

Semesterarbeit

**Die Wirkung von Hypergravitation und simulierter
Hypogravitation auf das Wachstum und die Morphologie
von *Saccharomyces cerevisiae*.**

Gruppe Weltraumbiologie
Dr. Augusto Cogoli
ETH Zürich

Betreut von Dr. Isabelle Walther



Fabio Rezzonico
Abt. XAc
September 1996



To see the earth as it truly is:
small and blue and beautiful
in the eternal silence where it floats,
is to see ourselves as riders on the earth together.
Brothers on that bright loveliness in the eternal cold,
brothers who know they are truly brothers.

Archibald MacLeish

0. Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 0. Inhaltsverzeichnis | 5 |
| 1. Zusammenfassung | 6 |
| 2. Einleitung | 7 |
| 2.1. Weltraumbiologie | 7 |
| 2.1.1. Was ist Weltraumbiologie | 7 |
| 2.1.2. Heutiger Stand des Wissens | 8 |
| 2.1.3. Mikro- und Makrogravitation | 9 |
| 2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 9 |
| 2.2.1. Physiologie der Bäckerhefe | 9 |
| 3. Aufgabestellung | 10 |
| 3.1. Hintergrund | 10 |
| 3.2. Ziel | 10 |
| 3.3. Methodik | 10 |
| 4. Material und Methoden | 11 |
| 4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 11 |
| 4.1.1. Züchtungsbedingungen | 11 |
| 4.2. Medium | 11 |
| 4.3. Versuchsaufbau | 12 |
| 4.3.1. Versuche im Klinostat | 12 |
| 4.3.2. Hypergravitationsversuche | 13 |
| 4.4. Methoden zur Bestimmung relevanter Grössen | 14 |
| 4.4.1. Optische Dichte | 14 |
| 4.4.2. Zellzahl und Zellgrösse | 15 |
| 4.4.3. Trockengewicht | 16 |
| 4.4.4. Glukosegehalt des Mediums | 16 |
| 4.4.5. Ethanolgehalt des Mediums | 17 |
| 4.4.6. Sprossnarbenanalyse | 18 |
| 5. Resultate und Diskussion | 19 |
| 5.1. Test der verschiedenen Kulturbehältern | 19 |
| 5.1.1. Wachstum in Erlenmeyerkolben | 19 |
| 5.1.2. Wachstum in Biorack Typ I-Containers | 19 |
| 5.1.3. Wachstum in Klinostatröhrchen | 20 |
| 5.2. Wachstum in simulierter Hypogravitation | 21 |
| 5.2.1. Versuch # 1 | 22 |
| 5.2.2. Versuch # 2 | 23 |
| 5.3. Wachstum in Hypergravitation | 24 |
| 5.3.1. Zellwachstum bei 1.4 x g | 25 |
| 5.3.2. Zellwachstum bei 2.3 x g | 26 |
| 5.4. Diskussion | 28 |
| 5.4.1. Wachstum in den verschiedenen Kulturbehälter | 28 |
| 5.4.2. Wachstum in simulierter Mikrogravitation | 29 |
| 5.4.3. Wachstum in Hypergravitation | 29 |
| 5.4.4. Schlussfolgerungen | 29 |
| 6. Abkürzungen | 31 |
| 7. Literaturverzeichnis | 32 |

1. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung der Wirkung von Hypergravitation und simulierter Hypogravitation auf das Wachstum und die Morphologie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei sollten die Ergebnisse mit den Experimente, die auf den Missionen IML-2 (International Microgravity Laboratory 2, in 1994) und S/MM-03 (Shuttle to MIR Mission 03, in 1996) flogen, verglichen werden.

Wichtige Ziele dieser Semesterarbeit waren sicher das Erlernen des Umgangs mit Zellkulturen, das Kennenlernen der biologischen und analytischen Methoden zur Bestimmung des Zellwachstums und das Lernen der Funktionsweise der dazugehörigen Apparaturen.

Das Wachstum der Zellen erfolgte für die Versuche unter Hypergravitation in einigen für das Biorack speziell angefertigten Kulturbehälter. Zur Simulation von Mikrogravitation wurde ein Klinostat benutzt, der mit speziellen Teflonröhrchen ausgerüstet war. Die Experimente erfolgten unter den gleichen Gravitationsbedingungen, die auf der Bodenkontrolle der beiden Missionen vorhanden waren (1 x g, 1.4 x g). Zusätzlich wurde ein Experiment bei 2.3 x g und eines in simulierter Mikrogravitation durchgeführt. Alle Versuche erfolgten bei einer Temperatur von 30 °C, welche für das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* optimal ist.

Aus den Kulturen erfolgte nach bestimmten Zeiten eine Probeentnahme und verschiedene Parameter wie optische Dichte, Zellzahl, Zellgröße, Trockengewicht (Biomasse), Glukose- und Ethanolgehalt des Kulturmediums wurden gemessen, um den Wachstumszustand der Zellen festzustellen. Bei einigen Proben wurden zudem auch die Sprossnarben angefärbt und deren Verteilung auf der Zelloberfläche unter dem Mikroskop untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten viele der Befunde der Missionen IML-2 und S/MM-03, zeigten aber auch die Schwierigkeiten, die verschiedenen Effekte der Gravitation, wie direkte Effekte auf die Zellen und die Sedimentation, voneinander zu unterscheiden.

2. Einleitung

2.1. Weltraumbiologie

2.1.1. Was ist Weltraumbiologie?

Weltraumbiologie ist eine Wissenschaft, in der die Reaktionen von lebenden Organismen, vom Einzeller bis zum Mensch, unter den Bedingungen untersucht werden, die während eines Weltraumfluges herrschen und auf der Erde normalerweise nicht vorhanden sind: nämlich Mikrogravitation und erhöhte kosmische Radiation.

Die ersten Experimente in diesem Gebiet hatten als primäres Ziel nachzuprüfen, ob ein bemannter Raumflug überhaupt möglich sei: in diesem Zusammenhang stehen die ersten amerikanischen Parabolflüge in den späten Vierziger mit Affen an Bord und der Orbitalflug der russischen Polarhündin Laika mit dem Satelliten 'Sputnik 2' in 1957. Damit wurde damals bewiesen, dass Säugetiere sowohl die heiklen Phasen des Starts und des Wiedereintritts in der Atmosphäre als auch mindestens einen kurzfristigen Aufenthalt im Weltraum überleben können: der Weg war somit frei für den erste bemannte Flug von Juri Gagarin in 1961.

Die ersten amerikanischen und sowjetischen Missionen trugen schon kleine biologische Experimente mit sich an Bord, aber die Bedingungen für eine vertieften Forschung wurden erst in den siebzigen Jahren geschaffen, mit dem Flug des Skylabs, wo für das erste Mal akzeptable Arbeitsbedingungen vorhanden waren. In den Achtziger erlaubte das Space Shuttle (mit zuerst Spacelab und später Biorack) endlich eine systematische Untersuchung der biologischen Phänomene im Weltraum.

Doch sind die Fortschritte in diesem Gebiet noch stark von den wenigen vorhandenen Flugmöglichkeiten und von den Kosten abhängig, die erforderlich sind, um eine Nutzlast in die Erdumlaufbahn zu schicken. Neben diesen Einschränkungen, die sich hauptsächlich auf das Gewicht und die Grösse der Probe beziehen, stellen die Sicherheitsbestimmungen, die im Weltraum streng eingehalten werden müssen, weitere Restriktionen bezüglich der benutzbaren Materialien und Chemikalien dar. Ein Versuch muss deshalb im Weltraum unter anderen Arbeitsbedingungen durchgeführt werden, gegenüber denjenigen die in einem Labor auf der Erde vorhanden sind, was einen Antrieb für die Entwicklung von neuen Technologien, Materialien und Methoden zur Folge hat.

2.1.2. Heutiger Stand des Wissens

Die beträchtliche Wichtigkeit von *Saccharomyces cerevisiae* und anderen Hefen für die Ernährung des Menschen, für die Biotechnologie und die Forschung ist bekannt: ein guter Teil unserer Kenntnisse über eukaryontische Zellen bezieht sich gerade auf diese Organismen. Es ist deshalb überraschend zu erfahren, dass die Versuche mit Hefe im Weltraum an den Fingern abzuzählen sind, was natürlich dazu führt, dass auch unseres Wissen entsprechend begrenzt ist.

Die wichtigste Befunde der bisher durchgeführten Experimenten sind hier kurz beschrieben:

- Bei dem temperatursensitiven diploiden Stamm STS42-2 (homozygot für das fehlerhafte *rec1-1* -Gen), der bei den Bodenkontrollen bei 36 °C nicht in der Lage war, mitotischen Rekombinationen durchzuführen, konnte man anhand verschiedenen genetischen Markers während eines Versuches an Bord der IML-1 Mission bei derselben Temperatur eine ähnliche Anzahl an Rekombinanten gegenüber den Stamm STS42-1 (*REC1-1/REC1-1*) mit intaktem Wildtyp-Gen feststellen. Da Rekombinationsereignisse auch von anderen Proteinen hervorgerufen werden können, die in DNA-Reparatur Systeme vorhanden sind, und da bei STS42-2 rekombinierenden Zellen den Phänotyp *Rec*⁻

erhalten blieb, wurde vorgeschlagen, dass eine verstärkte Inzidenz an DNA-Schäden die Ursache der Erhöhung der Rekombinationsereignisse sein könnte ⁽¹⁾.

- Eine erhöhte Anzahl an Zellen mit zufällig verteilten Sprossnarben gegenüber den 1 xg-Kontrollen (sowohl an Bord als auch am Boden) wurde bei Hefen während die IML-2 Mission gefunden. Vermutet wird, dass in Mikrogravitation Veränderungen in dem Zytoskelett auftreten, die verantwortlich für diesen Effekt sein könnten ⁽²⁾.

Auch auf anderen Mikroorganismen konnte man die Effekte von der Mikrogravitation auf verschiedenen biologischen Prozesse beweisen, wie zum Beispiel eine erhöhte Resistenz an Antibiotika in *Escherichia coli* ⁽³⁾. Ein umfassender Überblick der Befunde in Mikroorganismen und anderen Einzelzellen kann in der Literatur gefunden werden ^(4, 5).

Bemerkenswert sind auch die Effekte, die Mikrogravitation auf höhere Organismen und ihre Zellen ausüben kann. Menschliche Lymphozyten, zum Beispiel, haben sich besonders schwerkraftempfindlich gezeigt: eine 90%-ige Reduktion in der Aktivierung durch den Mitogen Concanavallin A ^(6, 7) und eine fünffache *in vitro*-Produktion von α -Interferon ^(8, 9) konnten bisher im Weltraum beobachtet werden.

2.1.3. Mikro- und Makrogravitation

Mikrogravitation ($g < 10^{-2}$): dieser Ausdruck wird in der Fachsprache gegenüber dem Ausdruck 'Schwerelosigkeit' bevorzugt, weil reelle Schwerelosigkeit wegen der engen Beziehung zwischen Masse und Gravitation praktisch unmöglich zu erzeugen ist. Die Idee der Schwerelosigkeit ist oft mit der des freien Falles gekoppelt. Allgemein kann man Schwerelosigkeit definieren als den Zustand in dem keine anderen Kräfte als die virtuellen Inertialkräfte der Gravitation entgegenwirken ⁽¹⁰⁾.

Schon vor dem Beginn der Ära der Weltraumfahrt war die Wichtigkeit des Einflusses der Gravitation auf die Entwicklung von Pflanzen und Oocyten dank pionieristischen Arbeiten bekannt ^(11, 12)

Die Pflanzen waren an dem sogenannten 'slow rotating clinostat' horizontal befestigt: dieser rotierte mit einer Geschwindigkeit in der Größenordnung von 1 rpm, wobei die langsame Reaktion auf der Erdbeschleunigung dieser Organismen benutzt wurde, um eine Randomisierung des Gravitationsvektors zu erhalten.

Dieses Prinzip wurde dann 1965 mit dem schnell rotierenden Klinostat erweitert (fast rotating clinostat ^(13, 14, 15)) und ermöglichte simulierte Mikrogravitationsbedingungen auch an Einzeller zu erforschen.

Zu bemerken bleibt jedoch die Tatsache, dass beide Typen von Klinostaten nur die vektoriellen Effekte der Gravitation beseitigen können: die skalaren Effekten, wie die Erzeugung eines hydrostatischen Druckes, bleiben erhalten. Zudem erzeugt der Klinostat Konvektion in dem Medium, ein Effekt, der also in diesem Sinn genau in der entgegengesetzten Richtung zur effektiven Schwerelosigkeit wirkt. Echte Mikrogravitation ist nur im Weltraum zu erhalten, da auch in einem parabolischen Flug oder in der 'free-fall machine' externe Kräfte auf das System ausgeübt werden (nämlich Luftwiderstand oder der kurze Impuls, der notwendig ist um den Behälter mit der Probe entlang des Rohres zu schießen).

Mit dem schnell rotierenden Klinostat kann man bei einer Umdrehungszahl von 90 rpm und einem Durchmesser des Probebehälters von 4.5 mm eine Hypogravitation von 0.02 x g erreichen.

Makrogravitation ($g > 1$): eine erhöhte Gravitation ist im Labor einfacher zu erzeugen als Mikrogravitation: benötigt wird nur eine Zentrifuge. Die dabei erzeugte Schwerkraft ist die vektorielle Summe zwischen der von der Rotation entwickelten Kraft und der Erdanziehungskraft. Zudem kann eine geeignete Zentrifuge einen praktisch zeitunbegrenzten Versuch erlauben, so dass die Möglichkeit besteht, zum Beispiel Versuchstiere für Monate oder sogar Jahre unter Hypergravitationsbedingungen zu halten.

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Unter dem Oberbegriff Hefen werden mehr als über zwanzig Gattungen von eukaryontischen Mikroorganismen mit je mehr als fünf gut charakterisierten Spezien zusammengefasst, die zur Klasse der Schleimpilze (Ascomyceten) gehören.

Hefen vom Typ *Saccharomyces* werden schon seit Jahrtausende von den Menschen biotechnologisch für die Brot- und Bierherstellung genutzt: Beweise von diesen beiden Prozessen sind bereits aus dem alten Ägypten bekannt ⁽¹⁶⁾.

Dank ihrer Resistenz und Leistungsfähigkeit, die wenigen Ansprüche, die ihre Züchtung verlangt und die Ähnlichkeit ihrer zellularen Mechanismen mit denen von höheren Eukaryonten, sind Hefen ein Modellsystem in der Biologie und ein der beliebtesten Werkzeugen in der Biotechnologie geworden.

2.2.1. Physiologie der Bäckerhefe

Die verschiedenen *Genera* von Hefen unterscheiden sich unter anderem von ihrem Verhalten gegenüber Glukose und Sauerstoff : *S. cerevisiae* ist Glukose- und Sauerstoffsensitiv, was bedeutet, dass die Ethanolbildung erfolgt, entweder wenn ein Überangebot an Glukose oder wenn ein Unterangebot an Sauerstoff vorhanden ist. Das ausgeschiedene Ethanol kann wiederum als Energiequelle verwendet werden, vorausgesetzt das Angebot an Sauerstoff genügend ist und die Glukose völlig verbraucht ist, das heisst wenn die respiratorische Kapazität der Zellen nicht erschöpft ist (Abb. 1).

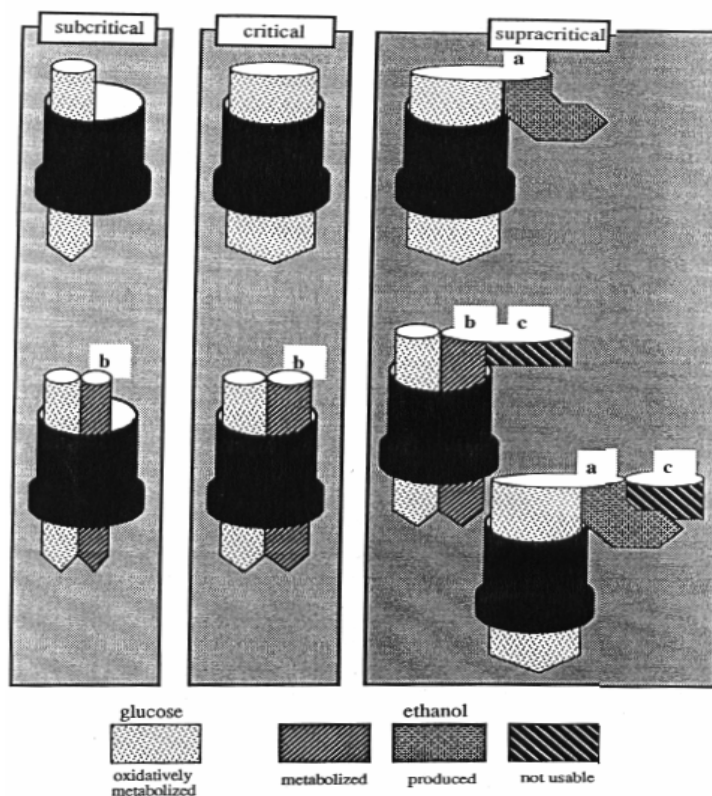
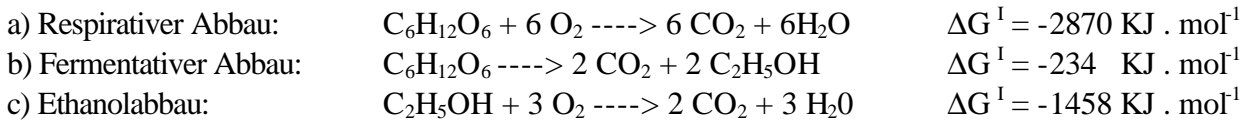


Abb. 1: Schematische Darstellung der limitierenden respiratorischen Kapazität als Flaschenhals (schwarz). Die möglichen Konstellationen von Substratflüssen sind als mehr oder minder dicken Pfeile gezeigt. Oben: nur Glukose als Substrat. Unten: Mischsubstrat Glukose + Ethanol ⁽¹⁷⁾.

Glukose wird oxidativ benutzt und vollständig in Biomasse umgesetzt nur wenn genügend Sauerstoff und einen nicht allzuviel grössen Überschuss an Glukose selbst gibt.



Weg a) und b) werden gemeinsam genutzt sofern genügend Sauerstoff als auch freie respiratorische Kapazität zur Verfügung stehen.

Dieses komplizierte Muster der Substratverwertung hat für die Bäckerhefe verschiedene Vorteile: erstens ermöglicht es ein grosses Teil der Energie in Form von Ethanol mit einer guten Ausbeute zu speichern und zweitens wirkt das produzierte Ethanol toxisch auf vielen anderen Mikroorganismen, was *Sacchromyces cerevisiae* gleichzeitig erlaubt die Glucose den Konkurrenten zu entziehen und in einer für sie toxischen Substanz zu verwandeln ⁽¹⁸⁾.

Das Wachstum von *Sacchromyces cerevisiae* ist in Abb. 2 gut vorgestellt: die Bedingungen sind praktisch die selben die während dieser ganzen Arbeit herrschten.

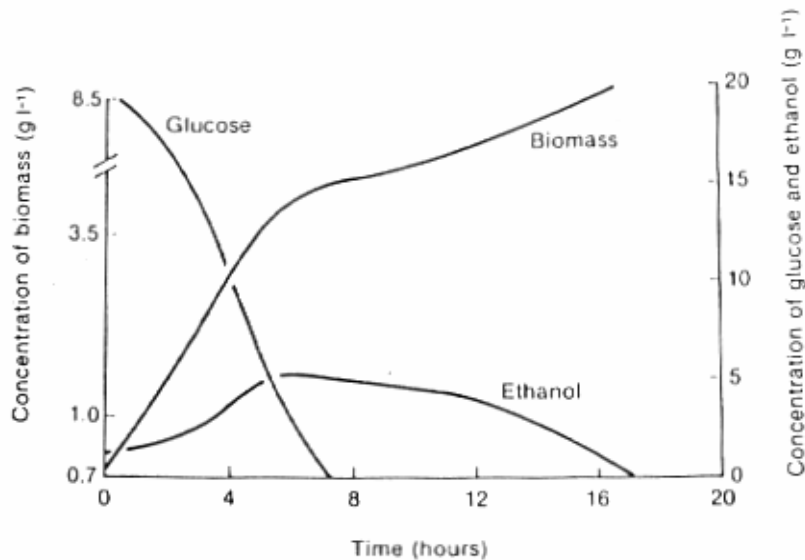


Abb. 2: Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* in einer aerobischen batch Kultur. Nach einer anfänglichen Adaptationsphase (lag-Phase) beginnen die Zellen exponential zu wachsen (log-Phase). Nachdem die ganze Glukose in Ethanol gewandelt worden ist, tritt eine kurze Pause ein, wobei die Zellen ihren Metabolismus auf der neuen C-Quelle umstellen, beginnen die Zellen sich erneut zu vermehren, indem das zuvor produzierte Alkohol zur Energiegewinnung benutzt wird ⁽¹⁹⁾.

3. Aufgabestellung

Wirkung der Hypo- und Hypergravitation auf die Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae*: analytische und morphologische Untersuchungen.

3.1. Hintergrund

Hefezellen sind eukaryotische Mikroorganismen, die eine sehr wichtige Rolle in der Biotechnologie und in der Molekularbiologie spielen. Aufgrund ihrer Aehnlichkeit auf verschiedenen Ebenen mit höheren Zellarten und ihrer einfachen Kultivierung werden sie sehr oft als Modellorganismen benutzt. Die Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* sind für das 'Bioreaktor' Experiment auf die Missionen IML-2 (International Microgravity Laboratory 2, in 1994) und S/MM-03 (Shuttle to MIR Mission 03, in 1996) ausgewählt worden. Das Wachstum dieser Zellen ist in batch Kultur unter verschiedenen Bedingungen (gerührt/ungerührt) im Weltraum untersucht worden. Die Experimente mussten bei der leichten suboptimalen Temperatur von 22 °C (statt 30 °C) durchgeführt werden, weil Inkubatoren entweder auf 37 °C oder 22 °C eingestellt waren. Vorexperimente zeigten, dass die Kultur sehr zufriedenstellend bei 22 °C war.

Keine grosse Unterschiede zwischen Boden und Weltraum Chemostat-Proben waren zu beobachten ausser in der Verteilung der Sprossnarben. Vermutet wird, dass das Zytoskelett, das in anderen Zellen unter Mikrogravitation geändert wird, auch hier eine Rolle spielt. In der Batchkultur sind auch Unterschiede im Wachstum zwischen Boden und Mikrogravitation bemerkt worden.

3.2. Ziel

Untersuchung der Wirkung von Hypergravitation (Zentrifuge) und simulierter Hypogravitation (im Klinostat) auf das Wachstum und die Morphologie von *Saccharomyces cerevisiae*.

3.3. Methodik

Hefezellekultivierung und biologischen Methoden werden erlernt. Das Zellwachstum wird durch verschiedene Methoden bestimmt (OD, Zellzahl, eventuell Biomasse). Die analytische Untersuchungen werden mit Spektrophotometrie und Gas-Chromatographie durchgeführt. Der Schwerpunkt der morphologischen Analysen ist der Färbung der Sprossnarben (Fluorometrie).

4. Material und Methoden

4.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Der *Saccharomyces cerevisiae* LBGH1022 (ATCC 32167) Stamm wurde für alle Versuche in dieser Semesterarbeit benutzt. Für die langfristige Aufbewahrung werden diese Zellen in 20% glycerinhaltigem D2-Medium tiefgefroren. Lebende Kulturen können bei 4 °C auf YEED-Agarpetrischalen für mehrere Wochen konserviert werden.

4.1.1. Züchtungsbedingungen

Der Ansatz einer neuen Kultur erfolgte immer von auf Petrischalen aufbewahrten Zellen aus: aus diesen wurden zuerst eine Vorkultur in D2-Medium (pH=4.5) in einem Erlenmeyer hergestellt, die dazu diente, die Hefen an die neuen Züchtungsbedingungen anzupassen. Eine Aliquot der Zellen wurde dann entnommen, um die gewünschte anfängliche optische Dichte zu erhalten und wiederum in D2-Medium verdünnt. Sowohl bei der Vorkultur als auch bei dem eigentlichen Versuch wurde eine Temperatur von 30 °C eingehalten.

4.2. Medium

Wie bereits erwähnt erfolgte die Züchtung der Zellen in D2-Medium ⁽²⁰⁾, welcher die folgende Zusammensetzung besitzt:

D2-Basis:

| | |
|-----------------------------|-------------------------|
| Glukose anhydrat | 20.00 g.l ⁻¹ |
| Ammoniumsulfat | 4.00 g.l ⁻¹ |
| di-Ammoniumhydrogenphosphat | 1.28 g.l ⁻¹ |
| Kaliumchlorid | 0.60 g.l ⁻¹ |
| Calciumchlorid dihydrat | 0.20 g.l ⁻¹ |
| Magnesiumsulfat heptahydrat | 0.30 g.l ⁻¹ |

Spurenelemente (aus 1000x-Stammlösung):

| | |
|--------------------------|-------------------------|
| Kupfersulfat pentahydrat | 1.55 mg.l ⁻¹ |
| Zinksulfat heptahydrat | 6.00 mg.l ⁻¹ |
| Mangansulfat monohydrat | 7.00 mg.l ⁻¹ |

Eisen (aus 1000x-Stammlösung):

| | |
|-------------------------------|-------------------------|
| Eisen(III)-Chlorid hexahydrat | 9.60 mg.l ⁻¹ |
|-------------------------------|-------------------------|

Vitamine (aus 1000x-Stammlösung):

| | |
|----------------|--------------------------|
| myo-Inositol | 40.00 mg.l ⁻¹ |
| Ca-Panthotenat | 20.00 mg.l ⁻¹ |
| Thiamin HCl | 4.00 mg.l ⁻¹ |

| | |
|---------------|-------------------------|
| Pyridoxin HCl | 1.00 mg.l ⁻¹ |
| (+)-Biotin | 0.02 mg.l ⁻¹ |

Antibiotikum (aus 1000x-Stammlösung):

| | |
|------------|-----------------------|
| Gentamycin | 50 µg.l ⁻¹ |
|------------|-----------------------|

Alle Stammlösungen wurden durch Millipore-Filtern (0.2 µm) steril filtriert, dann aliquotiert und zur Basislösung zugegeben (1000x-Verdünnung: je 1ml pro Liter). Das Medium wurde dann auf pH 4.5 mit Phosphorsäure angesäuert und wiederum in autoklavierten Vorratsflaschen steril filtriert. Die Aufbewahrung von der auf dieser Weise hergestellten Lösung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

4.3. Versuchsaufbau

4.3.1. Versuche im Klinostat

Der Klinostat, der für die Hypogravitationsexperimenten benutzt wurde, ist ein Eigenbau der ETH-Werkstätte (Abb.3). Dieser befand sich in einem 30 °C-Brutraum. Die definierte Umdrehungsgeschwindigkeit (90 rpm) und ein maximaler Durchmesser der Teflonröhrchen von 4.5 mm erlauben die vektorielle Kompensation der Erdanziehungskraft: eine minimale Gravitation von 0.02 x g ist damit erzeugbar, wobei dieser Wert durch die von der Rotation bedingte Zentrifugalkraft hervorgerufen wird.

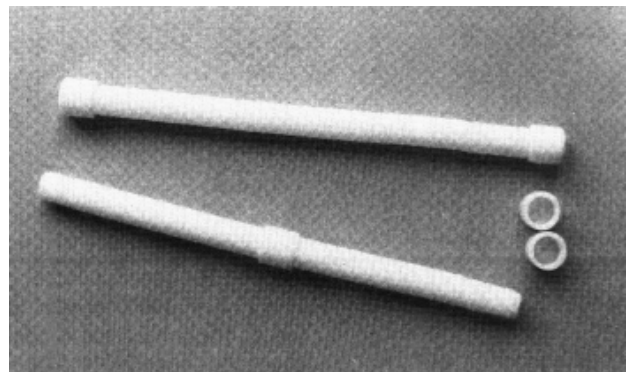
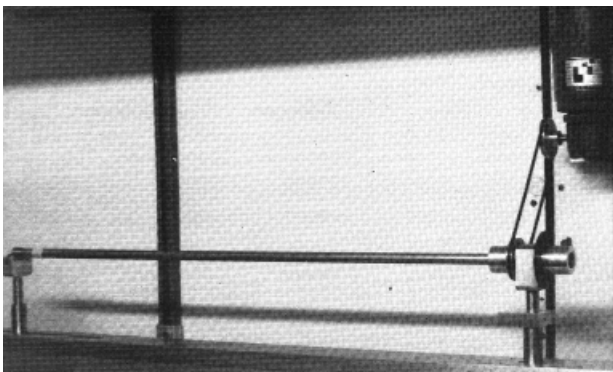


Abb. 3: Der schnell rotierende Klinostat (links) und die Teflonröhrchen welche die Zellkultur enthalten (rechts). Die hier gezeigten Röhrchen sind länger als diejenige, die während dieser Arbeit benutzt wurden und haben ein Volumen von 2 ml statt 1.2 ml ⁽⁴⁾.

Die Teflonröhrchen wurden mit der vom Experimentensatz stammenden Zellsuspension ($OD_{600}=0.2$) bis zum maximalen Volumen (1.2 ml) mit einer sterilen Pasteurpipette gefüllt, wobei speziell darauf geachtet wurde, Lufteinschlüsse zu vermeiden. Die Röhrchen wurden in den Trägeröhrchen eingefügt und anschliessend auf dem Klinostat montiert oder für die 1g-Kontrolle auf einem Schüttler befestigt. Eine geschüttelte Kontrolle wurde in diesem Fall bevorzugt, um die von der Rotation verursachte Abwesenheit von Sedimentation im Klinostat zu simulieren.

Die Probeentnahme erfolgte dann nach bestimmter Zeitintervallen, wobei die Klinorotation für einige Sekunden gestoppt werden musste.

Alle Schritte die danach folgten wurden auf Eis durchgeführt, um ein weiteres Wachstum der Zellen zu vermeiden: die Zellsuspension wurde zuerst in einem Eppendorf transferiert: 200 µl dienten für die OD- und etwa 50 µl für die Zellzahlmessung; bei einigen Proben wurde eine zusätzliche Aliquot von etwa $2 \cdot 10^6$

Zellen für die Spossenarben-Analyse entnommen. Das Medium wurde dann von den Zellen durch Zentrifugation bei 13000 rpm getrennt und für die Glukose- und Ethanolanalysen im Tiefkühlschrank bei -20 °C aufbewahrt.

4.3.2. Hypergravitationsversuche

Die Hypergravitationsversuche erfolgten in besonderer Kulturkammer, die speziell für das Biorack entwickelt worden sind. Acht Proben à je 1 ml finden in diesen sogenannten 'Typ I-Container' Platz, jedoch betrug das verwendete Volumen der Zellkultur wegen Undichtheitsproblemen nur 700 µl. Zur Herstellung von Hypergravitationsbedingungen stand eine für den Zweck an der ETH gebaute Zentrifuge (Hyperfuge, Abb. 4) zur Verfügung, in der sowohl konventionelle Kulturflaschen als auch Biorack-Containers des Typs I benutzt werden konnten (Abb. 5).

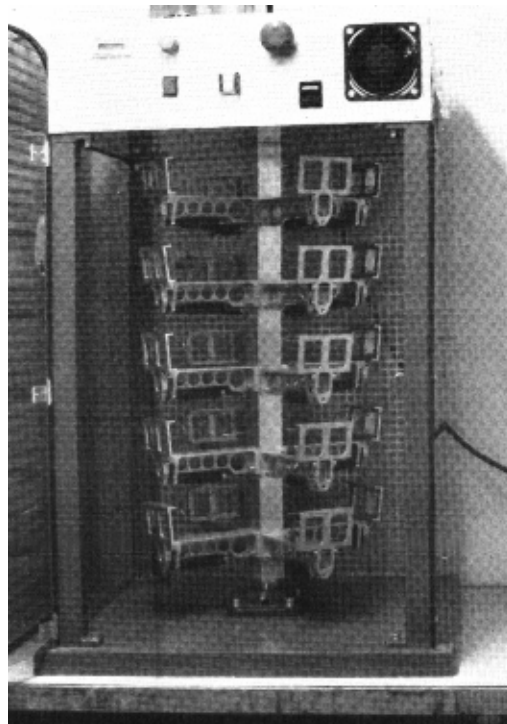


Abb. 4: Mit der Hyperfuge kann eine ganze Palette von verschiedenen Gravitationsbedingungen erreicht werden. Die Typ I-Containers des Bioracks können an den Enden der Zweigen befestigt werden⁽⁴⁾.

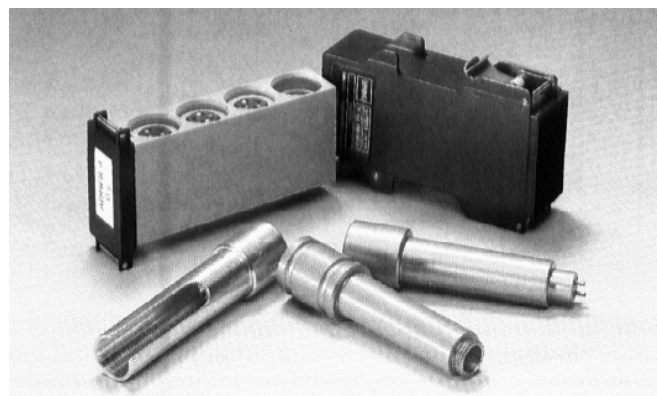


Abb. 5: Ein Typ I-Container (rechts der Abbildung) mit den Kulturbehälter für die Zellsuspension (links). Unten sind die Werkzeuge gezeigt, die für sämtliche Manipulationen benötigt werden.

Die gewünschte g-Zahl kann durch Veränderung der Umdrehungsrate der Hyperfuge stufenlos reguliert werden, wobei die folgende Beziehung gilt:

$$g\text{-Zahl}_{\text{Zentrifuge}} = 4 \cdot \pi^2 \cdot f^2 \cdot g^{-1} \cdot r = 1.118 \cdot 10^{-3} \cdot r \cdot \text{rpm}^2$$

$f = \text{Frequenz [s}^{-1} \text{]}$
 $g = 9.81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$
 $r = 0.15 \text{ m konstant}$

Die totale Beschleunigung ist dann die vektorielle Summe der von der Hyperfuge erzeugten Beschleunigung und der Erdanziehungskraft:

$$g\text{-Zahl}_{\text{tot}} = (g\text{-Zahl}_{\text{Zentrifuge}}^2 + 1)^{1/2}$$

Da bei diesen Versuche nicht die Möglichkeit bestand, die Sedimentation der Zellen zu vermeiden, wurden statische statt geschüttelte 1g-Kontrollen bevorzugt: diese wurden dabei so positioniert, dass die Erdanziehungskraft ihre Wirkung auf dem Kulturkammer in der gleichen Richtung ausübte wie die von der Rotation resultierende Beschleunigung.

Die Entnahme und Behandlung der Proben erfolgten auf der gleichen Weise wie bei den Versuche im Klinostat (siehe 4.3.1.).

4.4. Methoden zur Bestimmung relevanter Grössen

Das Wachstum der Zellen wurde auf drei verschiedenen Weisen, durch die Zellzahl, die optische Dichte der Kultur und die Trockenmasse der Zellen direkt gemessen. Die Messung des Glukose- und Ethanolgehaltes des Kulturmediums liefert zusätzliche indirekte Informationen über das Wachstum und erlaubt zudem Rückschlüsse über den Metabolismus der Zellen.

4.4.1. Optische Dichte

Diese Methode benutzt die Tatsache, dass die Molekülen, aus denen eine Hefezelle gebildet ist, unter anderem im sichtbaren Bereich des Lichtes absorbieren. Das Verhältnis zwischen emittiertes und absorbiertes Licht zur Menge dieser Verbindungen und damit auch zur Zellzahl proportional ist (1 OD-Einheit entspricht etwa $1,45 \cdot 10^7$ Zellen).

Die optische Dichte, oder Absorption, lässt sich durch die folgende Formel beschreiben:

$$OD = \log (I_0 / I) = \epsilon \cdot d \cdot c$$

$I_0 = \text{Intensität des verwendeten Lichtes}$
 $I = \text{Lichtintensität nach dem Durchgang durch die Lösung}$
 $\epsilon = \text{Molaren Extinktionskoeffizient}$
 $d = \text{Schichtdicke in cm}$
 $c = \text{Konzentration der absorbierenden Verbindung}$

Um die OD zu bestimmen, wurde die Probe 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt (100 µl Probe + 900 µl H₂O) und in dem Spektrophotometer (Shimadzu UV-160 A, Japan) gemessen (als 'blank' diente dest. Wasser). Die Messung erfolgte in Duplikaten.

4.4.2. Zellzahl und Zellgrösse

Zur Messung der Zellzahl und der Zellgrösse stand einen 'flow cytometer' (Coulter-Counter) mit einem 'channelyzer' (Coulter-Channelyzer) zur Verfügung. Die Anzahl und die Grösse der Hefen werden bestimmt, indem die Leitfähigkeit einer Suspension der Zellen in einer elektrisch leitenden Lösung durch eine durchgelocherte Elektrode gemessen wird. Wenn die Zellen durch diese Elektrode fliessen, kann eine Veränderung in der Leitfähigkeit der Lösung festgestellt werden, bedingt durch die Tatsache, dass die Doppellipidschicht ihrer Membran einem erhöhten elektrischen Widerstand besitzt. Die Anzahl und die Intensität dieser Stromausfälle sind somit ein Mass für die Bestimmung von Zellzahl und Zellgrösse.

Durchführung: Eine Aliquot (10 µl) der Zellsuspension wurde mit 20 ml einer isotonischen elektrisch leitenden Salzlösung (Isoton, Coulter) gemischt. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten, wobei jedes Duplikat dreimal gemessen wurde: für jede einzelne Bestimmung waren 500 µl Suspension nötig und als Kontrolle wurde eine reine Isoton-Lösung benutzt.

Unter Berücksichtigung der Verdünnung war es dann möglich aus der Anzahl Zellen in der Aliquot die Konzentration pro Milliliter auszurechnen.

Ein Printout der Kurve, in der die Zellen nach ihre Grösse eingeteilt wurden, wurde von dem Channelyzer geliefert und dann mit dem Computer ausgewertet.

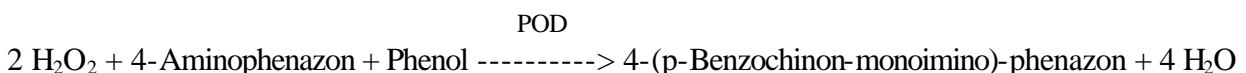
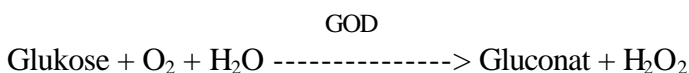
4.4.3. Trockengewicht

Als dritter Parameter für die Abschätzung des Zellwachstums wurde in einigen Fällen auch die Biomasse bestimmt. Diese Methode zeigte sich für kleine Kulturen schlecht geeignet, die kleine Biomassen lieferten, da der Messfehler der zur Verfügung stehende Waage, die jedoch eine Präzision von 0.1 mg hatte, in der Grössenordnung von bis zum 20% der zu ermittelnden Masse lag.

Durchführung: Die in einem bestimmten Volumen enthaltende Zellen wurden bei 13000 rpm zentrifugiert, wobei der Überstand für die Bestimmung von Glukose und Ethanol benutzt wurde. Das Pellet wurde dann in bidest. Wasser resuspendiert und dann durch tarierte Membranfiltern (Gelman, 0.45 µm, USA) filtriert. Die Filtern wurden dann bei 110 °C bis zur Gewichtkonstanz getrocknet.

4.4.4. Glukosegehalt des Mediums

Der Glukoseverbrauch gibt gute Hinweise auf der metabolischen Aktivität und vor allem, zusammen mit dem Ethanolgehalt, auf dem Wachstumsmodus der Zellen in der Kultur: diese Analyse erfolgte nach einem enzymatischen Test (Peridochrom[®] Glucose, Boehringer Mannheim) in dem Glukose als Substrat für eine Reaktion dient, der als Produkt eine photometrisch leicht nachweisbare Verbindung liefert:



GOD = Glukose oxidase
POD = Peroxidase

Die Absorption von 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon wurde bei 490 nm gemessen: die Umrechnung der optischen Dichte in Gramm Glukose pro Liter erfolgte mittels einer Eichgerade mit bekannten Glukosekonzentrationen (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und 1.0 g·l⁻¹).

Durchführung: Test in 96-well Mikrotitrierplatten, in Triplikaten. Der Überstand wurde aufgetaut und eine nach dem abgeschätzten Glukosegehalt angemessene Verdünnung vorbereitet (1:20 für bis sechsstündige Kulturen, 1:10 für bis zehnstündige Kulturen und unverdünnt für Kulturen älter als zehn Stunden). 10 µl der Proben bzw. der unverdünnten Standards wurden dann zu 200 µl des enzymenthaltenden Reagenzpuffers zugefügt. Nach einer 30- bis 60-minütige Inkubierung im Dunkel bei Raumtemperatur folgte die Messung im Photospektrometer.

Dank der Eichgerade und den Triplikaten war es möglich, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die Glukosekonzentrationen mit den entsprechenden Standardabweichungen zu berechnen.

4.4.5. Ethanolgehalt des Mediums

Aus dem Ethanolgehalt des Mediums, zusammen mit dem Verbrauch von Glukose, können Rückschlüsse gemacht werden über auf welchem Substrat und wie die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt wachsen: da *Saccharomyces cerevisiae* sowohl Sauerstoff- als auch Glukosesensitiv ist, wird die Glukose nur dann direkt in Wasser und Kohlendioxid abgebaut wenn sie nicht in Überschuss vorhanden ist und genügend Sauerstoff zur Verfügung steht. Ist das nicht der Fall, wird Glukose zuerst in Ethanol umgewandelt: kann Ethanol nach der Erschöpfung von Glukose nicht abgebaut werden, dann ist es zu vermuten, dass die Zellen, wenn sie überhaupt noch lebensfähig sind, keinen Zugang zum Sauerstoff haben.^(17, 18)

Durchführung: Ethanolkonzentrationen wurden auf einem Gaschromatographen (Hewlett Packard, Model 5830A, USA) mit eine Stahlsäule von 1830 x 2 mm mit Porapak Q-Füllung (Supelco, Switzerland) und Flammenionisationsdetektor bestimmt. Die Temperatur der Säule war 190 °C, diejenige der Detektor 240 °C, als Trägergas wurde Stickstoff benutzt.

150 µl der unverdünnten Probe wurden mit dem gleichen Volumen von einer 1 g·l⁻¹ Isopropanol-Lösung (aus reinem Isopropanol) gemischt, die als internen Standard für den Gaschromatograph diene. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte automatisch mit einem Integrator Gaschromatographen (Hewlett Packard, Model 18850 A, USA), wobei die Fläche unter jedem einzelnen Peak als Output geliefert wurde.

Die entsprechenden Mengen an Ethanol könnten folgenderweise berechnet werden:

$$c_{\text{EtOH}} = (F_{\text{EtOH}} \cdot K) / F_{\text{iso}} \quad \text{wobei} \quad K = (c_{\text{SEtOH}} \cdot F_{\text{Siso}}) / F_{\text{SEtOH}}$$

F_{EtOH} = Peak von Ethanol in der Probe

F_{iso} = Peak von Isopropanol in der Probe

c_{SEtOH} = Konzentration von Ethanol im Standard

F_{Siso} = Peak von Isopropanol im Standard

F_{SEtOH} = Peak von Ethanol im Standard

Der Wert von K wurde für jede Messreihe mit Hilfe von Standards bekannter Ethanolkonzentration (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und 1.0 g·l⁻¹ aus reinem Ethanol) neu berechnet: der Mittelwert von K für die sechs Standards (je zwei mal ermittelt) wurde dann zur Berechnung der Alkoholmengen in den Proben benutzt.

4.4.6. Sprossnarbenanalyse

An der Stelle der Trennung der neuen Zelle bildet sich bei vegetativ sich fortpflanzende Hefen eine Sprossnarbe, die wegen ihres Gehaltes an Chitin durch Fluorometrie leicht nachweisbar ist. Das Verteilungsmuster der Sprossnarben ist unterschiedlich zwischen den verschiedenen Spezies: man unterscheidet zwischen monopolen und bipolaren Sprossung. Bei Hefen vom Typ *Saccharomyces* ist die Verteilung der Sprossnarben zudem noch vom Ploidiegrad abhängig: bei diploiden Zellen (wie zum Beispiel diejenige der benutzte H1022-Stamm) ist die Sprossung bipolar⁽²¹⁾. Die entstehende Tochterzelle ist kleiner als die Mutterzelle, wobei dieser Verhältnis von der Wachstumsrate abhängig ist und neue Zellen nicht entstehen können, wo bereits eine alte Sprossnarbe vorhanden ist. Die Folge ist, dass die Anzahl an Tochterzellen, die von einer *Saccharomyces cerevisiae* Zelle gebildet werden können, begrenzt ist. Von der Anzahl von Sprossnarben kann man damit das Alter einer Hefezelle abschätzen. Jede Zelle besitzt eine Geburtnarbe und zusätzlich soviele Sprossnarben wie die Anzahl Tochterzellen⁽²²⁾. Man weiss heute, dass sowohl einige Gene als auch das Cytoskelett eine wichtige Rolle in der Entstehung und Verteilung der Sprossnarben spielen: das Fehlen einer dieser Gene⁽²³⁾ oder die Mikrogravitationbedingungen während einer Raumfahrt⁽²⁾ können diesen Prozess stören und zu Organismen führen, die ein zufälliges Muster in der Verteilung der Sprossnarben aufweisen.

Durchführung: Eine Aliquot der Suspension mit etwa $2 \cdot 10^6$ Zellen wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet dreimal mit 1 ml einer 0.9%-igen Salzlösung gewaschen und wieder abzentrifugiert (5', 13000 rpm). Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunkel auf dem Schüttler mit einer Calcofluor-white M2R-Lösung ($15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ in 0.9% NaCl) folgten wieder drei Waschschrte in 0.9% Natriumchlorid. Das Pellet wurde dann in 30 μl warmes Glycergel (56 °C) resuspendiert und nach Zugabe von 15 μl frischer Johnson-Lösung auf einem Objektträger mit Deckglas gelegt und schliesslich bei 3000 rpm für drei Minuten zentrifugiert (Cytofuge, IG).

Die Auswertung der Proben erfolgte dann in einem Mikroskop (Leica Ortholux II) unter UV-Licht bei 330-385 nm. Da die Art der Sprossung bei Zellen mit drei oder weniger Sprossnarben nicht eindeutig festzustellen war, wurden für die Auswertung nur die Zellen mit mindestens vier Sprossnarben in Betracht gezogen.

Johnson-Lösung Zusammensetzung:

| | | |
|----------------------|-----|----|
| Glycerin | 90 | ml |
| PBS 10 x Stammlösung | 10 | ml |
| Paraphenyldiammin | 100 | mg |

pH wird mit 0.5 M Carbonat-Bicarbonat Puffer (pH 9.0) auf 8.0 eingestellt.

PBS:

0.9 % Natriumchlorid
10 mM Natriumphosphat (pH 7.2)

5. Resultate und Diskussion

5.1. Test der verschiedenen Kulturbehältern

Vor den eigentlichen Versuchen unter modifizierten Gravitationsbedingungen wurden in drei Vorversuche einige Kulturen in ihrem Wachstum in den verschiedenen Behältern gefolgt, die für Saatkulturen zur Verfügung standen. Dies war nötig, um feststellen zu können, ob die Ergebnisse der verschiedenen Experimenten überhaupt vergleichbar waren und war bedingt durch die Tatsache, dass die Simulation der Mikrogravitationsbedingungen nur im Klinostat möglich war.

5.1.1. Wachstum in Erlenmeyerkolben

Eine Kultur mit anfänglicher OD von 0.39 und Gesamtvolumen von 30 ml wurde aus einer Vorkultur mit OD = 4.58 hergestellt und bei 30 °C und einer Schüttelintensität von 180 rpm inkubiert. Die Temperatur von 22 °C (suboptimal), die bei den Experimente mit Biorack im Weltraum vorhanden war, war nicht zu erreichen wegen der wärmeren Bedingungen im Labor: man hat sich dabei entschlossen diesen Versuch, sowie alle die dann gefolgt sind bei der optimalen Temperatur von 30 °C durchzuführen.

Eine andere Kultur aus der selben Vorkultur und mit gleicher OD und Volumen wurde 14 Stunden danach eingesetzt um den Zeitbereich abzudecken, der in der ersten Kultur nicht gemessen werden könnte. Damit könnte man eine Kurve erhalten, wobei die Punkte in der ersten 20 Stunden in zweistündiger Intervallen gemessen werden könnten (Abb. 6).

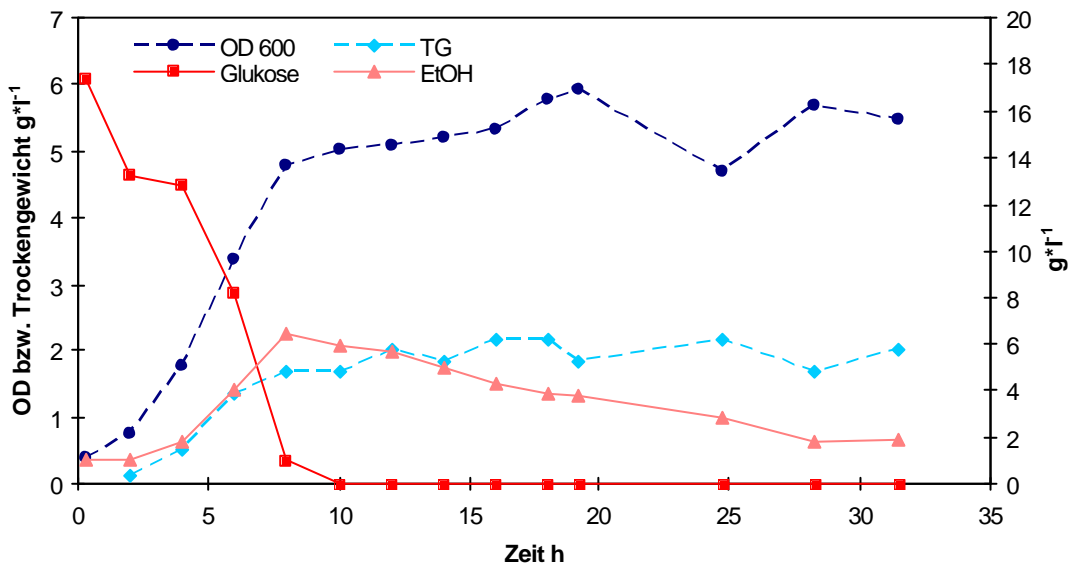


Abb. 6: Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* H1022 Stamm in einem Erlenmeyerkolben. Wachstumsbedingungen: Medium D 2%, Kulturvolumen 30 ml, Temperatur 30 °C, Schüttelintensität 180 rpm.

5.1.2. Wachstum in Biorack Typ I-Containers

Die Saatkultur für die Typ I-Containers wurde auf der selben Weise hergestellt wie in 5.1.1. beschrieben, die anfängliche optische Dichte betrug jedoch in diesem Fall nur 0.2. Ein Volumen von 700 µl wurde dann in jedem der vier Fächer von mehrerer Typ I-Kammern verteilt und diese wurden entweder statisch oder auf der rotierenden Platte des Inkubators gestellt: die Rotationsgeschwindigkeit betrug wie bei dem oberen Versuch 180 rpm.

Die Messung der statischen und der geschüttelten Probe erfolgte gleichzeitig, um einen zeitlichen Vergleich der Proben zu erlauben (Abb. 7).

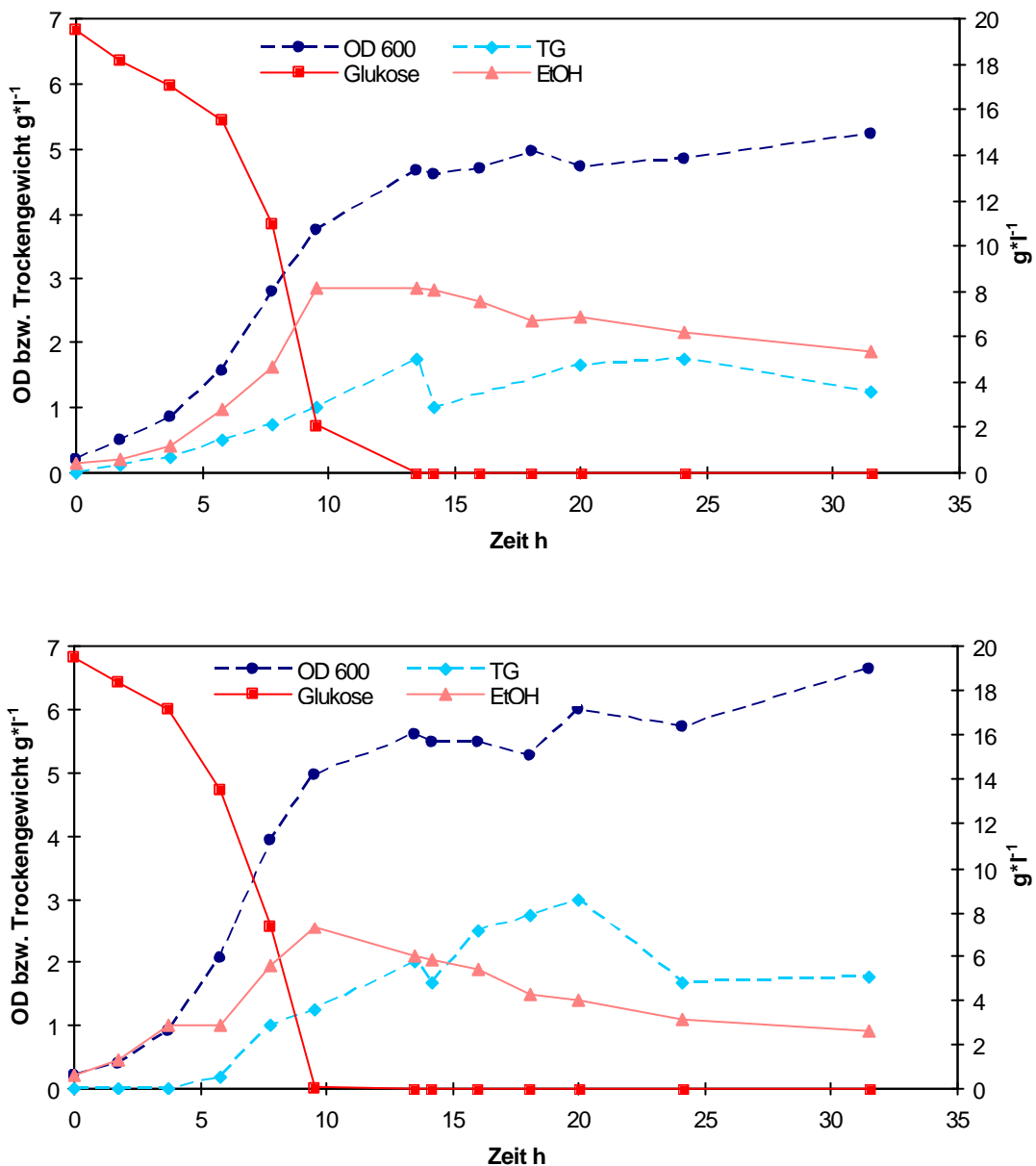


Abb. 7: Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* H1022 Stamm in Typ I-Containers. Wachstumsbedingungen: Medium D 2%, Kulturvolumen 700 μ l, Temperatur 30 °C. **Oben:** statische Probe **Unten:** geschüttelte Probe (180 rpm).

5.1.3. Wachstum in Klinostatröhrchen

Die Klinostatröhrchen wurden bis zu ihrem Maximalvolumen (1.2 ml) mit einer Hefekultur mit optischer Dichte 0.2. (Vorbereitung wie oben, OD der Vorkultur 3.1) und in den Trägerröhrchen montiert. Die Inkubierung erfolgte dann im Brutraum bei 30 °C entweder auf dem Klinostat bei 90 rpm oder auf einem Schüttler. Wegen der Konstruktionsweise diesem Schüttler war unmöglich die exakt verwendete Schüttlerintensität zu bestimmen, diese wurde jedoch für alle Kontrollen der Mikrogravitationsversuche konstant gehalten.

Die Wachstumskurve im Klinostat ist in Abb. 8 gezeigt.

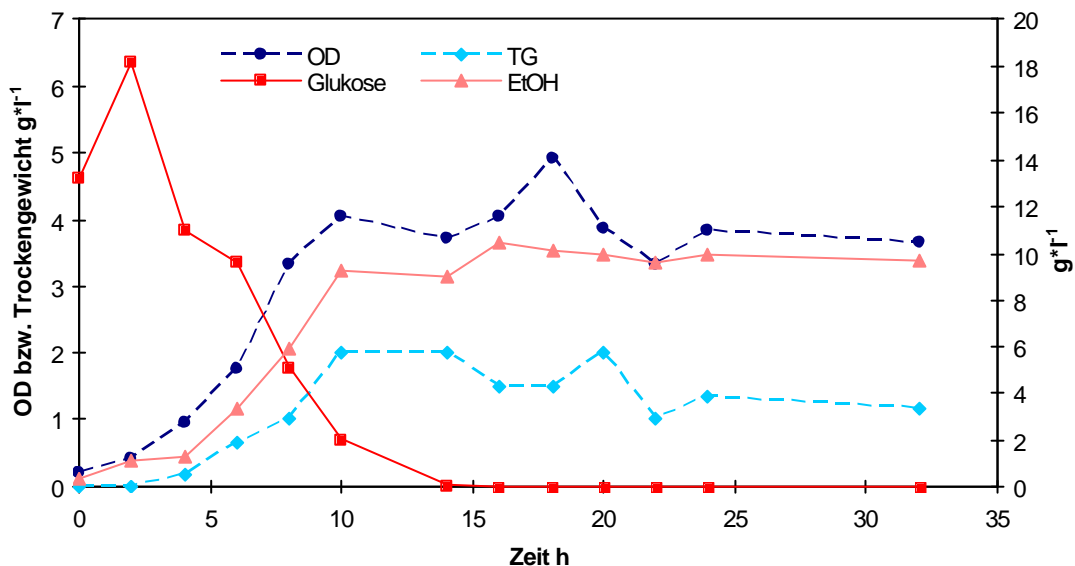
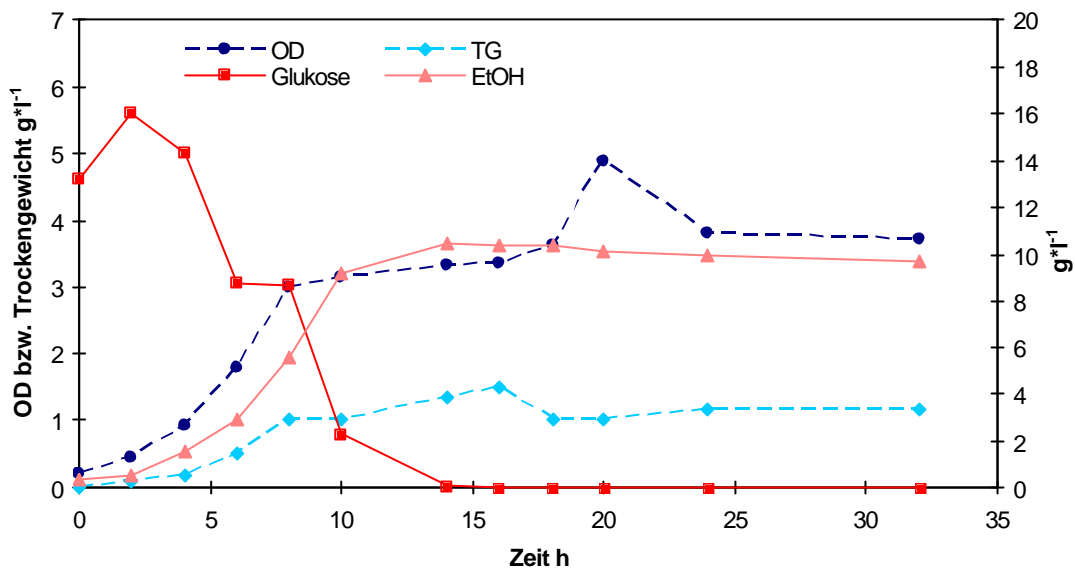


Abb. 8: Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* H1022 Stamm in Klinostatröhrchen. Wachstumsbedingungen: Medium D 2%, Kulturvolumen 1.2 ml, Temperatur 30 °C. **Oben:** geschüttelte 1g-Probe **Unten:** Probe unter simulierter Mikrogravitation (Rotationsgeschwindigkeit 90 rpm).

5.2. Wachstum in simulierte Hypogravitation

Es wurden zwei Versuche im Klinostat in simulierter Mikrogravitation durchgeführt, die praktisch unter den selben Bedingungen, bis zur OD der Vorkultur, läuften. Die Kulturen wurden nach dem oben genannten Verfahren vorbereitet und inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach 5¼, 9, 14 und 19½ Stunden, wobei sowohl bei der Probe im Klinostat als auch bei der Kontrolle je drei Röhrchen gemessen wurden, um die Fehlerabschätzung zu ermöglichen.

5.2.1. Versuch #1

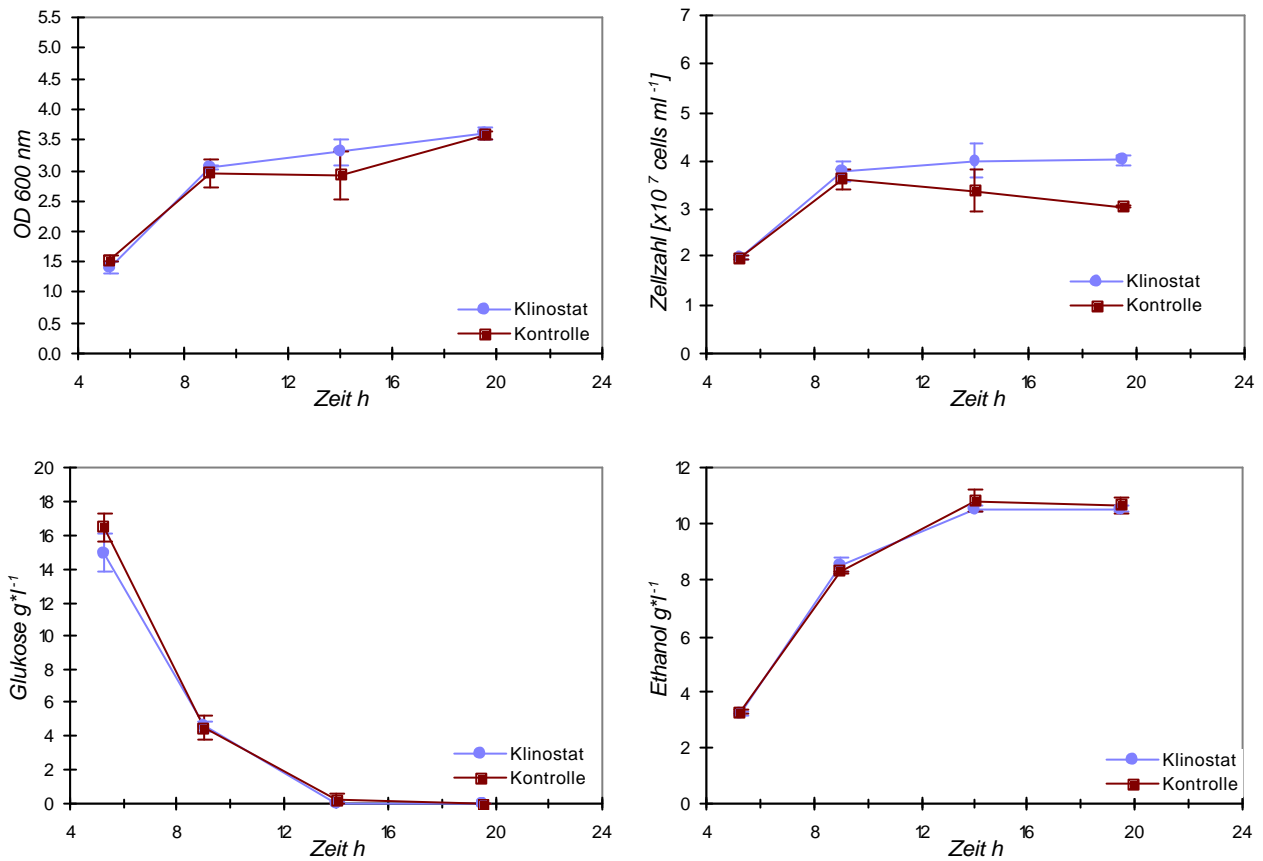
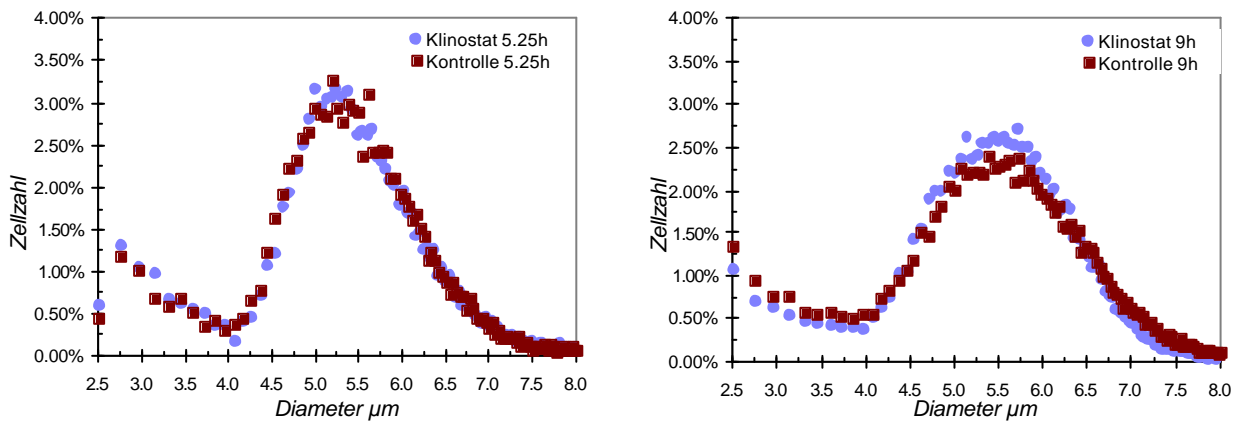


Abb. 9: Vergleich des Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* H1022 Stamm in simulierte Hypogravitation gegenüber 1g-geschüttelte Kontrolle. Wachstumsbedingungen: Medium D 2%, Kulturvolumen 1.2 ml, Temperatur 30 °C. **Oben links:** Optische Dichte bei 600 nm. **Oben rechts:** Zellzahl. **Unten links:** Übriggebliebene Glukose im Kulturüberstand. **Unten rechts:** Ethanol im Kulturüberstand.



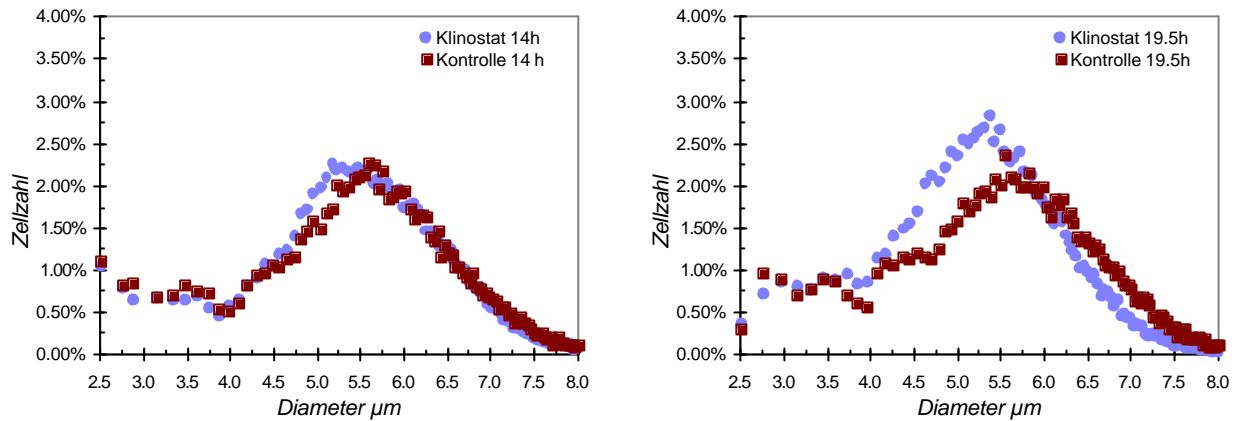


Abb. 10: Vergleich der Grösse der Zellen zwischen die Kultur in simulierte Hypogravitation und 1g-Kontrolle. Die Zellzahl wurde normalisiert und ist als prozentueller Wert der Anzahl gemessenen Zellen angegeben.

5.2.2. Versuch # 2

Der zweite Versuch wurde durchgeführt, um die nicht ganz eindeutige Ergebnisse des ersten Versuches zu bestätigen: dabei wurde bei der neunzehnstündigen Probe auch die Verteilung der Sprossnarben untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11 bis 13 dargestellt:

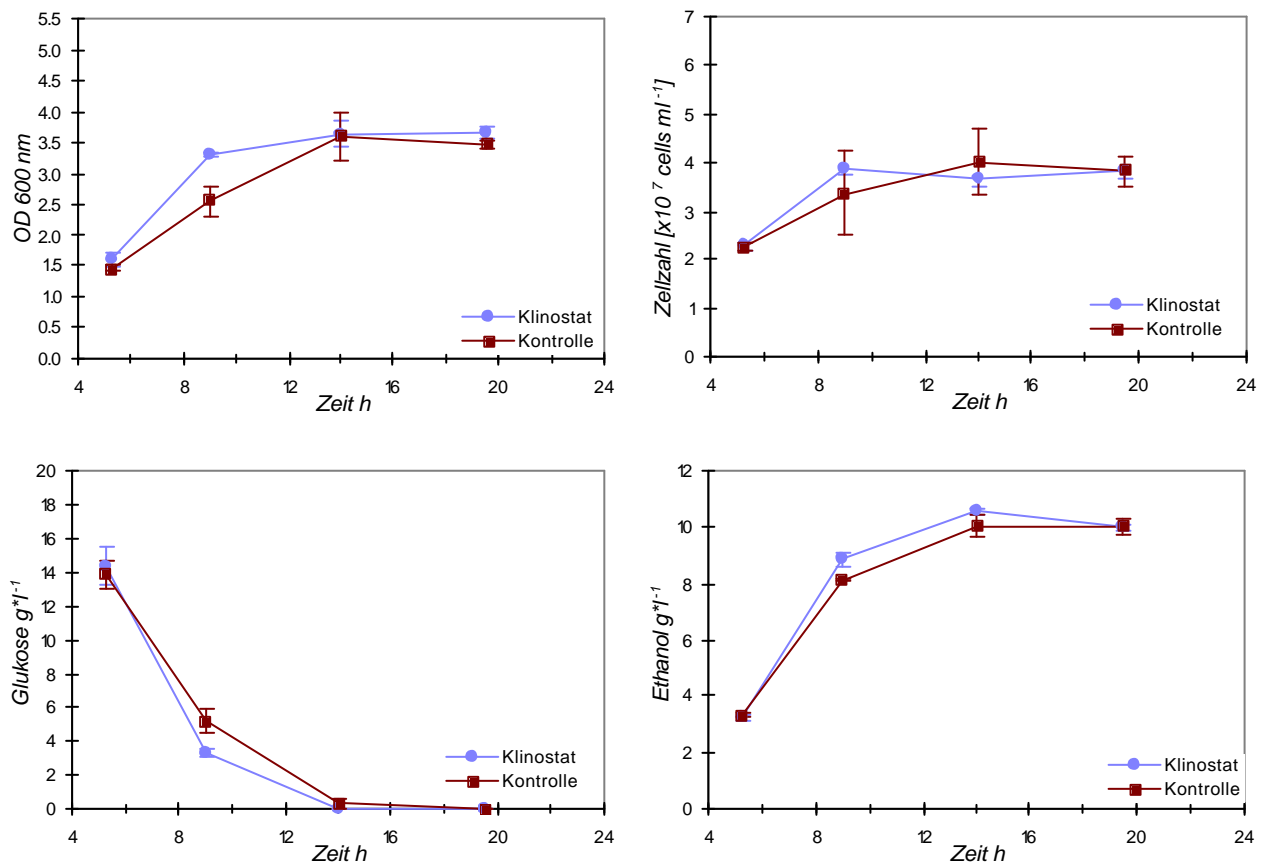


Abb. 11: Vergleich des Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* H1022 Stamm in simulierter Hypogravitation gegenüber 1g-geschüttelte Kontrolle. Wachstumsbedingungen: Medium D 2%, Kulturvolumen 1.2 ml, Temperatur 30 °C. **Oben links:** Optische Dichte bei 600 nm. **Oben rechts:** Zellzahl. **Unten links:** Übriggebliebene Glukose im Kulturüberstand.. **Unten rechts:** Ethanol im Kulturüberstand.

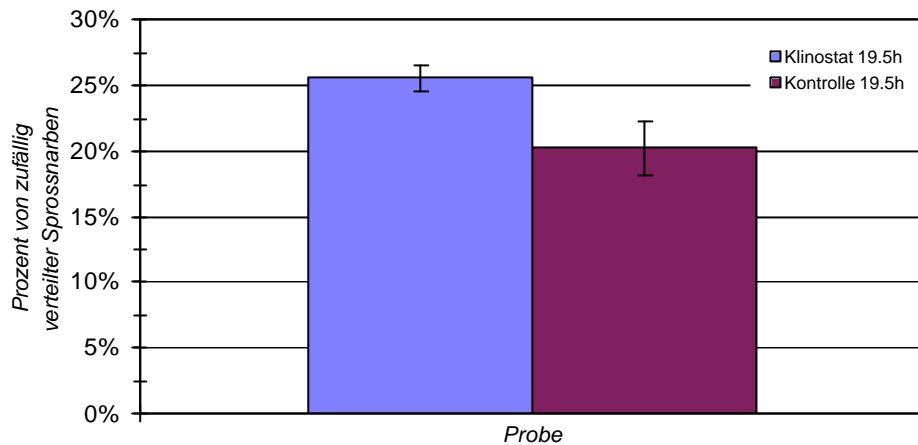


Abb. 12: Vergleich der Fraktion von Zellen mit zufällig verteilten Sprossnarben zwischen die Probe in simulierter Hypogravitation und die Kontrolle nach 19½ Stunden.

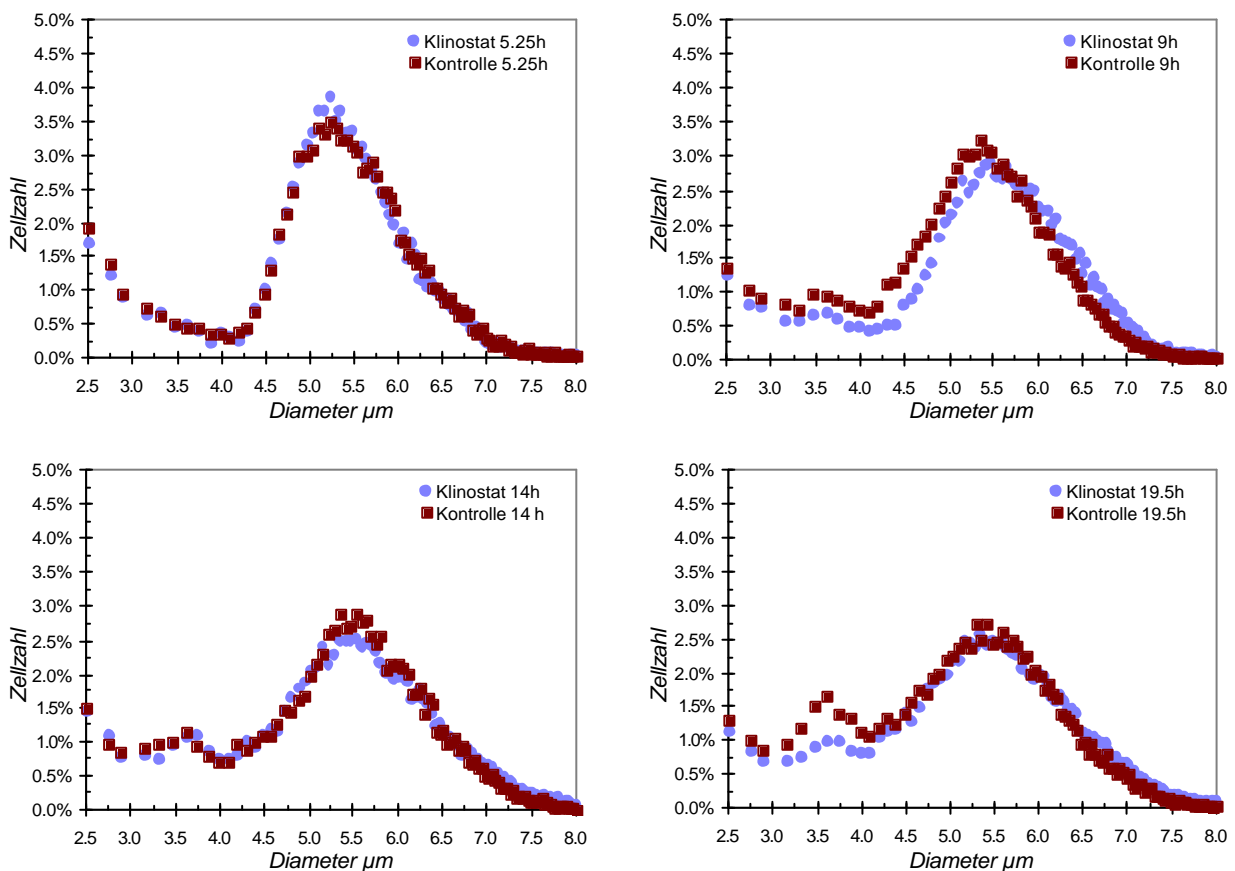


Abb. 13: Vergleich der Grösse der Zellen zwischen die Kultur in simulierter Hypogravitation und die 1g-Kontrolle. Die Zellzahl wurde normalisiert und ist als prozentueller Wert der Anzahl gemessenen Zellen angegeben.

5.3. Wachstum in Hypergravitation

Auch das Wachstum in Hypergravitation wurde in zwei separater Versuche untersucht: die einzigen Unterschiede zwischen die beide Experimente lagen in der g-Kraft an der die Zellen untergeworfen waren und an der optischen Dichten der jeweiligen Vorkulturen. Die Experimenten wurden in Typ I-Containern durchgeführt und die Vorbereitung der Proben erfolgte gemäss den in Punkt 5.1.2. beschriebenen Protokoll. Die Zeitpunkte der Probeentnahmen entsprechen die, die für beide Versuche in simulierter Mikrogravitation gewählt worden waren. In beiden Experimenten

wurde bei aller Proben zusätzlich auch die Anzahl sprossender Zellen unter dem Mikroskop gezählt, da dieser Wert Rückschlüsse auf der Proliferation der Zellkultur erlaubt. Eine statische Kontrolle wurde für beide Versuche gewählt, um die Sedimentation der Zellen in der Zentrifuge zu simulieren.

5.3.1. Zellwachstum bei 1.4 x g

Die Hefekultur für diesen Versuch wurde aus einer Vorkultur mit optischer Dichte 4.24 hergestellt, die anfängliche OD der Kultur betrug wie üblich 0.2. Eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 78 rpm war in der Hyperfuge nötig, um die gewünschte Beschleunigung von 1.4 x g zu erreichen (diese Beschleunigung war bei einer der Bodenkontrolle der IML-2 Mission vorhanden). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt:

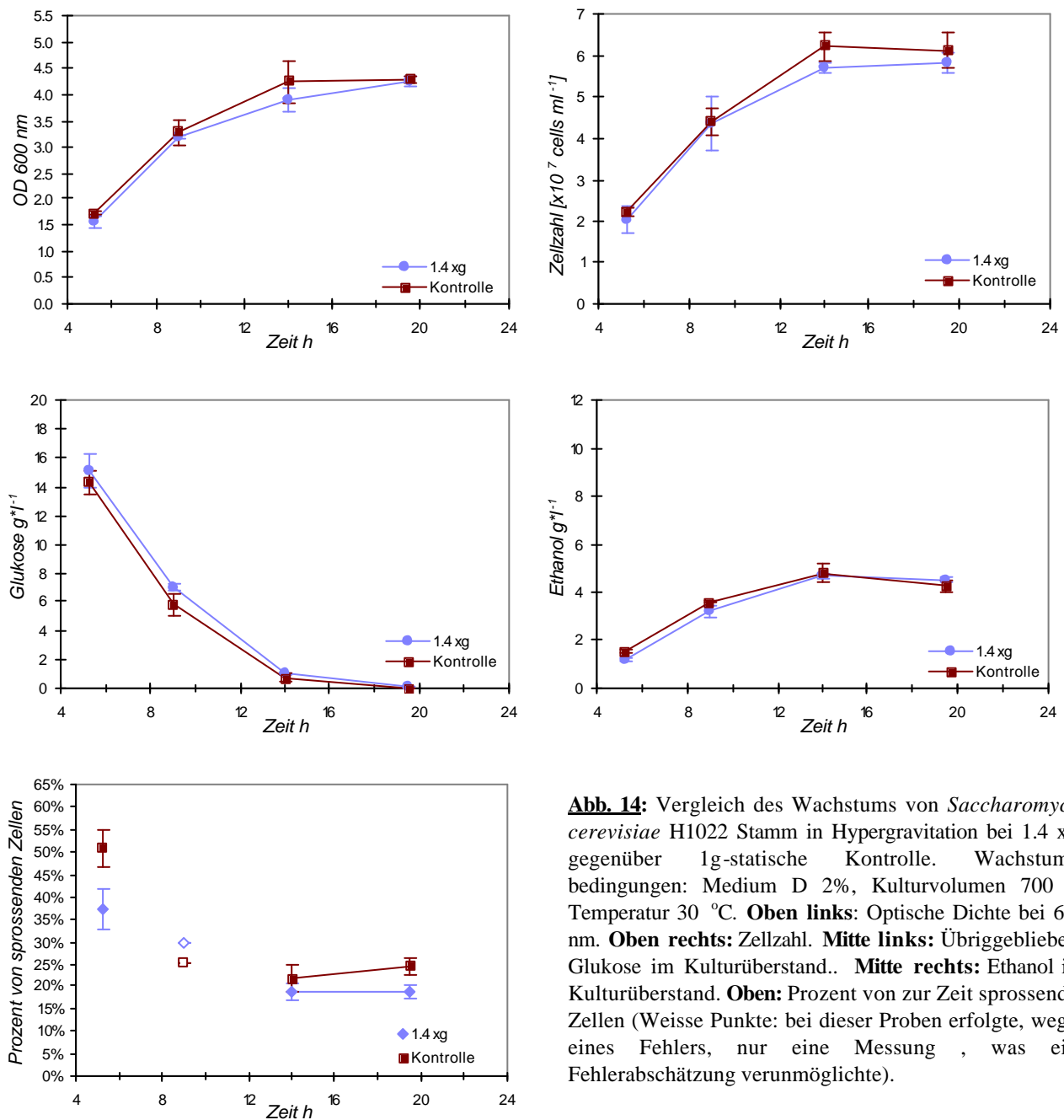


Abb. 14: Vergleich des Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* H1022 Stamm in Hypergravitation bei 1.4 x g gegenüber 1g-statische Kontrolle. Wachstumsbedingungen: Medium D 2%, Kulturvolumen 700 μ l, Temperatur 30 °C. **Oben links:** Optische Dichte bei 600 nm. **Oben rechts:** Zellzahl. **Mitte links:** Übriggebliebene Glukose im Kulturüberstand.. **Mitte rechts:** Ethanol im Kulturüberstand. **Oben:** Prozent von zur Zeit sprossenden Zellen (Weisse Punkte: bei dieser Proben erfolgte, wegen eines Fehlers, nur eine Messung, was eine Fehlerabschätzung verunmöglichte).

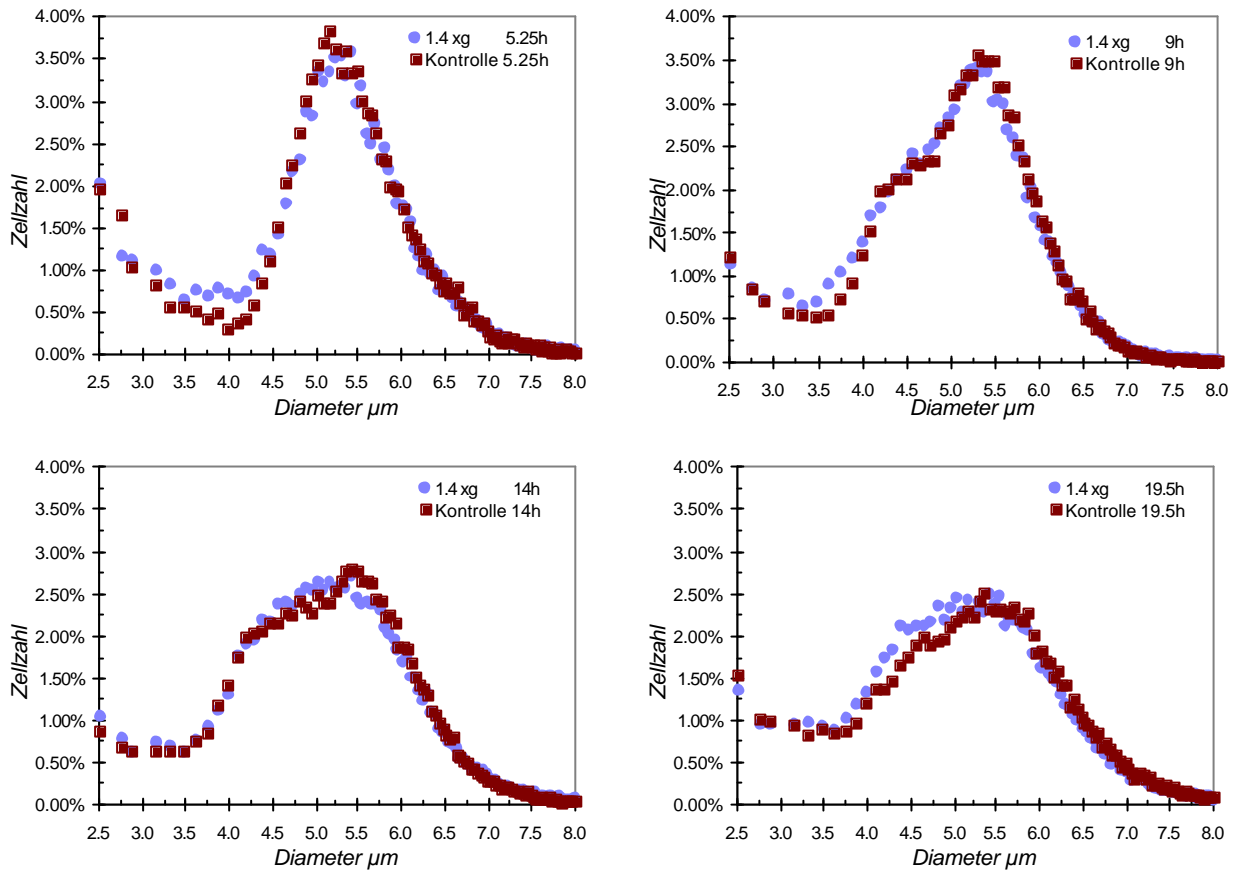
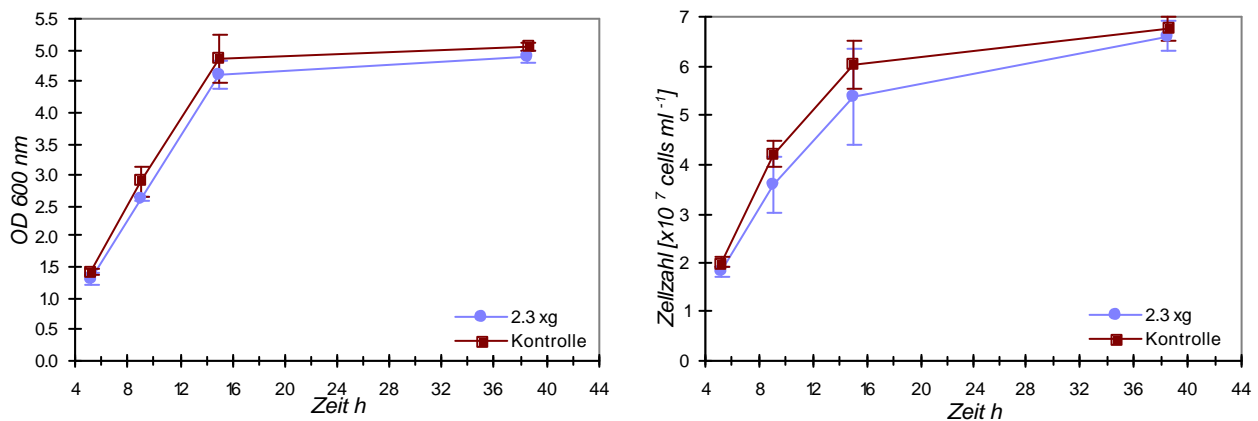


Abb. 15: Vergleich der Grösse der Zellen zwischen die Kultur in Hypergravitation bei 1.4 x g und die 1g-Kontrolle. Die Zellzahl wurde normalisiert und ist als prozentueller Wert der Anzahl gemessener Zellen angegeben.

5.3.2. Zellwachstum bei 2.3 x g

Die Bedingungen dieses Versuches entsprechen diejenigen des Versuches bei 1.4 x g: die letzte Probe wurde jedoch bei 38½ Stunden (statt 19½ Stunden) gemessen, um den Abbau von Ethanol besser verfolgen zu können (Abb. 16-18).



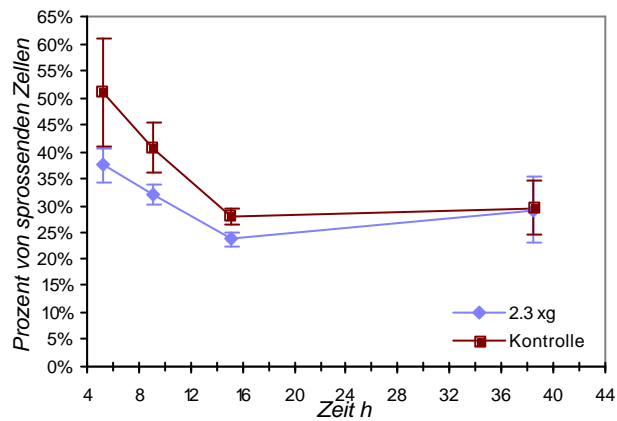
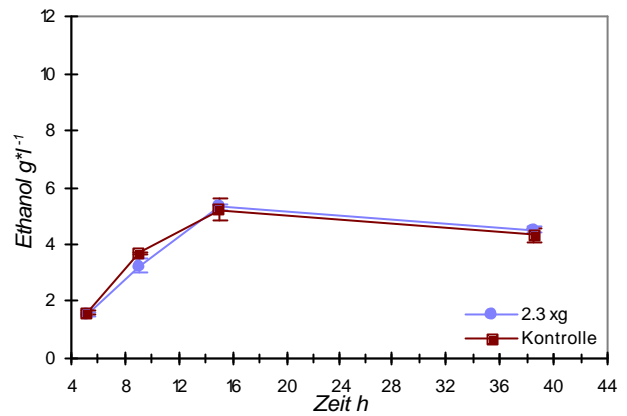
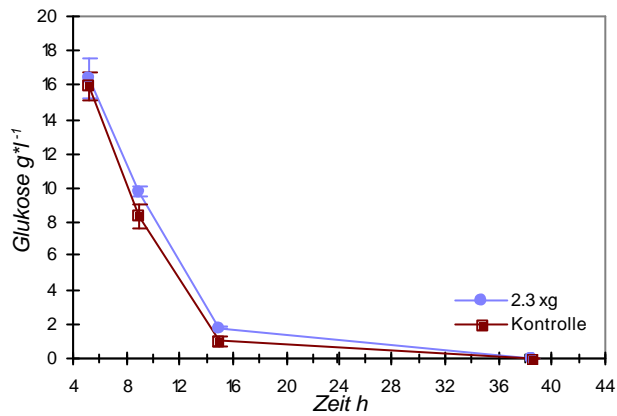


Abb. 16: Vergleich des Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* H1022 Stamm in Hypergravitation bei 2.3 x g gegenüber 1g-statische Kontrolle. Wachstumsbedingungen: Medium D 2%, Kulturvolumen 700 µl, Temperatur 30 °C. **Vorige Seite links:** Optische Dichte bei 600 nm. **Vorige Seite rechts:** Zellzahl. **Oben links:** Übriggebliebene Glukose im Kulturüberstand. **Oben rechts:** Ethanol im Kulturüberstand. **Unten:** Prozent von zur Zeit sprossenden Zellen.

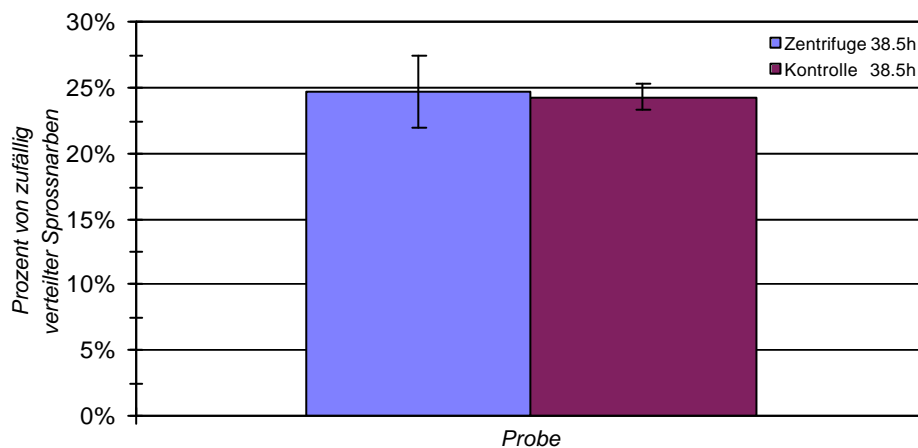


Abb. 17: Vergleich der Fraktion von Zellen mit zufällig verteilten Sprossnarben zwischen die Probe bei 2.3 x g und die Kontrolle nach 38½ Stunden.

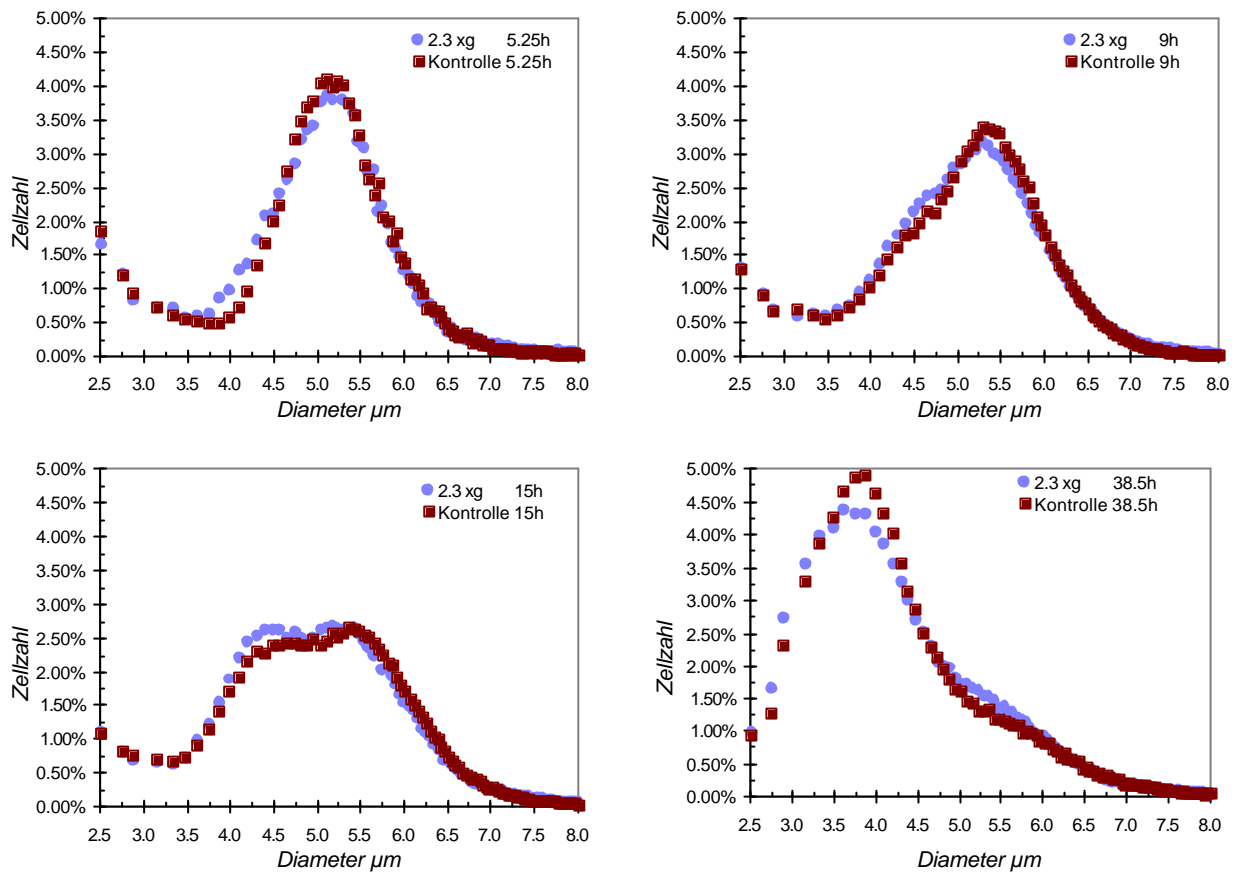


Abb. 18: Vergleich der Grösse der Zellen zwischen die Kultur in Hypergravitation bei 2.3 x g und die 1g-Kontrolle. Die Zellzahl wurde normalisiert und ist als prozentueller Wert der Anzahl gemessener Zellen angegeben.

5.4. Diskussion

5.4.1. Wachstum in den verschiedenen Kulturbehälter

Gleich erkennbar sind die verschiedenen Wachstumsmodi zwischen die Kulturen in den Erlenmeyer-kolben beziehungsweise in den Typ I-Containers und die Kultur in den Klinostatröhrchen. Die Zellen vermehren sich in den ersten beiden Behältern bis zu einer OD von 6, während in den Teflonröhrchen des Klinostats nur eine optische Dichte von 4 erreicht wird. Die Erklärung dafür ist sicher an der Verfügbarkeit an Sauerstoff zurückzuführen, wie es von den verschiedenen Ethanolkurven der beiden Kulturen erkennbar ist. Die Hefen können im Klinostat zwar die Glukose abbauen (auch wenn das langsamer als in Typ I-Containers und Erlenmeyerkolben geschieht), produzieren aber mehr Ethanol und können es nicht weiter verwenden, was zum Stillstand des Wachstum führt. Die niedrigere Werte von Ethanol in Typ I-Kammern und Erlenmeyerkolben deuten an, dass entweder ein Teil der Glukose direkt in Wasser und Kohlenstoffdioxid abgebaut wird oder dass die Zellen in der log-Phase auf einem Mischsubstrat wachsen⁽¹⁸⁾. Da die Produktion von CO₂ nicht gemessen wurde, sind diese zwei Möglichkeiten schwer voneinander zu unterscheiden.

Es fällt zudem aus, dass das Durchmischen der Probe nur bei den aeroben Kulturen einen positiven Effekt aufweist. Zuerst Glukose und dann das produzierte Ethanol werden schneller abgebaut, was auch ein schnelleres Wachstum zur Folge hat. Das liegt vermutlich daran, dass bei den geschüttelten Kulturen alle Zellen an dem atmosphärischen Sauerstoff einen besseren Zugang finden können. Dieser Effekt kann als relevant bezeichnet werden, da die durchgemischte Kultur nach 32 Stunden eine 20%-ige Erhöhung der optischen Dichte gegenüber die statische Kultur aufweist.

Wegen der obengenannten unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, wird ein direkter Vergleich zwischen den Experimenten in simulierter Mikrogravitation und diejenigen in Hypergravitation deswegen schwierig. Als Alternative könnte man die Klinostatröhrchen sowohl für den Versuch unter simulierter Mikrogravitation als auch für den unter Hypergravitation benutzen.

5.4.2. Wachstum in simulierter Mikrogravitation

Einige Proben unter simulierter Mikrogravitation im Klinostat weisen eine leichte Zunahme in der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber die Kontrolle. Diese ist jedoch ziemlich klein und nicht in allen gemessenen Proben nachweisbar. Man kann deshalb behaupten, dass wenn überhaupt ein Effekt vorhanden ist, dieser gering sein muss und auf jedem Fall nicht grösser als die Messgenauigkeit, die in dem Versuch erzielt werden könnte. Auch die Zellgrösse der klinorotierten Proben unterscheidet sich im Wesentlichen nicht von derjenigen des Kontrollversuches, weder während das logarithmische Wachstum noch nach der Erschöpfung der Glukose im Medium. Der einzige bedeutende Unterschied zwischen beiden Kulturen, obwohl die geringe Anzahl an gemessenen Proben keine definitiven Rückschlüsse erlaubt, lag in der Fraktion von Hefen mit zufällig verteilten Sprossnarben, die bei den Zellen in simulierter Mikrogravitation eine 25%-ige Erhöhung gegenüber die Kontrolle aufweist. In dieser Hinsicht korreliert die Simulation im Klinostat gut mit den Resultaten, die im Weltraum in der IML 2-⁽²⁾ und in der S/MM-03-Mission (noch nicht publiziert, persönliche Kommunikation) erhalten wurden, obwohl die prozentuellen Werte nicht übereinstimmen, was vermutlich an den unterschiedlichen Beurteilungskriterien aus der Seite der Experimentatoren zurückzuführen ist.

5.4.3. Wachstum in Hypergravitation

Eine erhöhte Erdbeschleunigung scheint in dem untersuchten Bereich einen bremsenden Effekt auf der Proliferation der Zellkultur zu haben. Dieser Effekt ist jedoch gering und nur dann zu erkennen, wenn alle Kenngrössen der Kultur zusammen gewertet werden. Die leichten Erhöhungen bei der optischen Dichte und der Zellzahl erlauben für sich keine klaren Rückschlüsse über eventuell vorhandenen Unterschiede zu ziehen. Vor allem die vermehrte Anzahl an zur Zeit sprossenden Zellen bei der 1g-Kontrolle deutet auf eine verbesserte Wachstumsgeschwindigkeit der Kontrolle gegenüber die Proben in Hypergravitation: am Anfang ist die Zahl sich teilenden Zellen bei der 1g-Kontrolle höher, was zu einer erhöhten Proliferation hindeutet. Mit der Zeit nimmt dieser Wert sowohl als Unterschied als auch als absoluten Wert ab, wie man erwartet, wenn die Erschöpfung der Energiequellen die Zellen dazu zwingt, das Wachstum einzustellen. Im Gegenteil konnten Unterschiede weder bei der Zellgrösse noch bei der Verteilung der Sprossnarben nachgewiesen werden.

Unerklärlicherweise zeigen alle Werte der Kultur bei 1.4 x g, inklusive die Kontrolle, ein reduziertes Wachstum sowohl gegenüber die statische Probe in Typ I-Containern (in Punkt 5.1.2 beschrieben) als auch gegenüber den Versuch bei 2.3 x g. Keine Erklärung konnte für diesen Effekt gefunden werden, da die Zuchtungsbedingungen sämtlicher Kulturen unter die gleichen Bedingungen stattgefunden hat (abgesehen natürlich von der Schwerkraft). Trotzdem kann dieses Resultat als nützlich betrachtet werden, weil wenn die Probe bei 1.4 x g mit der dazugehörigen Kontrolle verglichen wird, korrelieren die Resultate gut mit denen der Probe bei 2.3 x g.

5.4.4. Schlussfolgerungen

Simulierter Mikrogravitation und Hypergravitation, mindestens in dem untersuchten Bereich, haben nur einen geringen Effekt auf dem Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser Effekt ist vor allem durch

die Sedimentation der Zellen verursacht, die zu einer Absammlung von toxischen Abfallverbindungen und an einem Mangel an Sauerstoff in der Kultur führt. Direkte Effekte der Gravitation an den Zellen, so wie zum Beispiel eine Reorganisierung der Lage der intrazellulären Zellsubstanz, sind geringer und schwer vom ersten Effekt zu unterscheiden. Ein solcher Effekt scheint die veränderte Verteilung der Sprossnarben in Mikrogravitation zu sein, nicht klar ist aber der Mechanismus, der diese Veränderung hervorruft. Bekannt ist, dass einige Gene diesen Vorgang steuern und dass ein korrekt organisiertes Zytoskelett eine wichtige Voraussetzung für das Auftauchen der Sprossnarben in einer korrekten Lage ist ⁽²³⁾. Ob Mikrogravitation nur den Phänotyp der Zellen beeinflusst, das heisst einen direkten Effekt auf den Zytoskelett hat, oder ob die beobachtete Effekte auf einer Selektion von genomischen Mutationen zurückzuführen sind, ist noch eine unbeantwortete Frage. Klar scheint, wenn wir die Ergebnisse der Proben unter den verschiedenen Gravitationsbedingungen vergleichen, dass die Anwesenheit einer g-Kraft ein wichtiger Faktor (aber nicht eine Voraussetzung) für korrektes bipolare Budding ist, aber seine Erhöhung (mindestens in dem untersuchten Bereich) keine erkennbaren Veränderungen verursacht. Der geringe Einfluss von veränderten Gravitationsbedingungen auf der Hefe soll aber keine Überraschung darstellen, da alle bisherige Befunde deuten an, dass vor allem sich differenzierende Zellen von diesen Effekte betroffen werden ^(4, 5).

Was während dieser Semesterarbeit auch erkannt werden konnten, waren die Schwierigkeiten der Arbeit mit der Hefe in dem Klinostat. Wie bereits erwähnt, kann diese Apparatur nur die vektoriellen Wirkungen der Erdbeschleunigung aufheben, die skalaren Effekten bleiben meist erhalten und werden in einigen Fällen sogar betont. Das ist zum Beispiel der Fall für die fast totale Abwesenheit von Durchmischung in einer Probe in echter Mikrogravitation, die nur von Konzentration- und Temperaturgradienten verursachten konvektiven Strömungen hervorgerufen wird. Im Klinostat verschwindet wegen der ständigen Rotation dieser Effekt vollständig.

Was aber mit der Hefe vor allem Probleme vorbereitete, war die fast vollständige Impermeabilität der Teflonröhrchen an Gasen. Das hatte zur Folge, dass wegen des produzierten Kohlendioxides einem Überdruck entstand, der sich zu dem schon vorhandenen hydrostatischen Druck addierte, welcher wiederum in echter Mikrogravitation nicht vorhanden ist.

Das Problem die verschiedenen Effekten der Gravitation voneinander zu unterscheiden, stehen nicht nur dem Experimentator im Labor gegenüber, sondern sind auch in der Versuchen im Weltraum vorhanden. Auch hier stellt sich die Frage der richtigen Wahl der Kontrolle. Um direkte Effekte der Schwerelosigkeit von denen der Sedimentation zu unterscheiden, könnte man zwischen statische und durchgemischte 1g-Kontrolle vergleichen oder sich für eine durchgemischte Probe entscheiden sowohl für den Experiment in Mikrogravitation als auch für die 1g-Kontrolle. Leider ist es aus technischer Gründe nicht immer möglich. Es wird damit leicht zu erkennen wie in der Weltraumbiologie die Bodenkontrollen und eine präzise Vorbereitung des Versuches in dieser Hinsicht eine grosse Bedeutung besitzen.

6. Abkürzungen

| | | |
|-----------|---|---|
| ATCC | : | American Type Culture Collection |
| x g | : | Vielfach der Erdbeschleunigung (9.81 ms ⁻²) |
| D2-Medium | : | Dextrose 2% Medium |
| GOD | : | Glukose oxidase |
| EtOH | : | Ethanol |
| IML | : | International Microgravity Laboratory |
| OD | : | Optische Dichte |
| PBS | : | Phosphate buffered salt solution |
| POD | : | Peroxidase |
| rpm | : | Umdrehungen pro Minute |
| S/MM-03 | : | Shuttle to MIR Mission 03 |
| TG | : | Trockengewicht |
| YEPD | : | Yeast Extract Peptone Dextrose (Medium) |

7. Literaturverzeichnis

1. Bruschi, C.V., Esposito, M.S. Cell Division, Mitotic Recombination and Onset of Meiosis by Diploid Yeast Cells during Space Flight. In: *Biorack on Spacelab IML-1*. ESA SP-1162.
2. Walther, I., Bechler, B., Müller, O., Hunzinger, E., Cogoli, A. Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in a bioreactor in microgravity. *Journal of Biotechnology*, **47**: 113-127, 1996.
3. Lapchine, L., Moatti, N., Richolley, G., Templier, J., Gasset, G., Tixador, R. The Antibio Experiment. In: *Biorack on Spacelab D-1*, ESA SP-1091, pp. 45-51. ESA Publication Division, ESTEC, Noordwijk, The Netherlands, 1988.
4. Cogoli, A., Gmünder, F.K. Gravity effects on single cells: techniques, findings and theory. In: *Advances in Space Biology and Medicine*, **2**: 183-248, JAI Press Inc., 1991.
5. Moore, D., Bie P., Oser H. *Biological and medical research in space*. Springer Verlag, Berlin, 1996.
6. Cogoli, A., Tschopp, A., Fuchs-Bislin, P. Cell Sensivity to Gravity. *Science*, **225**: 228-230, 1984.
7. Cogoli, A., Bechler, B., Müller, O., Hunzinger, E. Effects of Microgravity on Lymphocyte Activation. In: *Biorack on Spacelab D-1*, ESA SP-1091, pp. 89-100. ESA Publication Division, ESTEC, Noordwijk, The Netherlands, 1988.
8. Tálas, M., Bátkai, L., Stöger, I., Nagy, K.,Hiros, L., Konstantinova, I., Rykova, M.,Mozgovaya, I., Guseva, O., Kozharinov, V. In Vitro Interferon Production by Human Lymphocytes during Spaceflight. *The Physiologist*, **31**: 550-551, 1988.
9. Bátkai, L., Tálas, M., Stöger, I., Nagy, K.,Hiros, L., Konstantinova, I., Rykova, M.,Mozgovaya, I., Guseva, O., Kozharinov, V. Results of Space Experiment Program 'Interferon'. *Acta Microbiologica Hungarica*, **30**: 53-61, 1983.
10. Albrecht-Buehler, G. The Simulation of Microgravity Conditions on the Ground. *ASGSB Bulletin*, **5** (2): 3-10, 1992.
11. Knight, T.A. On the Direction of the Radical and Germen During Vegetation of Seeds. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **96**: 99-108, 1806.
12. Pflüger, E.F.W. Über den Einfluss der Schwerkraft auf die Teilung der Zellen. *Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Tiere*, **31**: 311-318, 1883.
13. Silver, I.L. The Dynamics of a Discrete Geotropic Sensor Subject to Rotation-induced Gravity Compensation. *Journal of theoretical Biology*, **61**: 353-362, 1976.
14. Briegleb, W. The Clinostat- A Tool for Analysing the Influence of Acceleration on Solid-liquid systems. *Proceedings of a workshop on Space Biology*. Cologne, Germany, 9-11 March 1983. Esa SP-206.
15. Schatz, A. Problems of Og-Simulation with the Fast running Clinostat. *Proceedings of a workshop on Space Biology*. Cologne, Germany, 9-11 March 1983. Esa SP-206.
16. Samuel, D. Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy. *Science*, **273**: 488-490, 1996.
17. Fiechter, A., Seghezzi, W. Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells. *Journal of Biotechnology*, **27**: 27-45, 1992.
18. Sonnleitner, B. Hefe-ein Modellsystem der Biotechnologie. *Swiss biotech*, **10** (2): 7-12, 1992.
19. Käppeli, O. Regulation of Carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and Related Yeasts. *Advances in Microbial Physiology*, **28**: 181-209.
20. Hug H., Blanch H.W., Fiechter A. The functional role of lipids in hydrocarbon assimilation. *Biotechnologie and bioengineering*. **16**: 9665-9685, 1974.
21. Chant, J., Herskowitz, I. Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenic pathway. *Cell*, **65**: 1203-1213, 1991.
22. Slater, M.L. Molecular Biology of Budding. In: *Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics, and Ultrastructure. Volume II*. Arnold, W.N Editor. CRC Press. Boca Raton, Florida.
23. Chant, J., Corrado, K., Pringle, J.R., Herskowitz, I. Yeast BUD5, Encoding a Putative GDP-GTP Exchange Factor, Is Necessary for Bud Site Selection and Interacts with Bud Formation Gen BEM1. *Cell*, **65**: 1213-1224, 1991.