegenüber der anderen einzigartige DNA-Sequenzbereiche aufweisen soll, wird hier im weiteren entsprechend Lisitsyn (1993) als Tester bezeichnet, die andere als Driver. Der Driver ist in der Regel im Überschuss gegenüber dem Tester in der Reaktion vorhanden, um sicherzustellen, dass Testermoleküle bevorzugt mit Drivermolekülen hybridisieren, wenn Sequenzhomologien vorhanden sind. Nach der Hybridisierung liegen fünf verschiedene Hybridtypen vor: Driver-Driver, Driver-Tester, Tester-Tester, Driver_{einzelsträngig} und Tester_{einzelsträngig}.

Die Tester-Tester und Tester_{einzelsträngig} enthalten die Fragmente, die einzigartig für die Tester-Repräsentation (Repräsentation: Die Teilmenge der Restriktionsfragmente, die in einer PCR amplifizierbar sind) sind. Um diese zu isolieren, müssen die anderen Typen so beschaffen sein, dass sie entweder aus dem Gemisch entfernt werden können oder auf andere Weise nicht mehr für weitere Schritte zugänglich sind.

Der Großteil der beschriebenen Anwendungen für die Methode basiert auf der PCR: Die DNA wird mit Restriktionsendonucleasen verdaut, an die entstehenden

Fragmente Primerbindestellen ligiert und die Fragmente anschließend mit der PCR vervielfältigt.

Die beiden Fragmentmengen werden miteinander hybridisiert und danach erneut in eine PCR eingesetzt, in der nurmehr die Tester spezifischen Fragmente vervielfältigt werden. In einem Teil der beschriebenen Anwendungen wird hierzu der Driver mit Biotin markiert, so dass mit Hilfe von Streptavidin-beschichteten Partikeln Driver-haltige Hybride aus dem Gemisch entfernt werden können. Im anderen Teil werden die Adapter des Drivers vor der Hybridisierung durch Restriktionsverdau wieder entfernt, so dass nur reine Tester-Tester in der anschließenden PCR vervielfältigt werden können.

In der hier entwickelten Methode war der Driver uracilhaltig, so dass er mit Uracil-N-Glycosilase / T4 Endonuclease V verdaut werden konnte. Auf diese Weise wurden alle Driver-Moleküle stark fragmentiert. Die so aus den Driver-Tester-Fragmenten entstehenden Tester_{einzelsträngig} sowie alle anderen einzelsträngigen DNA-Moleküle wurden mit einer Mung Bean Nuclease verdaut, so dass nur noch Tester-Tester-Fragmente übrig blieben.

Durchführung

Restriktion und Ligation (ReLi)

- Restriktionsverdau von 500 ng Hefe-DNA mit jeweils 5 U EcoR I und Mse I, Reaktionsvolumen: 30 µl, Reaktionspuffer: Mse I, 37 °C, 5 h
- Zugabe von 10 µl Adapter-Mix (vgl. Tabelle 20)
- Inkubation 20 °C, 10 h

Tabelle 20: Zusammensetzung Adaptermix (vgl. Tabelle 2).

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer Mse I	1-fach
Ad E 1	0,5 µM
Ad E 2	0,5 µM
Ad M 1	5,0 µM
Ad M 2	5,0 µM
ATP	1 mM
T4 DNA-Ligase	1 U

Pre-Amplifikation (Pre)

- Verdünnung ReLi 1:5 mit H₂O_{dd}
- 5 µl in eine 50 µl-Reaktion einsetzen

Tabelle 21: Zusammensetzung Reaktionsmix Pre-Amplifikation.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer	1-fach
dATP, dCTP, dGTP	200 µM
dUTP	600 µM
EcoR I-Primer	300 nM
Mse I-Primer	300 nM
MgCl ₂	2,5 mM
Taq Polymerase	0,025 U/µl

Tabelle 22: Temperaturprofil Pre-Amplifikation.

Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklenzahl
94	0,5	
56	1,0	20
72	1,0	

Amplifikation (Amp)

- Verdünnung Pre 1:10 mit H₂O_{dd}
- 5 µl in eine 50 µl-Reaktion einsetzen; 16 Driver-, 2 Tester-Reaktionen

Tabelle 23: Zusammensetzung Reaktionsmix Amplifikation.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix	
	<i>Driver</i>	<i>Tester</i>
Reaktionspuffer	1-fach	1-fach
dATP, dCTP, dGTP	200 µM	200 µM
dTTP	/	200 µM
dUTP	600 µM	/
EcoR I-Primer	300 nM	300 nM
Mse I-Primer	300 nM	300 nM
MgCl ₂	2,5 mM	1,5 mM
Taq Polymerase	0,025 U/µl	0,025 U/µl

Tabelle 24: Temperaturprofil Amplifikation.

Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklenzahl
94	0,5	
56	0,5	36
72	1,0	

- Vereinigung und Konzentrierung der Driver-Reaktionen entsprechend 2.8.5 und Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Elution in 100 µl 0,3x Puffer EB (Puffer EB im Kit enthalten))
- Vereinigung und Reinigung der Tester-Reaktionen mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Elution in 50 µl 0,3x Puffer EB (Puffer EB im Kit enthalten))
- 25 µl Driver und 10 µl Tester in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß mischen, im Speed Vac Concentrator trocknen
- Aufnehmen in 4 µl 1x SH-Hybridisierungspuffer und überführen in ein 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäß
- Lösung mit 10 µl Mineralöl überschichten und 5 min bei 100 °C in einem Thermocycler (PTC 100) inkubieren
- Wässrige Phase mit 1 µl 5 M NaCl mischen und das Reaktionsgefäß weitere 3 min bei 100 °C inkubieren
- Abkühlen auf 68 °C innerhalb 30 min
- Inkubieren, 68 °C, 36 h
- Zugabe von 45 µl H₂O und 50 µl 2x EU-Lösung
- Inkubieren, 37 °C, 8 h
- Inkubieren, 65 °C, 15 min
- Extrahieren mit 100 µl Phenol-CIA und CIA (Überkopfschütteln, 5 min; zentrifugieren, 5 min, 13 000 g)
- Konzentrierung der Reaktion entsprechend 2.8.5, Aufnehmen in 60 µl H₂O_{dd}
- Verteilen von vier 6 µl-Aliquots und Zugabe von je 3µl 3x Mung-Puffer mit 2,5 U, 5,0 U, 10,0 U und 20,0 U Mung Bean Nuclease
- Inkubieren bei 37 °C, 30 min
- Inkubieren bei 90 °C, 10 min
- Reaktionen 1:10 verdünnen
- Je 5 µl in eine 50 µl-PCR einsetzen

Tabelle 25: Zusammensetzung Reaktionsmix PCR nach Mung Bean Nuclease Verdau.

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
Reaktionspuffer	1-fach
dNTP's	200 μ M
EcoR I-Primer	300 nM
Mse I-Primer	300 nM
MgCl ₂	1,5 mM
Taq Polymerase	0,025 U/ μ l

Tabelle 26: Temperaturprofil PCR nach Mung Bean Nuclease Verdau.

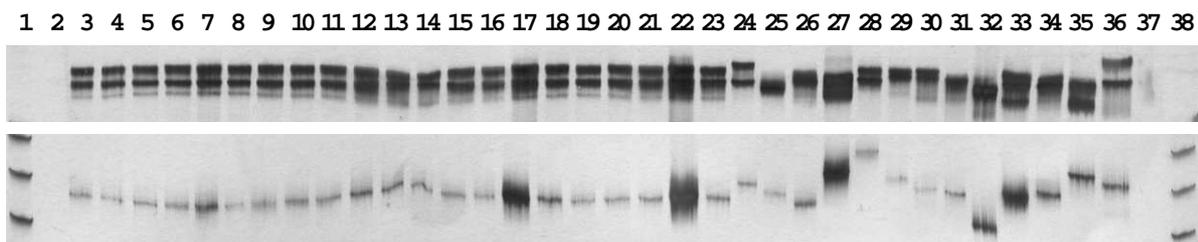
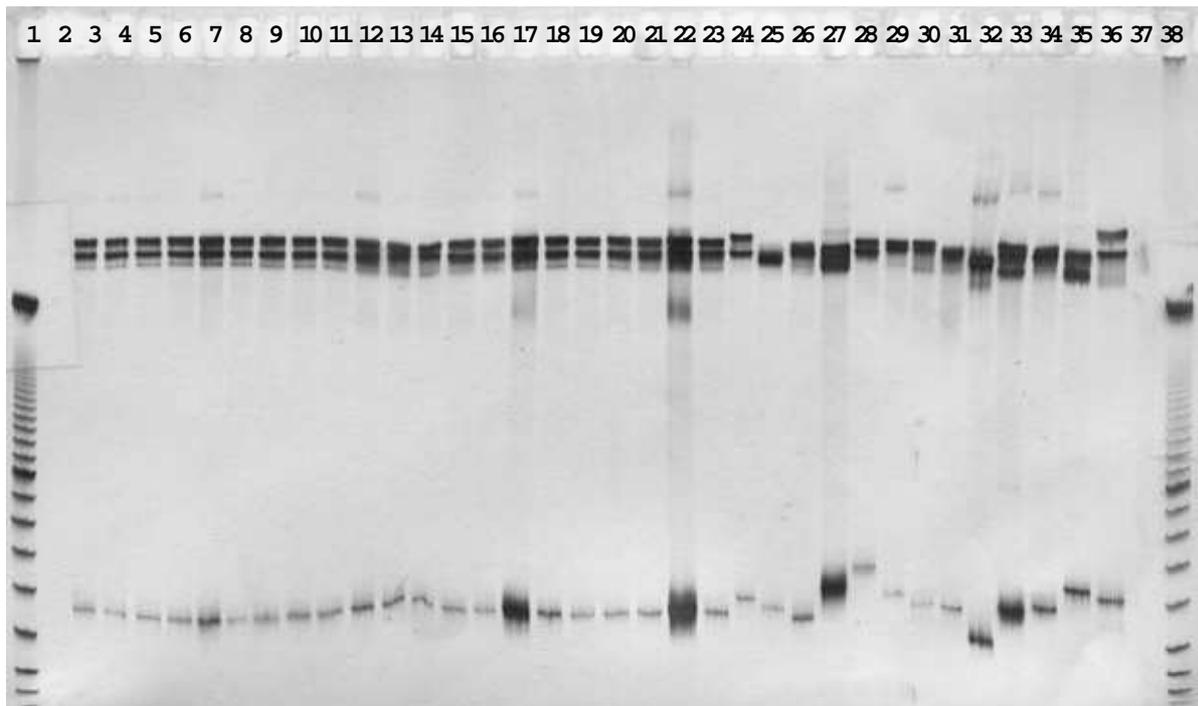
Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklenzahl
94	0,5	
56	0,5	40
72	1,0	

3 Ergebnisse

3.1 SSCP-Analyse ribosomaler DNA

Die DNAs von *S. cerevisiae*-Brauereihefestämmen sowie von einigen Nicht-Kulturhefen wurden in eine PCR mit den Primern H550/H1200, die ihre Bindestellen auf hoch konservierten Bereichen des 18s rRNA-Genes haben, eingesetzt. Für alle Stämme wurde ein PCR-Produkt der Größe 650 bp gebildet, das zwei variable Bereiche des Genes beinhaltet [James, S. A. 1994; Ando, S. 1996]. Aliquots der Reaktionen wurden denaturiert und unter nicht-denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (vgl. 2.13 und 2.10.2). In Abbildung 1 zeigt das obere Bild das gesamte Gel. Die Bereiche der Einzelstrang-Banden und der Bereich mit den Doppelstrang-Banden sind im mittleren bzw. unteren Bild nochmals direkt untereinander dargestellt.

Für alle *S. cerevisiae*-Stämme (Spuren 3 bis 22) war ein einheitliches Laufverhalten sowohl der Einzelstränge, die in der oberen Gelhälfte zumeist als Doppelbanden zu sehen sind, als auch für die doppelsträngigen DNA-Moleküle in der unteren Gelhälfte zu beobachten. Die Bandenmuster (Einzelstränge und Doppelstränge zusammen betrachtet) der anderen Hefestämme waren unterschiedlich sowohl zu dem *S. cerevisiae*-Muster als auch untereinander. In vielen Fällen war eine Unterscheidung aufgrund des Laufverhalten der Einzelstränge möglich. Da offensichtlich unter den verwendeten Laufbedingungen auch die doppelsträngigen PCR-Produkte nicht ausschließlich aufgrund ihrer Länge getrennt wurden, konnten auch diese für die Differenzierung verwendet werden.



Spur 1	100 bp-Leiter	Spur 14	34/78	Spur 27	Saccharomyces ludwigii
Spur 2	/	Spur 15	26	Spur 28	Zygosaccharomyces bailii DSM 70834
Spur 3	34/70	Spur 16	54	Spur 29	Zygosaccharomyces rouxii DSM 2531
Spur 4	66	Spur 17	168	Spur 30	Debaromyces hansenii
Spur 5	128	Spur 18	Laureiro	Spur 31	Candida tropicalis CBS 2317
Spur 6	148	Spur 19	Eperney	Spur 32	Rhodotorula rubra DSM 70403
Spur 7	68	Spur 20	S. c. ellipsoideus DSM 70451	Spur 33	Hansenula anomala DSM 70263
Spur 8	175	Spur 21	W 4	Spur 34	Pichia membranaefaciens
Spur 9	177	Spur 22	R II	Spur 35	Kloek. apiculata DSM 70285
Spur 10	120	Spur 23	S. c. diastaticus	Spur 36	Brett. bruxellensis DSM70726
Spur 11	184	Spur 24	S. exiguus	Spur 37	/
Spur 12	194	Spur 25	Schizosaccharomyces pombe DSM 70576	Spur 38	100 bp-Leiter
Spur 13	69	Spur 26	S. uvarum beijerinck		

Abbildung 1: SSCP-Analyse von PCR-Produkten mit Primerpaar H550 / H1200, Silberfärbung.

3.2 RAPD

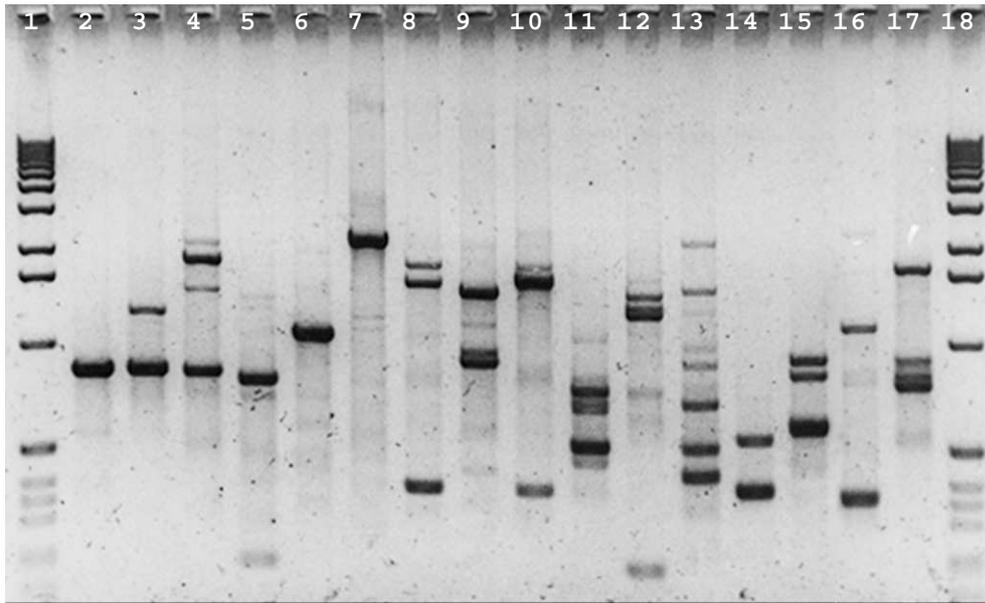
In Vorversuchen wurden als Primer insgesamt 58 10mere an einem Set von *Saccharomyces*- und Nicht-*Saccharomyces*-Hefen getestet. Von diesen waren letztendlich fünf für weitere Versuche geeignet. Mit den anderen Primern wurden entweder keine PCR-Produkte gebildet oder es entstanden sehr komplexe Bandenmuster, die in der Versuchwiederholung nicht reproduzierbar waren. Die weitere Auswahl der Primer erfolgte unter dem Gesichtspunkt, dass zumindest die beiden obergärigen Stämme 68 und 148 voneinander unterschieden werden konnten.

Bei der Optimierung der Parameter wie Konzentration der Komponenten im Reaktionsmix und Temperaturprofil der PCR ergab sich, dass bei Annealingtemperaturen bis zu 39 °C oder auch bei der Verwendung von komplizierteren Temperaturprofilen (z.B. Touchdown) kaum Veränderungen in den Bandenmustern entstanden, so dass im Folgenden mit einem Standardprofil mit 33 °C Annealingtemperatur gearbeitet wurde.

Trotz konstanter Versuchsbedingungen waren auch bei den im weiteren verwendeten Primern die Bandenmuster in verschiedenen PCR-Ansätzen nicht immer vollständig reproduzierbar. Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines PCR-Ansatzes war dagegen gut.

Abbildung 2 und Abbildung 3 zeigen die PCR-Produkte von Hefe-DNAs verschiedener *Saccharomyces*- und Nicht-*Saccharomyces*-Arten mit den Primern R 360-6 und R D-02.

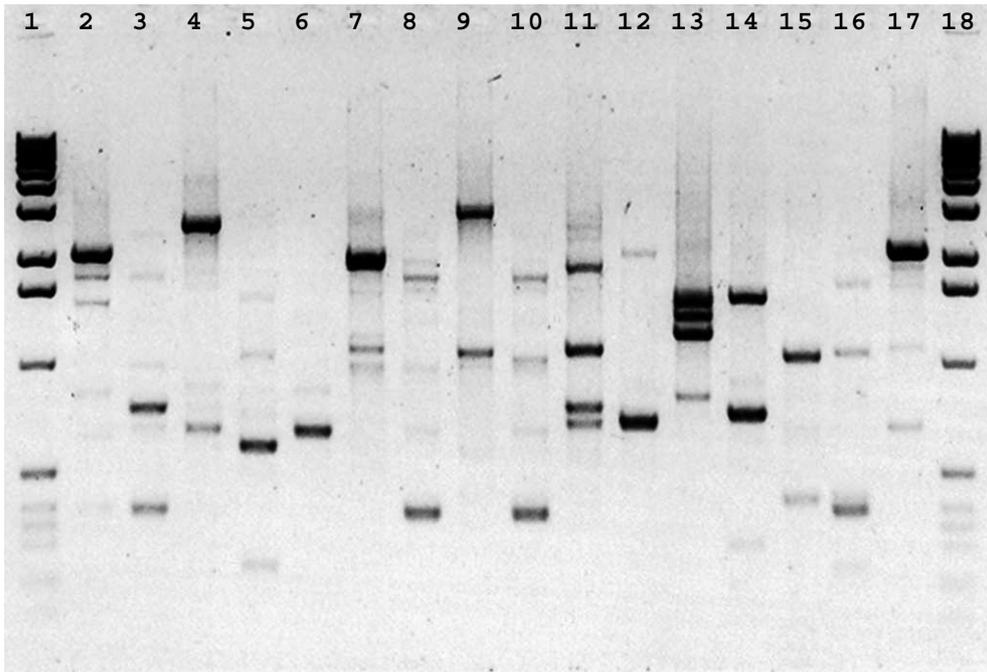
Alle untersuchten Hefen zeigten unterschiedliche Bandenmuster.



Spur 1	1 kbp-Leiter	Spur 10	<i>S. c. ellipsoideus</i>
Spur 2	34	Spur 11	<i>Candida tropicalis</i>
Spur 3	68	Spur 12	<i>Rhodotorula rubra</i>
Spur 4	<i>B. bruxellensis</i>	Spur 13	<i>Hansenula anomala</i>
Spur 5	<i>K. apiculata</i>	Spur 14	<i>S. uvarum beijerinck</i>
Spur 6	<i>Z. bailii</i>	Spur 15	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
Spur 7	<i>Z. rouxii</i>	Spur 16	<i>Pichia membranefaciens</i>
Spur 8	<i>S. c. diastaticus</i>	Spur 17	<i>Debaromyces hansenii</i>
Spur 9	<i>S. exiguus</i>	Spur 18	1 kbp-Leiter

Abbildung 2: PCR-Produkte von Fremdhefen mit Primer R-360 6.

Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 3 h; GNA, 8 °C.



Spur 1	1 kbp-Leiter	Spur 10	<i>S. c. ellipsoideus</i>
Spur 2	34	Spur 11	<i>Candida tropicalis</i>
Spur 3	68	Spur 12	<i>Rhodotorula rubra</i>
Spur 4	<i>B. bruxellensis</i>	Spur 13	<i>Hansenula anomala</i>
Spur 5	<i>K. apiculata</i>	Spur 14	<i>S. uvarum beijerinck</i>
Spur 6	<i>Z. bailii</i>	Spur 15	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
Spur 7	<i>Z. rouxii</i>	Spur 16	<i>Pichia membranefaciens</i>
Spur 8	<i>S. c. diastaticus</i>	Spur 17	<i>Debaromyces hansenii</i>
Spur 9	<i>S. exiguus</i>	Spur 18	1 kbp-Leiter

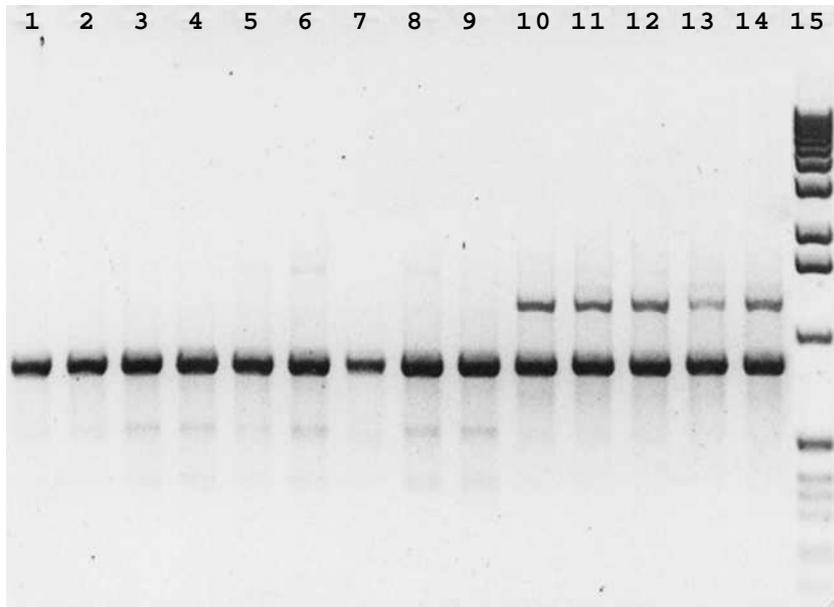
Abbildung 3: PCR-Produkte von Fremdhefen mit Primer R-D 02.
 Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 3 h; GNA, 8 °C.

Wie bereits erwähnt, waren bei einer Versuchswiederholung oft nicht alle und nicht immer die stärker ausgeprägten Banden reproduzierbar, so dass nur die zuverlässigsten PCR-Produkte zur Orientierung in Tabelle 27 angegeben sind.

Tabelle 27: Reproduzierbare PCR-Produkte (Länge in bp) für RAPD-Primer zur Unterscheidung von Hefearten.

Hefestamm	Primer	
	R 360-6	R D-02
34	800	1500 / 1800 / 2100
68	800 / 1100	800 / 1800 / 2600
<i>B. bruxellensis</i>	800 / 1800	2900
<i>K. apiculata</i>	220 / 750	690
<i>Z. bailii</i>	1050	720
<i>Z. rouxii</i>	2050	2000
<i>S. c. diastaticus</i>	370 / 1600 / 1700	400 / 1800
<i>S. exiguus</i>	900 / 950 / 1500	1050 / 3000
<i>S. c. ellipsoideus</i>	370 / 1600 / 1680	400 / 1800
<i>Candida tropicalis</i>	500 / 650	800 / 1050 / 1800
<i>Rhodotorula rubra</i>	200 / 1200 / 1250	750
<i>Hansenula anomala</i>	400 / 500 / 600	1300 / 1400 / 1500
<i>S. uvarum</i> beijerinck	370 / 550	800 / 1550
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	570 / 800	1050
<i>Pichia membranefaciens</i>	360 / 1050	400 / 1100
<i>Debaromyces hansenii</i>	650 / 1650	2100

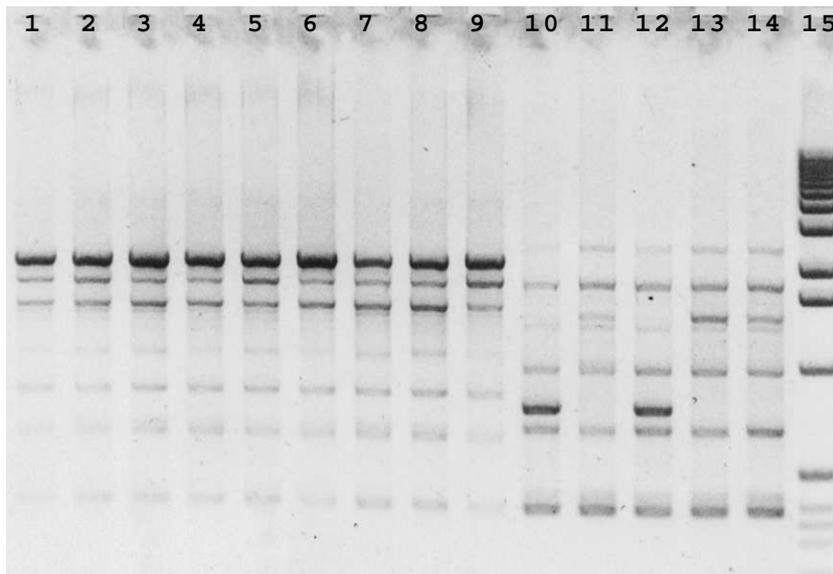
Mit denselben Primern wurde eine Auswahl an unter- und obergärigen Hefestämmen untersucht.



Spur 1	34	Spur 9	85
Spur 2	26	Spur 10	68
Spur 3	44	Spur 11	148
Spur 4	59	Spur 12	127
Spur 5	120	Spur 13	184
Spur 6	66	Spur 14	177
Spur 7	69	Spur 15	1 kbp-Leiter
Spur 8	71		

Abbildung 4: PCR-Produkte von Kulturhefen mit Primer R-360 6.
 Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 3 h; GNA, 8 °C.

Mit dem Primer R 360-6 wurde sowohl für die ober- als auch für untergärigen Stämme ein 800 bp-Fragment amplifiziert. Die obergärigen Stämme wiesen zusätzlich eine 1100 bp-Bande auf



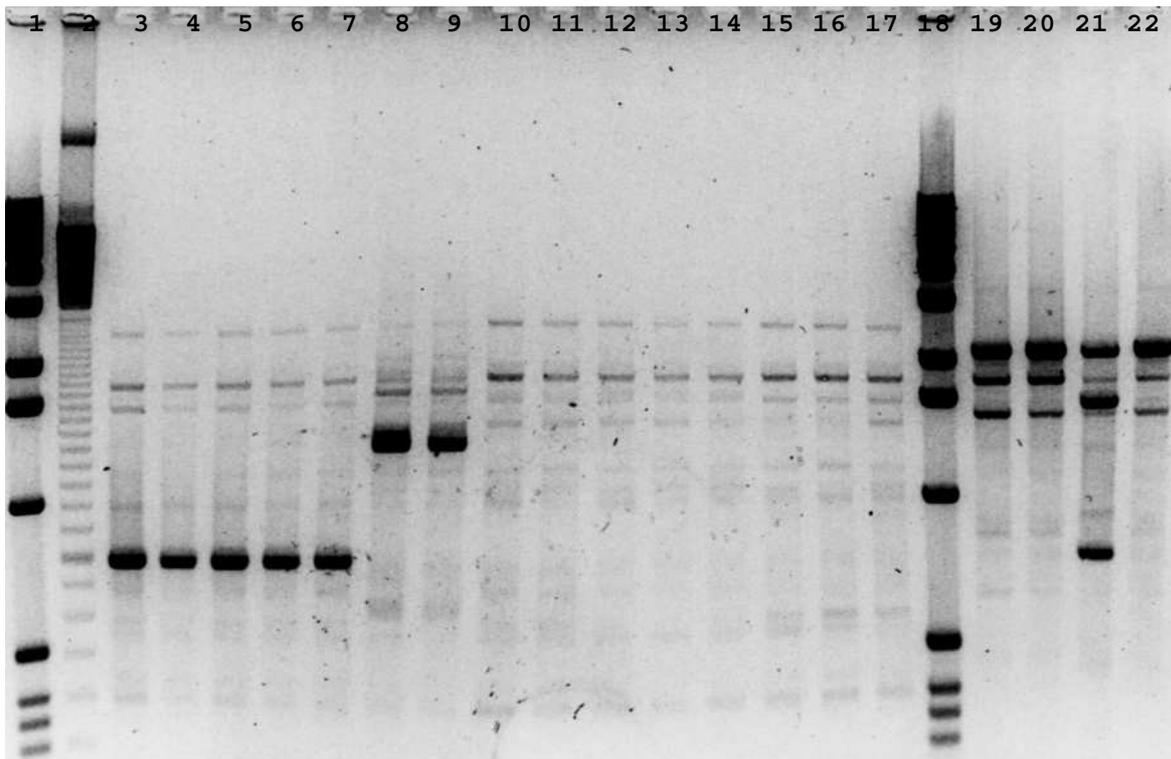
Spur 1	34	Spur 9	85
Spur 2	26	Spur 10	68
Spur 3	44	Spur 11	148
Spur 4	59	Spur 12	127
Spur 5	120	Spur 13	184
Spur 6	66	Spur 14	177
Spur 7	69	Spur 15	1 kbp-Leiter
Spur 8	71		

Abbildung 5: PCR-Produkte von Kulturhefen mit Primer R-D 02.

Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 3 h; GNA, 8 °C.

Mit dem Primer R D 02 zeigten alle Stämme ein etwas komplexeres Bandenmuster. Die untergärigen Stämme reagierten als einheitliche Gruppe; bei den obergärigen Hefen konnten die Stämme 68 und 127 (Spuren 10 und 12, Abbildung 5) von den übrigen durch ein zusätzliches 800 bp-Produkt unterschieden werden.

In einem weiteren Versuch wurden zusätzliche Kulturhefe-Stämme, zwei *S. pastorianus*-Stämme und ein *S. bayanus* in einer PCR mit dem Primer R D02 analysiert. Abbildung 6 zeigt die PCR-Produkte dieser Hefen mit Primer R-D02.



Spur 1	1 kbp-Leiter	Spur 9	165	Spur 17	213
Spur 2	100bp-Leiter	Spur 10	148	Spur 18	1 kbp-Leiter
Spur 3	68	Spur 11	184	Spur 19	<i>S. pastorianus</i> DSM 6581
Spur 4	127	Spur 12	174	Spur 20	<i>S. pastorianus</i> DSM 6580
Spur 5	149	Spur 13	177	Spur 21	<i>S. bayanus</i> DSM 70412
Spur 6	205	Spur 14	208	Spur 22	34
Spur 7	212	Spur 15	210		
Spur 8	141	Spur 16	211		

Abbildung 6: PCR-Produkte von Hefe-DNA mit Primer R-D02.

Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 3 h; GNA, 8 °C.

Auffällig in Abbildung 6 ist, dass im Vergleich zum vorhergehenden Versuch einige PCR-Produkte zugunsten eines oder zweier sehr effizient amplifizierter Fragmente schlecht oder nicht mehr gebildet wurden. Alle untersuchten obergärigen Stämme unterschieden sich deutlich vom Stamm 34. Sie ließen sich aufgrund der Bandenmuster mit Primer R D 02 in drei Gruppen einteilen.

Für den untergärigen Stamm 34 sowie die beiden *S. pastorianus*-Stämme wurden Produkte gleicher Länge nachgewiesen. Der *S. bayanus*-Stamm unterschied sich von diesen Stämmen durch zwei zusätzliche Fragmente der Größe 800 und 1600 bp.

Die Tabelle 28 verschafft einen Überblick über die Möglichkeiten der Gruppeneinteilung der analysierten Hefen mit dem Primer R D-02.

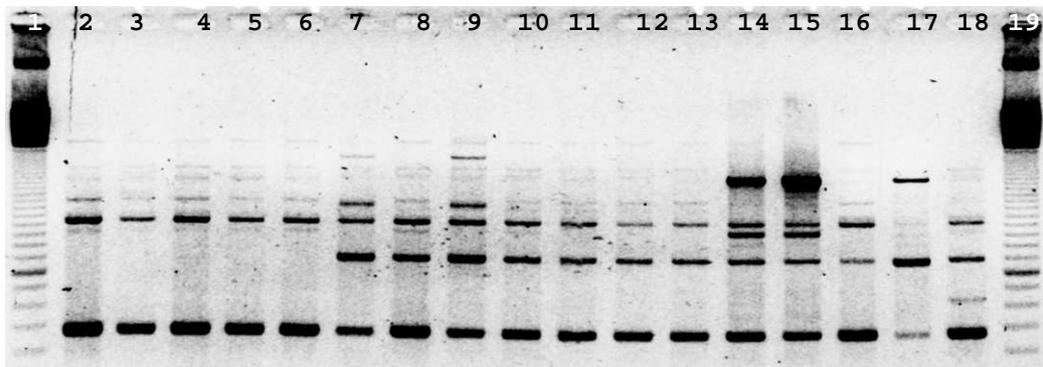
Tabelle 28: Reproduzierbare Banden für (Kultur-) Hefen mit Primer R D-02.
1: Bande, 0: keine Bande; A: Alt, K: Kölsch, WB: Weißbier.

			Fragmentgröße in bp							
	Stamm	Gruppe	800	1400	1500	1600	1700	1800	2100	2600
WB	68	1	1	0	0	(1)	0	1	0	1
WB	127	1	1	0	0	(1)	0	1	0	1
WB	149	1	1	0	0	(1)	0	1	0	1
WB	205	1	1	0	0	(1)	0	1	0	1
WB	212	1	1	0	0	(1)	0	1	0	1
A / K	141	2	0	1	0	0	1	1	0	1
A	148	3	0	0	0	(1)	0	1	0	1
A / K	165	2	0	1	0	0	1	1	0	1
A	184	3	0	0	0	(1)	0	1	0	1
A	174	3	0	0	0	(1)	0	1	0	1
A / K	177	3	0	0	0	(1)	0	1	0	1
A	208	3	0	0	0	(1)	0	1	0	1
A / Ale	210	3	0	0	0	(1)	0	1	0	1
A / Ale	211	3	0	0	0	(1)	0	1	0	1
A / Ale	213	3	0	0	0	(1)	0	1	0	1
DSM 6581	<i>S. pastorianus</i>	4	0	0	1	0	0	1	1	0
DSM 6580	<i>S. pastorianus</i>	4	0	0	1	0	0	1	1	0
DSM 70412	<i>S. bayanus</i>	5	1	0		1	0	1	1	0
	34	4	0	0	1	0	0	1	1	0

3.3 PCR mit δ Element basierten Primern

In einer PCR mit dem Primer LTR 01 r, der seine Bindestelle auf dem δ Element von *S. cerevisiae* hat, wurden alle ober- und untergärigen Brauhefen sowie einige weitere *Saccharomyces*-Hefen untersucht.

In Abbildung 7 sind die PCR-Produkte der obergärigen Bierhefen und die des untergärigen Stammes 34 dargestellt.



Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	148	Spur 15	211
Spur 2	68	Spur 9	165	Spur 16	213
Spur 3	127	Spur 10	184	Spur 17	Ale CT
Spur 4	149	Spur 11	174	Spur 18	34
Spur 5	205	Spur 12	177	Spur 19	100bp-Leiter
Spur 6	212	Spur 13	208		
Spur 7	141	Spur 14	210		

Abbildung 7: PCR-Produkte obergäriger Bierhefen mit Primer LTR 01 r.

Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 2 h; GNA, 8 °C.

Die obergärigen Hefen ließen sich anhand der Bandenmuster in vier Gruppen unterteilen. Alle Hefestämme wiesen zwei gemeinsame Banden auf. Der untergärige Stamm 34 unterscheidet sich von den obergärigen durch eine zusätzliche Bande mit 620 bp Länge.

In Abbildung 8 sind die PCR-Produkte der untergärigen Bierhefen sowie die der weiteren untersuchten *Saccharomyces*-Hefen zu sehen.

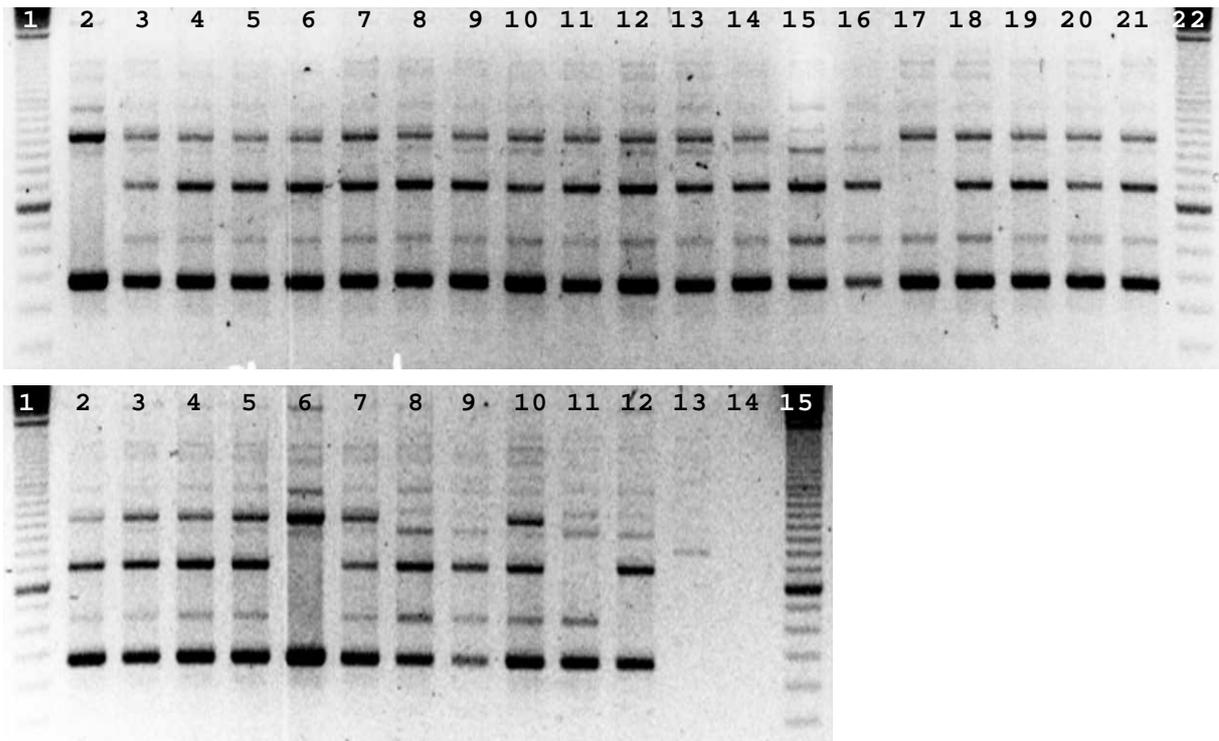


Bild oben

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 9	69	Spur 17	70
Spur 2	68	Spur 10	71	Spur 18	114
Spur 3	34	Spur 11	85	Spur 19	88
Spur 4	26	Spur 12	166	Spur 20	107
Spur 5	44	Spur 13	167	Spur 21	178
Spur 6	59	Spur 14	128	Spur 22	100bp-Leiter
Spur 7	120	Spur 15	155		
Spur 8	66	Spur 16	170		

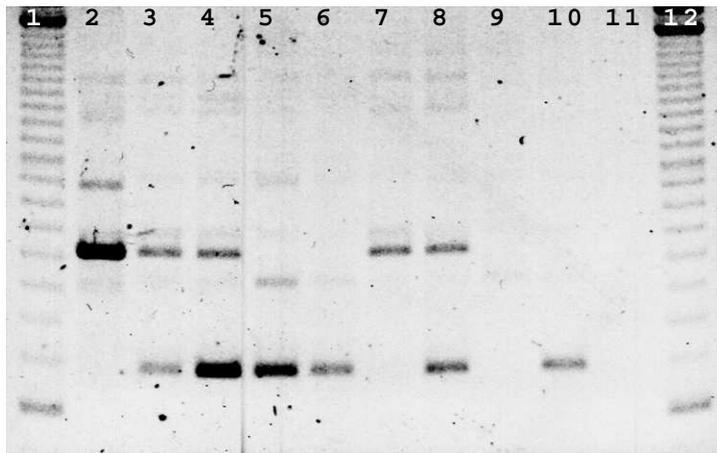
Bild unten

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 9	170
Spur 2	109	Spur 10	114
Spur 3		Spur 11	<i>S. pastorianus</i> DSM 6581
Spur 4	122	Spur 12	<i>S. pastorianus</i> DSM 6580
Spur 5	176	Spur 13	<i>S. bayanus</i> DSM 70412
Spur 6	Scb2	Spur 14	NTC
Spur 7	68	Spur 15	100bp-Leiter
Spur 8	34	Spur 16	
	155		

Abbildung 8: PCR-Produkte (untergärer) Bierhefen mit Primer LTR 01 r.

Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 2 h; GNA, 8 °C.

Abbildung 9 zeigt einige der schon in Abbildung 8 dargestellten PCR-Produkte, die in einer anderen Elektrophoresekammer unter leicht modifizierten Laufbedingungen aufgetrennt wurden, um den Größenbereich zwischen 800 bp und 2000 bp besser aufzulösen.



Spur 1	100bp-Leiter	Spur 7	70
Spur 2	68	Spur 8	114
Spur 3	34	Spur 9	<i>S. pastorianus</i> DSM 6581
Spur 4	66	Spur 10	<i>S. pastorianus</i> DSM 6580
Spur 5	155	Spur 11	<i>S. bayanus</i> DSM 70412
Spur 6	170	Spur 12	100bp-Leiter

Abbildung 9: Auswahl von PCR-Produkten (untergäriger) Bierhefen mit Primer LTR 01 r.
 Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 2 h; Hoefer, RT.

Die untergärigen Stämme reagierten mit Ausnahme der Stämme 155, 170 und 70 als einheitliche Gruppe und wiesen vier gemeinsame Banden auf. Alle Stämme hatten die bereits vorher für den Stamm 34 gezeigte Bande gemeinsam, mit der sie sich von den obergärigen Stämmen unterschieden. Diese Bande ließ sich auch für den *S. pastorianus*-Stamm (DSM 6581) nachweisen. Allerdings fehlte bei diesem Stamm im Gegensatz zum *S. pastorianus*-Stamm (DSM 6580) die allen untergärigen Stämmen, mit Ausnahme des Stammes 70, gemeinsame 900 bp Bande.

In Tabelle 29 sind die Banden der untersuchten Hefen mit Primer LTR 01 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 29: Auswertung Bandenmuster PCR mit Primer LTR 01r (vgl. Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9).

1: Bande, 0: keine Bande; A: Alt, K: Kölsch, WB: Weißbier.

Stamm	Gruppe	Fragmentlänge in bp								
		500	620	900	1000	1100	1230	1450	2000	
34/70	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
26	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
44	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
59	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
120	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
66	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
69	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
71	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
85	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
166	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
167	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
128	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
155	2	1	1	1	0	(1)	0	0	0	
170	2	1	1	1	0	(1)	0	0	0	
70	3	1	1	0	0	0	1	0	0	
114	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
88	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
107	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
178	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
109	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
122	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
176	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
WB	68	4	1	0	0	0	0	1	0	0
WB	127	4	1	0	0	0	0	1	0	0
WB	149	4	1	0	0	0	0	1	0	0
WB	205	4	1	0	0	0	0	1	0	0
WB	212	4	1	0	0	0	0	1	0	0
A / K	141	5	1	0	1	0	0	1	1	0
A	148	6	1	0	1	0	0	1	0	0
A / K	165	5	1	0	1	0	0	1	1	0
A	184	6	1	0	1	0	0	1	0	0
A	174	6	1	0	1	0	0	1	0	0
A / K	177	6	1	0	1	0	0	1	0	0
A	208	6	1	0	1	0	0	1	0	0
A / Ale	210	7	1	0	1	0	1	1	0	1
A / Ale	211	7	1	0	1	0	1	1	0	1
A / Ale	213	6	1	0	1	0	0	1	0	0
DSM 6581	<i>S. pastorianus</i>	8	1	1	0	0	1	0	0	0
DSM 6580	<i>S. pastorianus</i>	9	1	0	1	0	1	0	0	0
DSM 70412	<i>S. bayanus</i>	10	0	0	0	1	0	0	0	0

3.4 AFLP

3.4.1 Fingerprints

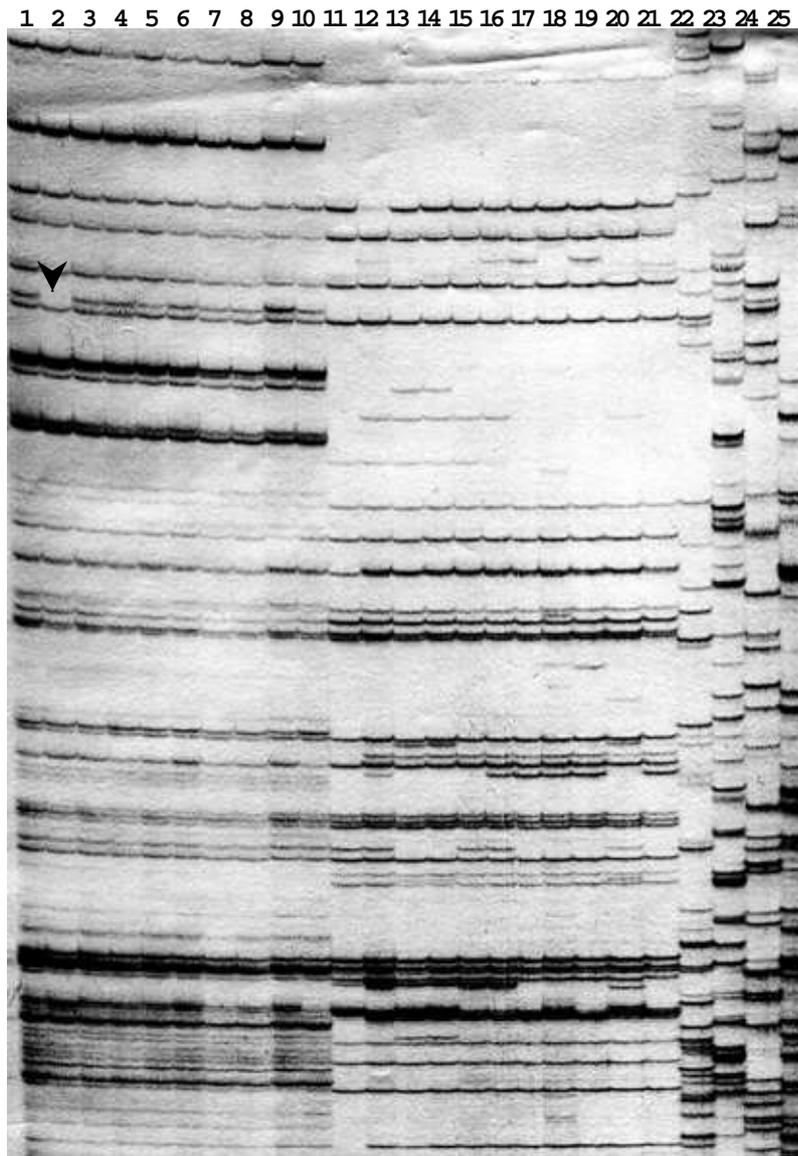
In Vorversuchen wurde getestet, wie viele zusätzliche Nukleotide an den Primern nötig waren, um reproduzierbare und aussagekräftige Bandenmuster zu erhalten. In Übereinstimmung mit der Literatur [Vos, P. 1995; de Barros Lopes, M. A 1999] erwiesen sich drei Nukleotide (ein Primer mit zwei, ein Primer mit einem) für Hefen als optimal. In Abhängigkeit von den jeweiligen Primern konnten zwischen 25 und 50 Banden pro Spur detektiert werden. Mit zwei Nukleotiden waren die Bandenmuster nicht mehr auswertbar und sehr schlecht reproduzierbar. Mit vier Nukleotiden wurden nur wenige Fragmente amplifiziert ohne dass sich bessere Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen den Stämmen als mit drei Nukleotiden ergaben.

Unter- und obergärige Bierhefen, weitere *S. cerevisiae* Hefen sowie einige Fremdhefen wurden mit sieben Primerkombinationen (jeweils 3 Zusatznukleotide) untersucht. Die Preamplifikationsreaktion enthielt Primer mit zwei Zusatznukleotiden. Die eingesetzten Primer sind Tabelle 30 zu entnehmen:

Tabelle 30: Primerkombinationen für die AFLP.

Reaktion	Pre		Amp	
Primer	E+	M+	E+	M+
zusätzliche Nukleotide	A	g	AA	g
	A	g	AC	g
	A	C	AA	C
	A	C	AC	C
	C	A	C	Ag
	C	A	C	AC
	C	T	C	TT

Abbildung 10 zeigt beispielhaft die AFLP-Produkte mit einer Primerkombination.



1	34 / 70	8	26	15	177	22	<i>S. exiguus</i>
2	66	9	54	16	184	23	<i>Z. bailii</i>
3	128	10	168	17	Laureiro	24	<i>Z. rouxii</i>
4	120	11	R II	18	Epernay	25	<i>Hansenula anomala</i>
5	194	12	148	19	<i>S. c. ellipsoideus</i>		
6	69	13	68	20	W4		
7	34 / 78	14	175	21	<i>S. c. diastaticus</i>		

Abbildung 10: Membranfixierte AFLP-Produkte mit Primern E + C (Biotin-markiert) / M + Ag.
Auftrennung in GATC 1500.

Die untergärigen Hefen (Spuren 1 – 10) bildeten eine einheitliche Gruppe in der sich lediglich der Stamm 66 (Spur 2) durch eine fehlende Bande (s. Pfeil) mit einer Primerkombination von den übrigen unterscheiden ließ. Für die obergärigen Bierhefen sowie die Weinhefen und den *S. c. diastaticus* Stamm war ebenfalls ein

gemeinsames Grundmuster zu erkennen. Hier ließen sich aber einzelne Stämme, teilweise in Gruppen (z.B. Stamm 148 und 184), von den übrigen abgrenzen wobei eine Unterscheidung teilweise nur mit zwei oder mehr Primerkombinationen möglich war.

Der Prozentsatz an gemeinsamen Banden (zweimal die Summe der gemeinsamen Banden / die Summe aller Banden) zwischen dem untergärigen Stamm 34 und der obergärigen Hefe 68, hier stellvertretend für die beiden Gruppen gewählt, betrug in Abhängigkeit von den Primern zwischen 70 und 85 %.

Die übrigen Hefen (Spuren 22 bis 25) unterschieden sich deutlich sowohl von den Brauerei- und Weinhefen als auch untereinander. So wiesen beispielsweise die obergärige Bierhefe 68 und der *S. exiguus* Stamm eine Bandenteilung von durchschnittlich unter 30 % auf.

3.4.2 Isolierung von Markern

Abbildung 11 zeigt die membranfixierten AFLP-Produkte der Hefestämme 34 und 66 (Primer E+C/M+Ag) nach Auftrennung im GATC 1500-System. Die mit einem Pfeil markierte Bande, weist auf einen Polymorphismus hin, der näher charakterisiert werden sollte und auf dem aufbauend nach Möglichkeit ein spezifisches Primersystem entwickelt werden sollte, mit dem die beiden Stämme direkt voneinander unterschieden werden können. Zum besseren Verständnis sind die einzelnen Entwicklungsschritte in Abbildung 22 am Ende des Kapitels grafisch zusammengefasst. Die römischen Nummerierungen beziehen sich auf diese Abbildung.

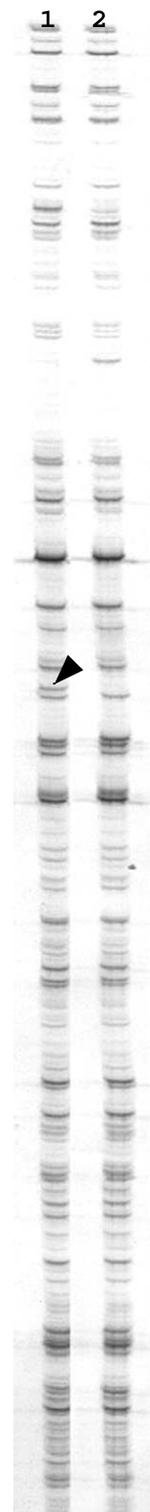
I

Das gekennzeichnete DNA-Fragment von Stamm 34 wurde wie unter 2.8.4 beschrieben reamplifiziert.

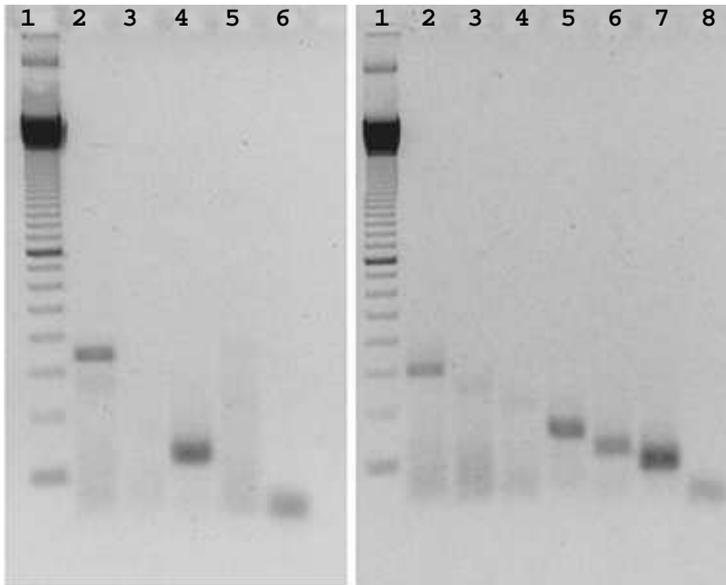
Für die Auftrennung im Sequenziergel stand kein geeigneter DNA - Größenstandard zur Verfügung, anhand dessen die Größenübereinstimmung des Reamplifikats mit der ursprünglichen Bande sichergestellt hätte werden können. Um einigermaßen auszuschließen, dass es sich bei den PCR-Produkten der Reamplifikation um Artefakte handelte, wurden zusätzlich aus beliebigen Spuren derselben Membran in regelmäßigen Abständen unterhalb der interessierenden Bande DNA-Banden ausgeschnitten und wie oben behandelt.

Spur 1	34
Spur 2	66

Abbildung 11: PCR-Produkte von Preamplifikationen (Pre) mit Primerpaar E+C/M+Ag. Auftrennung über GATC 1500, vgl.2.10.3).



Wie in Abbildung 12 zu sehen, wurden teilweise PCR-Produkte gebildet, die, wenn auch verschieden stark ausgeprägt, zumindest die erwarteten Größenunterschiede aufwiesen, so dass es sich bei der auf dem linken Bild zu sehenden Bande in Spur 2 tatsächlich um das gesuchte Fragment handeln sollte.



Gel links

Spur 1 100bp-Leiter
 Spur 2 Bande (Pfeil)
 Spur 3 Bande < Bande Spur 2
 Spur 4 Bande < Bande Spur 3
 Spur 5 leere Membran
 Spur 6 NTC

Gel rechts

Spur 1 100bp-Leiter
 Spur 2 Bande < Spur 2 links
 Spur 3 Bande < Bande Spur 2
 Spur 4 Bande < Bande Spur 3
 Spur 5 Bande < Bande Spur 4
 Spur 6 Bande < Bande Spur 5
 Spur 7 leere Membran
 Spur 8 NTC

Abbildung 12: Reamplifikate einzelner nach Auftrennung in GATC membranfixierter DNA-Banden mit Primerpaar E+C / M+Ag.
 Auftrennung in Agarosegel: 2,0 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 45 min; Hoefer, RT.

Diese Bande wurde wie unter 2.8.2 mit dem Primerpaar E+0/M+0 reamplifiziert und sequenziert.

Die Sequenz in Abbildung 13 ist in der 5'-3'-Richtung des Primers M+0 angegeben.

```

          v10          v20          v30          v40          v50
CCTCCAATATGGAAATGTACNTAATTCAGGCAGCCGGGTTCTCCACGAKT

          v60          v70          v80          v90          v100
TGGGCAGTAGTWSRCTTGCTTGAAATACCSCATSTTTGTAATGCATATC

          v110         v120         v130         v140         v150
YATTTGATGTARTSGCAAGTGTAAACGGGCAAGGANNNNGTAGATGCAG

          v160         v170         v180         v190         v200
ATACAGGATGGAAACTGTGGACGCCATGTGCAGCCGGAGCCTCAGCTCTT

          v210         v220         v230         v240
CTTGGGGTTGGTCGTTGATTGTTTTNNNNAGTTTCAGCCATATTATT

```

Abbildung 13: Sequenz 9811_02_M : Position 31 – 46: Primer bh e , Position 118 – 135: Primer bh m (rc), Position 157 – 174: Primer bh m 2 (rc).

Aus dem Sequenzabschnitt wurden zu den beiden Primern M+0 (bh m, bh m 2) und E+0 (bh e) kompatible Primer ausgewählt, um selektiv Teile des Restriktionsfragments mit dem vermuteten Polymorphismus zu vervielfältigen und im weiteren ermitteln zu können, an welcher der beiden Restriktionsschnittstellen der Polymorphismus vorlag.

Die ReLis (EcoR I, Mse I) der beiden zu unterscheidenden Hefestämme wurden in zwei PCRs mit den Primerpaaren bh m / M+Ag und BH E / E+C eingesetzt. Aus Abbildung 14 wurde geschlossen, dass sich die beiden Stämme mindestens an der Mse I-Schnittstelle unterscheiden, da nur für den Stamm 34 ein PCR-Produkt von 200 bp Länge gebildet wurde.

Über die EcoR I-Schnittstelle konnten keine Annahmen getroffen werden, da für keinen der beiden Stämme ein PCR-Produkt gebildet wurde.

In einer PCR mit den Primerpaaren bh m / bh e (ohne Abbildung) wurde sowohl für den Stamm 34 als auch für den Stamm 66 ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von ca. 100 bp gebildet, womit ausgeschlossen werden konnte, dass maßgebliche Sequenzunterschiede zwischen den Stämmen innerhalb der Primerbindestellen der Primer bh m und bh e für das Fehlen der relevanten Bande in Spur 3 verantwortlich waren.

Spur 1	100bp-Leiter
Spur 2	ReLi 34
Spur 3	ReLi 66
Spur 4	ReLi 34
Spur 5	ReLi 66

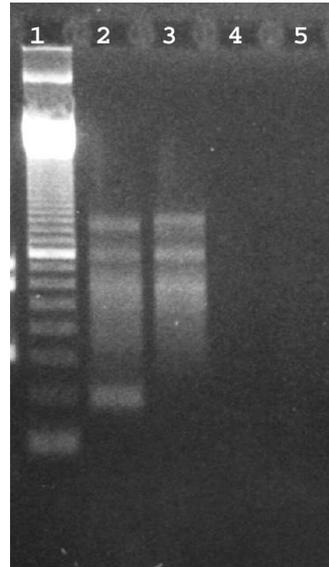


Abbildung 14: PCR von ReLis (EcoR I, Mse I) mit Primerpaar bh m / M+AG (Spur 2 und 3) und Primerpaar BH E / E+C (Spur 4 und 5).

II

Um die interessierende Mse I-Schnittstelle näher charakterisieren zu können wurde mit DNAs der Stämme 34 und 66 eine ReLi durchgeführt (vgl. 2.16), wobei nur mit EcoR I geschnitten wurde und die entsprechenden Adapter (Ad E 1 / Ad E 2) verwendet wurden. Aus dieser ReLi sollte mit dem Primerpaar bh m / E+0 ein Fragment vervielfältigt werden, das den gesuchten Polymorphismus beinhaltet.

Eine selektive Amplifikation des gesuchten Fragments war nicht möglich. Vielmehr wurden in der Reaktion Fragmente in einem Größenbereich von 200 bis 3.000 Basenpaaren vervielfältigt (vgl. Abbildung 15). Diese wurden vermutlich durch den Primer E+0 initiiert wurden, da bei der Verwendung des Primerpaars bh m / E+0 keine zusätzliche Bande gegenüber einer Reaktion mit ausschließlich E+0-Primer sichtbar war.

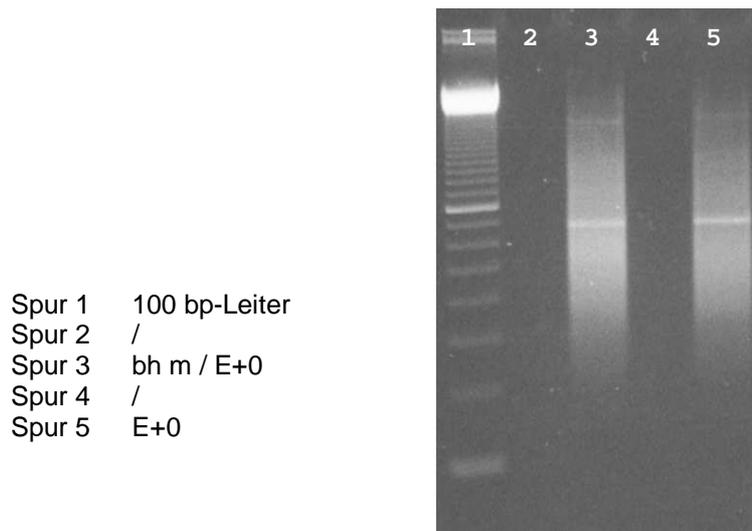


Abbildung 15: PCR von ReLi Hefe 34 (EcoR I) mit Primern bh m und E+0.

Da die Bildung von PCR-Produkten mit zwei unterschiedlichen Primerbindestellen normalerweise gegenüber der von Produkten mit nur einer einzigen Primerbindestelle favorisiert abläuft [Vos, P. 1995], bestand die Möglichkeit, dass das gesuchte DNA-Fragment relativ groß war und deshalb keine bzw. keine bevorzugte Vervielfältigung gegenüber den Eco-Eco-Fragmenten stattfand.

Um dies näher zu ergründen, wurden 5 µg genomischer DNA des Stammes 34 8 h bei 37 °C mit EcoR I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und per Vacublott auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde mit einem DIG-markierten PCR-Produkt von DNA aus Stamm 34, mit den Primern bh m/bh e hybridisiert (vgl. 2.10.3.1 und 2.12).

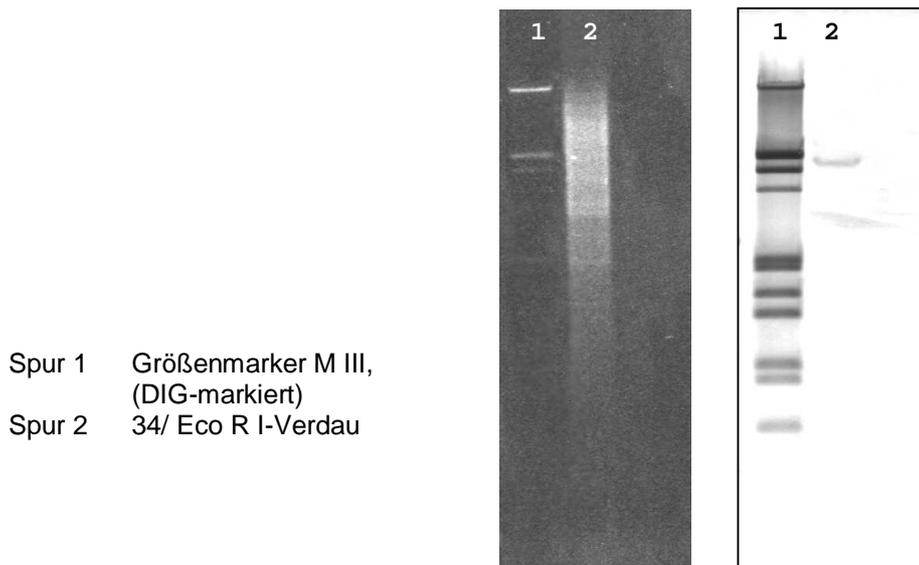


Abbildung 16: Southern-Hybridisierung eines Eco R I- Verdau von 5 µg Hefe-DNA (34).
Sonde: DIG-markiertes PCR-Produkt Hefe 34 mit Primern bh m / bh e.
Bild links: elektrophoretische Auftrennung in Agarosegel: 1,5 % Seakem LE, TAE-Puffer, 3 V/cm, Hoefer, RT; Bild rechts: Membran nach Hybridisierung und Anfärben (vgl. 2.10.3.1 und 2.12).

Nach der Färbung der Membran war eine Bande von ca. 4000 bp zu sehen, was den Verdacht bestärkte, dass das gesuchte Fragment aufgrund seiner relativen Größe nicht selektiv amplifiziert werden konnte.

III

Um ein kleineres Fragment zu erhalten wurden DNAs der Stämme 34 und 66 eine ReLi eingesetzt (vgl. 2.16), wobei die DNA in parallelen mit verschiedenen Blunt-End-Restriktionsenzymen verdaut wurde und ein universeller Blunt-End-Adapter (LCS AP / Ad LCS) verwendet wurde.

Die ReLis wurden in PCRs mit den Primerpaaren LCS AP / bh m 2 eingesetzt. Wie Abbildung 17 zeigt, konnte aus der ReLi mit Alu I ein Fragment mit ca. 950 bp Länge amplifiziert werden, das anschließend wie unter 2.8.2 beschrieben mit dem Primerpaar LCS AP/ bh m reamplifiziert wurde. Um sicherzustellen, dass es sich bei diesem auch um das gesuchte handelt, wurde das aus dem Gel ausgeschnittene Fragment zusätzlich in eine PCR mit dem Primerpaar bh m/bh e eingesetzt (vgl. Abbildung 18).

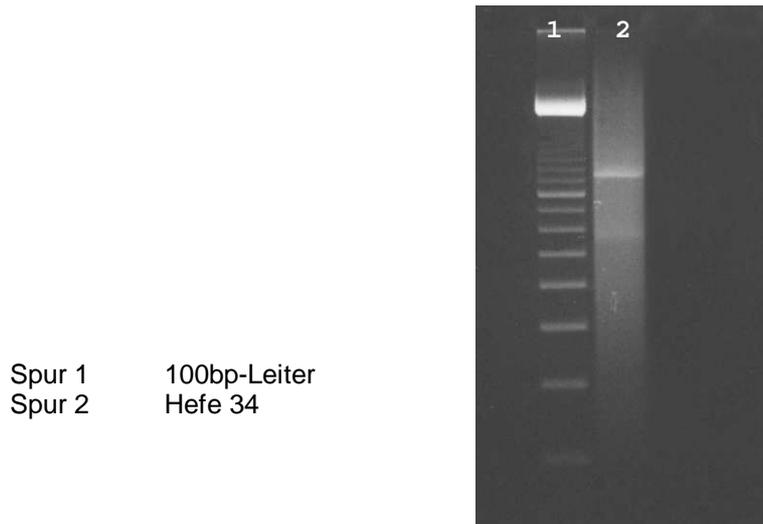


Abbildung 17: PCR von ReLi (Alu I) mit Primerpaar bh m 2 / LCS AP.
 Auftrennung in Agarosegel: 2,0 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 45 min; Hoefer, RT.

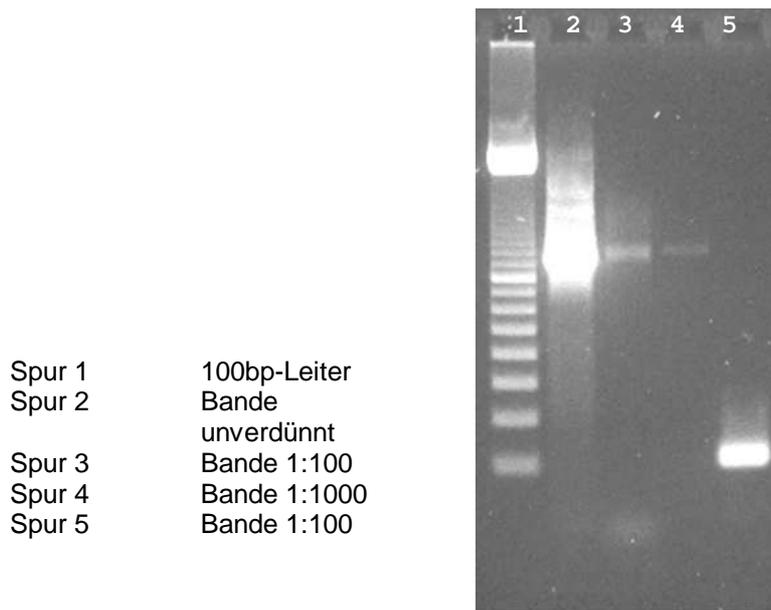


Abbildung 18: PCR mit dem 950 bp-Fragment (vgl. Abbildung 17) mit Primerpaar LCS AP / bh m
 (Spur 2 bis 4); PCR mit Primerpaar bh M / bh e; Spur 5.

Die Sequenzanalyse des 950 bp-Fragments ergab die Basensequenz in Abbildung 19 aus der der Primer bh e 3 abgeleitet wurde.

```
          v10      v20      v30      v40      v50
TCAAANAAAATAATCCAGTGTATCGTAAGCATNAAATAAGAAGATGATTC

          v60      v70      v80      v90      v100
TCAATTCAGCGTGGTTGCTTATCGGTCCTGTGNGACGTTTCGTCTTATTCT

          v110     v120     v130     v140
TTCCCAAAGCGTTAGGTTCTTGATGTCCGTTTCTTTGAANTTCGATGAT

          v160     v170     v180     v190     v200
TTGCTTTGTATAAAAAGTAGNACTCTGAGGGCAGCGGNGTATTGCATCCNC

          v210     v220     v230     v240     v250
CAGTTTCAATANCAACCCCTGGCATGAAACTTGGGAGTTNAAAGATTTGT

          v260     v270     v280     v290     v300
TAAATTGAATCGTGCCGCAAGTNAAAGCGATTTTGTTCACAACTGGCCG

          v310     v320     v330     v340     v350
TTAAAGGNCCAAATGNACCCCCCAATATGGAAATGTAGTAATTCGNNA

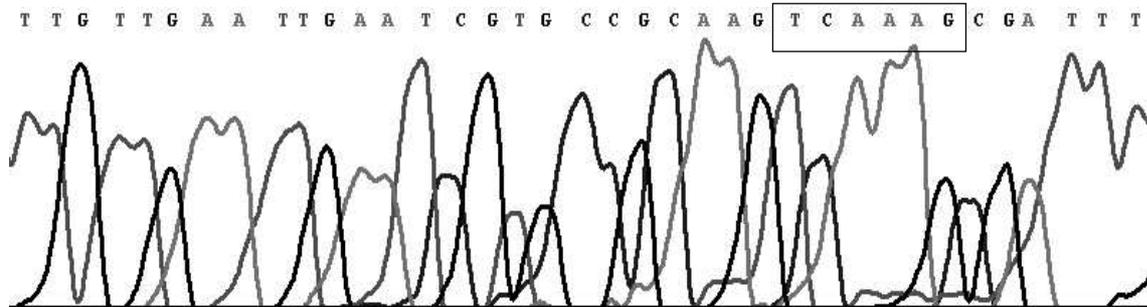
          v360     v370     v380     v390     v400
ACCGGGTTCTCCACGNNTTGGGCAGTAGTTCCCTTGCTTGCAGGTNCGNN

          v410     v420     v430     v440     v450
TTCTAATTGGGGGGGCNTTAGCNNTNNGGATNCNATTCCCNTTNGCCNG
```

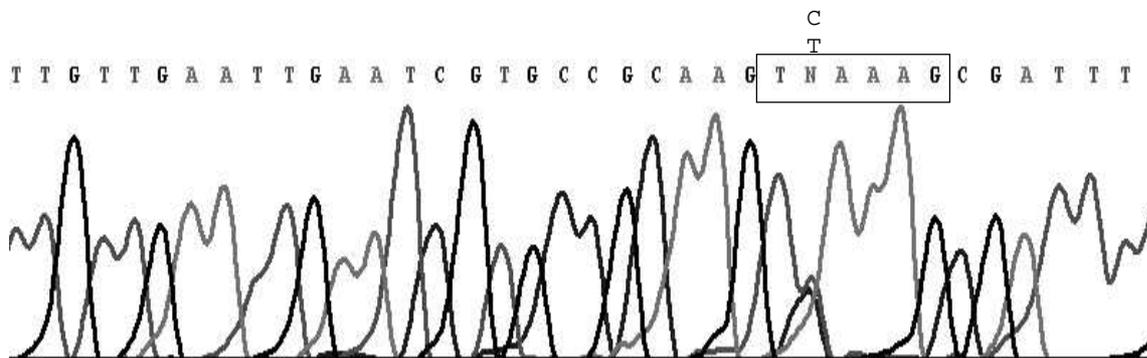
Abbildung 19: Partielle Sequenz 990308: Position 213 – 227: Primer bh e 3.

IV

Mit dem Primerpaar bh e 3 / bh m 2 konnte von genomischer DNA der Hefestämme 34 und 66 ein DNA-Fragment der Größe 290 bp vervielfältigt werden, deren Sequenzanalyse in Abbildung 20 dargestellt ist.



9901818_rc (66)



9901819_rc (34)

Abbildung 20: Ausschnitt aus Sequenzier-Chromatogrammen der PCR-Produkte Hefen 34 und 66 mit Primerpaar bh e 3 / bh m 2.

Die Hefe 34 besitzt offenbar ein Allel, das sie von der Hefe 66 unterscheidet. Es beinhaltet die Mse I-Schnittstelle sowie die daran anschließende Basensequenz AG des selektiven Mse-Primers. Der Hefe 66 fehlt an dieser Stelle die Mse I-Schnittstelle, so dass der entsprechende Sequenzabschnitt, sofern er überhaupt in einer AFLP-Reaktion mit der Enzymkombination EcoR I / Mse I vervielfältigbar ist, in einem größeren Fragment zu finden wäre.

In Abbildung 21 sind die beiden Sequenzen des gesuchten DNA-Abschnittes der Hefestämme 34 und 66 gegenübergestellt.

```

                v10      v20      v30      v40      v50
66      NCAACCCCTGGCATGAAACTTGGGAGTTGAAAGATTTGTTGAATTGAATC
        |||
34      NCAACCCCTGGCATGAAACTTGGGAGTTGAAAGATTTGTTGAATTGAATC
bh e 4a5tb      ATC
                ^10      ^20      ^30      ^40      ^50

                v60      v70      v80      v90      v100
66      GTGCCGCAAGTCAAAGCGATTTTGTTCACAACCTGGCCGTTGAAGGGCGA
        |||
34      GTGCCGCAAGTNAAAGCGATTTTGTTCACAACCTGGCCGTTGAAGGGCGA
        T/C
bh e 4a5tb      GTGCCGCTAGTT
                ^60      ^70      ^80      ^90      ^100

                v110     v120     v130     v140
66      AATGGAGCCCTCCAATATGGAAATGTAGTAATTCGGCAGCCGGGTT
        |||
34      AATGGAGCCCTCCAATATGGAAATGTAGTAATTCGGCAGCCGGGTT
        ^110     ^120     ^130     ^140

```

Abbildung 21: Alignment partieller Sequenzen der 290 bp PCR-Produkte der Hefen 34 und 66 mit Primerpaar bh e 3 / bh m 2. Position 2 – 16: Primer bh e 3, Position 48 – 62: Primer bh e 4 a5t b (destabilisiert an 5. Position).

V

Aufbauend auf dem Basenaustausch (Position 62, Abbildung 21) wurde der Primer bh e a5t b entwickelt. Mit diesem sollte in einer PCR nur für den Stamm 34 (im Vergleich zum Stamm 66) ein PCR-Produkt gebildet werden. Eine analoge Entwicklung eines Primers für den Stamm 66 basierend auf diesem Sequenzabschnitt war nicht möglich, da das Allel bzw. die Allele des Stammes 66 identisch mit einem der beiden Allele des Stammes 34 waren. Der Primer wurde zusätzlich an Position 5 (vom 3'-Ende) destabilisiert, um eine ausreichende Spezifität sicherzustellen.

In Abbildung 22 sind die einzelnen Entwicklungsschritte grafisch kurz zusammengefasst.

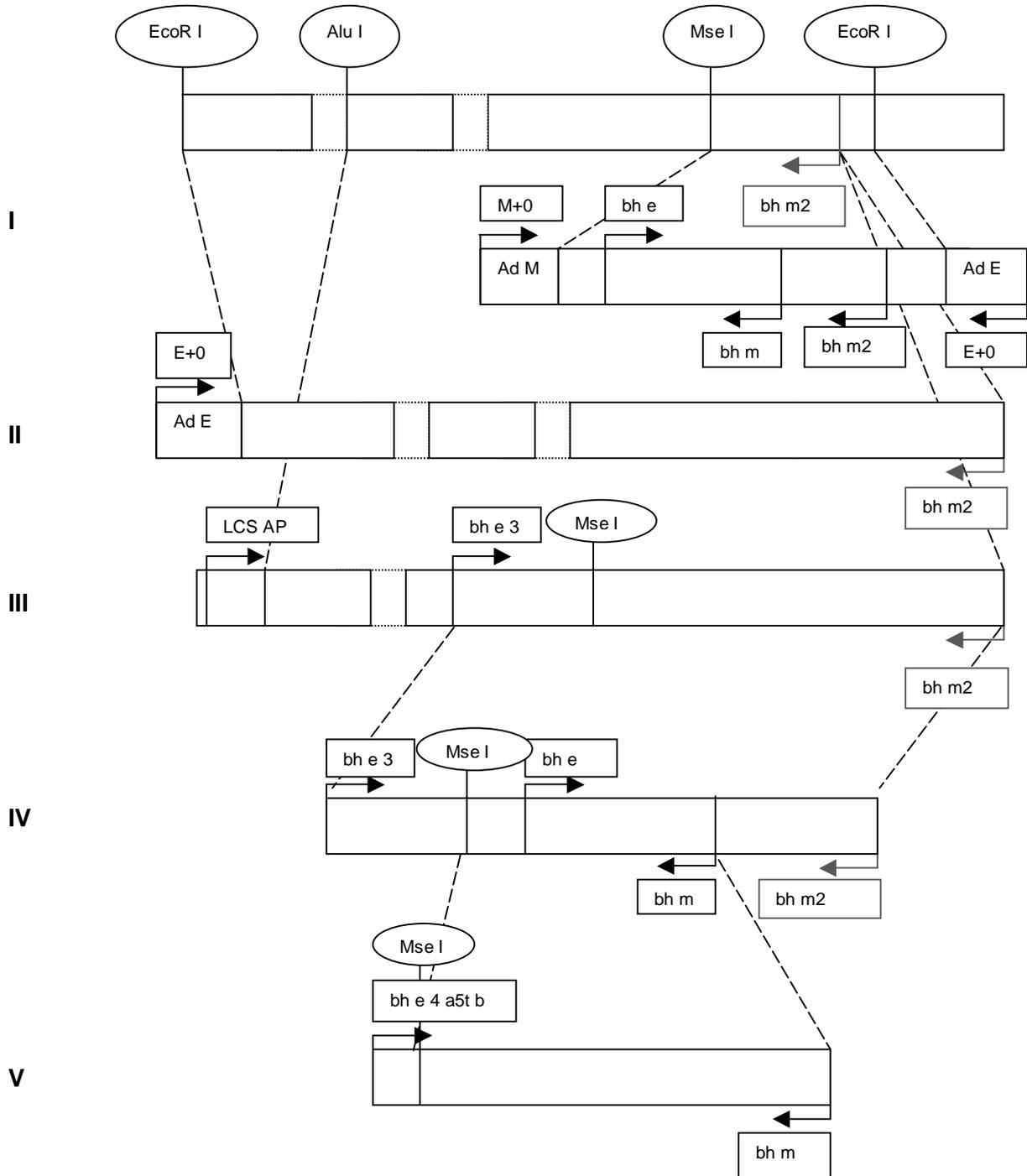
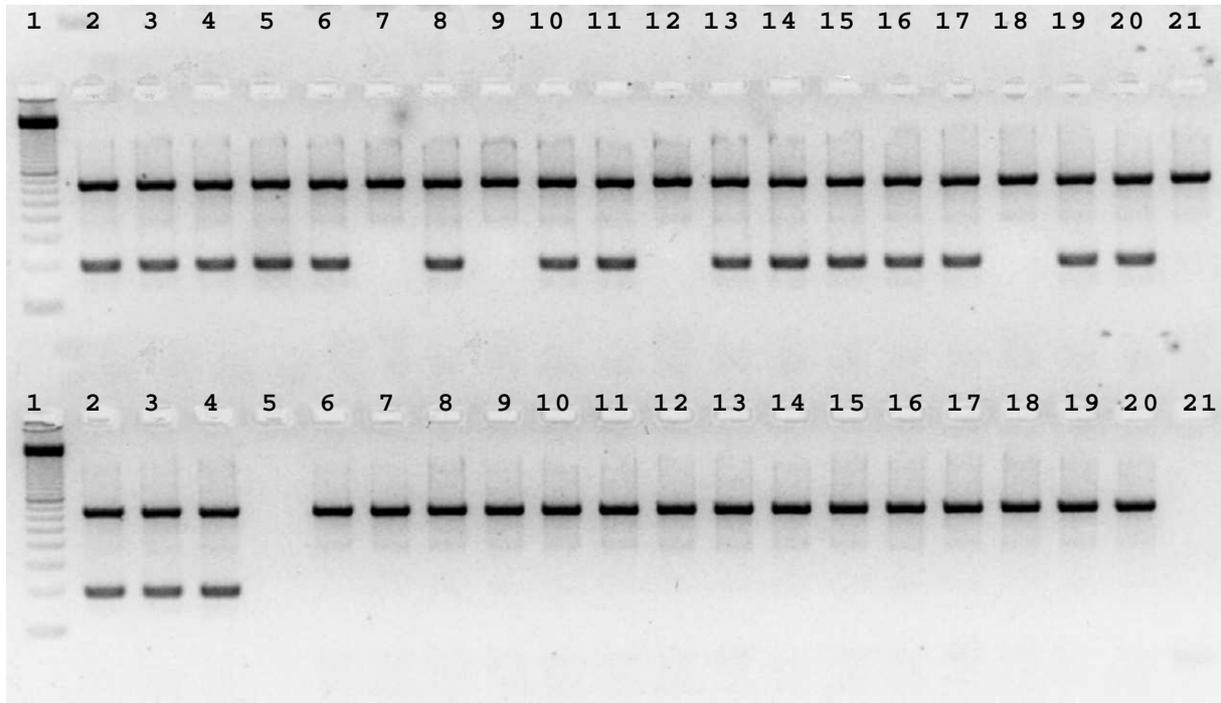


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Entwicklung eines spezifischen Primersystems basierend auf einem AFLP-Marker.

In Abbildung 23 sind die PCR-Produkte (ca. 200 bp Länge) von Hefe-DNAs mit dem Primerpaar bh m / bh e a5t b zu sehen. Als interne Amplifikationskontrolle wurde das Primerpaar H 550/1200 eingesetzt, das bei allen Hefen die Bildung eines PCR-Produkts der Länge 650 bp initiiert.



Reihe oben:

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	69	Spur 15	170
Spur 2	34	Spur 9	71	Spur 16	70
Spur 3	26	Spur 10	85	Spur 17	114
Spur 4	44	Spur 11	166	Spur 18	88
Spur 5	59	Spur 12	167	Spur 19	107
Spur 6	120	Spur 13	128	Spur 20	178
Spur 7	66	Spur 14	155	Spur 21	109

Reihe unten:

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	149	Spur 15	174
Spur 2	122	Spur 9	205	Spur 16	177
Spur 3	176	Spur 10	212	Spur 17	208
Spur 4	SCB 2	Spur 11	141	Spur 18	210
Spur 5	/	Spur 12	148	Spur 19	211
Spur 6	68	Spur 13	165	Spur 20	213
Spur 7	127	Spur 14	184	Spur 21	

Abbildung 23: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaar H 550/1200, bh m / bh e a5t b. Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 1,5 h; GNA, 8 °C.

Wie erwartet, wurde für die Hefe 34 ein spezifisches PCR-Produkt gebildet, für die Hefe 66 nicht.

Dieses PCR-Produkt wurde für alle untersuchten untergärigen Stämme mit Ausnahme der Stämme 66, 71, 88, 109 und 167 gebildet. Für alle untersuchten obergärigen Stämme fehlte das Amplifikat ausnahmslos.

Da sich die beiden Stämme 34 und 66 in ihrem Bruchbildungsverhalten unterscheiden, wurden die PCR-Resultate mit den spezifischen Primern mit dem beschriebenen Flockulationsverhalten der verschiedenen Stämme verglichen, um festzustellen, ob der Marker als Indikator für das Bruchbildungsvermögen eines Hefestammes dienen könnte.

Tabelle 31: Vergleich der PCR-Analyse untergäriger Hefen mit dem Primerpaar bh m / bh e a5t b mit ihrem beschriebenen Flockulationsverhalten.

Stamm	Flockulationsverhalten	spezifisches PCR-Produkt	Übereinstimmung	Stamm	Flockulationsverhalten	spezifisches PCR-Produkt	Übereinstimmung
34	b	+	✓	155	b	+	✓
26	b	+	✓	170	s	+	✗
44	b	+	✓	70	b	+	✓
59	b	+	✓	114	b	+	✓
120	b	+	✓	88	b	-	✗
66	s	-	✓	107	b	+	✓
69	b	+	✓	178	b	+	✓
71	s	-	✓	109	b	-	✗
85	b	+	✓	122	b	+	✓
166	b	+	✓	176	b	+	✓
167	s	-	✓	SCB 2	s	+	✗
128	b	+	✓				

Wie aus Tabelle 31 hervorgeht, ergaben sich für die Stämme 88, 109, 170 und SCB2 keine Übereinstimmung zwischen beschriebenem Flockulationsverhalten und An- bzw. Abwesenheit des spezifischen PCR-Produkts, so dass der analysierte Polymorphismus nicht oder zumindest nicht als alleiniger Marker für das Flockulationsverhalten dienen kann.

Um zu zeigen, dass das entwickelte Primersystem direkt auf ein Online-PCR-Gerät übertragen werden kann, wurden die DNAs der beiden Stämme 34 und 66 im LightCycler mit dem Primerpaar bh m / bh e a5t analysiert. Als externe Amplifikationskontrolle diente eine PCR mit dem Primerpaar bh m / bh e. Um sicherzustellen, dass ein fehlendes PCR-Signal für den Stamm 66 auf eine zu geringe DNA-Konzentration zurückzuführen ist, wurde die DNA des Stammes 66 in

10-facher Konzentration (0,1 ng in einer 20 µl Reaktion) gegenüber der des Stammes 34 eingesetzt.

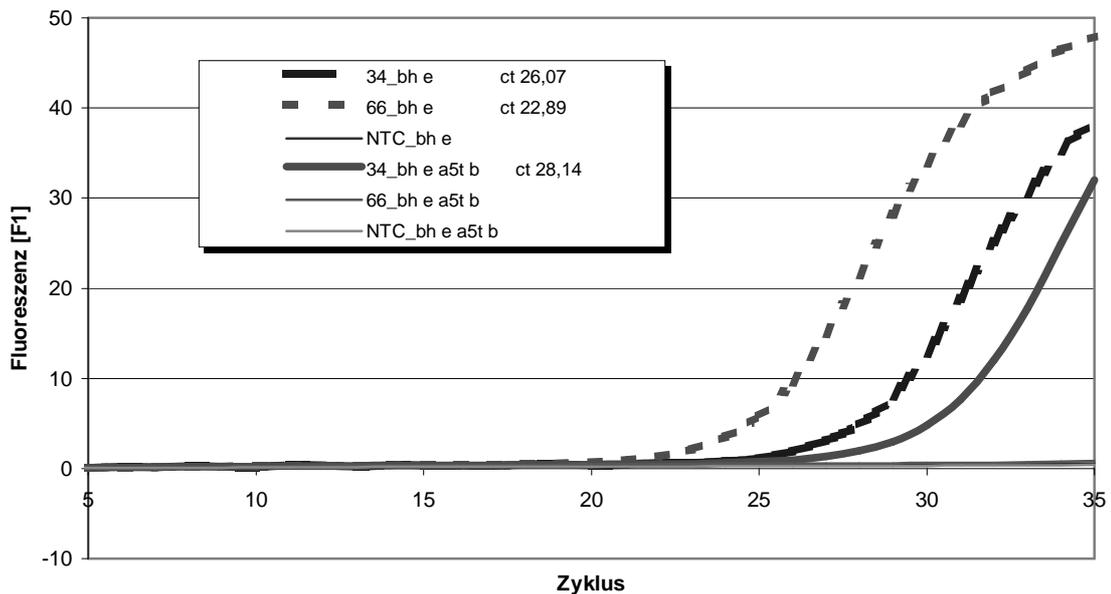


Abbildung 24: Amplifikationsplott PCR mit Primerpaaren bh m / bh e und bh m / bh e a5t b. Detektionsformat: SYBR-Green. Excel-Diagramm aus exportierten Rohdaten; ct-Werte aus LightCycler Datenanalyse Softwaremodul.

Aus Abbildung 24 geht hervor, dass in der Kontrollreaktion für beide Hefen ein PCR-Produkt gebildet wurde, wobei die Differenz der ct-Werte nahezu den aufgrund des 10-fachen Überschusses der 66er-DNA erwarteten 3,3 Zyklen (26,07 zu 22,89) entspricht. Mit dem spezifischen Primerpaar wurde für den Stamm ein PCR-Produkt gebildet, dessen Signal bei Zyklus 28,14 aus dem Hintergrund tritt. Theoretisch wäre ein ct-Wert von ca. 27 zu erwarten, da mit dem spezifischen Primer im Gegensatz zur Kontrollreaktion nur ein Allel erfasst wird. Das verzögerte Signal ist vermutlich größtenteils auf die zusätzliche Destabilisierung des einen Primers zurückzuführen. Für den Stamm 66 wurde kein PCR-Produkt gebildet.

Mit der Schmelzkurvenanalyse wurde verifiziert, dass die Signale PCR-Produkten entsprechen.

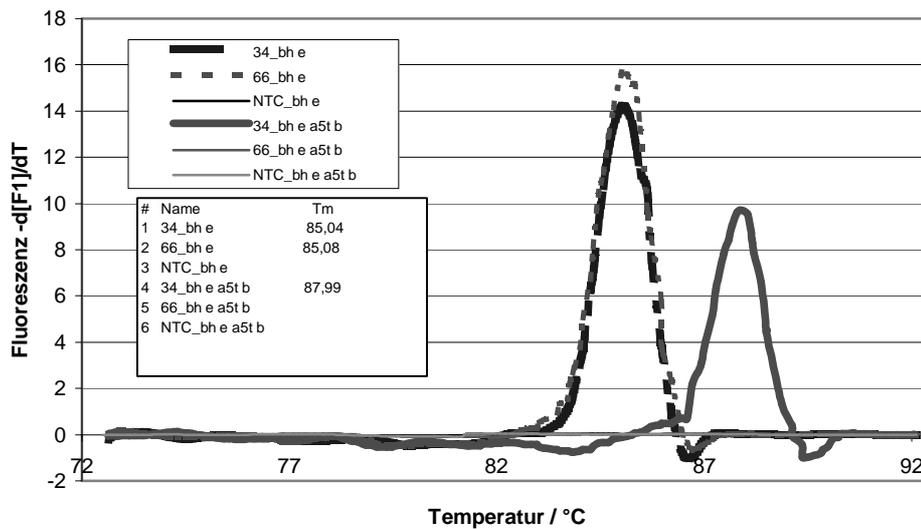


Abbildung 25: Schmelzpeaks PCR mit Primerpaaren bh m / bh e und bh m / bh e a5t b. Detektionsformat: SYBR-Green. Excel-Diagramm aus exportierten Rohdaten; Schmelztemperaturen aus LightCycler Datenanalyse Softwaremodul.

Wie aus Abbildung 25 zu ersehen, zeigten die beiden Amplifikate der Kontrollreaktion einen Schmelzpunkt von 85 °C, das der spezifischen Reaktion einen Schmelzpunkt von 88 °C. Die Nullproben (NTC) zeigten weder ein Signal während der PCR (siehe Abbildung 24) noch einen Peak in der Schmelzkurvenanalyse, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die positiven Signale von PCR-Produkten herrühren.

3.5 Mikrosatelliten Analyse

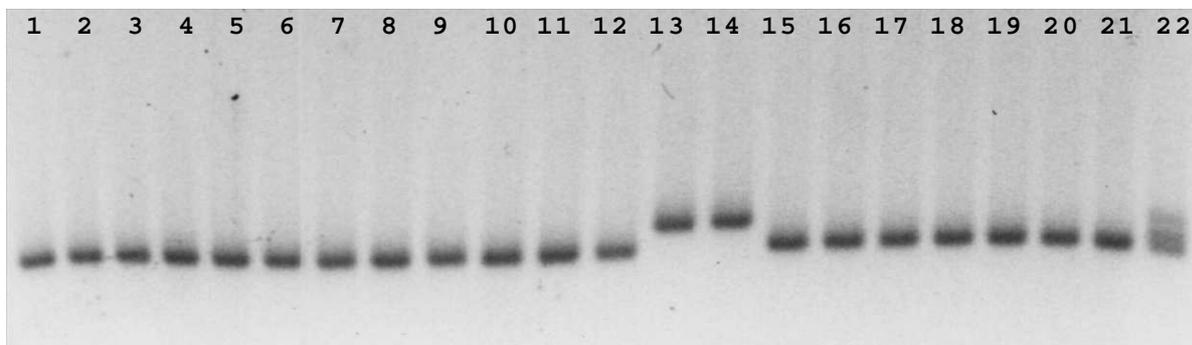
3.5.1 Mikrosatellitenloci aus DNA-Datenbanken

Mit Primern, die aus der Literatur oder durch Datenbankrecherche bekannte Mikrosatellitenloci flankieren, wurden unter- und obergärige Kulturhefen sowie einige *Saccharomyces*-Fremdhefen in der PCR untersucht.

Die Primer MS 01/MS01 r und MS02 / MS02 r wurden aus der Literatur übernommen [Richard, G.-F. 1996]. Die Mikrosatellitenloci, die mit den hier entwickelten Primern MS 04/MS04 r und MS07 / MS07 r amplifiziert werden sollten, resultierten aus einer PatMatch-Suche [Cherry, J. M. 1999]. Die Details sind Tabelle 32 zu entnehmen:

Tabelle 32: Sequenzmotive und Lokalisierung untersuchter Mikrosatellitenloci.

Primerpaar	wiederholtes Motiv	Chromosom Nr.	ORF bzw. Gen bzw. Koordinaten
MS 01	(GAA) ₁₀	XI	ORF YKL172w
MS 02	(GTC) ₁₃	XI	ORF YKR072c
MS 04	(TG) ₃₁	IV	210308 – 210417
MS 07	(CCT) ₉ (GCA) ₁₁	XI	SRP40

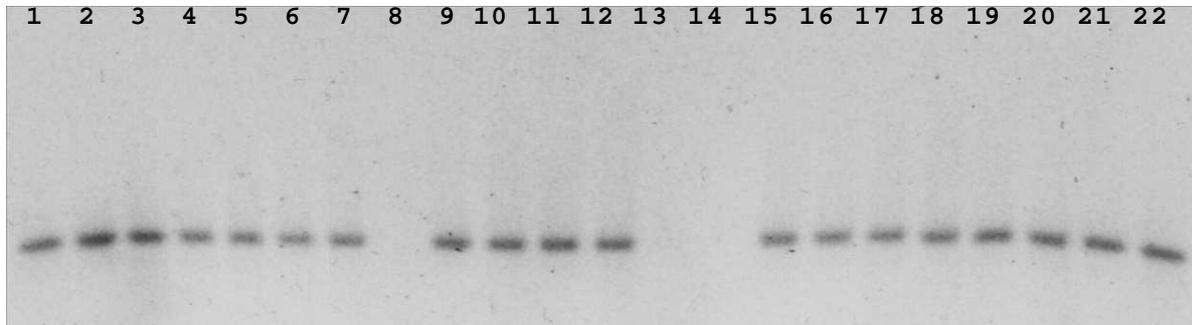


Spur 1	34	Spur 9	85	Spur 17	88
Spur 2	26	Spur 10	166	Spur 18	107
Spur 3	44	Spur 11	167	Spur 19	178
Spur 4	59	Spur 12	128	Spur 20	109
Spur 5	120	Spur 13	155	Spur 21	122
Spur 6	66	Spur 14	170	Spur 22	176
Spur 7	69	Spur 15	70		
Spur 8	71	Spur 16	114		

Abbildung 26: PCR-Produkte untergäriger Hefen mit Primerpaar MS 01/01 r. Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 6 h; GNA, 8 °C.

Wie Abbildung 26 zeigt, wurde mit dem Primerpaar MS 01/01 r für alle untersuchten untergärigen Hefestämme ein PCR-Produkt von ca. 120 bp Länge gebildet. Für die

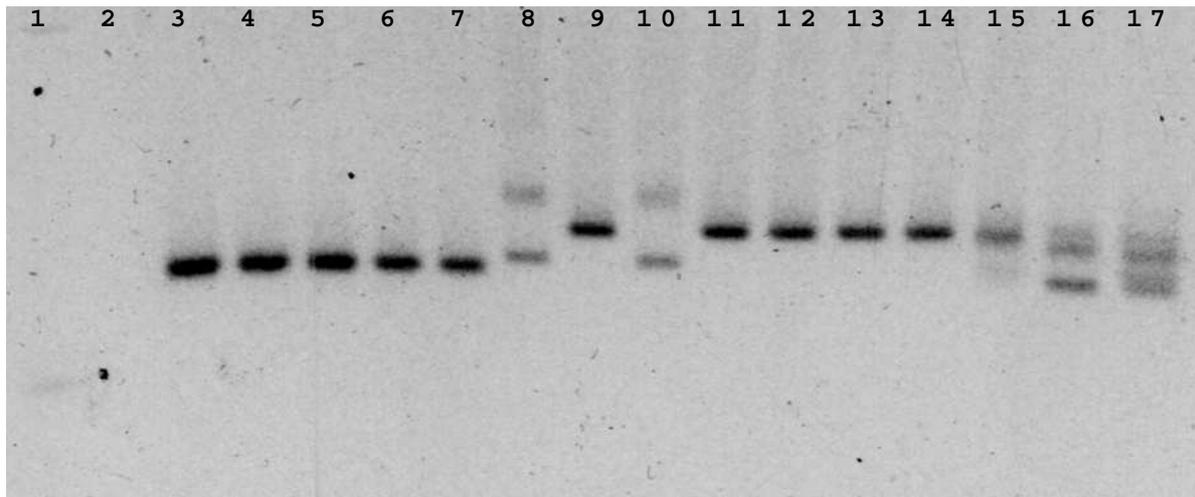
Stämme 155, 170 und 176 konnten Längenunterschiede zu den PCR-Produkten der übrigen Stämme detektiert werden, wobei der Stamm 176 sich von den beiden anderen Stämmen durch ein separates Bandenmuster unterschied.



Spur 1	34	Spur 9	85	Spur 17	88
Spur 2	26	Spur 10	166	Spur 18	107
Spur 3	44	Spur 11	167	Spur 19	178
Spur 4	59	Spur 12	128	Spur 20	109
Spur 5	120	Spur 13	155	Spur 21	122
Spur 6	66	Spur 14	170	Spur 22	176
Spur 7	69	Spur 15	70		
Spur 8	71	Spur 16	114		

Abbildung 27: PCR-Produkte untergäriger Hefen mit Primerpaar MS 04/04 r.
 Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 6 h;
 GNA, 8 °C.

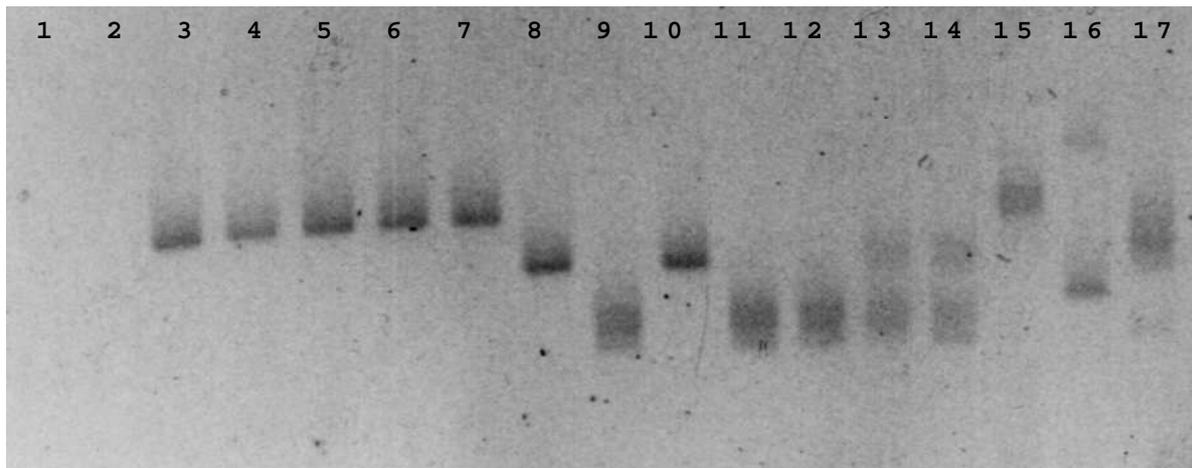
Mit dem Primerpaar MS 04/04 r wurde für alle untersuchten untergärigen Stämme mit Ausnahme der Stämme 71, 155 und 170 ein PCR-Produkt gleicher Länge (ca. 90 bp) gebildet. Für die erwähnten Stämme fehlte das PCR-Produkt (vgl. Abbildung 27).



Spur 1	100bp-Leiter	Spur 7	212	Spur 13	177
Spur 2	/	Spur 8	141	Spur 14	208
Spur 3	68	Spur 9	148	Spur 15	210
Spur 4	127	Spur 10	165	Spur 16	211
Spur 5	149	Spur 11	184	Spur 17	213
Spur 6	205	Spur 12	174		

Abbildung 28: PCR-Produkte obergäriger Hefen mit Primerpaar MS01/01 r.
 Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 6 h;
 GNA, 8 °C.

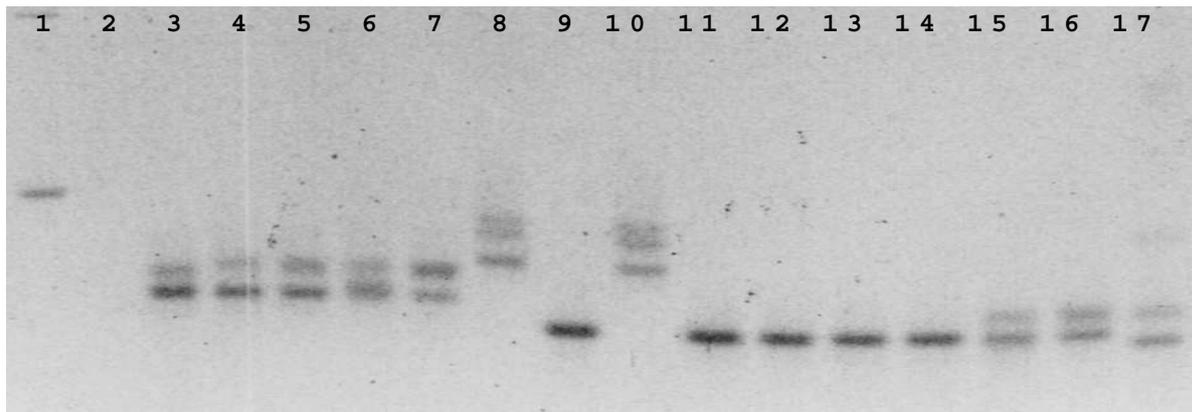
Die PCR-Analyse der obergärigen Stämme mit den Primern MS01 / MS01 r ergab für alle untersuchten Stämme PCR-Produkte von ca. 120 bp Länge. Nach der Auftrennung in einem Methaphor-Agarosegel erhielt man Bandenmuster, die eine Einteilung der Stämme in vier Gruppen erlaubt (vgl. Abbildung 28).



Spur 1	100bp-Leiter	Spur 7	212	Spur 13	177
Spur 2	/	Spur 8	141	Spur 14	208
Spur 3	68	Spur 9	148	Spur 15	210
Spur 4	127	Spur 10	165	Spur 16	211
Spur 5	149	Spur 11	184	Spur 17	213
Spur 6	205	Spur 12	174		

Abbildung 29: PCR-Produkte obergäriger Hefen mit Primerpaar MS02/02 r.
 Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 6 h;
 GNA, 8 °C.

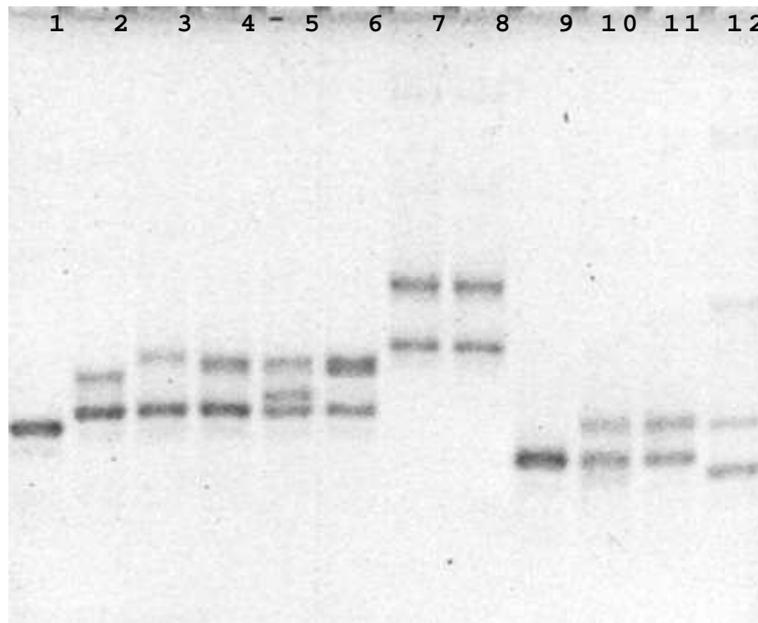
In einer PCR obergäriger Stämme mit den Primern MS02 / MS02 r wurde für alle untersuchten Stämme ein PCR-Produkt von ca. 150 bp Länge amplifiziert (vgl. Abbildung 29). Für sieben Stämme (Spuren 3 bis 8, 10) waren scharfe Banden sichtbar, anhand derer diese in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Die Produkte der anderen Hefen waren teilweise sehr unscharf getrennt. Eine Unterscheidung der Ale-Stämme (Spuren 15 bis 17) ist über den untersuchten Genort möglich. Möglicherweise sind in den Spuren 13 und 14 zwei zusätzliche, größere Allele im Vergleich zu denen in den Spuren 9, 11 und 12 sichtbar, so dass sich zwei weitere Gruppen ergäben. Die unscharfen Banden ließen sich weder durch Modifikationen im PCR-Temperaturprofil noch durch Veränderungen der Mg^{2+} -Ionenkonzentration korrigieren.



Spur 1	100bp-Leiter	Spur 7	212	Spur 13	177
Spur 2	/	Spur 8	141	Spur 14	208
Spur 3	68	Spur 9	148	Spur 15	210
Spur 4	127	Spur 10	165	Spur 16	211
Spur 5	149	Spur 11	184	Spur 17	213
Spur 6	205	Spur 12	174		

Abbildung 30: PCR-Produkte obergäriger Hefen mit Primerpaar MS04/04 r.
 Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 6 h;
 GNA, 8 °C.

Die Untersuchung mit den Primern MS04 / MS04 r ergab für alle obergärigen Stämme ein PCR-Produkt von ca. 90 bp Länge (vgl. Abbildung 30). Die Analyse in einem 3 % Methaphor/1 % Seakem LE-Agarosegel ließ fünf verschiedene Bandenmuster für die untersuchten Stämme erkennen. Außerdem konnte vermutet werden, dass mehrere Stämme an diesem Locus Längenpolymorphismen aufwiesen, die mit den in Abbildung 30 beschriebenen Elektrophoresebedingungen nicht deutlich dargestellt werden konnten.

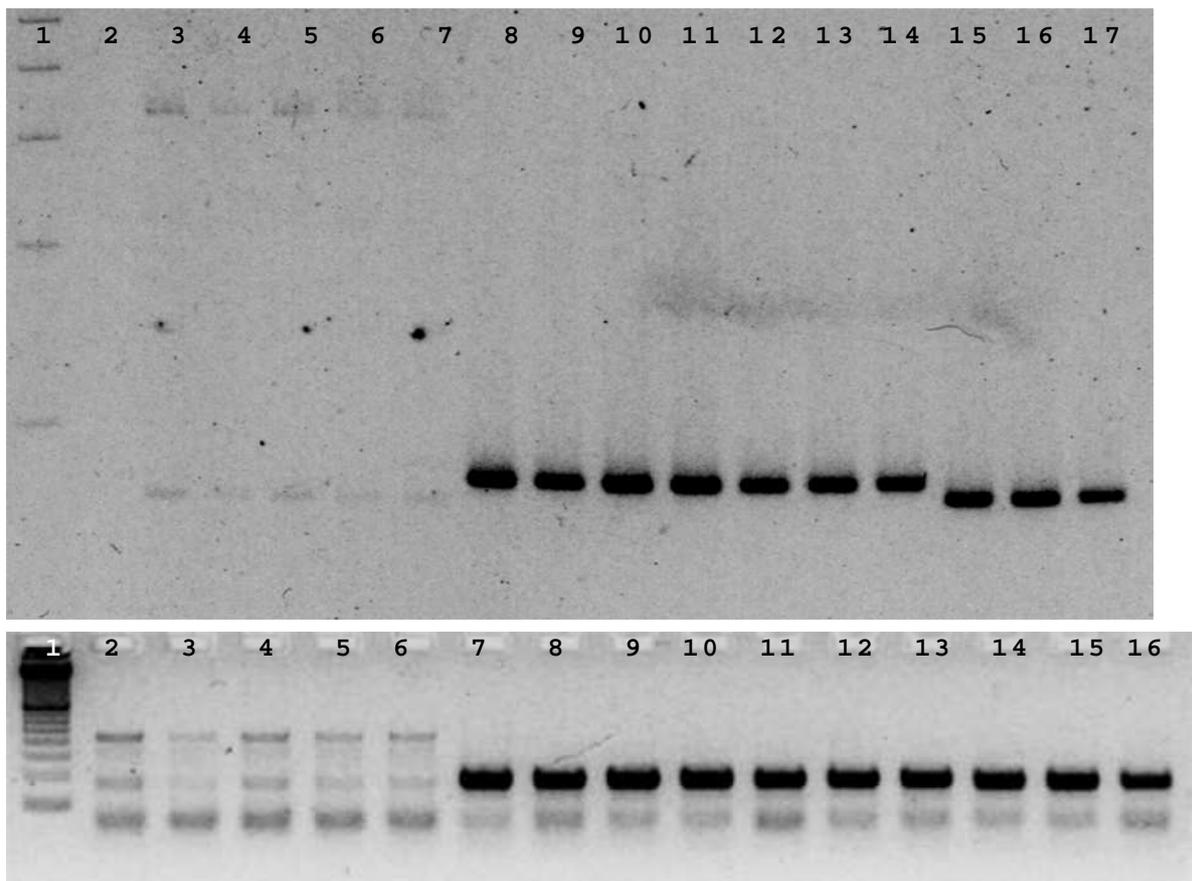


Spur 1	34	Spur 7	141
Spur 2	68	Spur 8	165
Spur 3	127	Spur 9	148
Spur 4	149	Spur 10	210
Spur 5	205	Spur 11	211
Spur 6	212	Spur 12	213

Abbildung 31: PCR-Produkte obergäriger Hefen (untergäriger Stamm 34 als Referenz) mit Primerpaar MS 04/04 r.
 Auftrennung in Agarosegel: 5 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TBE-Puffer;
 Ethidiumbromid-Nachfärbung; 10 V/cm; 3 h; Hoefer, RT.

Nach einer Elektrophorese der PCR-Produkte mit Primern MS04 / MS04 r unter modifizierten Bedingungen wurden diese Längenunterschiede deutlich (vgl. Abbildung 31). Für die zuvor einheitlich erscheinende Gruppe der fünf Weißbierhefen (Spuren 3 bis 7, Abbildung 30) waren jetzt vier unterschiedliche Bandenmuster erkennbar (Spuren 2 bis 6, Abbildung 31).

Für die anderen Hefestämme ergaben sich gegenüber den Elektrophoresebedingungen aus Abbildung 30 keine weiteren Differenzierungsmöglichkeiten.

Gel oben

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	141	Spur 15	210
Spur 2	/	Spur 9	148	Spur 16	211
Spur 3	68	Spur 10	165	Spur 17	213
Spur 4	127	Spur 11	184		
Spur 5	149	Spur 12	174		
Spur 6	205	Spur 13	177		
Spur 7	212	Spur 14	208		

Gel unten

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	148	Spur 15	211
Spur 2	68	Spur 9	165	Spur 16	213
Spur 3	127	Spur 10	184		
Spur 4	149	Spur 11	174		
Spur 5	205	Spur 12	177		
Spur 6	212	Spur 13	208		
Spur 7	141	Spur 14	210		

Abbildung 32: PCR-Produkte obergäriger Hefen mit Primerpaar MS07/07 r.

Bild oben: Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 6 h; GNA, 8 °C.

Bild unten: Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 1 h; GNA, 8 °C.

In der PCR obergäriger Stämme mit den Primern MS07 / MS07 r wurde für alle untersuchten Stämme ein PCR-Produkt von ca. 150 bp Länge vervielfältigt. In den Spuren 3 bis 7, oberes Gel, besser im unteren Gel (Spuren 2 bis 6) in Abbildung 32

ist eine zusätzliche Bande von ca. 430 bp mindestens gleicher Intensität zu erkennen.

Mit diesem Primerpaar war eine Einteilung der Stämme in drei Gruppen möglich.

Tabelle 33 fasst die Möglichkeiten zur Einteilung der untersuchten obergärigen Hefestämme in Gruppen mit Hilfe der eingesetzten Mikrosatellitenprimer zusammen:

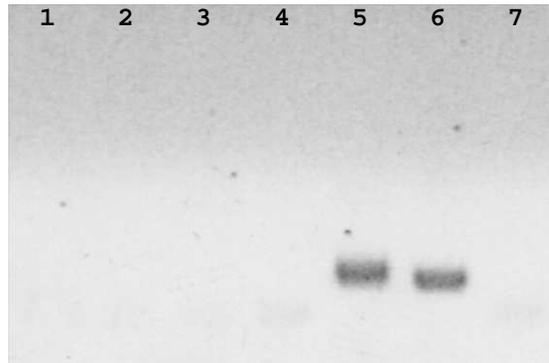
Tabelle 33: Gruppeneinteilung obergäriger Bierhefen aufgrund der Bandenmuster mit Mikrosatellitenprimern.

Stamm	MS01	MS02	MS04	MS07
(34)			(M4 ug)	
68	M1 1	M2 1	M4 1	M7 1
127	M1 1	M2 1	M4 2	M7 1
149	M1 1	M2 1	M4 3	M7 1
205	M1 1	M2 1	M4 4	M7 1
212	M1 1	M2 1	M4 3	M7 1
141	M1 2	M2 2	M4 5	M7 2
148	M1 3	(M2 3)	M4 6	M7 2
165	M1 2	M2 2	M4 5	M7 2
184	M1 3	(M2 3)	M4 6	M7 2
174	M1 3	(M2 3)	M4 6	M7 2
177	M1 3	(M2 4)	M4 6	M7 2
208	M1 3	(M2 4)	M4 6	M7 2
210	M1 3	(M2 1)	M4 7	M7 3
211	M1 4	M2 5	M4 7	M7 3
213	M1 4	(M2 2)	M4 8	M7 3

Zusätzlich zu den Kulturhefen wurde eine Auswahl an *Saccharomyces*-Fremdhefen mit den Primerpaaren MS 01/01 r und MS 04/04 r untersucht, um zu überprüfen, ob diese für *Saccharomyces cerevisiae* spezifisch waren. In der gelelektrophoretischen Auswertung sollte lediglich die Bildung eines PCR-Produktes überprüft werden; auf eine Auftrennung in einem höher auflösenden Gel wurde verzichtet.

Primer MS 04

Spur 1	<i>S. pastorianus</i> DSM 6581
Spur 2	<i>S. pastorianus</i> DSM 6580
Spur 3	<i>S. bayanus</i> DSM 70412
Spur 4	<i>S. exiguus</i>
Spur 5	<i>S.c. var ellipsoideus</i> DSM 70451
Spur 6	<i>S.c. diastaticus</i> A&G
Spur 7	NTC



Primer MS 01

Spur 1	<i>S. pastorianus</i> DSM 6581
Spur 2	<i>S. pastorianus</i> DSM 6580
Spur 3	<i>S. bayanus</i> DSM 70412
Spur 4	<i>S. exiguus</i>
Spur 5	<i>S.c. var ellipsoideus</i> DSM 70451
Spur 6	<i>S.c. diastaticus</i> A&G
Spur 7	NTC

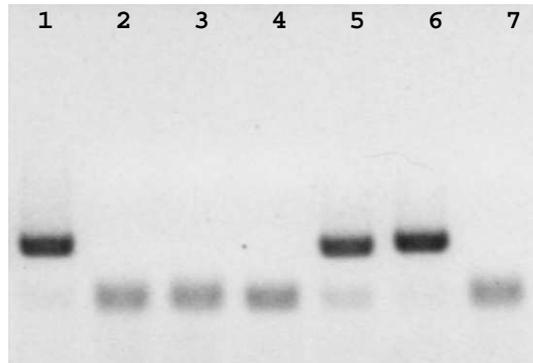


Abbildung 33: PCR-Produkte von *Saccharomyces*-Fremdhefen mit Primerpaar MS 04/04 r (Gel oben) und Primerpaar MS 01/01 r (Gel unten). Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 45 min; Hofer, RT.

Mit dem Primerpaar MS 04/04 r wurde für die beiden Hefen *S. c. var ellipsoideus* DSM 70451 und *S. c. diastaticus* A&G, mit dem Primerpaar MS 01/01 r für die Stämme *S. pastorianus* DSM 6581, *S. c. var ellipsoideus* DSM 70451 und *S. c. diastaticus* A&G ein DNA-Fragment vervielfältigt (vgl. Abbildung 33).

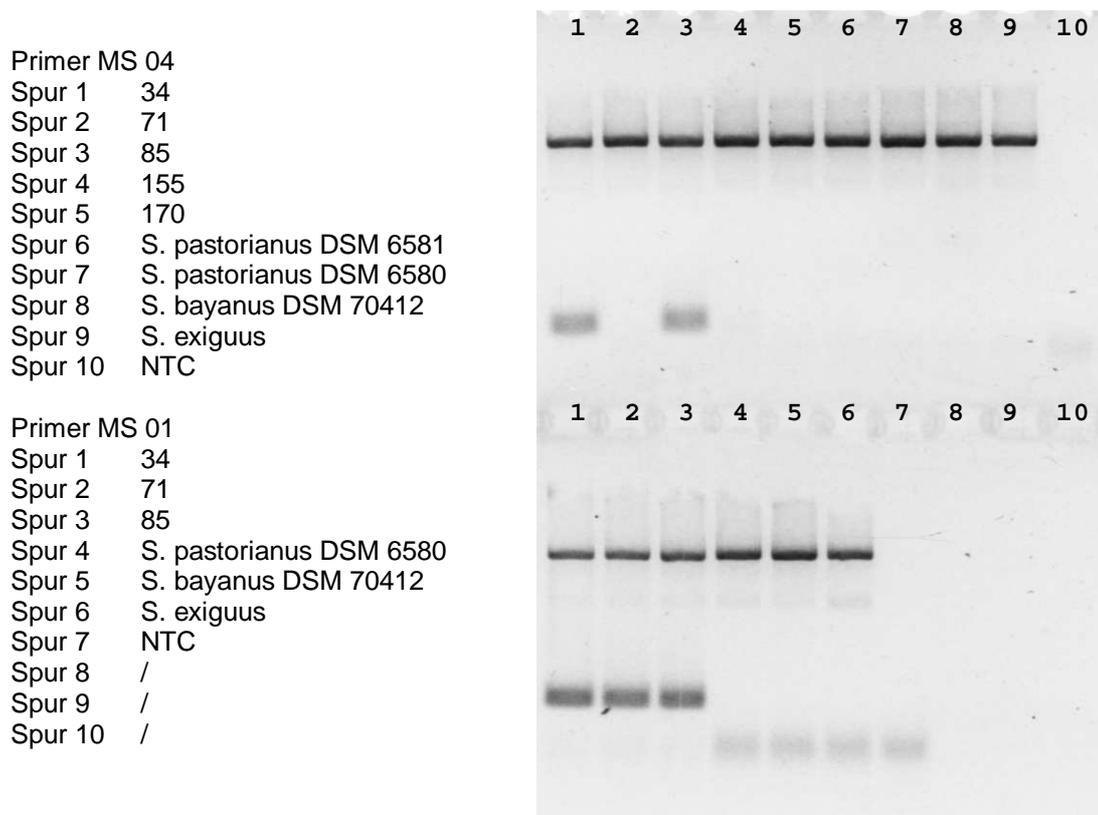


Abbildung 34: PCR-Produkte von *Saccharomyces*-Hefen mit Primerpaaren H550/H1200 und MS 04/04 r (Gel oben) und Primerpaaren H550/H1200 und MS 01/01 r (Gel unten). Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 45 min; Hoefer, RT.

Um auszuschließen, dass das Fehlen von Amplifikaten nicht auf zu geringe DNA-Konzentrationen oder Inhibitoren in der Reaktion zurückzuführen war, wurden die DNAs, für die kein PCR-Produkt mit einem Mikrosatellitenprimer gebildet wurde, mit denselben Primern nochmals analysiert. Die Reaktion enthielt zusätzlich als interne Amplifikationskontrolle das Primerpaar H550/H1200. In allen Reaktionen konnte das Kontroll-Produkt (obere Bande) nachgewiesen werden. Die negativen Ergebnisse der vorhergehenden PCRs konnten bestätigt werden.

3.5.2 Isolierung von variablen Mikrosatellitenloci

Da die Differenzierungsmöglichkeiten für untergärrige Hefen mit den willkürlich aus der Datenbank ausgewählten Loci nicht ausreichend waren, ist davon auszugehen, dass zum Auffinden eines einigermaßen variablen Genortes zahlreiche Mikrosatelliten hätten untersucht werden müssen. Im folgenden sollte daher unabhängig von öffentlichen Daten direkt eine Satellitensequenz isoliert werden, die zumindest die Unterscheidung zweier untergärriger Hefen erlaubt. Dazu wurden die ReLis (Mse I / EcoR I) der Hefen 34 und 66 in fünf 20µl-Preamplifikationsreaktionen (Primer M+0 / E+0) vervielfältigt. Die Reaktionen wurden jeweils vereinigt, wie unter 2.8.5 konzentriert, in 50 µl H₂O_{dd} resuspendiert und wie unter 2.17.2 weiterbehandelt. Ein biotinyliertes (CA)₈-Oligonukleotid diente als Sonde.

Jeweils 10 µl des ersten Eluats wurden in eine PCR entsprechend der ursprünglichen Preamplifikationsreaktion eingesetzt.

Je 6 µl aus diesen Reaktionen wurden über ein 10 %iges Polyacrylamid "Clean", DISC-Puffersystem aufgetrennt und silbergefärbt (vgl. 2.10.2)

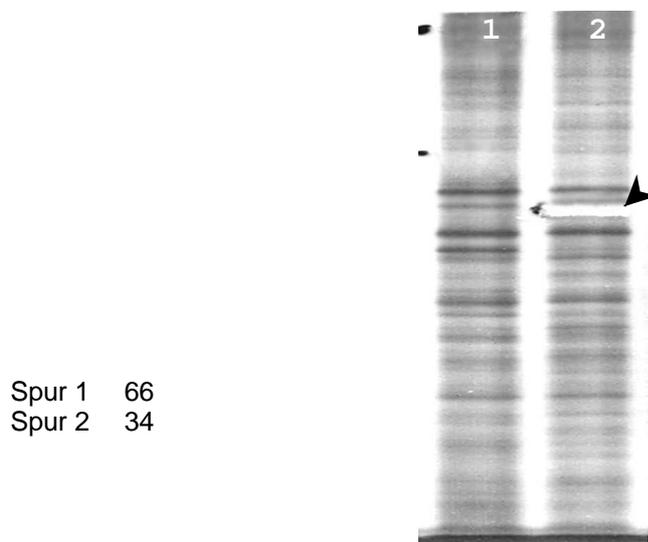


Abbildung 35: PCR mit Eluat; Primerpaar M+0 / E+0 (vgl. 2.17.2). Auftrennung in 10 % Clean-Gel, DISC-Puffer, Laufbedingungen (vgl.2.10.2); Bande an markierter Stelle ausgeschnitten.

An der in Abbildung 35 mit einem Pfeil gekennzeichneten Stelle war für den Hefestamm 34 gegenüber dem Stamm 66 eine zusätzliche Bande sichtbar, die wie unter 2.8.3 aus dem getrockneten Gel reamplifiziert wurde.

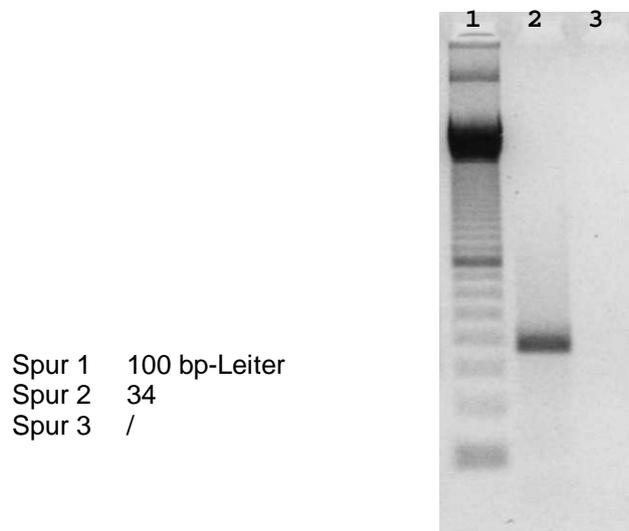


Abbildung 36: Reamplifiziertes DNA-Fragment mit Primerpaar M+0 / E+0 (siehe Abbildung 35, Pfeil) (vgl. 2.17.2).
Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 45 min; Hoefer, RT.

Das reamplifizierte DNA-Fragment der Größe 400 bp wurde in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 36), ausgeschnitten, erneut wie unter 2.8.2 vervielfältigt und sequenziert. Die Sequenz beinhaltet einen Tandemrepeat mit der Kernsequenz GGT TGT GTT perfekt wiederholt von Position 192 bis Position 290.

An den Positionen 294 und 312 liegt ein T->G Austausch gegenüber der Kernsequenz vor, an der Position 318/19 ein GG->AA Austausch. Durch diesen Austausch liegt an dieser Stelle eine Mse I-Schnittstelle vor (vgl. Abbildung 37).

```

          v10      v20      v30      v40      v50
AATAAGGATCGATCGTATTTTTTCACATCTAGAGTTGGTACCATATCCTGT

          v60      v70      v80      v90      v100
TGCTTTGTCTGGGTTGATAGTACCGATGGTGCTGGTAATGATGACTGTAT

          v110     v120     v130     v140     v150
CGATGATGGTGCCGATGGTGCCGATAATGATGATTGTGTTGATGGTGGTG

          v160     v170     v180     v190     v200
CCAGAGGTGCAGACGGAACAGACGGCGCGCTAGAGGAGCTGGTTGTGTT

          v210     v220     v230     v240     v250
GGTTGTGTTGGTTGTGTTGGTTGTGTTGGTTGTGTTGGTTGTGTTGGTTG

          v260     v270     v280     v290     v300
TGTTGGTTGTGTTGGTTGTGTTGGTTGTGTTGGTTGTGTTGGTGGTGGTTG

          v310     v320     v330
GTTGTGTTGGTGGTGGTTACTCAGGACTCATCA

```

Abbildung 37: Sequenz 214-5, Position 153 – 172: Primer MS 05, Position 316 – 331: Primer M+0 (rc).

Anhand der Sequenzdaten konnte der Vorwärts-Primer MS05 in der Nähe des Repeats ausgewählt werden. Für einen Rückwärts-Primer standen zunächst keine Daten zur Verfügung, da der Repeat direkt an die Adaptersequenz angrenzte.

Mit einer PCR mit den Primern MS 05 und M+0 sollte zunächst überprüft werden, ob an dem für den Hefestamm 34 analysierten Genort tatsächlich Unterschiede zu anderen Hefestämmen zu finden waren.

Wie in Abbildung 38 dargestellt, wiesen die PCR-Produkte von ReLis (EcoR I, Mse I) vier verschiedener Hefestämme Längenunterschiede auf (siehe Pfeil).

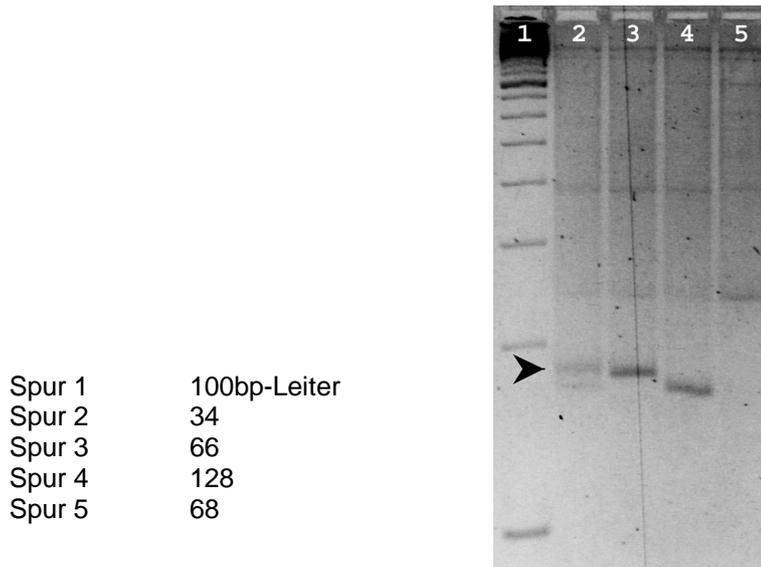


Abbildung 38: PCR von ReLis (EcoR I, Mse I) mit Primerpaar MS 05 / M + 0.
 Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 10 V/cm; 2,5 h; Hoefler, RT.

Um Sequenzinformationen über den Bereich nach dem Repeat zu erhalten, wurde DNA des Stammes 34 in eine ReLi eingesetzt, die nur das Enzym EcoR I sowie die entsprechenden Adapter enthielt. Aus dieser Reaktion wurde, wie Abbildung 39 zeigt, mit dem Primerpaar MS 05 / E+0 ein ca. 300 bp langes Fragment vervielfältigt (Spur 3).

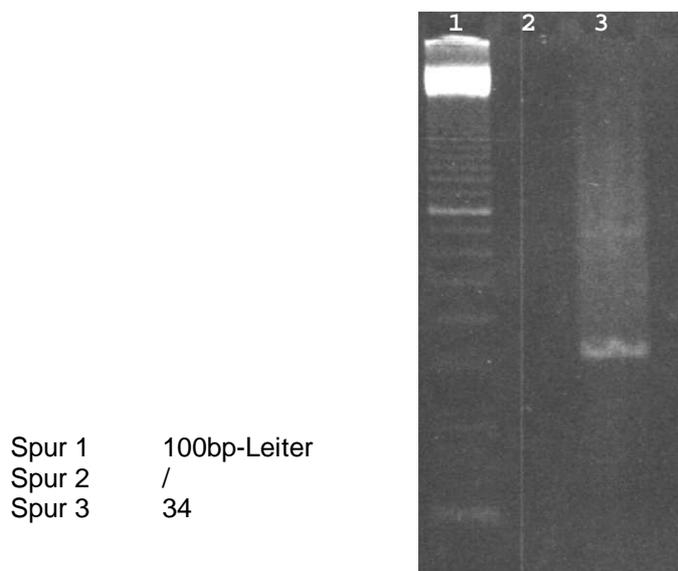


Abbildung 39: PCR von ReLis (Eco R I) mit Primerpaar E+0 / MS 05.
 Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 45 min; Hoefler, RT.

Das PCR-Produkt wurde wie unter 2.8.2 aufbereitet und mit Primer MS 05 sequenziert. Aus den Sequenzdaten (Abbildung 40) wurde der Primer MS 05 r abgeleitet.

```

          v10          v20          v30          v40          v50
NNNNNNNTTGGTACAATANCCTTCTGTGTCGCGGAGTTGGCTTATTTTGTAT

          v60          v70          v80          v90          v100
ATTAGCACTGTTTTATTANAACCTTTGGGGGGTATTCTTATTACGAGCAGTAG

          v110         v120         v130         v140         v150
GTTGCGTGCTNTTCGTTGGAGCTTGAATGGGTTGGGAACCTTGCTGGTGGA

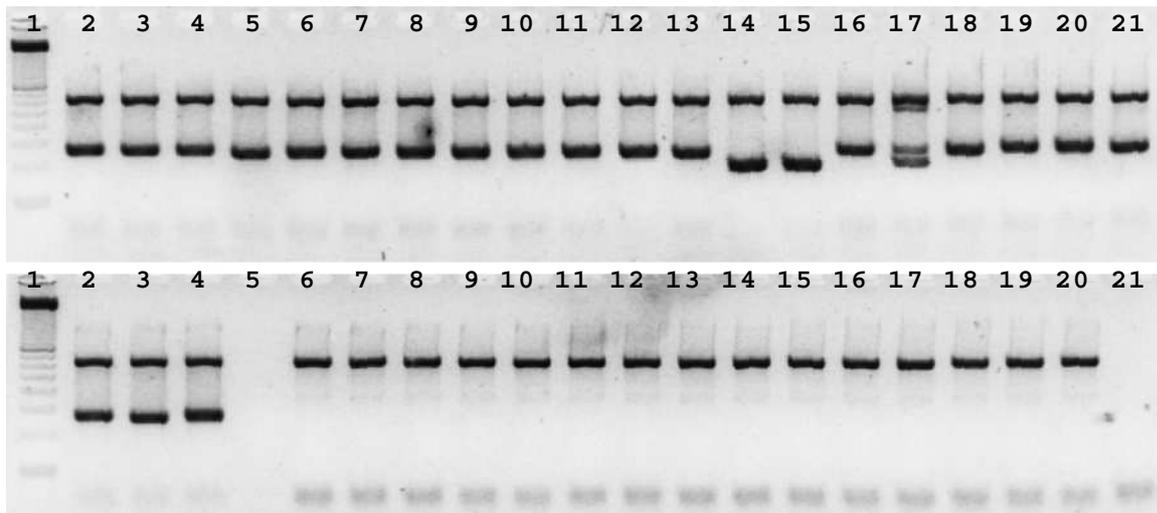
          v160
GCAGAATTGGTAC

```

Abbildung 40: Sequenz 1108, Primer MS 05. Position 86 – 107: Primer MS 05 r (rc), Position 154 – 163: Primer E+0 (3'-Ende, rc).

In einer Recherche in der SGD [Cherry, J. M. 1999] ergaben sich weder Fundstellen für die wiederholte Satellitensequenz (PatMatch) noch für die flankierenden Sequenzen (BLAST bzw. FASTA).

In einer PCR mit dem Primern MS05 und MS05 r (interne Kontrollreaktion mit Primern H550 / H1200, 650 bp PCR-Produkt) wurde für alle untersuchten untergärigen Hefen ein ca. 270 bp PCR-Produkt gebildet (vgl. Abbildung 41). Abweichend davon wurde für die Stämme 155 und 170 (Spuren 14 und 15, oben) ein deutlich kürzeres bzw. für den Stamm 114 (Spur 17, oben) ein zusätzliches, deutlich kürzeres Fragment amplifiziert. Die DNAs der obergärigen Stämme zeigten keine Reaktion mit diesem Primerpaar.



Reihe oben:

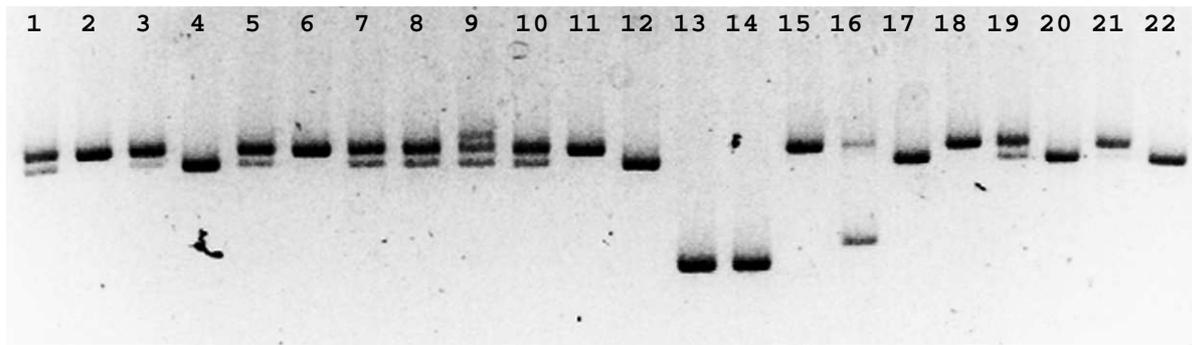
Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	69	Spur 15	170
Spur 2	34	Spur 9	71	Spur 16	70
Spur 3	26	Spur 10	85	Spur 17	114
Spur 4	44	Spur 11	166	Spur 18	88
Spur 5	59	Spur 12	167	Spur 19	107
Spur 6	120	Spur 13	128	Spur 20	178
Spur 7	66	Spur 14	155	Spur 21	109

Reihe unten:

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	149	Spur 15	174
Spur 2	122	Spur 9	205	Spur 16	177
Spur 3	176	Spur 10	212	Spur 17	208
Spur 4	SCB 2	Spur 11	141	Spur 18	210
Spur 5	/	Spur 12	148	Spur 19	211
Spur 6	68	Spur 13	165	Spur 20	213
Spur 7	127	Spur 14	184	Spur 21	NTC

Abbildung 41: PCR-Produkte (multiplex) untergarger Hefen mit Primerpaaren H 550/1200, MS05/MS05r.
 Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 1,5 h; GNA, 8  C.

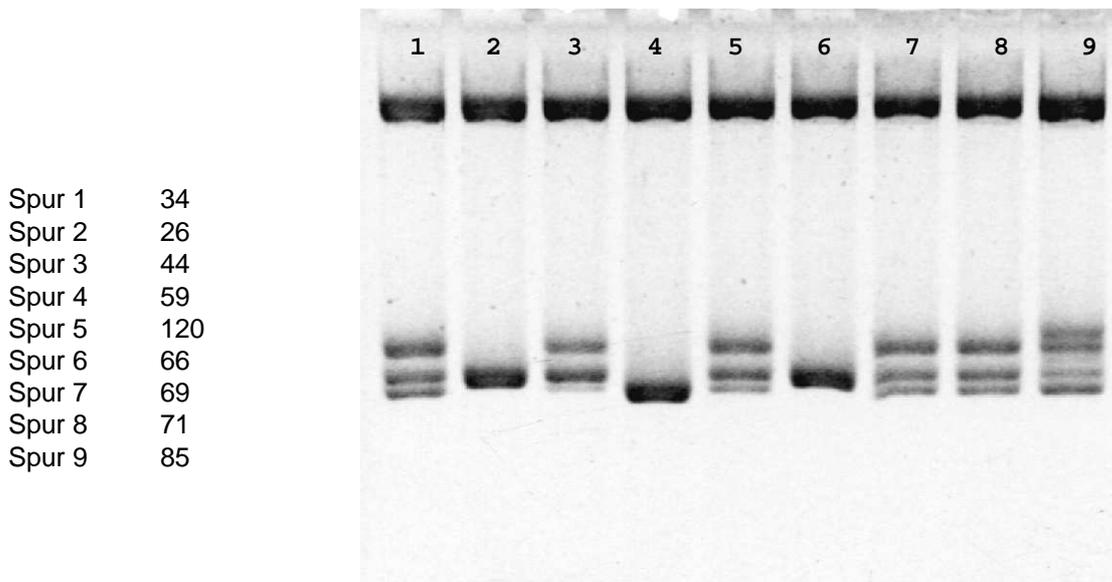
Nach einer Auftrennung der PCR-Produkte in einem höher auflösenden Gel (vgl. Abbildung 42) konnten, abgesehen den oben beschriebenen Abweichungen, vier verschiedene Bandenmuster festgestellt werden.



Spur 1	34	Spur 9	85	Spur 17	88
Spur 2	26	Spur 10	166	Spur 18	107
Spur 3	44	Spur 11	167	Spur 19	178
Spur 4	59	Spur 12	128	Spur 20	109
Spur 5	120	Spur 13	155	Spur 21	122
Spur 6	66	Spur 14	170	Spur 22	176
Spur 7	69	Spur 15	70		
Spur 8	71	Spur 16	114		

Abbildung 42: PCR-Produkte (multiplex) untergäriger Hefen mit Primerpaaren H 550/1200, MS05/MS05r.
 Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 6 h; GNA, 8 °C.
 Kontrollbanden nicht dargestellt.

Diese Unterschiede ließen sich durch eine Elektrophorese unter abgeänderten Bedingungen (siehe Abbildung 43) noch deutlicher darstellen.



Spur 1	34
Spur 2	26
Spur 3	44
Spur 4	59
Spur 5	120
Spur 6	66
Spur 7	69
Spur 8	71
Spur 9	85

Abbildung 43: PCR-Produkte (multiplex) untergäriger Hefen mit Primerpaar H 550/1200, MS 05/05 r.
 Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TBE-Puffer; Ethidiumbromid-Nachfärbung; 10 V/cm; 3 h; Hofer, ungekühlt.

In Tabelle 34 sind die Möglichkeiten einer Einteilung der untersuchten untergärigen Hefen in Gruppen mittels Analyse der beschriebenen Mikrosatellitenloci zusammengefasst.

Tabelle 34: Gruppeneinteilung von untergärigen Hefen anhand des Bandenmusters nach PCR mit Mikrosatellitenprimern.

Stamm	MS01	MS04	MS05	Stamm	MS01	MS04	MS05
34/70	1	1	1	128	1	1	3
26	1	1	2	155	2	2	5
44	1	1	1	170	2	2	5
59	1	1	3	70	1	1	2
120	1	1	1	114	1	1	6
66	1	1	2	88	1	1	3
69	1	1	1	107	1	1	2
71	1	2	1	178	1	1	1
85	1	1	4	109	1	1	3
166	1	1	1	122	1	1	2
167	1	1	2	176	3	1	3

Zusätzlich zu den Kulturhefen wurden verschiedene Fremdhefen mit dem Primerpaar MS05 / MS05 r (interne Kontrollreaktion mit Primern H550 / H1200) untersucht. Wie Abbildung 44 zeigt, konnte für die beiden *S. pastorianus*-Stämme (Spuren 3 und 4) eine starke DNA-Bande (220 bp) nachgewiesen werden, die im Vergleich zu der des Stammes 34 (270 bp) deutlich kürzer war. Ein 220 bp DNA-Fragment sehr schwacher Intensität ließ sich auch für die Hefen *S. bayanus* (Spur 5) und *S. exiguus* (Spur 6) detektieren.

Spur 1 34
 Spur 2 68
 Spur 3 *S. pastorianus* DSM 6581
 Spur 4 *S. pastorianus* DSM 6580
 Spur 5 *S. bayanus* DSM 70412
 Spur 6 *S. exiguus*
 Spur 7 *S. c. var ellipsoideus*
 DSM 70451
 Spur 8 *S. c. diastaticus* A&G
 Spur 9 NTC
 Spur 10 100bp-Leiter

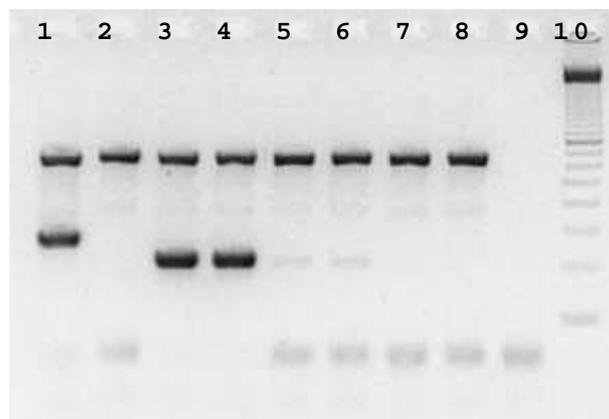


Abbildung 44: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550/1200, MS05/MS05r. Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 1,5 h; GNA, 8 °C.

Wie in Abbildung 41 und Abbildung 42 gezeigt, wiesen die Stämme 155 und 170 ebenfalls gegenüber dem Stamm 34 ein kürzeres PCR-Produkt mit den Primern MS05/MS05r auf. Beim Vergleich der PCR-Produkte dieser Hefestämme mit dem der *S. pastorianus*-Stämme in einem höher auflösendem Gel konnten keine Längenunterschiede festgestellt werden (vgl. Abbildung 45).

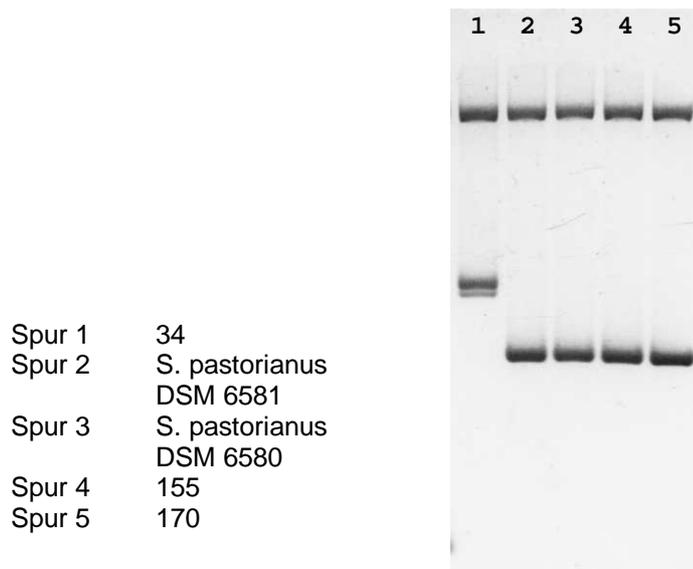


Abbildung 45: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550/1200, MS05/MS05r. Auftrennung in Agarosegel: 3 % Methaphor, 1 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm, 2,5 h; Hoefer, RT.

3.6 Subtraktive Hybridisierung

In dem Versuch sollten Sequenzabschnitte ermittelt werden, die untergärrige Hefen zusätzlich zu obergärrigen Hefen oder in polymorpher Form gegenüber obergärrigen Hefen besitzen.

Demzufolge basierte der Driver auf dem obergärrigen Hefestamm 68, der Tester auf dem untergärrigen Stamm 34.

DNA der beiden Stämme wurde mit EcoR I und Mse I verdaut und wie unter 2.18 beschrieben weiterbehandelt.

Nach dem Mung Bean Nuclease -Verdau und darauffolgender PCR mit den Primern M+0 und Ad E 1 waren im Agarosegel zwei Banden der Größe 150 bp und 260 bp sichtbar, die in der Reaktion mit 2,5 U Nuclease am deutlichsten gegenüber einem Hintergrund ausgeprägt waren (vgl. Abbildung 46).

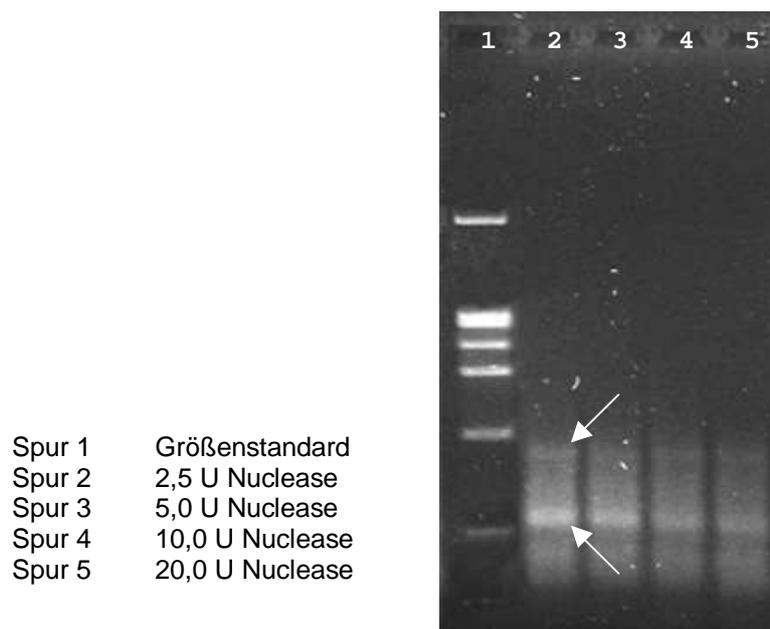


Abbildung 46: PCR-Produkte mit Primerpaar M+0 / Ad E 1 einer subtraktiven Hybridisierung nach Mung Bean Nuclease-Verdau.
 Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 6 V/cm; 45 min; Hoefer, RT.

Ein Aliquot der PCR wurde in einem 4 %igen NuSieve 3:1-Gel (TAE-Puffer; 10 V/cm; 2 h; Hoefer, RT) aufgetrennt, um gegenüber dem Hintergrund schärfer abgegrenzte Banden zu erhalten. Die beiden Banden wurden zur Herstellung von Hybridisierungssonden mit biotinylierten Primern reamplifiziert (vgl. 2.8.2).

Um zu überprüfen, ob die angereicherten DNA-Fragmente tatsächlich einzigartig für die Tester-Repräsentation waren, wurden aus einigen vorhergehenden Schritten Aliquots in eine PCR mit den Primern Ad E 1 / M + 0 eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einem 1,5 %igen Seakem LE-Gel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit den Sonden hybridisiert.

Die Templates für diese PCR sind in Tabelle 35 aufgeführt:

Tabelle 35: Templates für die PCR zur Kontrolle der Subtraktiven Hybridisierung.

Template		Verdünnung	Anmerkung	µl im Gel	Spur
Gel mit 150bp-Fragment		1:100	vgl. Abbildung 46	2	1
Gel mit 260 bp-Fragment		1:100	vgl. Abbildung 46	2	1
Pre	34	1:10	Preamplifikationsreaktion mit dUTP	10	2
Pre	68	1:10		10	3
Tester	34	1:10	ungefähr entsprechend der Konzentration vor der Konzentrierung	10	4
Driver	68	1:200		10	5

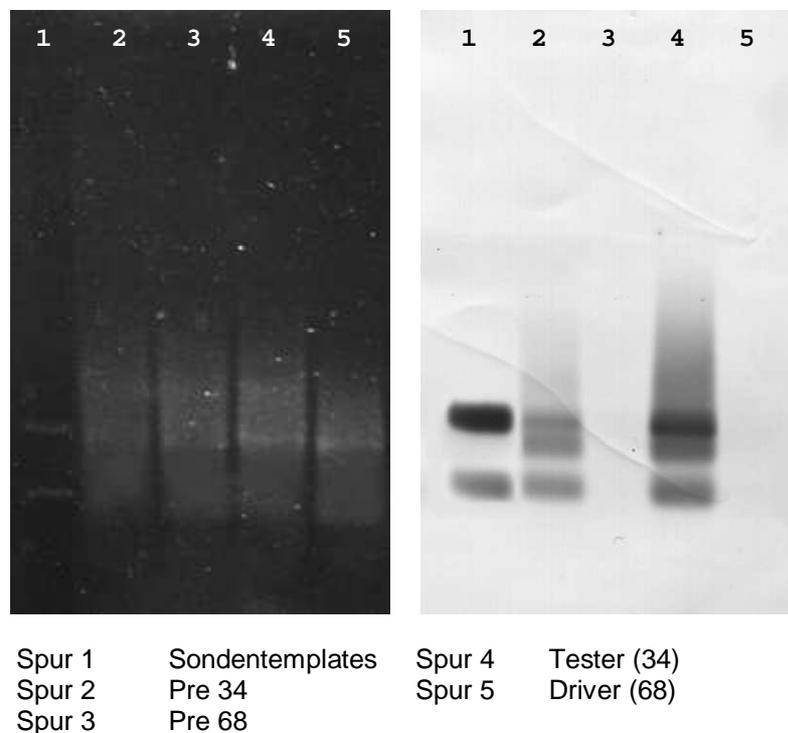


Abbildung 47: Southern-Hybridisierung von (Pre)-Amplifikationsreaktionen. Sonde: Biotin-markierte PCR-Produkte von DNA-Banden (vgl. Abbildung 46).

In Spur 1, Abbildung 47 beobachtet man erwartungsgemäß ein sehr starkes Signal, da die Templates für die Sonden und die analysierte Reaktion identisch waren. In den Spuren 2 und 4, in denen DNA des Stammes 34 analysiert wurde, sind deutliche Signale zu sehen. In beiden Spuren ist zusätzlich zu den erwarteten Banden zwischen diesen eine weitere Bande zu sehen. In den Spuren 3 und 5, in denen DNA des Stammes 68 untersucht wurde, sind keinerlei Hybridisierungssignale zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die untersuchten Fragmentmengen, die als Templates eingesetzt wurden, keine PCR-Produkte mit der den Sondensequenzen entsprechenden Basenabfolge enthielten.

Die PCR-Produkte der reamplifizierten DNA-Banden aus Abbildung 46 wurden sequenziert und die Sequenzen in einer BLAST-Suche mit den Daten in der SGD [Cherry, J. M. 1999] abgeglichen.

Die Alignments der Sequenzen mit der jeweiligen Sequenz mit der höchsten Übereinstimmung in der Datenbank sind in Abbildung 48 und Abbildung 49 dargestellt.

Martinez/Needleman-Wunsch DNA Alignment
 Minimum Match: 9; Gap Penalty: 1.10; Gap Length Penalty: 0.33
 Seq1(1>153) Seq2(1558<1423) Similarity Gap Gap Consensus
 0924-2 YML035C Index Number Gap Length Length
 (14>136) (1545<1423) 90.2 0 0 123

```

          v10      v20      v30      v40      v50
0924-2  GATGAGTCCTGAGTAAACCAACGAACATTATGGGAAATGACTTTGTTGTCG
          || |      || |      || |      || |      || |
YML035C  TCGGAATTTGGACTAACCAACGAACATTATGGGAAATAACTTTGTTGTCA
          ^1550      ^1540      ^1530      ^1520      ^1510

          v60      v70      v80      v90      v100
0924-2  ATGACCCAGCTAGCTAATTTATCCCATTCATCAAGAGATCTACCATAAAC
          || |      || |      || |      || |      || |
YML035C  ATCACCCAGCTAGCTAGTTTATCCCATTCATCGAGAGACCTGCCATAAAC
          ^1500      ^1490      ^1480      ^1470      ^1460

          v110     v120     v130     v140     v150
0924-2  GGAGATTCTGTACTCGCAGTTTTGGTATTTTCGAATTGGTACGCAGTCTACGAG
          || |      || |      || |      || |      || |
YML035C  AGAAATTCTATACTCACAGTTTTGGTATTTTGAATTCTCTAAATCGAATATGA
          ^1450      ^1440      ^1430      ^1420      ^1410

```

Abbildung 48: Alignment Sequenz PCR-Produkt 0924-2 mit Sequenz ORF YML035C (AMD1) (ChrXIII: Koordinaten 208860 bis 206428) [Cherry, J. M. 2001].
 Position 1 –16: Primer M+0; Position 137 – 153: Primer Ad E1 (rc); Position 33 –53: Primer UG100E; Position 89 – 110: Primer UG100M (rc) (Positionsangaben relativ zur Sequenz PCR-Produkt 0924-1).

Für das 150 bp-Fragment ergab sich eine 90,2 %ige Übereinstimmung mit dem Gen AMD1. An Position 1433 bis 1438 ist eine EcoR I-Schnittstelle lokalisiert. Eine der Sequenz 0924-2 entsprechende Mse I-Schnittstelle fehlt (T->C an Position 1555).

Martinez/Needleman-Wunsch DNA Alignment
 Minimum Match: 9; Gap Penalty: 1.10; Gap Length Penalty: 0.33
 Seq1(14>247) Seq2(681>914) Similarity Gap Gap Consensus
 0924-1 YPR184W.seq Index Number Length Length
 (14>247) (681>914) 81.7 4 4 236

```

                                v10      v20      v30      v40      v50
0924-1  GATGAGTCCTGAGTAACACACACCGCAAACAATTCTCCTTGGCTT-GTCGAA
          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
YPR184W  CAGATATTGTTTTTAAACACACAGCTAATAATTCTCCTTGG-TTAGTTGAG
          ^670      ^680      ^690      ^700      ^710

                                v60      v70      v80      v90      v100
0924-1  CACCCTGAAGCTGGGTATAACACCTCACTGCTCCACATTTGATCAGCGC
          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
YPR184W  CACCCGGAGGCTGGGTATAACACATCACTGCGCCACATCTAATCAGCGC
          ^720      ^730      ^740      ^750      ^760

                                v110     v120     v130     v140     v150
0924-1  CATTGAGCTCGATCTAGAACTT-CTCAACTTCAGCAACAACCTCAAGTCCT
          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
YPR184W  CATAGAGCTCGACCAAGAA-TTGCTCAATTTTAGTAGGAATTTGAAATCCT
          ^770      ^780      ^790      ^800      ^810

                                v160     v170     v180     v190     v200
0924-1  GGGGCTACCCGACCGAGCTGAATACTATAGACGATCTTTTCAAAATCATG
          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
YPR184W  GGGGCTATCCTACCGAACTGAAAAATATAGAAGATCTCTTCAAGATCATG
          ^820      ^830      ^840      ^850      ^860

                                v210     v220     v230     v240     v250
0924-1  GATGGTATCAAAGTGCATGTTCTAGGGTCGTTGAAACTTTGGGAATTGGT
          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
YPR184W  GACGGTATTAAAGTGCATGTTTTAGGGTCGTTGAAACTGTGGGAATATTA
          ^870      ^880      ^890      ^900      ^910

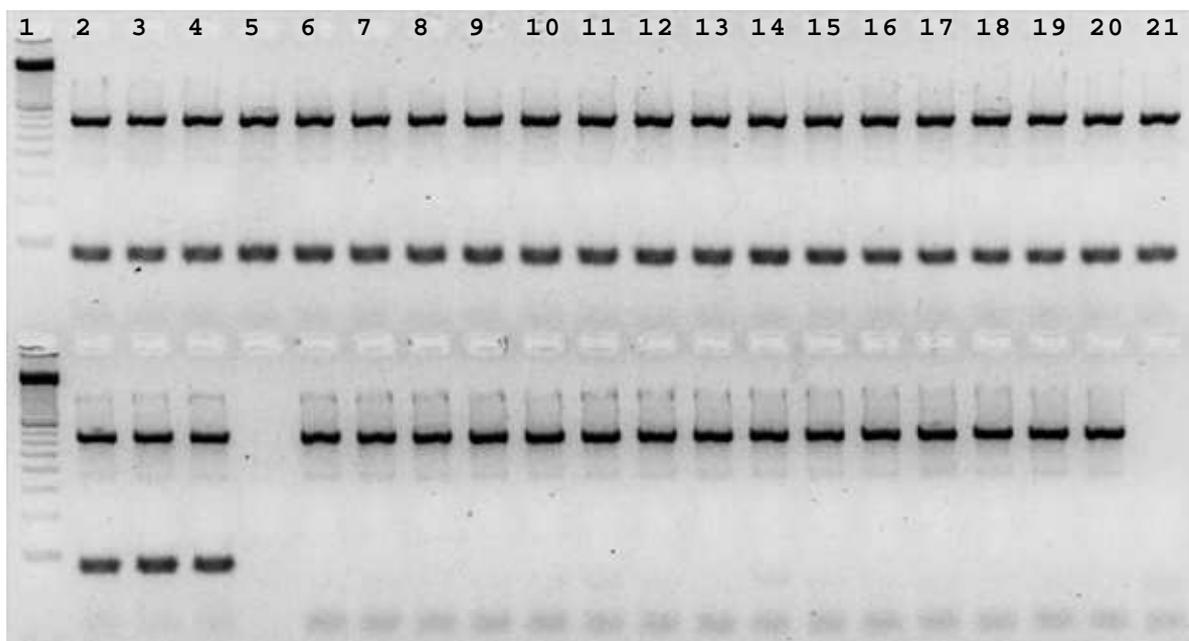
                                v260
0924-1  ACGCAGTCTACGAG
YPR184W  TCGCGTAAACGTGC
          ^920

```

Abbildung 49: Alignment Sequenz PCR-Produkt 0924-1 mit Sequenz ORF YPR184W (GDB1) (ChrXVI: Koordinaten 902039 bis 906649) [Cherry, J. M. 2001].
 Position 1 –16: Primer M+0; Position 248 – 264: Primer Ad E1 (rc); Position 34 –50: Primer UG300E; Position 122 – 141: Primer UG300M (rc) (Positionsangaben relativ zur Sequenz PCR-Produkt 0924-1).

Für das 260 bp-Fragment ergab sich eine 81,7 %ige Übereinstimmung mit dem Gen GDB1, bei dem an Position 680 bis 683 eine Mse I-Schnittstelle lokalisiert ist. Eine der Sequenz 0924-1 entsprechende EcoR I-Schnittstelle fehlt (TC->AT an Position 914/5).

Aus den Sequenzen der PCR-Produkte in Abbildung 48 und Abbildung 49 wurden die Primerpaare UG100M/UG100E und UG300M/UG300E abgeleitet, die theoretisch PCR-Produkte der Größe 78 bp bzw. 108 bp initiieren sollten. In PCRs mit diesen Primerpaaren wurden untergärige und obergärige Bierhefen sowie weitere *Saccharomyces*-Arten analysiert. Als interne Amplifikationskontrolle wurde das Primerpaar H 550/1200 eingesetzt, das die Bildung eines PCR-Produkts der Länge 650 bp startet.



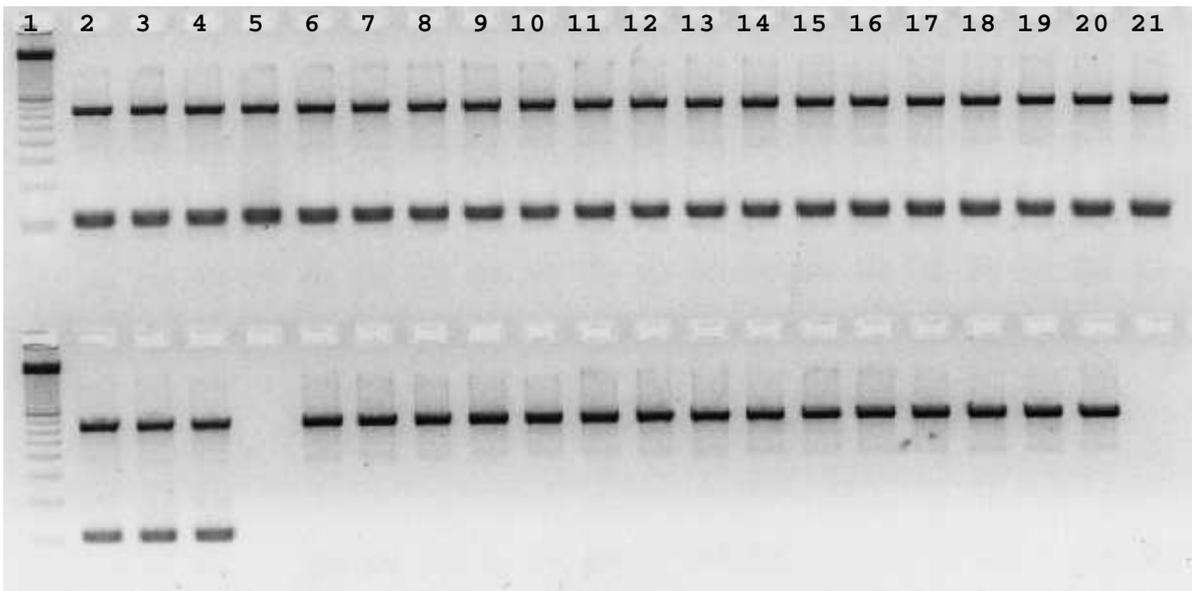
Reihe oben:

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	69	Spur 15	170
Spur 2	34	Spur 9	71	Spur 16	70
Spur 3	26	Spur 10	85	Spur 17	114
Spur 4	44	Spur 11	166	Spur 18	88
Spur 5	59	Spur 12	167	Spur 19	107
Spur 6	120	Spur 13	128	Spur 20	178
Spur 7	66	Spur 14	155	Spur 21	109

Reihe unten:

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	149	Spur 15	174
Spur 2	122	Spur 9	205	Spur 16	177
Spur 3	176	Spur 10	212	Spur 17	208
Spur 4	SCB 2	Spur 11	141	Spur 18	210
Spur 5	/	Spur 12	148	Spur 19	211
Spur 6	68	Spur 13	165	Spur 20	213
Spur 7	127	Spur 14	184	Spur 21	NTC

Abbildung 50: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550/ H 1200, UG100M / UG100E. Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 1,5 h; GNA, 8 °C.



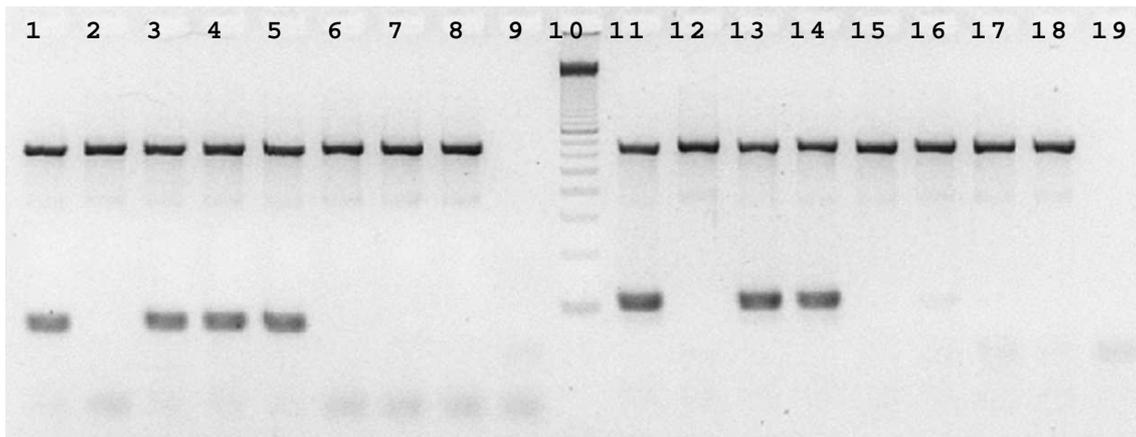
Reihe oben:

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	69	Spur 15	170
Spur 2	34	Spur 9	71	Spur 16	70
Spur 3	26	Spur 10	85	Spur 17	114
Spur 4	44	Spur 11	166	Spur 18	88
Spur 5	59	Spur 12	167	Spur 19	107
Spur 6	120	Spur 13	128	Spur 20	178
Spur 7	66	Spur 14	155	Spur 21	109

Reihe unten:

Spur 1	100bp-Leiter	Spur 8	149	Spur 15	174
Spur 2	122	Spur 9	205	Spur 16	177
Spur 3	176	Spur 10	212	Spur 17	208
Spur 4	SCB 2	Spur 11	141	Spur 18	210
Spur 5	/	Spur 12	148	Spur 19	211
Spur 6	68	Spur 13	165	Spur 20	213
Spur 7	127	Spur 14	184	Spur 21	NTC

Abbildung 51: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550/ H1200, UG300M / UG300E.
 Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 1,5 h; GNA, 8 °C.



Spur 1	34	Spur 8	<i>S. c. diastaticus</i> A&G	Spur 15	<i>S. bayanus</i> DSM 70412
Spur 2	68	Spur 9	NTC	Spur 16	<i>S. exiguus</i>
Spur 3	<i>S. pastorianus</i> DSM 6581	Spur 10	100bp-Leiter	Spur 17	<i>S. c. var ellipsoideus</i> DSM 70451
Spur 4	<i>S. pastorianus</i> DSM 6580	Spur 11	34	Spur 18	<i>S. c. diastaticus</i> A&G
Spur 5	<i>S. bayanus</i> DSM 70412	Spur 12	68	Spur 19	NTC
Spur 6	<i>S. exiguus</i>	Spur 13	<i>S. pastorianus</i> DSM 6581		
Spur 7	<i>S. c. var ellipsoideus</i> DSM 70451	Spur 14	<i>S. pastorianus</i> DSM 6580		

Abbildung 52: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550 / H1200, UG100M / UG100E (Spur 1-9) und Primerpaaren H 550 / H1200, UG300M / UG300E (Spur 11-19). Auftrennung in Agarosegel: 2 % Seakem LE; TAE-Puffer; 5 V/cm; 1,5 h; GNA, 8 °C.

Mit beiden Primerpaaren wurde für alle untergärigen Stämme ein PCR-Produkt der erwarteten Größe gebildet, während für keinen obergärigen Stamm ein PCR-Produkt erhalten wurde (vgl. Abbildung 50 und Abbildung 51). Mit dem Primerpaar UG100M / UG100E wurde auch für die beiden untersuchten *S. pastorianus*-Stämme sowie für den *S. bayanus*-Stamm ein DNA-Fragment der entsprechenden Größe vervielfältigt (Abbildung 52, Spuren 3 bis 5). Mit dem Primerpaar UG300M / UG300E erhielt man lediglich für die beiden *S. pastorianus*-Stämme ein PCR-Produkt (Spuren 13 und 14).

4 Diskussion

4.1 SSCP-Analyse ribosomaler DNA

Die SSCP-Analyse des in dieser Arbeit untersuchten rRNA-Genabschnittes erwies sich als geeignet, um Hefen auf dem Spezies-Niveau zu differenzieren.

Innerhalb der Art *S. cerevisiae* war jedoch keine weitere Unterscheidung weder der ober- noch untergärigen Kulturhefen möglich. Da jedoch nicht die exakte Sequenz für jeden Stamm ermittelt wurde, ist nicht auszuschließen, dass sich mit der angewandten Methode einzelne Sequenzpolymorphismen nicht detektieren ließen. Auch wären möglicherweise in anderen Bereichen der rRNA-Operons wie etwa den intern transkribierten Spacern, die in der Regel auch größere Inter-Spezies-Variabilität aufweisen als der hier untersuchte Abschnitt, weitere Differenzierungsmöglichkeiten gegeben. Wie aus einer anderen Arbeit hervorgeht, die die Analyse der ITS1-5.8S-ITS2-Region von unter anderem *S. cerevisiae*-Weinhefen mit Restriktionsenzymen beschreibt, ergaben sich auch in diesem Bereich, wenn auch nur basierend auf Restriktionsverdau, keine Polymorphismen zwischen diesen Stämmen [Pramateftaki, P. V. 2000], so dass die rRNA codierende DNA sich als wenig aussichtsreich für eine Differenzierung auf Stammebene darstellte. Für eine Identitätsprüfung auf Artebene hat sich die Methode dennoch als nutzbar erwiesen.

Die SSCP als Methode an sich hat den Vorteil, dass ohne Sequenzieraufwand PCR-Produkte von Genen verschiedener Arten oder Stämme auf Übereinstimmung geprüft werden können und im Gegensatz zur Restriktionsanalyse prinzipiell die gesamte Sequenz anstelle einzelner Erkennungssequenzen analysiert werden kann.

4.2 RAPD

Die Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung zwischen Fremd- und Kulturhefen mit der RAPD-PCR sehr gut möglich ist. Vor allem Hefen, die nicht zur Art *Saccharomyces cerevisiae* zählen, sind durch ihre Bandenmuster gut von den in der Brauerei eingesetzten Hefen zu unterscheiden.

Die untergärigen Bierhefen der Subspezies *Saccharomyces cerevisiae carlsbergensis* stellen eine eigene und sehr homogene Gruppe dar, innerhalb der keine weiteren Unterscheidungen möglich waren. Die obergärigen Bierhefen der Subspezies *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* bilden dagegen eine relativ heterogene Gruppe, die sich mit den verwendeten Zufallsprimern in drei Untergruppen unterteilen ließ. Die Bandenmuster der einzelnen Gruppen erlaubten es jedoch, die untergärigen Bierhefen deutlich von den obergärigen Hefen abzugrenzen.

Die Bandenmuster der untersuchten *S. pastorianus* Stämme unterschieden sich mit vielen Primern nicht oder nur unwesentlich von den Bandenmustern der untergärigen Bierhefen. Diese Beobachtung findet sich auch in der Literatur wieder [Tornai-Lehoczki, J. 2000]. Aufgrund der Ergebnisse der RAPD scheinen sich die untergärigen Bierhefen als näher verwandt zu den *S. pastorianus*-Stämmen als zu den obergärigen Bierhefen zu erwiesen.

Ein großer Vorteil der Methode an sich ist, dass keinerlei vorhergehende Kenntnis über das Genom eines Organismus benötigt wird, da sich die Zufallsprimer an nicht bekannte Stellen der DNA anlagern. Weiterhin als positiv zu bewerten ist der verhältnismäßig geringe Versuchsaufwand der Methode.

Der gravierendste Nachteil der RAPD-PCR ist generell ihre schlechte Reproduzierbarkeit, die auch bei der Verwendung identischer Reagenzien- und DNA-Lösungen an verschiedenen Versuchstagen zu beobachten war. Dieser negative Effekt mag möglicherweise je nach verwendetem Primer unterschiedlich stark ausgeprägt sein, jedoch besaßen nicht immer die effizientesten Primer das größte Differenzierungspotential.

Um einen unbekanntem Stamm zu charakterisieren sind in jedem Falle zwei oder mehr unabhängige PCRs mit verschiedenen Primern notwendig. Zudem ist es hilfreich, bei jedem Versuch Referenzproben der evtl. vermuteten Stämme oder

Gruppen mitlaufen zu lassen, um die Bandenmuster innerhalb eines Ansatzes miteinander vergleichen zu können.

4.3 PCR mit δ Element basierten Primern

Mit der PCR Analyse der δ Elemente war es möglich, die obergärigen Hefen in vier Gruppen einzuteilen. Diese Einteilung stimmte nahezu vollständig mit der beschriebenen Verwendung als Weißbier-, Alt-, Kölsch- bzw. Alehefe überein.

Alle untergärigen Stämme unterschieden sich von den obergärigen durch eine zusätzliche Bande. Von den untergärigen Hefen konnten drei Hefestämme (155, 170, 70) anhand einer fehlenden Bande von den übrigen – die ersten beiden als Gruppe - unterschieden werden. Entgegen einer Annahme aus der Literatur [Pramateftaki, P. V. 2000], wurden nicht nur für die *S. cerevisiae*-Stämme PCR-Produkte amplifiziert sondern auch für die beiden untersuchten *S. pastorianus*-Stämme. Die These von Joubert, R. (2000), die davon ausgeht, dass nicht nur die untergärigen Bierhefen sondern auch die Hefen *S. monacensis* und *S. pastorianus*, die oft neben *S. bayanus* als ein möglicher Elter der untergärigen Bierhefen diskutiert werden, selbst Hybride aus *S. cerevisiae* und einem weiteren Elter darstellen, wäre eine Erklärung hierfür. Die Bandenmuster der *S. pastorianus*-Stämme waren zudem denen der untergärigen Stämme sehr ähnlich. Insbesondere wies der *S. pastorianus*-Stamm DSM 6581 die allen untergärigen Bierhefen gemeinsame Bande auf, was ein Hinweis auf die verwandtschaftliche Nähe der untergärigen Hefen zu diesem Stamm sein könnte. Für die Hefen *S. exiguus* und *S. bayanus* wurde nur jeweils eine einzelne sehr schwache DNA-Bande detektiert.

Die Analyse an sich erwies sich während dieser Arbeit im Vergleich zur RAPD als stabiler, sowohl was die absolute Reproduzierbarkeit als auch die Intensitätsverteilung zwischen den einzelnen DNA-Banden betraf. Dies könnte daran liegen, dass die Primer zwar mehrfach im Genom binden können, die Bindung jedoch relativ spezifisch an einen Genort gekoppelt ist. Jedoch sind auch für diese Methode Variationen in der Intensität bis zum Verschwinden einzelner Banden beschrieben worden [Ness, F. 1993], was auch hier beobachtet werden konnte.

4.4 AFLP

Da die AFLP als eine Methode beschrieben ist, die sowohl RFLP als auch RAPD in ihrem Diskriminierungspotential übertrifft [Lin, J-J. 1996], war das Hauptaugenmerk hier auf die Differenzierung untergäriger Hefen gerichtet. Nach der Untersuchung mit 7 Primerkombinationen ergab sich für diese Stämme ein einziger Marker, der die Unterscheidung der untergärigen Stämme 34 und 66 erlaubte. Im Vergleich dazu unterschieden sich die obergärigen Stämme 68 und 148 teilweise mit einer einzelnen Primerkombination durch mehrere (bis zu sechs) Banden. Aber auch obergärige Stämme konnten teilweise nicht differenziert werden, sondern nur von den anderen als Gruppe unterschieden werden. Bemerkenswert erscheint hier, dass sich Rearrangements auf Chromosomenebene, die die Unterscheidung einzelner Stämme durch Karyotypisierung zulassen (vgl. 2.1), sich offensichtlich mit der AFLP nahezu überhaupt nicht darstellen ließen.

Die Variationsmöglichkeiten wurden hier aber bei weitem nicht ausgeschöpft, zumal neben allen Zusatznukleotidkombinationen auch noch die Möglichkeit der Verwendung anderer Enzymkombinationen bestünde. Letztendlich könnten wahrscheinlich für viele Stämme mit entsprechendem Aufwand Marker detektiert werden.

Die bessere Differenzierungsmöglichkeit gegenüber der RAPD schien sich dennoch zu bestätigen. Auch die Reproduzierbarkeit betreffend war die AFLP der RAPD überlegen, wobei im Widerspruch zu den früheren Ergebnissen von Vos (1995) durchaus leichte Änderungen im Temperaturprofil die Bandenmuster verändern können. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Spezifität der Reaktion von einer einzigen Fehlpaarung am 3'-Ende eines Primers abhängen kann.

Basierend auf einer zusätzlichen Bande, die der Stamm 34 gegenüber dem Stamm 66 aufwies, konnte ein spezifisches Primersystem entwickelt werden, mit dem in einer einfachen PCR von genomischer DNA direkt zwischen diesen beiden Stämmen unterschieden werden konnte. Diese PCR konnte sowohl in einem konventionellen Thermocycler als auch in einem Online-Gerät (hier LightCycler, Roche) durchgeführt werden, wodurch der Arbeitsaufwand für eine Analyse im Vergleich zur

zugrundeliegenden AFLP wesentlich verringert wurde. Vorausgesetzt, es könnten mit der AFLP mehrere Marker detektiert werden, die jeweils bestimmten Eigenschaften zugeordnet werden können, ließen sich aufbauend auf der hier gezeigten Methodik PCR-Systeme entwickeln, mit denen mit relativ geringem Aufwand Hefen gezielt auf bestimmte Eigenschaften hin untersucht werden könnten. Begrenzend wird voraussichtlich die bei untergärigen Hefen äußerst geringe Zahl an stammspezifischen Markern sein, die - wie hier am Beispiel des Flockulationsverhaltens gezeigt - nur teilweise bzw. möglicherweise auch gar nicht einer Eigenschaft zugeordnet werden können.

Die Charakterisierung eines Markers und die Entwicklung eines darauf basierenden PCR-Systems kann sich sehr arbeits- und zeitintensiv gestalten, so dass der Entwicklungsaufwand für zusätzliche Marker möglicherweise nicht durch die dadurch vereinfachte Anwendbarkeit aufgewogen wird.

4.5 Mikrosatelliten Analyse

Mit den Primern, die aus der Literatur entnommen bzw. für aus der SGD stammende Mikrosatellitenloci entworfen wurden, wurde für alle untersuchten obergärigen Hefen PCR-Produkte (pro Stamm zwischen einem und drei, unterschiedlich von Primer zu Primer) amplifiziert. Die verschiedenen Mikrosatellitenloci unterschieden sich teilweise deutlich in ihrem Differenzierungspotential. So erlaubt das Primerpaar MS07 eine sehr grobe Gruppierung in Weißbier-, Alt- und Kölsch- oder Alehefe.

Mit den Primern MS01 und MS04 konnte innerhalb der Gruppe der Alt- und Kölschhefen aufgrund ihrer Bandenverteilung zwei Gruppen festgestellt werden, die mit ihrem beschriebenen Verwendungszweck nahezu übereinstimmten. Lediglich ein Hefestamm (177), der als Hefe zur Herstellung von Alt und Kölsch beschrieben ist, reagierte wie die als reine Altheferen beschriebenen Stämme. Diese Abweichung zeigte sich bereits in vorhergehenden Analysen (vgl. 3.3), so dass der Stamm genetisch wohl eher dieser Gruppe zuzuordnen sein dürfte.

Mit den Primern MS04 konnten Weißbierstämme zum Großteil individuell identifiziert werden, da sich für fünf Weißbierhefen vier unterschiedliche Bandenmuster ergaben. Bei der Untersuchung des Genortes MS02 konnten die Alehefen untereinander unterschieden werden. Auch in der Gruppe der Altheferen ergab sich für diesen Locus

eine Möglichkeit der Untergruppierung, wenn auch gerade für diese Hefen sehr unscharfe Banden detektierbar waren. Eventuell könnte dies durch die Verschiebung der Primerbindestelle verbessert werden, da in den flankierenden Sequenzbereichen von Satelliten bisweilen Mutationen beobachtet werden [Richard, G. F. 1996]. Die Primerbindung und somit die Effizienz der PCR könnten möglicherweise durch eine solche Variation negativ beeinflusst worden sein.

Mit den hier verwendeten Primern für Mikrosatellitenloci konnten die untersuchten obergärigen Hefen je nach Bedarf entweder gröber charakterisiert oder auch individuell identifiziert werden. Lediglich für weitere Differenzierungsmöglichkeiten innerhalb der Alt- und Kölschhefen müssten weitere Loci aus der SGD untersucht werden bzw. speziell für diese Hefen analog zu den untergärigen Stämmen polymorphe Satellitensequenzen isoliert werden.

Mit den oben beschriebenen Primern konnten für nahezu alle untergärigen Hefen jeweils nur ein PCR-Produkt einheitlicher Länge detektiert werden.

Mit dem Primer MS01 zeigten die Stämme 155 und 170 einheitlich ein größeres PCR-Produkt. Der Stamm 176 wies eine zusätzliche größere Bande auf. Bei der Analyse von Nicht-*Saccharomyces cerevisiae* Hefen mit den Primern MS01 wurde nur für den *S. pastorianus* Stamm DSM 6581 ein PCR-Produkt vervielfältigt, was auf eine Verwandtschaft speziell dieses Stammes zu den Bierhefen hinweisen könnte.

In der Reaktion mit den Primern MS 04 fehlte bei drei Stämmen das Produkt ganz. Wiederum konnten so die beiden Stämme 155 und 170 und daneben der Stamm 71 von den übrigen unterschieden werden. Mit dem Primerpaar konnte bei keiner der untersuchten Nicht-*Saccharomyces cerevisiae* Hefen eine Bande detektiert werden.

Mit der hier entwickelten Methode konnte ein Mikrosatellit isoliert werden, der in einer PCR mit den Primern MS05 eine Einteilung der untergärigen Hefen in sechs Gruppen erlaubte. Dabei wiesen wiederum die beiden Stämme 155 und 170 zu den anderen Stämmen deutlich unterschiedliche Banden auf. Bei der Untersuchung der Nicht-*Saccharomyces cerevisiae* Hefen mit Primer MS 05 wurde nur für die *S. pastorianus* Stämme ein Produkt gebildet, das mit denen der Stämme 155 und 170 eine identische Länge aufwies.

In der SGD konnten keinerlei Entsprechungen für den isolierten Genort gefunden werden, so dass es sich möglicherweise um eine Nicht-*S. cerevisiae* Sequenz

handelte. Mit den auf diesem basierenden Primern wurde für alle untergärigen Stämme, jedoch für keine obergärige Hefe in der PCR ein Fragment vervielfältigt. Die Tatsache, dass sich der hier isolierte Satellit sowohl bei untergärigen Bierhefen als auch bei den beiden *S. pastorianus* Stämmen, nicht aber für die obergärigen Bierhefen nachweisen ließ, kann als weiterer Hinweis auf die verwandtschaftliche Nähe der untergärigen Bierhefen zur Spezies *S. pastorianus* gewertet werden. Die PCR-Ergebnisse mit den verwendeten Mikrosatellitenprimern lassen darauf schließen, dass es sich bei den Stämmen 155 und 170 um *S. pastorianus* Stämme handelt.

Die Methode der Mikrosatellitenanalyse zeigte ein relativ hohes Unterscheidungspotential auf Stammebene, so dass auch untergärige Stämme differenziert werden konnten.

Da mit spezifischen Primern gearbeitet wurde, entstanden in einer PCR je nach verwendetem Primer und Hefestamm sehr gut reproduzierbar zwischen einem und drei PCR-Produkte. Diese überschaubare Zahl an Produkten, die zudem kaum Intensitätsunterschiede zwischen den verschiedenen großen Fragmenten innerhalb einer Reaktion zeigten, ermöglichen eine eindeutige Auswertbarkeit. Die hier aufgezeigte Möglichkeit der Auftrennung in hochauflösenden Agarosegelen hat den Vorteil, dass die Analytik zu relativ geringen Kosten auch in einfach ausgestatteten Labors durchgeführt werden könnte. Möglicherweise gehen hierbei aber Informationen verloren, die in einem Sequenziergerät aufgrund der sicheren Auflösung von einer Base detektierbar wären. Zudem bestünde die Möglichkeit, die Allelgrößen zu bestimmen und so den Banden Zahlen zuzuordnen, was die Auswertung der Ergebnisse nochmals erheblich vereinfachen würde.

4.6 Subtraktive Hybridisierung

Ein entscheidender Schritt bei der subtraktiven Hybridisierung ist die Entfernung bzw. "Neutralisierung" driverhaltiger Hybride aus dem bzw. im Reaktionsgemisch nach der Hybridisierung, wie unabhängig von den verschiedenen Methodenvarianten oftmals betont wird [Lisitsyn, N. 1995; Wassil, L. 1998; Yang, M. 1996; Millner, J. J. 1995; Cho, T. 1998]. Von verschiedenen Autoren werden unterschiedliche Lösungen beschrieben. Der Lösungsweg, der hier gewählt wurde, ging von uracilhaltiger Driver-DNA aus, die enzymatisch soweit abgebaut wurde, dass sie für nachfolgende Reaktionen nicht mehr zugänglich war. Als Test-DNAs dienten genomische DNAs eines obergärigen und eines untergärigen Stammes. Ziel war die Isolierung von Sequenzen, die einzigartig für den untergärigen Stamm sind.

Für den untergärigen Stamm 34 konnten zwei DNA-Abschnitte isoliert werden, die eine 81,7 %ige bzw. 90,2 %ige Übereinstimmung zu in der SGD hinterlegten Sequenzen aufwiesen. Es wurde angenommen, dass die obergärigen Bierhefen hohe Sequenzhomologien zum Laborhefestamm S288c, aus dessen Sequenzdaten die SGD überwiegend aufgebaut ist, aufweisen. Basierend auf den Sequenzunterschieden zu den isolierten Fragmenten wurden Primer entwickelt, die die Unterscheidung der der Isolierung zugrundeliegenden Stämme 34 und 68 (obergärig) ermöglichen sollten. Hierbei sollte noch einmal auf die fehlenden Restriktionsschnittstellen (Eco R I bzw. Mse I, vgl. 3.6) in den SGD-Sequenzen hingewiesen werden. Aus diesem Grunde war das jeweilige Driverfragment mit hoher Sequenzhomologie zu den isolierten Fragmenten vermutlich nicht in der Driverrepräsentation vorhanden, so dass die beiden DNA-Abschnitte im Reaktionsgemisch verblieben. Mit beiden Primerpaaren konnte für alle untersuchten untergärigen Hefen PCR-Produkte amplifiziert werden. Die PCRs mit den DNAs der obergärigen Hefen waren ausnahmslos negativ. Somit war die Methode geeignet, Marker zur Differenzierung von Bierhefen auf Stammebene zu isolieren.

Bei der Analyse von Nicht-*S. cerevisiae*-Hefen wurde mit beiden Primerpaaren für zwei *S. pastorianus*-Stämme ebenfalls ein Fragment vervielfältigt, für den untersuchten *S. bayanus*-Stamm lediglich mit einem Primerpaar.

Hieraus ergab sich ein weiterer Hinweis auf die nahe Verwandtschaft der untergärigen Bierhefen zur Spezies *S. pastorianus*.

Die Methodik der Subtraktiven Hybridisierung ist eine interessante Methode zur Isolierung von DNA-Abschnitten, die Unterschiede zwischen zwei Organismen aufweisen. Die Variationsmöglichkeiten der Versuchsparameter sind jedoch mannigfaltig. Die Auswahl der Restriktionsenzyme und Adapter, die die Größe und Komplexität der zu vergleichenden Fragmentuntermengen (Repräsentation) bestimmen, das optimale Verhältnis von Driver und Tester, welches letztendlich aber wieder von der Komplexität der Repräsentationen abhängt und die Hybridisierungsbedingungen seien hier beispielhaft genannt. Das hier erzielte Unterscheidungspotential zwischen ober- und untergärigen Hefen ließe sich durch weitere Versuche sicherlich verbessern, zumal die Methodik an sich ursprünglich u.a. zur Identifizierung von spezifischen Sequenzen für Krebszellen anhand genomischer, menschlicher DNA entwickelt wurde. So sollte die Methode auch zur Isolierung spezifischer Sequenzen zur Unterscheidung von untergärigen Hefen verwendet werden können. Auf diesen könnten dann PCR-Systeme basieren, die die Identifizierung bestimmter untergäriger Hefestämme erlauben.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der SSCP ließen sich keine stammspezifischen Unterschiede zwischen den untersuchten Bierhefen feststellen. Eine Abgrenzung der Brauereihefestämme zu den anderen Arten war hingegen möglich, so dass eine Sicherstellung der Artzugehörigkeit mit dieser Methode möglich wäre.

Die RAPD ließ sowohl eine Differenzierung von Fremd- und Kulturhefen als auch eine Unterscheidung von ober- und untergärigen Bierhefen zu. Zudem war innerhalb der obergärigen Bierhefen eine Gruppeneinteilung möglich.

Aufgrund der Ergebnisse der PCR mit δ Element basierten Primern konnten ebenso ober- und untergärige Bierhefen voneinander unterschieden werden und die obergärigen Hefen in Gruppen unterteilt werden. Diese Gruppeneinteilung entsprach im wesentlichen dem beschriebenen Verwendungszweck als Weißbier-, Alt-, Kölsch- bzw. Alehefe und war somit weitergehend als mit der RAPD. Zudem konnten drei der untersuchten untergärigen Bierhefen von den übrigen untergärigen Stämmen differenziert werden.

Mit der AFLP wiesen verschiedene obergärige Stämme deutliche Unterschiede zueinander auf, wobei auch hier Stämme teilweise nur in Gruppen eingeteilt werden konnten. Außerdem konnten zwei untergärige Stämme differenziert werden, die mit den obigen Methoden nicht unterschieden werden konnten. Aufbauend auf diesem Marker konnte eine spezifische PCR entwickelt werden, die eine Analyse dessen direkt von genomischer DNA erlaubte. Die Ergebnisse dieser Analyse bei untergärigen Stämmen gestatteten mit wenigen Ausnahmen eine Differenzierung von Bruch- und Staubhefen.

Die Analyse von Mikrosatelliten, die in der SGD zu finden waren, erlaubte je nach untersuchtem Locus eine Gruppierung der obergärigen Hefen nach ihrem Einsatzbereich bis hin zu einer Differenzierung einzelner Stämme. Für die untergärigen Stämme musste ein polymorpher Mikrosatellitenlocus isoliert werden, dessen Analyse dann eine Gruppeneinteilung ermöglichte.

Mit Hilfe einer Methode der subtraktiven Hybridisierung konnten DNA-Sequenzen ermittelt werden, die Unterschiede zwischen ober- und untergärigen Hefen aufwiesen. Die darauf basierenden PCRs erfassten alle untersuchten untergärigen Hefestämme und keinen obergärigen Stamm, so dass eine Unterscheidung in einer einfachen PCR mit spezifischen Primern möglich war.

Mit den hier angewendeten bzw. entwickelten Methoden konnten Hefen sowohl auf Spezies- als auch auf Stammniveau differenziert werden.

Einige Hefestämme konnten nicht individuell identifiziert werden, sondern nur verschiedenen Gruppen zugeordnet werden. Da jedoch eine exakte Identifizierung zur Sicherstellung der Identität des verwendeten Hefestammes für den Brauer durchaus interessant ist, müssten weitere Anstrengungen unternommen werden, bestimmte Stämme sicher nachweisen zu können. Als besonders aussichtsreiche Methoden hierfür erscheinen die AFLP, die Analyse von Mikrosatelliten, aber auch die subtraktive Hybridisierung.

Bei der AFLP könnten beispielsweise zwei Stämme einer Gruppe, die unterschieden werden sollen unter Verwendung zweier Restriktionsenzyme mit allen 128 möglichen Primerkombinationen untersucht werden. Durch den Austausch eines Restriktionsenzym – und entsprechend der Adapter und Primer – ergäben sich allein weitere 128 Kombinationsmöglichkeiten. Bei der Untersuchung einer entsprechend hohen Zahl an Kombinationen sollten sich Polymorphismen detektieren lassen, die eine Differenzierung zulassen bzw. sogar als Marker für bestimmte phänotypische Eigenschaften dienen können.

Bezüglich der Analyse von Mikrosatellitenloci könnte die SGD nach weiteren Satellitenmotiven durchsucht werden und die entsprechenden Genorte für bisher nicht unterscheidbare Stämme untersucht werden. Parallel dazu könnte die hier entwickelte Methode zur Isolierung polymorpher Mikrosatellitenloci mit weiteren Di- bzw. Trinukleotidrepeat-Sonden angewendet werden, so dass sich auch hier sicherlich weitere Stämme einzeln identifizieren ließen.

Da wie oben schon erwähnt die subtraktive Hybridisierung auch angewendet wird, um Sequenzpolymorphismen in menschlicher DNA zu detektieren, hat diese Methode sicherlich nach einer eventuellen Optimierung das Potential, DNA-Unterschiede in nah verwandten Hefestämmen aufzuzeigen.

Basierend auf den Polymorphismen, die über die AFLP oder die subtraktive Hybridisierung entdeckt würden, könnten, im Gegensatz zu polymorphen Mikrosatelliten, stammspezifische Primer- bzw. Primer- / Sondensysteme entwickelt werden. Auf diese Weise könnten einzelne Marker auch auf Realtime-PCR-Maschinen, die immer häufiger in den Betriebslabors von Brauereien zu finden sind, ohne die Verwendung einer Elektrophoreseapparatur analysiert werden.

Ein weiterer Aspekt, der in zukünftigen Arbeiten thematisiert werden könnte, ist die weitere Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen ober- und untergärigen Bierhefen sowie weiteren *Saccharomyces*-Hefen. In dieser Arbeit fanden sich Hinweise, die, zum großen Teil in Übereinstimmung mit der Literatur, nahe legen, dass die untergärigen Bierhefen eine phylogenetische Nähe zu *Saccharomyces pastorianus*-Stämmen aufweisen. Darüber hinaus erschienen die untergärigen Stämme näher verwandt zu den *Saccharomyces pastorianus*-Stämmen als zu den obergärigen Bierhefen. Als wiederum hilfreich könnten sich hierfür die AFLP, die Analyse von Mikrosatelliten sowie die subtraktive Hybridisierung erweisen, die schon hier wertvolle Hinweise, die durch die Ergebnisse der RAPD sowie der PCR mit δ Element basierten Primern untermauert wurden, lieferten.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich Hefestämme mit PCR-basierten Methoden differenzieren bzw. identifizieren lassen. Bei den untersuchten Stämmen handelt es sich überwiegend um zur Bierherstellung genutzte Hefestämme aus der Hefebank Weihenstephan. Daneben wurden auch sogenannte Fremdhefen, die nicht der Gattung *Saccharomyces* bzw. der Art *S. cerevisiae* angehören, mit einbezogen.

Mithilfe der SSCP-Analytik wurde gezeigt, dass sich die Bierhefen anhand des untersuchten Abschnittes des 18S rRNA-Genes nicht voneinander unterscheiden ließen, die Methode aber geeignet war, Hefen auf Artebene zu differenzieren.

Mit verschiedenen Mustertechniken wie RAPD, Analyse der δ Elemente und AFLP sollten die Hefen auf Stammebene differenziert werden. Anhand der Ergebnisse aus den beiden erstgenannten konnten obergärige Hefen in Gruppen eingeteilt werden, die größtenteils eine Entsprechung im industriellen Verwendungszweck der Stämme, z. B. Weißbier- oder Altbierhefe, hatten. Die untergärigen Stämme reagierten als einheitliche Gruppe, innerhalb der sich so gut wie keine Unterscheidungsmöglichkeiten ergaben.

Mit der AFLP ergab sich eine Differenzierungsmöglichkeit für untergärige Hefen, die auf einem einzelnen Marker basierte. Nach einer näheren Charakterisierung wurde auf diesem aufbauend eine spezifische PCR entwickelt, die die Analyse dieses Markers direkt von genomischer DNA ermöglicht.

Die AFLP erwies sich bezüglich der Reproduzierbarkeit als die stabilste der drei Methoden, die auch das höchste Differenzierungspotential zu haben schienen.

Die Analyse von Mikrosatelliten, die aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD) entnommen waren, ergab für obergärige Hefen je nach untersuchtem Locus unterschiedliche Differenzierungsniveaus von einer groben Gruppierung, wie für die Mustertechniken beschrieben, bis hin zur Identifizierung einzelner Stämme. Die Unterteilung der untergärigen Hefestämme in Gruppen war erst durch die gezielte Isolierung eines variablen Locus und dessen Analyse möglich.

Eine Methode zur subtraktiven Hybridisierung wurde entwickelt, mit der spezifische Sequenzen für einzelne Hefestämme ermittelt werden sollten. Mit der Methode konnten zwei Fragmente isoliert werden, die spezifische Sequenzen für untergärige gegenüber obergärigen Bierhefen aufwiesen. Mit Primern, die auf diesen Sequenzen basierten, wurden in der PCR alle untergärigen Stämme und kein obergäriger Stamm erfasst.

In der Untersuchung weiterer *Saccharomyces*-Arten mit diesen Primern wurde für zwei *S. pastorianus*-Stämme ebenfalls ein PCR-Produkt amplifiziert, woraus ein hoher Verwandtschaftsgrad der untergärigen Hefen zur Art *S. pastorianus* gefolgert wurde. Diese Behauptung wird durch die Ergebnisse mit den anderen Methoden gestützt, in denen diese Hefen ebenfalls große Ähnlichkeiten speziell zum ehemaligen *S. monacensis* Typstamm aufwiesen.

7 Summary

The aim of the present study was to find out, whether it is possible to distinguish or identify yeast strains by using PCR-based methods. The majority of the strains to be analyzed was obtained from the Hefebank Weihenstephan. These strains are normally used in the process of beer-brewing. In addition, yeasts which do not belong to the genus *Saccharomyces* or the species *S. cerevisiae* and which are not used in beer production were also analyzed.

It was found by applying SSPC technology that it is not possible to distinguish the beer yeasts with the help of the analyzed fragment of their 18S rRNA-gene. Yet, the technique allowed to differentiate yeasts on the species level.

With different fingerprinting techniques such as RAPD, analysis of δ elements and AFLP, yeasts were to be differentiated on the strain level.

Top-fermenting yeasts were assigned to different groups according to the results of the first two of the above-mentioned methods. In general, these groups corresponded to the industrial use of the strains, e. g. wheat beer or "Altbier" yeast. The lager strains presented as a uniform group in which no further differentiation was possible. When AFLP-technique was applied, the discrimination of different lager yeasts was possible based on a single marker. Said marker was further characterized. Consequently, it was possible to establish a specific PCR, that allowed the analysis of this marker directly from genomic DNA.

When comparing the three applied techniques, AFLP showed most stability concerning reproducibility and seemed to have the highest discrimination potential.

Analysis of microsatellites, obtained from *Saccharomyces* Genome Database (SGD), showed several differentiation levels for top-fermenting yeasts ranging from the main groups as described for the fingerprinting techniques to the identification of single strains depending on the analyzed locus. The subdivision of lager yeast strains was only possible by a systematic isolation of a variable locus and its consequent analysis.

Furthermore, a method of subtractive hybridization was developed. The aim was to identify specific sequences for single yeast strains. With this method, two fragments were isolated, that showed specific sequences for lager yeasts when compared to top-fermenting yeasts. With primers based upon these sequences all lager strains but none of the top-fermenting strains were detected by PCR analysis.

While screening further *Saccharomyces*-species with these primers, a PCR-product was amplified out of two *S. pastorianus* strains. This indicates a close relationship between lager yeasts and the species *S. pastorianus*. This conclusion is supported by further results of the present work, since these yeasts proved to be very similar especially to the former type strain of *S. monacensis* when analyzed by the above-mentioned techniques.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
Amp	Amplifikation
bp	Basenpaare
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
dd	bidestilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethyldiamin-tetraessigsäure
HEPES	N- (2-Hydroxyethyl) piperazin-N´- (2-ethansulfonsäure)
NTC	no template control (PCR-Negativkontrolle)
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAA(G)	Polyacrylamid(gel)
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pre	Pre-Amplifikation
ReLi	Restriktion und Ligation (von Adaptern)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGD	Saccharomyces Genome Database
sp.	Spezies
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TEMED	N, N, N´, N´-tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
UV	ultraviolett

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: SSCP-Analyse von PCR-Produkten mit Primerpaar H550 / H1200, Silberfärbung. ____	34
Abbildung 2: PCR-Produkte von Fremdhefen mit Primer R-360 6. _____	36
Abbildung 3: PCR-Produkte von Fremdhefen mit Primer R-D 02. _____	37
Abbildung 4: PCR-Produkte von Kulturhefen mit Primer R-360 6. _____	39
Abbildung 5: PCR-Produkte von Kulturhefen mit Primer R-D 02. _____	40
Abbildung 6: PCR-Produkte von Hefe-DNA mit Primer R-D02. _____	41
Abbildung 7: PCR-Produkte obergäriger Bierhefen mit Primer LTR 01 r. _____	43
Abbildung 8: PCR-Produkte (untergäriger) Bierhefen mit Primer LTR 01 r. _____	44
Abbildung 9: Auswahl von PCR-Produkten (untergäriger) Bierhefen mit Primer LTR 01 r. _____	45
Abbildung 10: Membranfixierte AFLP-Produkte mit Primern E + C (Biotin-markiert) / M + Ag. ____	48
Abbildung 11: PCR-Produkte von Preamplifikationen (Pre) mit Primerpaar E+C/M+Ag. _____	50
Abbildung 12: Reamplifikate einzelner nach Auftrennung in GATC membranfixierter DNA-Banden mit Primerpaar E+C / M+Ag. _____	51
Abbildung 13: Sequenz 9811_02_M : Position 31 – 46: Primer bh e , Position 118 – 135: Primer bh m (rc), Position 157 – 174: Primer bh m 2 (rc). _____	52
Abbildung 14: PCR von ReLi (EcoR I, Mse I) mit Primerpaar bh m / M+AG (Spur 2 und 3) und Primerpaar BH E / E+C (Spur 4 und 5). _____	53
Abbildung 15: PCR von ReLi Hefe 34 (EcoR I) mit Primern bh m und E+0. _____	54
Abbildung 16: Southern-Hybridisierung eines Eco R I- Verdaus von 5 µg Hefe-DNA (34). ____	55
Abbildung 17: PCR von ReLi (Alu I) mit Primerpaar bh m 2 / LCS AP. _____	56
Abbildung 18: PCR mit dem 950 bp-Fragment (vgl. Abbildung 17) mit Primerpaar LCS AP / bh m (Spur 2 bis 4); PCR mit Primerpaar bh M / bh e; Spur 5. _____	56
Abbildung 19: Partielle Sequenz 990308: Position 213 – 227: Primer bh e 3. _____	57
Abbildung 20: Ausschnitt aus Sequenzier-Chromatogrammen der PCR-Produkte Hefen 34 und 66 mit Primerpaar bh e 3 / bh m 2. _____	58
Abbildung 21: Alignment partieller Sequenzen der 290 bp PCR-Produkte der Hefen 34 und 66 mit Primerpaar bh e 3 / bh m 2. _____	59
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Entwicklung eines spezifischen Primersystems basierend auf einem AFLP-Marker. _____	60
Abbildung 23: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaar H 550/1200, bh m / bh e a5t b. _____	61
Abbildung 24: Amplifikationsplott PCR mit Primerpaaren bh m / bh e und bh m / bh e a5t b. ____	63
Abbildung 25: Schmelzpeaks PCR mit Primerpaaren bh m / bh e und bh m / bh e a5t b. ____	64
Abbildung 26: PCR-Produkte untergäriger Hefen mit Primerpaar MS 01/01 r. _____	65
Abbildung 27: PCR-Produkte untergäriger Hefen mit Primerpaar MS 04/04 r. _____	66
Abbildung 28: PCR-Produkte obergäriger Hefen mit Primerpaar MS01/01 r. _____	67
Abbildung 29: PCR-Produkte obergäriger Hefen mit Primerpaar MS02/02 r. _____	68
Abbildung 30: PCR-Produkte obergäriger Hefen mit Primerpaar MS04/04 r. _____	69

Abbildung 31: PCR-Produkte obergäriger Hefen (untergäriger Stamm 34 als Referenz) mit Primerpaar MS 04/04 r. _____	70
Abbildung 32: PCR-Produkte obergäriger Hefen mit Primerpaar MS07/07 r. _____	71
Abbildung 33: PCR-Produkte von <i>Saccharomyces</i> -Fremdhefen mit Primerpaar MS 04/04 r (Gel oben) und Primerpaar MS 01/01 r (Gel unten). _____	73
Abbildung 34: PCR-Produkte von <i>Saccharomyces</i> -Hefen mit Primerpaaren H550/H1200 und MS 04/04 r (Gel oben) und Primerpaaren H550/H1200 und MS 01/01 r (Gel unten). _____	74
Abbildung 35: PCR mit Eluat; Primerpaar M+0 / E+0 (vgl. 2.17.2). _____	75
Abbildung 36: Reamplifiziertes DNA-Fragment mit Primerpaar M+0 / E+0 (siehe Abbildung 35, Pfeil) (vgl. 2.17.2). _____	76
Abbildung 37: Sequenz 214-5, Position 153 – 172: Primer MS 05, Position 316 – 331: Primer M+0 (rc). _____	77
Abbildung 38: PCR von ReLis (EcoR I, Mse I) mit Primerpaar MS 05 / M + 0. _____	78
Abbildung 39: PCR von ReLis (Eco R I) mit Primerpaar E+0 / MS 05. _____	78
Abbildung 40: Sequenz 1108, Primer MS 05. Position 86 – 107: Primer MS 05 r (rc), Position 154 – 163: Primer E+0 (3'-Ende, rc). _____	79
Abbildung 41: PCR-Produkte (multiplex) untergäriger Hefen mit Primerpaaren H 550/1200, MS05/MS05r. _____	80
Abbildung 42: PCR-Produkte (multiplex) untergäriger Hefen mit Primerpaaren H 550/1200, MS05/MS05r. _____	81
Abbildung 43: PCR-Produkte (multiplex) untergäriger Hefen mit Primerpaar H 550/1200, MS 05/05 r. _____	81
Abbildung 44: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550/1200, MS05/MS05r. _____	82
Abbildung 45: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550/1200, MS05/MS05r. _____	83
Abbildung 46: PCR-Produkte mit Primerpaar M+0 / Ad E 1 einer subtraktiven Hybridisierung nach Mung Bean Nuclease-Verdau. _____	84
Abbildung 47: Southern-Hybridisierung von (Pre)-Amplifikationsreaktionen. _____	85
Abbildung 48: Alignment Sequenz PCR-Produkt 0924-2 mit Sequenz ORF YML035C (AMD1) (ChrXIII: Koordinaten 208860 bis 206428) [Cherry, J. M. 2001]. _____	87
Abbildung 49: Alignment Sequenz PCR-Produkt 0924-1 mit Sequenz ORF YPR184W (GDB1) (ChrXVI: Koordinaten 902039 bis 906649) [Cherry, J. M. 2001]. _____	88
Abbildung 50: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550/ H 1200, UG100M / UG100E. _____	89
Abbildung 51: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550/ H1200, UG300M / UG300E. _____	90
Abbildung 52: PCR-Produkte (multiplex) mit Primerpaaren H 550 / H1200, UG100M / UG100E (Spur 1-9) und Primerpaaren H 550 / H1200, UG300M / UG300E (Spur 11-19). _____	91

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte Hefestämme mit industriellem Verwendungszweck, teilweise mit Karyotyp. _____	3
Tabelle 2: Daten der verwendeten Oligonukleotide mit Zuordnung zum Ergebnisteil. _____	9
Tabelle 3: Standardzusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes. _____	14
Tabelle 4: Standardtemperaturprofil PCR. T_A : Annealingtemperatur (vgl. Tabelle 2). _____	14
Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes LightCycler; Detektionsformat SYBR-Green. _____	14
Tabelle 6: Temperaturprofil und Datenaufnahme LightCycler-PCR; Detektionsformat SYBR-Green. _____	15
Tabelle 7: Gelvolumina für die verwendeten Elektrophoresekammern. _____	15
Tabelle 8: Laufbedingungen horizontale Elektrophorese von Polyacrylamidgelen. _____	16
Tabelle 9: Färbeschritte Silberfärbung nach Budowle. _____	17
Tabelle 10: Elektrophoresebedingungen und Membrantransport GATC 1500. _____	19
Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsmixes bei der RAPD-PCR. _____	22
Tabelle 12: Temperaturprofil der RAPD-PCR. _____	22
Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsmixes bei der PCR mit δ Element basierten Primern. _____	23
Tabelle 14: Temperaturprofil PCR mit δ Element basierten Primern. _____	23
Tabelle 15: Zusammensetzung Adaptermix. Ad: Adapter (vgl. Tabelle 2). _____	25
Tabelle 16: Zusammensetzung Reaktionsmix Pre-Amplifikation. _____	25
Tabelle 17: Temperaturprofil Pre-Amplifikation. _____	25
Tabelle 18: Zusammensetzung Reaktionsmix Amplifikation. _____	26
Tabelle 19: Temperaturprofil Amplifikation. _____	26
Tabelle 20: Zusammensetzung Adaptermix (vgl. Tabelle 2). _____	29
Tabelle 21: Zusammensetzung Reaktionsmix Pre-Amplifikation. _____	30
Tabelle 22: Temperaturprofil Pre-Amplifikation. _____	30
Tabelle 23: Zusammensetzung Reaktionsmix Amplifikation. _____	30
Tabelle 24: Temperaturprofil Amplifikation. _____	31
Tabelle 25: Zusammensetzung Reaktionsmix PCR nach Mung Bean Nuclease Verdau. _____	32
Tabelle 26: Temperaturprofil PCR nach Mung Bean Nuclease Verdau. _____	32
Tabelle 27: Reproduzierbare PCR-Produkte (Länge in bp) für RAPD-Primer zur Unterscheidung von Hefearten. _____	38
Tabelle 28: Reproduzierbare Banden für (Kultur-) Hefen mit Primer R D-02. _____	42
Tabelle 29: Auswertung Bandenmuster PCR mit Primer LTR 01r (vgl. Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9). _____	46
Tabelle 30: Primerkombinationen für die AFLP. _____	47
Tabelle 31: Vergleich der PCR-Analyse untergäriger Hefen mit dem Primerpaar bh m / bh e a5t b mit ihrem beschriebenen Flockulationsverhalten. _____	62

Tabelle 32: Sequenzmotive und Lokalisierung untersuchter Mikrosatellitenloci. _____	65
Tabelle 33: Gruppeneinteilung obergäriger Bierhefen aufgrund der Bandenmuster mit Mikrosatellitenprimern. _____	72
Tabelle 34: Gruppeneinteilung von untergärigen Hefen anhand des Bandenmusters nach PCR mit Mikrosatellitenprimern. _____	82
Tabelle 35: Templates für die PCR zur Kontrolle der Subtraktiven Hybridisierung. _____	85

9 Literaturverzeichnis

Ando, S., Mikata, K., Tahara, Y., Yamada, Y. (1996). Phylogenic Relationships of Species of the Genus *Saccharomyces* MEYEN ex REESS Deduced from Partial Base Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae). *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1070-1075.

Azumi, M., Goto-Yamamoto, N. (2001). AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast*, **18**, 1145-1154.

Baleiras Couto, M. M., Eijsma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J. H. J., van der Vossen, J. M. B. M. (1996). Evaluation of Molecular Typing Techniques To Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Applied And Environmental Microbiology* **62**, 41-46.

Ballvora, A., Hesselbach, J., Niewöhner, J., Leister, D., Salamini, F., Gebhardt, C. (1995). Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol Gen Genet* **249**, 82-90.

Barberio, C., Fani, R., Raso, A., Carli, A., Polsinelli, M. (1994). DNA fingerprinting of yeast strains by restriction enzyme analysis. *Res. Microbiol.* **145**, 659-666.

Barnett, J. A. (1992). The Taxonomy of the Genus *Saccharomyces* Meyen ex Rees: a Short Review for Non-taxonomists. *Yeast* **8**, 1-23.

Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarow, D. (1990). *Yeasts: Characteristics and Identification* (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge

Baum, T. J., Gresshoff, P. M., Lewis, S. A., Dean, R. A. (1994). Characterization and Phylogenetic Analysis of Four Root-Knot Nematode Species Using DNA Amplification Fingerprinting and Automated Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 39-47.

- Bazar, L. S., Collier, G. B., Vanek, P. G., Siles, B. A., Know, Y. W., Doetsch, P. W., Cunningham, R. P., Chirikjian, J. G. (1999). Mutation identification DNA analysis system (MIDAS) for detection of known mutations. *Electrophoresis* **20**, 1141-1148.
- Becker, J., Heun, M. (1995). Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphisms in barley. *Genome* **38**, 991-998.
- Becker, J., Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F., Heun, M. (1995) Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* **249**, 65-73.
- Bierwerth, S., Kahl, G., Weigand, F., Weising, K. (1992). Oligonucleotide fingerprinting of plant and fungal genomes: A comparison of radioactive, colorogenic and chemiluminescent detection methods. *Electrophoresis* **13**, 115-122.
- Børsting, C., Hummel, R., Schultz, R. H., Rose, T. M., Pedersen, M. B., Knudsen, J., Kristiansen, K. (1997). *Saccharomyces carlsbergensis* Contains Two Functional Genes Encoding the Acyl-CoA Binding Protein, one similar to the *ACB1* Gene from *S. cerevisiae* and one Identical to the *ACB1* Gene from *S. monacensis*. *Yeast* **13**, 1409-1421.
- Borštnik, B., Pumpernik, D., Lukman, D., Ugarković, D., Plohl, M. (1994). Tandemly repeated pentanucleotides in DNA sequences of eucaryotes. *Nucleic Acids Research* **22**, 3412-3417.
- Braden, J. M., Simon, P. W. (1998). Generation of Codominant, PCR-based Markers from AFLP Bands. <http://www.hort.wisc.edu/usdavcru/simon/posters/post1.html>.
- Budowle, B. (1991). Analysis of the VNTR locus DIS 80 by the PCR followed by high resolution Page. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**(1), 137-144.
- Buerger, H., Schmidt, H., Beckmann, A., Zanker, K. S., Boecker, W., Brandt, B. (2001). Genetic characterisation of invasive breast cancer: a comparison of CGH and PCR based multiplex microsatellite analysis. *J Clin Pathol* **54**(11), 836-840

Buitkamp, J., Ammer, H., Geldermann, H. (1991). DNA fingerprinting in domestic animals. *Electrophoresis* **12**, 196-174.

Caetano-Anollé, G., Bassam, B. J., Gresshoff, P. M. (1991). DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers. *BIO/TECHNOLOGY* **9**, 553-557.

Caetano-Anollé, G., Bassam, B. J., Gresshoff, P. M. (1992). Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol Gen Genet* **235**, 157-165.

Caetano-Anollés, G. (1994). MAAp: a versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Molecular Biology* **25**, 1011-1026.

Cervera, M. T., Gusmão, J., Steenacker, M., Peleman, J. Storme, V., Vanden Broeck, A., Van Montagu, M., Boerjan, W. (1996). Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora laric-populina* in *Populus*. *Theoret Appl Genet* **93**, 733-737.

Challoner, P. B., Smith, K. T., Parker, J. D., MacLeod, D. L., Coulter, S. N., Rose, T. M., Schultz, E. R., Bennet, L., Garber, R. L., Chang, M., Schad, P. A., Steward, P. M., Nowinski, R. C., Brown, J. P., Burner, G. C. (1995). Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7440-7444.

Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. M., Moore, P. S. (1994). Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. *Science* **266**, 1865-1869.

Chen, H., Pulido, J. C., Duyk, G. M. (1995). MATS: A Rapid and Efficient Method for the Development of Microsatellites from YACs. *Genomics* **25**, 1-8.

Cherry, J. M., Ball, C., Dolinski, K., Dwight, S., Harris, M., Matese, J. C., Sherlock, G., Binkley, G., Jin, H., Weng, S., and Botstein, D. "Saccharomyces Genome Database"; <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

Cheung, V. G., Nelson, S. F. (1998). Genomic Mismatch Scanning Identifies Human Genomic DNA Shared Identical by Descent. *Genomics* **47**, 1-6.

Cho, T., Park, S. (1998). A simulation of subtractive hybridization. *Nucleic Acids Research* **26**, 1440-1448.

Cho, Y. G., Blair, M. W., Panaud, O., McCouch, S. R. (1996). Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome* **39**, 373-378.

Chong, D. K. X., Yeh, F. C., Aravanopoulos, F. A., Zsuffa, L. (1995). DNA Fingerprinting Willows (*Salix* L.) using Polymerase Chain Reaction with the M13 Universal Primer. *Scandinavian Journal of Forest Research* **10**, 27-31.

Cnops, G., den Boer, B., Gerats, A., Van Montagu, M., Van Lijsebettens, M. (1996). Chromosome landing at the *Arabidopsis* *TORNADO1* locus using an AFLP-based strategy. *Mol Gen Genet* **253**, 32-41

Cornélis, F., Hashimoto, L., Loveridge, J., MacCarthy, A., Buckle, V., Julier, C., Bell, J. (1992). Identification of a CA Repeat at the TCRA Locus Using Yeast Artificial Chromosomes: A General Method for Generating Highly Polymorphic Markers at Chosen Loci. *Genomics* **13**, 820-825.

de Barros Lopes, M. A., Rainieri, S., Henschke, P. A., Langridge, P. (1999). AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 915-924.

de Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P. A., Langridge, P. (1996). PCR Differentiation of Commercial Yeast Strains Using Intron Splice Site Primers. Applied And Environmental Microbiology **62**, 4514-4520.

de Barros Lopes, M., Soden, A., Martens, A. L., Henschke, P. A., Langridge, P. (1998). Differentiation and species identification of yeasts using PCR. International Journal of Systematic Bacteriology **48**, 279-286.

Delaney, D. E., Friebe, B. R., Hatcher, J. H., Gill, B. S., Hulbert, S. H. (1995). Target mapping of rye chromatin in wheat by representational difference analysis. Genome **38**, 458-466.

Diatchenko, L., Lau, Y. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 6025-6030.

Donhauser S., Vogeser, G., Springer, R. (1989). Klassifizierung von Brauereihefen und anderen industriell eingesetzten Hefen durch DNS-Restriktionsanalysen. Monatsschrift für Brauwissenschaft **42**, 4-10.

Donhauser, S., Springer, R., Vogeser, G. (1990). Identifizierung und Klassifizierung von Brauereihefen durch Chromosomenanalyse mit der Pulsfeldgelelektrophorese. Monatsschrift für Brauwissenschaft **12**, 392-399.

Donhauser, S., Wagner, D., Gordon, D. (1987). Hefestämme und Bierqualität, 2. Mitteilung. Brauwelt **38**, 1654-1664.

Donhauser, S., Wagner, D., Guggeis, H. (1987). Hefestämme und Bierqualität, 1. Mitteilung. Brauwelt **29**, 1273-1280.

Donnison, I. S., Siroky, J., Vyskot, B., Saedler, H., Grant, S. R. (1996). Isolation of Y Chromosome-Specific Sequences From *Silene latifolia* and Mapping of Male Sex-

Determining Genes Using Representational Difference Analysis. *Genetics* **144**, 1893-1901.

Drmanac, R., Nizetic, D., Lennon, G. G., Beitverda A., Lehrach, H. (1991). W (A or T) sequences as probes and primers suitable for genomic mapping and fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **19**, 5839-5842.

Duguid, J. R., Dinauer, M. C. (1989). Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids research* **18**, 2789-2792.

Epplen, J. T., Mäueler, W., Epplen, C. (1994). Exploiting the Informativity of 'Meaningless' Simple Repetitive DNA from Indirect Gene Diagnosis to Multilocus Genome Scanning. *Biol. Chem.* **375**, 795-801.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 329-337.

ETC Elektrophorese-Technik, Kirchentellinsfurt, Firmenschrift zur Silberfärbung

FMC BioProducts, Rockland, USA, Firmenschrift: The Sourcebook

Folkertsma, R. T., van der Voort, J. N. A. M. R, de Groot, K. E., van Zandvoort, P. M., Schots, A., Gommers F. J., Helder, J., Bakker, J. (1996). Gene Pool Similarities of Potato Cyst Nematode Populations Assesed by AFLP Analysis. *Molacular Plant-Microbe Interactions* **9**, 47-54.

Godwin, I. D., Aitken, E. A. B., Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* **18**, 1524-1528.

Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A., Sverdlov, E. D. (1996). Equalizing cDNA Subtraction Based on Selective Suppression of Polymerase

Chain Reaction: Cloning of Jurkat Cell Transcripts Induced by Phythemaglutinin and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. *Analytical Biochemistry* **240**, 90-97.

Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G. F., Lecointre, G., Nguyen, H. V., Gaillardin, C., Dujon, B. (2001): Microsatellite Typing as a New Tool for Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 551-559.

Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R., Michelmore, R. (1996). PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp.. *Theor Appl Genet* **93**, 1202-1210.

Hite, J. M., Eckert, K. A., Cheng, K. C. (1996). Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)_nd(G-T)_n microsatellite repeats. *Nucleic Acids Research* **24**, 2429-2434.

Hoffman, C. S., Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.

Hsu, C. M., Huang, N. E., Tsai, L. C., Kao, L. G., Chao, C. H., Linacre A., Lee, J. C. (1999). Identification of victims of the 1998 Taoyuan Airbus crash accident using DNA analysis. *Int J Legal Med*; **113(1)**, 43-46

Hubank, M., Schtz, D. G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research* **22**, 5640-5648.

Huys, G., Kersters, I., Coppman, R., Janssen, P., Kersters, K. (1996). Genotypic Diversity among *Aeromonas* Isolates Recoverd from Drinking Water Produktion Plants as Revealed by AFLP™ Analysis. *System. Appl. Microbiol.* **19**, 428-435.

Ingvarsson, S., Finnsdottir, V., Sigurdsson, A., Geirsson, G. (2000). Population studies and validation of paternity determinations by six microsatellite loci. *J Forensic Sci* **45(3)**, 692-695

James, S. A., Collins, M. D., Roberts, I. N. (1994). Genetic Interrelationship Among Species of the Genus *Zygosaccharomyces* as Revealed by Small-Subunit rRNA Gene Sequences. *Yeast* **10**, 871-881.

Janssen, P., Dijkshoorn, J. (1996). High resolution DNA fingerprint of *Acinetobacter* outbreak strains. *FEMS Microbiology Letters* **142**, 191-194.

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., Kersters, K. (1996). Evaluation of the fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142**, 1881-1893.

Joubert, R., Brignon, P., Lehmann, C., Monribot, C., Gendre, F., Boucherie, H. (2000). Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. *Yeast* **16**, 511-522

Kalcheva, I. D., Matsuda, Y., Plass, C., Chapman, V. M. (1995). Isolation and characterization of a pseudoautosomal region-specific genetic marker in C57BL/6 mice using genomic representational difference analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **92**, 12352-12356.

Kernodle, S. P., Cannon, R. E., Scandalios, J. G. (1993). Concentration of Primer and Template Qualitatively Affects Products in Random-Amplified Polymorphic DNA PCR. *BioTechniques* **14**, 362-364.

Kurzman, C. P., Robnett, C. J. (1997). Identification of Clinically Important Ascomycetous Yeast Based on Nucleotide Divergence in the 5' End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 1216-1223.

Laidlaw, L., Tompkins, T. A., Savard, L., Dowhanick, T. M. (1996). Identification and Differentiation of Brewing Yeasts using Specific and RAPD Polymerase Chain Reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54(2)**, 97-102.

Ledwith, B. J., Manam, S., Nichols, W. W., Bradley, M. O. (1990). Preparation of Synthetic Tandem-Repetitive Probes for DNA Fingerprinting, *BioTechniques* **9**, 149-152.

Leibhard, S., Nickel, A., Back, W., Bohak, I., Smida, J., Hieber, L., Eckardt-Schupp, F. (1995). Arbitrary-PCR: Eine neue Methode zum raschen Nachweis und zur raschen Identifizierung von Brauereiorganismen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **7/8**, 224-231.

Lieckfeld, E., Meyer, W., Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.* **33**, 413-426.

Lin, J-J., Kuo, J., Ma, J. (1996a). A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Research* **24**, 3649-3650.

Lin, J-J., Kuo, J., Ma, J. (1996b). Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Mol Biol Rep*, **14**, 156-169

Lisitsyn, N. A., Lisitsyn, N. M., Dalbagni, G., Barker, P., Sanchez, C. A., Gnarra, J., Linehan, W. M., Reid, B. J., Wigler, M. H. (1995). Comparative genomic analysis of tumors: Detection of DNA losses and amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 151-155.

Lisitsyn, N. A., Segre, J. A., Kusumi, K., Lisitsyn, N. M., Nadeau, J. H., Frankel, W. N., Wigler, M. H., Lander, E. S. (1994). Direct isolation of polymorphic markers linked to a trait by genetically directed representational analysis. *Nature Genetics* **6**, 57-63.

Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., Wigler, M. (1993). Cloning the Differences Between Two Complex Genomes. *Science* **259**, 946-951.

Lisitsyn, N., Wigler, M. (1995). Representational Difference Analysis in Detection of Genetic Lesions in Cancer. *Methods in Enzymology* **254**, 291-304.

- Lu, J., Knox, M. R., Ambrose, M. J., Brown, J. K. M., Ellis, T. H. N. (1996). Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theor Appl Genet* **93**, 1103-1111.
- Mackill, D. J., Zhang, Z., Redoña, E. D., Colowit, P. M. (1996). Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* **39**, 969-977.
- Martínez-Soriano, J. P., Wong, W. M., Van Ryk, D. I., Nazar, R. N. (1991). A Widely Distributed "CAT" Family of Repetitive DNA Sequences. *J. Mol. Biol.* **217**, 629-635.
- Mau, M., Timmis, K. N. (1998). Use of Subtractive Hybridization To Design Habitat-Based Oligonucleotide Probes for Investigation of Natural Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 185-191.
- Maughan, P. J., Saghai Maroof, M. A., Buss, G. R. (1995). Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* **38**, 715-723.
- Maughan, P. J., Saghai Maroof, M. A., Buss, G. R., Huestis, G. M. (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor Appl Genet* **93**, 392-401.
- McAllister, L., Penland, L., Brown P. O. (1998). Enrichment for Loci Identical-by Descent between Pairs of Mouse or Human Genomes by Genomic Mismatch Scanning. *Genomics* **47**, 7-11.
- Meaden, P. (1990). DNA fingerprinting of brewers' yeast: current perspectives. *J. Inst. Brew.* **96**, 195-200.
- Meksem, K., Leister, D., Peleman, J., Zabeau, M., Salamini, F., Gebhardt, C. (1995). A high-resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol Gen Genet* **249**, 74-81.

Meyer, W., Koch, A., Niemann, C., Beyermann, B., Epplen, J. T., Börner, T. (1991). Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Curr Genet* **19**, 239-242.

Meyer, W., Mitchell, T. G., (1995). Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: Strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* **16**, 1648-1656.

Micheli, M. R., Bova, R., Pascale, E., D'Ambrosio, E. (1994). Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research* **22**, 1921-1922.

Miller, R. D., Riblet, R. (1995). Improved phenol emulsion DNA reassociation technique (PERT) using thermal cycling. *Nucleic Acids Research* **23**, 2339-2340.

Millner, J. J., Cecchini, E., Dominy, P. J. (1995). A kinetic model for subtractive hybridization. *Nucleic Acids Research* **23**, 176-187.

Money, T., Reader, S., Qu, L. J., Dunford, R. P., Moore, G. (1996). AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **24**, 2616-2617.

Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., Dulau, L. (1993). Identification of Yeasts Strains Using the Polymerase Chain Reaction. *J Sci Food Agric* **62**, 89-94.

O'Neill, M. J., Sinclair, A. H. (1997). Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucleic Acids Research* **25**, 2681-2682.

Papiha, S. S., Sertedaki, A. (1995). Oligonucleotide (CAC)₅ fingerprinting: Validity and reliability in paternity testing. *Electrophoresis* **16**, 1624-1626.

Pecar, M., Tonissen, K., Roger, P. (1999). Novel Preliminary Washing Procedure for Industrial Yeast Samples, Used to Hasten the Differentiation of Closely Related Lager Strains Using Polymerase Chain Reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57**, 94-98.

Pedersen, M. B. (1986). DNA Sequence Polymorphisms in the Genus *Saccharomyces*. IV. Homologous Chromosomes III of *Saccharomyces bayanus*, *S. carlsbergensis*, and *S. uvarum*. *Carlsberg Res. Commun.* **51**, 185-202.

Pedersen, M. B. (1994). Molecular Analyses of Yeast DNA - Tools for Pure Yeast Maintenance in the Brewery. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52(1)**, 23-27.

Pedersen, M. P. (1983). DNA Sequence Polymorphisms in the Genus *Saccharomyces*. I. Comparison of the *His4* and Ribosomal RNA Genes in Lager Strains, ALE Strains and Various Species. *Carlsberg Res. Commun.* **48**, 485-503.

Pena, S. D. J., Macedo, A. M., Gontijo, N. F., Medeiros, A. M., Ribeiro, J. C. C. (1991). DNA bioprints: Simple nonisotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis* **12**, 146-152.

Petes, T. D., Greenwell, P. W., Dominsk, M. (1997). Stabilization of Microsatellite Sequences by Variant Repeats in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* **146**, 491-498.

Pöche, H., Peters, C., Wrobel, G., Schneider, V., Epplen, J. T. (1991). Determining consanguinity by oligonucleotide fingerprinting with (GTG)₅/(CAC)₅. *Electrophoresis* **12**, 397-402.

Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P., Typas, M. A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 236-248.

Purmal, A. A., Rabow, L. E., Lampman, G. W., Cunningham, R. P., Kow, Y. W. (1996). A common mechanism of action for the N-glycosylase activity of DNA N-glycosylase/AP lyases from *E. coli* and T4. *Mutation Research* **364**, 193-207.

Quain, D. E. (1986). Centenary Review Differentiation of Brewing Yest. *J. Inst. Brew.* **92**, 435-438.

Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. (1992). A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *System. Appl. Microbiol.* **15**, 439-446.

Quesada, M. P., Cenis, J. L. (1995). Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the Characterization of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 204-208.

Refseth, U. H., Fungan, B. M., Jakobsen, K. S. (1997). Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis* **18**, 1519-1523.

Richard, G.-F., Dujon, B. (1996). Distribution and variability of trinucleotide repeats in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **174**, 165-174.

Riedy, M. F., Hamilton, W. J., Aquadro, C. F. (1992). Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD-PCR. *Nucleic Acids Research* **20**, 918.

Rotman, G., Vanagaite, L., Collins, F. S., Shiloh, Y. (1995). Rapid Identification of polymorphic CA-Repeats in YAC Clones. *Molecular Biotechnology* **3**, 85-92.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory manual*. 2. Auflage, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schofield, M. A., Rowe, S. M., Hammond, J. R. M., Molzahn, S. W., Quain, D. E. (1995). Differentiation Of Brewery Yeast Strains By DNA Fingerprinting. *J. Inst. Brew.* **101**, 75-78.

Schutte, M., da Costa, L. T., Hahn, S. A., Moskaluk, C., Hoque, A. T. M. S., Rozenblu, E., Weinstein, C. L., Bittner, M., Meltzer, P. S., Trent, J. M., Yeo, C. J., Hruban, R. H., Kern, S. E. (1995). Identification by representational difference analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies within the *BRCA2* region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5950-5954.

Schutte, M., da Costa, L. T., Moskaluk, C. A., Rozenblum, E., Guan, X., de Jong, P. J., Bittner, M., Meltzer, P. S., Trent, J. M., Kern, S. E. (1995). Isolation of YAC inserts sequences by representational difference analysis. *Nucleic Acids Research* **23**, 4127-4133.

Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W., Biricolli, S. (1996). Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* **35**, 183-188.

Sharma, P. C., Winter, P., Bünger, T., Hüttel, B., Weigand, F., Weising, K., Kahl, G. (1995). Abundance and polymorphism of di-, tri- and tetra-nucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor Appl Genet* **90**, 90-96.

Sharma, S. K., Knox, M. R., Ellis, T. H. N. (1996). AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and ist comparison with RAPD analysis. . *Theoret Appl Genet* **93**, 751-758.

Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Leary, T. P., Dawson, G. J., Desai, S. M., Schlauder, G. G., Muerhoff, A. S., Erker, J. C., Buijk, S. L., Chalmers, M. L., Van Sant, C. L., Mushahwar, I. K. (1995). Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3401-3404.

Spinardi, L., Mazars, R., Theillet, C. (1991): Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Research*, **19**, 4009

Springer, R. (1998). Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II, TU München.
persönliche Mitteilung

Stubbs, S., James, S., Collins, M. D. (1994). Differentiation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces* species using 18S rDNA as target for a non-radioactive ligase detection reaction. *Letters in Applied Microbiology* **19**, 268-272.

Stumm, G. B., Vedder, H., Schlegel, J. (1997): A simple method for isolation of PCR fragments from polyacrylamide gels by scratching with a fine needle. Technical Tips Online (<http://tto.biomednet.com>), T01115.

Taylor, G. R. (1999). Enzymatic and chemical cleavage methods. *Electrophoresis* **20**, 1125-1130.

Timblin, C., Battey, J., Kuehl, W. M. (1990). Application for PCR technology to subtractive cDNA cloning: identification of genes expressed specifically in murine plasmacytoma cells. *Nucleic Acids Research* **18**, 1587-1593.

Tinsley, C. R., Nassif, X. (1996). Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: Two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11109-11114.

Tompkins, T. A., Steward, R., Savard, L., Russel, I., Dowhanick, T. M. (1996). RAPD-PCR Characterization of Brewery Yeast and Beer Spoilage Bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54(2)**, 91-96.

Tornai-Lehoczki, J., Dlauchy, D. (2000). Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 37-45.

Travis, G. H., Sutcliffe, J. G. (1988). Phenol emulsion-enhanced DNA-driven subtractive cDNA cloning: Isolation of low-abundance monkey cortex-specific mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1696-1700.

Ushijima, T., Morimura, K., Hosoya, Y., Okonogi, H., Tatematsu, M., Sugimura, T., Nagao, M. (1997). Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2284-2289.

Valle, G. (1993). TA-Repeat Microsatellites are Closely Associated with ARS Consensus Sequences in Yeast Chromosome III. *Yeast* **9**, 753-759.

Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J.-N. (1995). Genetic Diversity and Geographical Distribution of Wild *Saccharomyces cerevisiae* Strains from the Wine-Producing Area of Charentes, France. *Applied And Environmental Microbiology* **61**, 3521-3529.

von Stein, O. D., Thies, W., Hofmann, M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research* **25**, 2598-2602.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijjaans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.

Walmsley, R. M., Wikinson, B. M., Kong T. H. (1989). Genetic Fingerprinting For Yeast. *BIO/TECHNOLOGY* **7**, 1168-1170.

Walsh, T. J., Francesconi, A., Kasai, M., Chanock, S. J. (1995): PCR and Single Strand Conformational Polymorphism for Recognition of Medically Important Oportunistic Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 3216-3220.

Wang, Z., Brown, D. D. (1991). A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11505-11509.

Wassil, L., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1998). Development of a modified subtraction hybridization technique and its application for design of strain specific PCR systems for lactococci. *FEMS Microbiology Letters* **166**, 63-70.

Waterhouse, R. N., Glover, L. A. (1993). Identification of Procaryotic Repetitive DNA Suitable for Use as Fingerprinting Probes. *Applied And Environmental Microbiology* **59**, 1391-1397.

Waugh, R., McLean, K., Flavell, A. J., Pearce, S. R., Kumar, A., Thomas, B. B. T., Powell, W. (1997). Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in

the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (SSAP). *Mol Gen Genet* **253**, 687-694.

Weising, K., Beyerman, B., Ramser, J., Kahl, G. (1991). Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* **12**, 159-169.

Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**, 7213-7218.

Welsh, J., McClelland, M. (1991). Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic Acids Research* **19**, 861-866.

Wieland, I., Bolger, G., Asouline, G., Wigler, M. (1990). A method for difference cloning: Gene amplification following subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2720-2724.

Wierdl, M., Dominska, M., Petes, T. D. (1997). Microsatellite Instability in Yeast: Dependence on the Length of the Microsatellite. *Genetics* **146**, 769-779.

Wightman, P., Quain, D. E., Meaden, P. G. (1996). Analysis of production brewing strains of yeast by DNA fingerprinting. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 90-94.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids research* **18**, 6531-6535.

Wu, K. W., Jones, R., Danneberger, L., Scolnik, P. A. (1994). Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research* **22**, 3257-3258.

Yamagishi, H., Otsuta, Y., Funahashi, W., Ogata, T., Sakai, K. (1999) Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 505-513.

Yanagisawa, T., Hayashi, M., Hirai, A., Harada, K. (1994). DNA fingerprinting in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) with oligonucleotide probes for simple repetitive sequences. *Euphytica* **80**, 129-136.

Yang, C., Theis, J. F., Newlon, C. S. (1999). Conservation of ARS Elements and Chromosomal DNA Replication Origins on Chromosomes III of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. *Genetics* **152**, 933- 941.

Yang, M., Sytkowski, J. (1996). Cloning Differentially Expressed Genes by Linker Capture Subtraction. *Analytical Biochemistry* **237**, 109-114.

Yao, M., Kow, Y. W. (1995). Interaction of Deoxyinosine 3'-Endonuclease from *Escherichia coli* with DNA Containing Deoxyinosine. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 28609-28616.

Yao, M., Kow, Y. W. (1996). Cleavage of Insertion/Deletion Mismatches, Flap and Pseudo-Y DNA Structures by Deoxyinosine 3'-Endonuclease from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 30672-30676.

Yao, M., Kow, Y. W. (1997). Further Characterization of *Escherichia coli* Endonuclease V. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 30777-30779.

Zeng, J., Gorski, R. A., Hamer, D. (1994). Differential cDNA cloning by enzymatic degrading subtraction (EDS). *Nucleic Acids Research* **22**, 4381-4385.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplifikation. *Genomics* **20**, 176-183.

Zischler, H., Hinkkanen, A., Studer, R. (1991). Oligonucleotide fingerprinting with (CAC)₅: Nonradioactive in-gel hybridization and isolation of individual hypervariable loci. *Electrophoresis* **12**, 141-146.