

Fluoreszierende Metaboliten im Tryptophanstoffwechsel
von *M. furfur*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Heike Maria Voß geb. Stapelkamp
aus Dinslaken

Giessen 2003

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. P. Mayser

Gutachter: Prof. Dr. A. Szigoleit

Tag der Disputation:

18. November 2003

Folgende Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Abstracts:

Stapelkamp, H., Krämer, H.-J., Mayser, P.: Tryptophanstoffwechsel von *Malassezia furfur*: UV-Schutz durch fluoreszierende Metaboliten. H + G 75(7/8): 473, 2000

Stapelkamp, H., Krämer, H.-J., Steglich, W., Irlinger, B., Mayser, P.: Pityrialacton – ein neues Fluorochrom als Stoffwechselprodukt von *M. furfur*. Mycoses 44(6): 238, 2001

Stapelkamp, H., Mayser, P., Krämer, H.-J., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityrialacton und Pityriaanhydrid - strukturisomere Bisindolverbindungen im Tryptophan-Stoffwechsel von *M. furfur*. Mycoses 45: 248, 2002

Publikationen:

Mayser, P., Stapelkamp, H., Krämer, H.-J., Podobinska, M., Wallbott, W., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityrialactone – a new fluorochrome from the tryptophane metabolism of *M. furfur*. Antonie van Leeuwenhoek 84:185 – 191, 2003

Liste der verwendeten Abkürzungen

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

CI: Chemische Ionisation

DC: Dünnschichtchromatographie

Dix/Arg: Dixon-Agar mit Arginin als alleiniger Stickstoffquelle

Dix/Trp: Dixon-Agar mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle

DMSO: Dimethylsulfoxid

EI: electron ionization

ESI: Elektronensprayionisation

FAB: fast atom bombardement

HPLC: high liquid performance chromatography

HRMS: high resolution mass spectra

IR: Infrarotspektrum

LSF: Lichtschuttfaktor

M. furfur: *Malassezia furfur*

mDix: modifizierter Dixon-Agar

NMR: nuclear magnetic resonance

P-Agar: die Pigmentbildung induzierender Agar

PV: Pityriasis versicolor

R_f: relative Wanderungsgeschwindigkeit

RP: reverse phase

SD: standard deviation

UV: Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Allgemeine Kennzeichen der Gattung <i>Malassezia</i>	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	<i>Malassezia</i> -Spezies und ihre Differenzierungsmöglichkeiten	2
1.1.3	Morphologie	3
1.1.4	Physiologie und Biochemie	3
1.2	<i>Malassezia</i>-Hefen als Erreger der Pityriasis versicolor	4
1.2.1	Krankheitsbild	4
1.2.2	Diagnostik	6
1.2.3	Prädispositionsfaktoren und Pathogenese	8
1.3	Bildung von Pigmenten und Fluorochromen aus <i>Malassezia</i>-Hefen	10
2	HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG	12
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Anzucht und Kultur von <i>Malassezia</i>-Hefen	13
3.1.1	Referenzstamm	13
3.1.2	Anzucht und Nährmedien	13
3.2	Bildung von Pigmenten und Fluorochromen	14
3.2.1	Kulturbedingungen	14
3.3	Pigmentgewinnung und Aufreinigung	15
3.3.1	Gewinnung des Rohextraktes	15
3.3.2	Säulenchromatographie	16
3.3.3	Dünnschichtchromatographie	17
3.3.4	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	19
3.4	Strukturaufklärung	23
3.5	Vorschlag zur Biosynthese	25
3.6	Absorptionsspektren	25
3.7	Fluoreszenzspektrum von Pityrialacton	25
3.8	Funktion der Pigmente und Fluorochrome – Schutz vor ultravioletter Strahlung	26
3.8.1	Methoden der Keimzahlbestimmung und Erstellung von Eichkurven	26
3.8.2	Untersuchung der UV-protectiven Wirkung verschiedener Rohextraktbestandteile	29
3.8.3	Bestrahlungsversuche	32
3.8.4	Auftropfversuche	36
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Bildung von Pigmenten und Fluorochromen	39
4.1.1	Säulenchromatographie	39
4.1.2	Dünnschichtchromatographie	39
4.1.3	HPLC	42
4.2	Strukturaufklärung	46

4.3	Vorschlag zur Biosynthese	47
4.4	Absorptionsspektren	49
4.5	Fluoreszenzspektrum	51
4.6	Bestrahlungsversuche	52
4.6.1	Wachstumsraten ohne UV-Exposition	52
4.6.2	Wachstumsraten nach UVA -Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)	52
4.6.3	Wachstumsraten nach UVA -Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktionen (10%)	54
4.6.4	Wachstumsraten nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)	57
4.6.5	Wachstumsraten nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktionen (10%)	60
4.6.6	Wachstumsraten nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm ² UVB und Vorbehandlung der Pilzkulturen mit Säulenfraktionen (25% bzw. 50%)	62
4.6.7	Auftropfversuche	63
5	DISKUSSION	67
6	LITERATURVERZEICHNIS	81
7	TABELLENANHANG	90
8	ZUSAMMENFASSUNG	96
9	DANKSAGUNG	98
10	LEBENS LAUF	99

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Kennzeichen der Gattung *Malassezia*

Hefen der Gattung *Malassezia* sind seit über 100 Jahren als Bestandteile der Mikroflora der menschlichen Haut und der Haut vieler Warmblüter bekannt (Marples 1965, Sloof 1970, Noble 1981, Gueho 1996). Aufgrund der mehrschichtigen Struktur ihrer Zellwand (Simmons und Ahearn 1987), der Fähigkeit, Harnstoff abzubauen und der Anfärbbarkeit durch Diazoniumblau (Slooff 1970, Hagler und Ahearn 1981) werden sie zu den Basidiomyceten aus der Familie der *Cryptococcaceae* gerechnet (Yarrow und Ahearn 1984). Mit Ausnahme von *M. pachydermatis* sind *Malassezia*-Hefen zur Deckung ihres Kohlenstoffbedarfs von der Versorgung mit längerkettigen Fettsäuren abhängig (Kwon-Chung 1992, Ingham 1993) und gehören damit zu den wenigen obligat lipophilen Mikroorganismen.

1.1.1 Epidemiologie

Die Verteilung der *Malassezia*-Hefen auf der menschlichen Haut korreliert entsprechend ihrer Lipidabhängigkeit mit der Dichte der Talgdrüsen, die höchsten Zahlen finden sich am Kapillitium, im Gesicht sowie am vorderen und hinteren oberen Stamm (Roberts 1969, Faergemann 1985). Auch im Bereich des Meatus acusticus externus sind oft *Malassezia*-Hefen zu finden (Randjandiche 1975, Leeming, Notman und Holland 1989), ebenso in deutlich geringerer Dichte im Bereich der Extremitäten (Faergemann, Aly und Maibach 1983).

Das Ausmaß von Talgproduktion und die Feuchtigkeit der Hautoberfläche wirken förderlich auf die Besiedlungsdichte (Marples 1965, Noble 1981). Damit einhergehend wird verstärktes Auftreten von *Malassezia*-Hefen in bestimmten Altersgruppen beobachtet: während bei Kleinkindern die Keimdichte eher gering ist, steigt die Besiedlung der Hautoberfläche mit zunehmender Talgdrüsenaktivität in der Pubertät an (Noble und Midgley 1978, Faergemann und Fredriksson 1980). Entsprechend ist bei Seborrhoe (Martin-Scott 1952, Spoor 1954) und abnehmender Talgproduktion im Alter (Spoor 1954, Faergemann 1980, Noble 1981) eine Abnahme in der Besiedlungsdichte der oberflächlich in der Hornschicht, besonders in den Öffnungen der Talgdrüsenfollikel konzentrierten Hefen zu finden (Tosti 1972).

1.1.2 *Malassezia*-Spezies und ihre Differenzierungsmöglichkeiten

Die Klassifizierung der *Malassezia*-Hefen erweist sich seit ihrer Erstbeschreibung durch Robin 1853 und Einführung der Gattung *Malassezia* durch Baillon 1889 als schwierig.

Die Kultur war bis zur Entdeckung der Lipiddependenz der Pilze (Ota 1933) nicht möglich, später erschwerte die vom Nährmedium abhängige hohe Variabilität der Kulturen eine reproduzierbare und valide Klassifikation.

Fortschritte im Bereich immunologischer und molekularbiologischer Methoden (Gueho 1996) konnten die bis dahin zur Erstellung einer validen Taxonomie nicht ausreichenden mikro- und makromorphologischen Kriterien ergänzen.

Derzeit werden sieben verschiedene Spezies der Gattung *Malassezia* unterschieden. Die Differenzierung erfolgt nicht aufgrund einer Assoziation zu verschiedenen Krankheitsbildern, sondern aufgrund morphologischer, physiologischer und molekularbiologischer Kriterien (Gueho 1996). Tabelle 1 zeigt die momentan verwendete Einteilung der *Malassezia*-Spezies.

Tabelle 1: Spezies-Einteilung von Hefen der Gattung *Malassezia*

Spezies	Erstbeschreiber	Nummer des Referenzstammes
<i>M. furfur</i>	(Robin) Baillon 1889	CBS 1878 ^{NT} CBS 7019 ^{NT}
<i>M. pachydermatis</i>	(Weidmann) Dodge 1935	CBS 1879 ^{NT}
<i>M. sympodialis</i>	Simmons et Gueho 1990	CBS 7222 ^T
<i>M. globosa</i>	Midgley, Gueho et Guillot 1996	CBS 7966 ^T
<i>M. obtusa</i>	Midgley, Guillot et Gueho 1996	CBS 7876 ^T
<i>M. restricta</i>	Gueho, Guillot et Midgley 1996	CBS 7877 ^T
<i>M. slooffiae</i>	Guillot, Midgley et Gueho 1996	CBS 7956 ^T

NT: neotype of the species

T: type of the species

1.1.3 Morphologie

Die verschiedenen Species der Gattung *Malassezia* zeichnen sich durch einen großen Polymorphismus aus. Es finden sich runde, ovale bzw. zylindrische Sproßzellen ($\varnothing 2,5 \mu\text{m}$, $1,5 \times 3 \mu\text{m}$ bzw. $2,5 \times 8 \mu\text{m}$), bei einigen Spezies wird in Kultur Hyphenbildung beobachtet (Gueho 1996). *Malassezia*-Hefen besitzen eine besondere Zellhülle, die wahrscheinlich für ihre hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen verantwortlich ist. Die $0,12\mu\text{m}$ dicke mehrschichtige Zellhülle, die sich in Außenlamelle, eine mehrschichtige, multilamellös untergliederte Wand und die Plasmamembran unterteilt, zeigt einen spiraligen Aufbau (Barfatani 1964, Swift 1965, Keddie 1966, Breathnach 1976, Guillot 1995, Mittag 1994 und 1995) und weist einen besonders hohen Lipidanteil von 15% auf (Thompson 1970).

Die Vermehrung der *Malassezia*-Hefen erfolgt durch monopolare oder sympodiale Sproßung unter Ausbildung einer Narbe (Collarete) am Knospengrund (Yarrow und Ahearn 1984, Simmons und Ahearn 1987, Simmons und Gueho 1990).

Auf lipidhaltigem Dixon Agar sind die Kolonien cremefarben-gelblich und zeichnen sich durch einen fruchtig-hefigen Geruch aus (van Abbe 1964, Labows 1975). Die Bildung von Luftmyzel wird nicht beobachtet. Die Oberflächenstruktur der Pilzkolonien wird zum Teil als charakteristisch für einzelne Spezies beschrieben (van Abbe 1964, Sloof 1971, Gueho 1996).

1.1.4 Physiologie und Biochemie

Zur Anzucht von *Malassezia*-Hefen, für die optimale Wachstumsbedingungen zwischen 32°C und 37°C bei einem pH von 5,5 – 6,5 vorliegen, ist die Verwendung eines lipidhaltigen Mediums erforderlich. Es kommen mit einer Lipidquelle (Olivenöl) überschichtete Basalmedien (z.B. Sabouraud-Dextrose-Agar), Spezialnährböden (Dixon-Agar, van Abbe 1964; Leeming-Notman-Agar, Leeming 1987) und andere lipidhaltige Medien (Korting 1991, Gueho 1996) zum Einsatz. Dabei sind Fettsäuren mit einer Kettenlänge von mindestens zwölf Kohlenstoffatomen für das Wachstum essentiell (Nazzaro 1976, Shifrine 1963, Wilde 1968).

Abgesehen vom Lipidmetabolismus ist über StoffwechsellLeistungen von *Malassezia*-Hefen aufgrund der nicht vorhandenen Möglichkeit der Durchführung von Standardassimilations-tests nur wenig bekannt. Nur für *M. pachydermatis* konnte die Assimilation von Zuckern nachgewiesen werden (Sloof 1971, Marcon 1992).

1.2 *Malassezia*-Hefen als Erreger der Pityriasis versicolor

1.2.1 Krankheitsbild

Die Pityriasis versicolor, hervorgerufen durch *M. furfur*, zählt zu den häufigsten oberflächlichen Mykosen der Haut mit weltweiter Verbreitung (Hay 1996). Bereits 1801 wurde das Krankheitsbild von Willan beschrieben und 1846 von Eichstedt als erregerbedingt erkannt. Als Primärläsion findet sich eine scharf begrenzte, meist milchkaffeefarbene Makula, die sich durch feine, kleieförmige Schuppung auszeichnet. Aber auch gelbe, rötliche und schwärzliche Hautveränderungen werden beschrieben und rechtfertigen so den Beinamen „versicolor“. Typischerweise konfluieren die Läsionen zu großen, landkartenartigen Arealen in den talgdrüsenreichen Gebieten des oberen Stammes, in den Tropen wird gehäuft über Läsionen am Kapillitium und im Gesicht berichtet (Hay 1996, Ruete 1928).

Bei der Pityriasis versicolor unterscheidet man die hyperpigmentierte Form von der selteneren Pityriasis versicolor alba (Abb. 1 und 2). Dieses mit depigmentierten Läsionen einhergehende Krankheitsbild entsteht aus hyperpigmentierten Hautveränderungen in vornehmlich UV-exponierten Körperarealen, wird aber auch an bedeckten Stellen beobachtet (Lutz 1892, Adamson 1949, Lockshin 1973, Moynahan 1976). Die hellen Flecken bleiben oft über Monate bestehen und treten besonders auf sonnengebräunter bzw. dunkler Haut deutlich hervor. Bei entzündlich irritierten Formen wird Juckreiz beschrieben, der vor allem bei stärkerem Schwitzen auftritt (Götz 1962, Borelli 1991, Hay 1996). Der Grund für den Arztbesuch liegt jedoch meist in der kosmetischen Beeinträchtigung des Patienten durch die Hautveränderungen (Chetty, Kamalam und Thambiah 1979).



Abbildung 1: Pityriasis versicolor: hyperpigmentierte Form



Abbildung 2: Pityriasis versicolor alba

1.2.2 Diagnostik

Die Diagnose einer Pityriasis versicolor wird meist aufgrund der typischen Klinik gestellt. Ergänzend ist der Nachweis von Fluoreszenzerscheinungen durch Untersuchung der Läsionen im Wood-Licht (366 nm) hilfreich (Abb. 3).

Dabei treten auch im sichtbaren Licht eher unauffälligere Hautveränderungen hervor und machen damit das Gesamtausmaß der Erkrankung deutlicher (Noble 1983, Hay 1996).

Die Ausprägung der Fluoreszenz ist allerdings sehr variabel: nicht alle im sichtbaren Licht erkennbaren Hautveränderungen können im Wood-Licht nachgewiesen werden. Auch die Farbgebung der Läsionen variiert erheblich: die Beschreibungen reichen von blaßgelb, gelblich-grün, goldgelb, rötlichgelb bis hellbraun (Tabelle 2). Aus den fluoreszierenden Läsionen konnten teilweise keine Pilzelemente isoliert werden. Teilweise war in den Schuppen aber auch deutliche Besiedlung mit *Malassezia furfur* nachweisbar. Dabei wurde ausschließlich die Hefeform nachgewiesen (Roberts 1969).

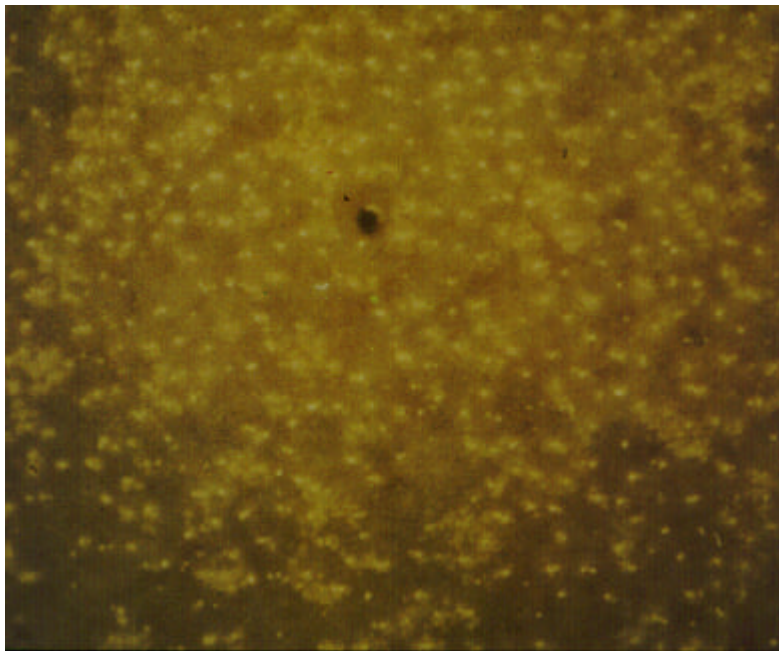


Abbildung 3: Fluoreszenzerscheinungen der Hautläsionen bei PV im Woodlicht

Tabelle 2: Farbgebung der Fluoreszenzerscheinungen der Pityriasis versicolor im Wood-Licht

Goldgelb bis (Hell)braune Fluoreszenz	Lewis 1936
Gelbe Fluoreszenz, variierendes Ausmass	Roberts 1969
Gelborange Fluoreszenz	Lockshin 1973
Gelbgrüne Fluoreszenz, kein Unterschied zwischen hyper- und depigmentierten Läsionen	Chetty 1979
Grünliche, goldgelbe oder rosafarbene Fluoreszenz	Grigoriu 1984
Hellgelbe Fluoreszenz	Hay 1996
Rötliche oder grünlichgelbe Fluoreszenz	Braun-Falco 1996
Goldgelb, grüngelb	Wigger-Alberti 1997
Grüngelb	Nenoff 2001

Die charakteristische pityriasiforme Schuppung, auch als „Hobelspanphänomen“ bezeichnet, kann durch Darüberstreichen mit dem Fingernagel oder Holzspatel ausgelöst werden.

Diagnostisch bedeutsam ist der mikroskopische Nachweis der Erreger aus läsionärem Schuppenmaterial im KOH-Nativpräparat. Das Nebeneinander von in Haufen angeordneten runden Sproßzellen (bis 8µm) und kurzen, teilweise segmentierten und leicht gekrümmten Hyphen (2,5 – 5 x 25µm) ist diagnostisch wegweisend („Spaghetti und Fleischklößchen“). Der bereits 1846 von Eichstedt beschriebene Dimorphismus der Hefen zeigt den Übergang von der saprophytären in die pathogene Form an. Auf die Kultur kann verzichtet werden, da der Keim zur residenten Hautflora gehört. Weiterhin gelingt die Induktion des Hyphenstadiums nur unter bestimmten Bedingungen (Dorn 1977)

Der Erregernachweis kann durch die oberflächliche Lokalisation der *Malassezia*-Hefen im oberen Drittel der Hornschicht auch durch Tesafilmabrieb mit anschließend sofortiger Färbung (Methylenblau 1%) geführt werden (Gueho 1996).

Differentialdiagnostisch gegenüber der PV sind bei der hyperpigmentierten Form vor allem das seborrhoische Ekzem, bei intertriginöser Lokalisation das Erythrasma, einige Dermatophytosen und postinflammatorische Hyperpigmentierungen zu nennen. Liegt eine hypopigmentierte Form vor, so sind vor allem Vitiligo und die Pityriasis alba bei Atopie abzugrenzen.

1.2.3 Prädispositionsfaktoren und Pathogenese

Die Kontagiosität der Erkrankung ist gering (Faergemann und Fredriksson 1982, Hay 1996), die Geschlechter sind mit einem Erkrankungsgipfel im jugendlichen und frühen Erwachsenenalter (Burke 1961) etwa gleichmäßig betroffen, nach dem 60. Lebensjahr ist die Inzidenz mit Abnahme der Talgdrüsenaktivität deutlich geringer (Michalowski 1965, Faergemann 1980, Noble 1981).

Die genauen Ursachen für das Ausbrechen der Krankheit sind nicht bekannt, eine genetische Disposition wird vermutet (Ashbee 2002, Gupta 2002).

Weiterhin sind vielfältige exo- und endogene Prädispositionsfaktoren beschrieben. Ein tropisch-feuchtwarmes Makroklima mit hoher Außentemperatur und Luftfeuchtigkeit, bestätigt durch die hohe Inzidenz der PV in tropischen Gebieten und gehäuftes Auftreten in den Sommermonaten in gemäßigten Zonen, wirkt ebenso begünstigend wie das Tragen okklusiver Kleidung (Hay 1996) und das Berufs- und Freizeitverhalten (Stefanovic 1976, Götz 1980).

Als endogene Faktoren werden eine erhöhte Schweißneigung, entweder anlagebedingt oder im Rahmen bestimmter Erkrankungen wie Hyperthyreose oder Tuberkulose angeführt (Ruete 1928, Razack 1977). Das Auftreten von Fällen einer Pityriasis versicolor ausschließlich oberhalb der denervierten Segmente bei Patienten mit Rückenmarkstraumen (Reed et al. 1961) unterstützt die Bedeutung des Schwitzens als Prädispositionsfaktor bei der PV.

Erhöhte Kortikoidspiegel werden zwar als begünstigend für das Auftreten einer PV beschrieben (Burke 1961, Roberts 1969, Hay 1996), jedoch ist unklar, ob dieses Phänomen ihren immunsuppressiven Eigenschaften oder Veränderungen der Schweißkomposition zuzuschreiben ist. Gegen die Bedeutung einer Immunsuppression spricht die nicht erhöhte Inzidenz der PV bei HIV-Infizierten. Als weitere Prädispositionsfaktoren werden Malnutrition und konsumierende Erkrankungen (Ruete 1928, Burke 1961) sowie genetische Faktoren (Burke 1961, Hay 1996) genannt, während der Einfluß von hormonellen Kontrazeptiva und Schwangerschaft umstritten ist (Roberts 1969, Hay 1996).

Ausgehend von der Lipidabhängigkeit des Erregers mit seiner bevorzugten Ansiedlung in den seborrhoeischen Körperarealen wurden Untersuchungen zur Hautoberflächenlipidzusammensetzung bei Gesunden und an PV erkrankten Personen durchgeführt. Grundlegende Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden, läsionär veränderte Gesamtlipide werden Stoffwechsellleistungen der *Malassezia*-Hefen zugeschrieben und haben pathogenetisch keine Bedeutung (Boardman 1962, Burke 1962/63, Caprilli 1978).

Auch entsprechende Untersuchungen zum dermalen Aminosäuregehalt konnten nicht zum besseren Verständnis des Übergangs der Hefen von der saprophytären in die pathogene Form beitragen (Burke 1962/63).

Weiterhin sind verschiedene Fragen im Zusammenhang mit dem Zustandekommen der für die Pityriasis versicolor charakteristischen hyper- und hypopigmentierten Läsionen sowie den Fluoreszenzerscheinungen im Wood-Licht zu klären.

Der Erreger ist im gesamten Stratum corneum, bevorzugt in den oberen Lagen innerhalb und zwischen den Korneozyten, nicht jedoch in tieferen Epidermisschichten lokalisiert (Götz 1962, Pierard 1972, Tosti 1972, Hay 1996).

Die histologisch insgesamt sehr mild ausgeprägten Veränderungen umfassen ein leichtes entzündliches Infiltrat in der oberen Dermis, epidermal zeigen sich Hyperkeratose, Parakeratose und zum Teil Akanthose, verbunden mit einem erhöhten Turnover von Hornzellen (Hay 1996), was mit der Schuppung der Läsionen vor allen Dingen in den hyperpigmentierten Arealen einhergeht. In den hypopigmentierten Läsionen wird – übereinstimmend mit ihrem eher schwach bis gar nicht schuppenden Aspekt - die epidermale Proliferationsrate gegenüber gesunder Haut als unverändert beschrieben (Charles 1973).

In den hyperpigmentierten Läsionen konnten vergrößerte Melanosomen nachgewiesen werden (Allen 1972, Hay 1996).

Diese ultrastrukturellen Veränderungen sind jedoch keine erschöpfende Erklärung für die rötlich-braunen Hautveränderungen. Die Eigenfarbe der Pilzauflagerungen trägt ebenso dazu bei, was durch das Auftreten von hyperpigmentierten Arealen in Vitiligo-Herden deutlich wird (Dotz 1985).

In den hypopigmentierten Arealen wird demgegenüber das Auftreten von kleinen, gepackt liegenden Melanosomen, deren Transfer in die Keratinozyten gestört ist, beschrieben (Charles 1973, Breathnach 1975, Allen 1976, Karaoui 1981). Als ursächlich werden dabei unabhängig von der auf die Haut einwirkenden UV-Strahlung erregerbedingte toxische Effekte auf den Melaninstoffwechsel angenommen (Ruete 1933, Charles 1973, Bojanovsky 1979). Das Auftreten von hypopigmentierten Arealen auch an bedeckten Körperstellen sowie bei

dunkelhäutigen Patienten (Jeliffe 1954, Blumenthal 1971) und die verzögerte Repigmentierung dieser Bereiche (Götz 1962, Rieth 1973) unterstützt diese These. Sie steht im Gegensatz zur Interpretation der hypopigmentierten Läsionen als Pseudoleukoderm in gebräunter Umgebung im Rahmen einer lichtfilternden Wirkung durch die Pityriasis versicolor-Schuppen (Lutz 1892, Kistiakovsky 1927, Wertheim 1928, Lewis 1936).

In diesem Zusammenhang wurden schon früh Überlegungen zur Entstehungsweise und Funktion der diagnostisch wertvollen gelblich-grünen Fluoreszenzerscheinungen der Pityriasis versicolor im Woodlicht angestellt. *M. furfur* würde ein gelbliches Pigment zur Verfügung stehen, durch dessen stark lichtbrechenden Eigenschaften die Ausbildung eines Sonnenbrands in den mit Pilzrasen bedeckten Arealen verhindert würde (Kistiakovsky 1927). Durch von Lewis 1936 durchgeführte Experimente wurde gezeigt, dass sich bei der Bestrahlung der weißen Areale kaum ein Lichterythem ausbildet, eher war die normal pigmentierte Umgebung davon betroffen (Ruete 1933).

1.3 Bildung von Pigmenten und Fluorochromen aus *Malassezia*-Hefen

Untersuchungen zum Aminosäure- und Stickstoffwechsel von *Malassezia*-Hefen deckten einen Stoffwechselweg auf, bei dem auf einem Minimalmedium bestehend aus einer Lipidquelle und Tryptophan als vorwiegender Stickstoffquelle ein rötlich-braunes Pigment, das im UV-Licht gelblich-grün fluoresziert, gebildet wird. Diese Syntheseleistungen scheinen für die Species *M. furfur* spezifisch zu sein und sind durch Gabe anderer Aminosäuren unterdrückbar (Mayser 1998).

Extraktion des in den Minimalagar diffundierten Pigmentes und Auftrennung des so gewonnenen Rohextraktes über verschiedene chromatographische Verfahren zeigten, dass es sich dabei um ein Substanzgemisch aus einer Vielzahl von Pigmenten und Fluorochromen handelt.

Die unvollständig geklärte Ursache der verschiedenfarbigen Hautläsionen und der gelblichgrünen Fluoreszenzerscheinungen im Woodlicht machten eine Bedeutung dieses neu entdeckten Stoffwechselweges im Rahmen der Pathogenese der Pityriasis versicolor wahrscheinlich, so dass weitere Untersuchungen zu Struktur und möglichen Funktionen der Pigmente und Fluorochrome durchgeführt wurden (Mayser und Pape 1998, Mayser 2002).

UV-Schutz durch Pigmentbildung

Das nur selten beschriebene Auftreten einer Dermatitis solaris in den hypopigmentierten Arealen einer Pityriasis versicolor gab Anlaß zur Durchführung einer Studie, die eine eventuelle Lichtschutzwirkung von *M. furfur* durch die synthetisierten Pigmente sowie die topische Applikation des Rohextraktes an freiwilligen Probanden beinhaltete.

Es konnte gezeigt werden, dass *M. furfur* durch die Bildung von Pigmenten und Fluorochromen einen potenten Lichtschutz im UVA- und UVB-Bereich gewinnt und auch an menschlicher Haut eine Schutzwirkung gegenüber UV-Bestrahlung erzielt werden kann, auch bestätigt durch das Absorptionsspektrum des Rohextraktes (Mayser und Pape 1998).

2 Hintergrund und Fragestellung

Die Pityriasis versicolor ist eine mit hyper- und hypopigmentierten, im Woodlicht gelblichgrün fluoreszierenden Hautveränderungen einhergehende, oberflächlich im Stratum corneum lokalisierte Pilzerkrankung. Bereits im Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die gelblich fluoreszierenden Inhaltsstoffe von *M. furfur* mit einer möglichen lichtschützenden Wirkung in Zusammenhang gebracht. Beobachtungen hatten gezeigt, dass die Sonnenbrandneigung in den hypopigmentierten Arealen nicht erhöht ist.

Die Entdeckung der Bildung des rotbraunen Pigmentes mit lichtschützender Wirkung unter Gabe von Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle konnte diese Überlegungen bekräftigen. Die chromatographische Auftrennung des Rohextraktes zeigte, dass es sich dabei um ein Substanzgemisch verschiedener Pigmente und Fluorochrome handelt, von denen einige gelbgrün fluoreszierende Substanzen besonders auffällig sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese gelbgrün fluoreszierenden Substanzen unter folgenden Fragestellungen untersucht:

1) Strukturaufklärung und Syntheseweg:

Welche chemische Struktur liegt den Substanzen zugrunde? Welcher Syntheseweg wird von *M. furfur* im Rahmen des Tryptophanstoffwechsels eingeschlagen?

2) Klinisches Erscheinungsbild der Pityriasis versicolor:

Stellen die fluoreszierenden Substanzen eine biochemisch-physiologische Erklärung für die Fluoreszenzerscheinungen bei der Pityriasis versicolor auf der Haut dar?

3) Funktion der Pigmente als Lichtschutzfaktoren:

Ist der bereits beschriebene UV-Schutz durch Tryptophanmetabolite einer einzigen Substanz zuzuordnen oder handelt es sich dabei um einen Summationseffekt mehrerer Verbindungen?

3 Material und Methoden

3.1 Anzucht und Kultur von *Malassezia*-Hefen

3.1.1 Referenzstamm

Bei den Untersuchungen wurde der Stamm CBS 1878 T* (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands) verwendet, der als Referenzstamm der Species *Malassezia furfur* dient.

*T= type of species

3.1.2 Anzucht und Nährmedien

Die Anzucht des Stammes erfolgte auf modifiziertem (m) Dixon-Agar (Guého 1996, Guillot 1997) in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 32°C. Etwa wöchentlich wurden die Kulturen auf frischen Nährboden weiterverimpft.

Zusammensetzung des mDixon-Agars

3,6% Malzextrakt	(Malzextrakt-Buillon, Merck, Darmstadt, FRG)
0,6% Pepton (Casein)	(Pepton aus Casein, Merck)
2% Ochsen-galle	(Dicfo, Detroit, USA)
1% Tween 40	(Tween 40 Atlas, Sigma, St. Louis, USA)
0,4% Olivenöl	(aus der Apotheke kaltsterilisiert)
1,2% Agar	(Agar Agar reinst, Merck)
0,04% Cycloheximid	(Sigma Aldrich, Steinheim, FRG)
0,005% Chloramphenicol	(Merck, Darmstadt, FRG)

Für die Herstellung von 250 ml Nährboden werden

9 g Malzextrakt,
1,5 g Pepton,
5 g Ochsengalle,
5 g Agar,
0,1 g Cycloheximid
und 2 ml Cycloheximid-Stammlösung¹

eingewogen und mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt.

Nach dem Autoklavieren bei 1 bar über 30 min (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin, FRG) und abkühlen auf etwa 50° C wurden 2,5 ml Tween 40 sowie 1,0 ml Olivenöl hinzugegeben.

Jeweils 10 ml des Nährbodens wurden unter einer Uniflow Biohazard Laminar Flow Sicherheitsarbeitsbank (Gerätetyp UVUB1200, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried, FRG) in Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegossen.

¹Die Stammlösung besteht aus 6,25 mg Chloramphenicol / 1ml H₂O, wurde sterilfiltriert abgefüllt und bei -20° C aufbewahrt.

3.2 Bildung von Pigmenten und Fluorochromen

3.2.1 Kulturbedingungen

Der Stoffwechsel von *Malassezia*-Hefen weist eine Besonderheit auf. Wird Tryptophan als vorwiegende Stickstoffquelle dem Nährboden zugefügt, so bildet insbesondere die Species *M. furfur* ein braunes Pigment, das aus einer großen Anzahl bisher unbekannter Farbstoffe und Fluorochrome zu bestehen scheint (Mayser und Imkampe 1998).

Zur Induktion der Pigmentbildung wird ein transparenter Minimalagar verwendet, der um Vitamine, Spurenelemente, Elektrolyte und Kohlenhydrate reduziert wurde und nur noch aus einer Lipidquelle und der Aminosäure Tryptophan besteht. Zur Vermeidung einer Kontamination wurden Chloramphenicol und Cycloheximid zugesetzt.

Zusammensetzung des Pigment (P)-Agars

0,3 g L-Tryptophan	(Min 98%, Sigma Ultra)
2 g Agar	(Agar Agar reinst, Merck)
0,05 g Cycloheximid	(Sigma Aldrich, Steinheim, FRG)
1000 µl Chloramphenicol	(Merck, Darmstadt, FRG)
3 ml Tween 80	(Tween 80, Sigma)
97 ml H ₂ O	

L-Tryptophan und Tween 80 wurden mit der autoklavierten, auf etwa fünfzig Grad abgekühlten Mischung aus Cycloheximid, Chloramphenicol, Agar und Wasser vermischt und je 10 ml in sterile Petrischalen ausgegossen.

3.3 Pigmentgewinnung und Aufreinigung

Die Tryptophanabhängigkeit der Bildung des braunen Pigmentes durch *M. furfur* läßt als Inhaltsstoffe des Rohextraktes Derivate dieser Aminosäure vermuten.

Im Stoffwechsel des Tryptophans sind zwei grundlegende Synthesewege beschrieben, deren mögliches Zugrundeliegen dünn-schichtchromatographisch überprüft werden kann. Zum einen handelt es sich dabei um die Bildung von Ommochromen, Farbstoffe, die bei Gliederfüßern als Augen-, Haut- und Flügel-pigmente sowie als Schlupfsekrete gefunden wurden (Butenandt 1956, Linzen 1974), zum anderen die Bildung von Indolen und Indolderivaten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorliegen von Indolen und Indolderivaten nach der Methode von Gill und Steglich 1987 dünn-schichtchromatographisch überprüft.

3.3.1 Gewinnung des Rohextraktes

6 Tage auf mDixon-Agar gewachsene Kulturen von CBS 1878 werden mit einem sterilen Tupfer auf P- Agar ausgestrichen und zwei Wochen lang bei 32° C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit ist der vorher transparente Nährboden durch das Pigment dunkelbraun verfärbt. Im UV-Licht bei 254 und 366 nm zeigen sich deutliche Fluoreszenzerscheinungen.

Der Inhalt von je 20 Petrischalen wird mit einem Pürrierstab (Quelle, Fürth, FRG) fein zerkleinert und zur Pigmentextraktion mit Ethylacetat (Merck) aufgegossen. Nach 48 Stunden

wird das Extrakt über Glaswolle abfiltriert und mit Aqua dest. aufgegossen und ausgeschüttelt. Über einen Scheidetrichter kann man zwei Phasen trennen: die obere Ethylacetat-Phase und eine untere Wasserphase, die noch Agarreste enthält. Diese Vorreinigung des Rohextraktes ermöglicht eine bessere Trennung über die anschließend durchgeführte Säulenchromatographie. Nach Trocknung der oberen Phase über einen Rotationsverdampfer wird das hochvisköse Pigment in etwa 4 ml Ethanol aufgenommen.

3.3.2 Säulenchromatographie

Lipophiles Sephadex LH 20 (Porengröße 25 – 100 μ , Sigma) ist ein hydroxyproliertes Derivat des Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Es wird für die Gelpermeationschromatographie, die Normalphasenverteilungs- und Adsorptionschromatographie von z. B. Lipiden, Steroiden, Fettsäuren, Hormonen und Vitaminen verwendet (Henke 1995).

Über eine Mitteldruck-Säulenchromatographie wurde das Rohextrakt unter UV-Licht (Desaga-GmbH, Heidelberg, Type 131200) von 254 und 366 nm Wellenlänge in einzelne Fraktionen aufgetrennt.

Die halbvoll mit dem Elutionsmittel Methanol (Merck) gefüllte Säule (NS29 mit Fritte Durchmesser 30 mm, Por.1, PTFE-Küken NS 14/2,5 mm spitz ausgezogen, Nutzlänge ca. 525 mm, Fa. Pfeuffer, Hannover, FRG) wurde mit der vorbereiteten Gelsuspension unter Vermeidung von Luftblasenbildung gefüllt. Nach Aufbringen des Rohextraktes (4 ml in Ethanol, entspricht etwa 20 Agar-Platten) wurde eine Flash-Birne (Schott Duran, 1000 ml) aufgesetzt, mit Methanol gefüllt und Druck über einen Gummiball aufgebaut. Die Laufzeit der Säule betrug etwa 130 min bei einem Fluß von ca. 19 ml/min und einem Elutionsvolumen von 2500 ml.

Die in getrennten Glasgefäßen aufgefangenen Fraktionen wurden mit einem Rotationsverdampfer getrocknet und in etwa 2,5 ml Ethanol aufgenommen.

Sephadex LH 20 wurde regelmäßig regeneriert, um verminderte Trenneigenschaften durch Verschmutzung des Gels zu reduzieren. Dabei wurde nach zwei Methoden verfahren:

Methode A:

Dem Sephadex wird 0,2 N NaOH zugeführt und unter gelegentlichem Schwenken über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird die Lauge über eine Nutsche abgesaugt und das Gel bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes mit Aqua dest. gewaschen.

Methode B:

Nach durchgeführter Chromatographie bleibt das Sephadex auf der Säule. Nach Einsickern von ca 1 ml 2 N HCl wird die Säule mit Methanol gespült, bis ein pH von 7 erreicht ist.

3.3.3 Dünnschichtchromatographie

Die durch die Gelpermeationschromatographie aus dem Rohextrakt gewonnenen Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie mit DC-Platten Kieselgel 60 (Merck) weiter aufgetrennt. Die Substanzen wurden unter Verwendung eines Camag Linomat IV aufgetragen und mit dem Laufmittel Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 entwickelt. (Laufkammern: Desaga, Heidelberg; Filterpapier: 20 x 20 cm, Camag, Muttenz, Schweiz)

Einstellung des Linomaten zur analytischen Trennung der Fraktionen:

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	10 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	7 sec/ μ l
Startposition horizontal	10mm
Startposition vertikal	20 mm
Zwischenraum	7 mm
Aufzutragendes Volumen	20 μ l
Druck Hauptventil	> 100 bar
Druck Reduzierventil	5 bar

Einstellung des Linomaten zur präparativen Trennung der Fraktionen:

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	180 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	4 sec/ μ l
Startposition horizontal	10mm
Startposition vertikal	20 mm
Zwischenraum	0 mm
Aufzutragendes Volumen	300 μ l
Druck Hauptventil	> 100 bar
Druck Reduzierventil	5 bar

Die Charakterisierung der einzelnen Fraktionen erfolgte über die Beschreibung der DC-Platten im sichtbaren Licht und UV-Licht bei 254 und 366 nm sowie die R_f -Werte (Quotient aus der Entfernung einer Substanz vom Startpunkt und Laufmittelstrecke).

Weiterhin wurden die Platten im sichtbaren Licht mit einer Olympus OM-2 Kamera mit autodynamischer Lichtmessung fotografiert. Bei Aufnahmen im UV-Licht wurden mehrere UV-Filter (käuferliche „Skylight“-Filter) vorgeschaltet, um Spektralverschiebungen durch hohe UV-Belichtung und damit eine Farbverfälschung zu vermeiden.

Die gelb-grün fluoreszierenden Banden mit dem R_f -Wert 0,15 bzw. 0,2 aus den Säulenfraktionen 2 und drei wurden für weitere Versuche verwendet.

Die gewünschte Bande wurde mit Bleistift angezeichnet, mit einem Einmalskalpell ausgekratzt, das Kieselgel sorgfältig zerkleinert und mit Ethylacetat und Wasser aufgegossen. In der oberen Ethylacetatphase löste sich das Pigment, in der unteren Wasserphase fiel das Kieselgel aus. Die obere Phase wurde abpipettiert, zur Bindung von Restwasser mit Natriumsulfat (Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz) versetzt und bei 25°C mit 4000 Umdrehungen/min über fünf Minuten zentrifugiert (Programm 5, Hettich Zentrifuge, Rotana RP). Die Lösung wurde anschließend in Glasröhrchen (neoLab Autosampler Vials, 4 ml, Heidelberg, FRG) unter einem Stickstoffstrom in einem Techne DRI-Block DB 3 (Thermo Dux, Heidelberg) bei 40 ° C getrocknet

3.3.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.3.4.1 Analytische HPLC

Die Zusammensetzung der durch präparative Dünnschichtchromatographie gewonnenen Banden (R_f -Wert 0,15 bzw. 0,2) wurde durch analytische HPLC überprüft. Verwendet wurde eine Merck-Hitachi Anlage (L-3000 Multi Channel Photodetektor mit einer L-6200A Pumpe), die mit einer RP8 Säule (Säulendurchmesser 4mm²) ausgestattet war. Die Chromatographie wurde mit einem Flow von 1ml/min bei einem Druck von 140 – 160 Bar durchgeführt. Es wurde sowohl mit einem UV-Detektor (Meßfrequenz 220 nm, Empfindlichkeit 0,15) als auch mit einem Fluoreszenz-Detektor (Anregung 355 nm, Messung bei 455 nm, Empfindlichkeit $R= 10$) gearbeitet. Die beiden Geräte waren in Serie geschaltet, die Chromatogramme wurden parallel aufgezeichnet.

Als flüssige Phase wurden Acetonitril (gradientenrein, Merck) und Wasser für die HPLC (Merck) verwendet, beide Phasen wurden vor Gebrauch mit einem Supleco Filtrationsapparat 2 (Supleco, Bellefonte, USA) mit einem Nylon 66 Filter entgast.

Die aufzureinigenden Substanzen wurden jeweils in 30% Acetonitril / 70% Wasser gelöst.

Um das Gesamtspektrum der in einer Probe enthaltenen Substanzen zu erfassen wurde zunächst die Analyse mittels eines Gradienten durchgeführt. Ausgehend von einem Acetonitrilanteil von 15% wird dieser Anteil innerhalb von 25 min auf 60% gesteigert und bleibt über 10 min bei dieser Konzentration konstant. Anschließend wird der Acetonitril-Anteil innerhalb von 15 min auf 15% gesenkt und verbleibt dort für 15 min.

3.3.4.2 Präparative HPLC

Die Gewinnung interessierender Substanzen wurde mittels präparativer HPLC unter isokratischen Bedingungen durchgeführt. Die flüssige Phase bestand wiederum aus entgastem Acetonitril und HPLC-Wasser.

Es wurde eine Lichrospher 100 – RP 8 (10 μ m) Säule auf einem Gilson Modell 302 (Gilson, USA) und 802 Modul eingesetzt. Der Flow betrug 6,25 ml/min, wobei darauf geachtet wurde, die präparative Säule nicht zu überlasten bzw. die Detektionsgrenze nicht zu unterschreiten.

Der Elutionszeitpunkt bzw. -raum einzelner Peaks bzw. Fraktionen wurde bestimmt und die Substanzen in mit 96%igem Ethanol vorgereinigten Erlenmeyerkolben aufgefangen.

Das Acetonitril wurde mittels Rotationsverdampfer bei 30° C entfernt. Die in der Wasserphase verbleibende Reinsubstanz wurde im Rotationskolben über

Trockeneis/Isopropanol unter Drehen eingefroren und bis zur vollständigen Trocknung lyophilisiert (Lyovac GT2).

3.3.4.3 Optimierung des HPLC-Verfahrens

Die mit dem oben beschriebenen HPLC-Verfahren gewonnenen Substanzen erwiesen sich als noch nicht ausreichend rein, so dass eine Strukturaufklärung noch nicht gelang. Deshalb wurde im folgenden zunächst die Auftrennung über HPLC optimiert. Abbildung 4 zeigt zusammenfassend die verwendete Methode.

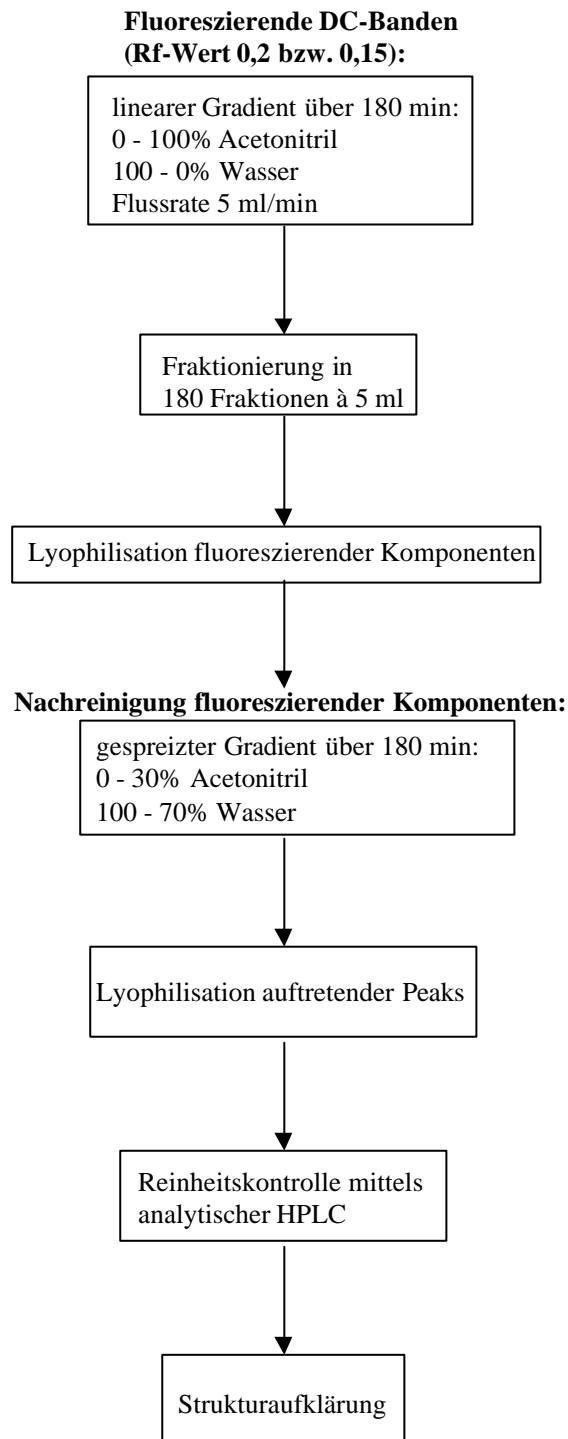


Abbildung 4: Aufreinigung der fluoreszierenden Dünnschichtbanden über präparative HPLC

Die trotz Vorreinigung noch recht komplexen Fraktionen (durchschnittlich 5 – 10 Komponenten) wurden durch präparative HPLC über einen Gradienten mit einer LiChrospher-RP8 Säule (Merck, Darmstadt) (30x250mm) mit entsprechender Vorsäule getrennt und in grösseren Mengen (mg-Bereich) rein dargestellt. Als Gradientenpumpe diente die Gilson Masterpumpe M305 gekoppelt mit einer Pumpe Gilson Modell 302 (Gilson, USA) mit jeweils einem präparativen 50ml/min Pumpenkopf, gesteuert von einem Gilson 802-Modul. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor (Holochrome, Gilson) bei 220 nm. Die Chromatogramme wurden mittels XY-Schreiber (LKB 2210, Stockholm, Schweden) aufgezeichnet. Der verwendete lineare Gradient (180 min) lief von 0 – 100 % Acetonitril bzw. 100 – 0 % Wasser. Die Flussrate betrug 5 ml/min. Die eluierenden Verbindungen wurden mittels Fraktionensammler (Super Frac, Pharmacia Biotech) in 180 Fraktionen von je 5 ml aufgefangen und anschliessend bei 366 nm mittels einer UV-Handlampe (Desaga-GmbH, Heidelberg, Type 131200) auf Fluoreszenz untersucht. Nach Lyophilisation (Lyovac GT2) wurden die fluoreszierenden Hauptkomponenten nochmals mit einem gespreizten Gradienten (0 – 30 % Acetonitril bzw. 100 – 70 % Wasser über 180 min) nachgereinigt. Dabei wurden die den auftretenden Peaks entsprechenden Fraktionen vereinigt und nach erneuter Lyophilisation per Express unter Stickstoffatmosphäre auf Trockeneis zur Strukturaufklärung an den Kooperationspartner in München geschickt. Ein Aliquot wurde mittels analytischen HPLC auf Reinheit überprüft.

Analytische HPLC

Zur analytischen HPLC wurde eine Reversed-Phase-Säule (RP-18, 4 × 250 mm, stationäre Phase Shandon ODS Hypersil 3 µm, Life Science International LTD, Cheshire, England) verwendet. Die Elution erfolgte mittels Hochdruck-Gradienten (Gynkotek Gradientenpumpe 480, Gynkotek, Germering). Als mobile Phase wurde Acetonitril-Wasser (linearer Gradient von 0 – 100% Acetonitril bzw 100 – 0% Wasser über 100 min) bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Die Detektion eluierter Substanzen erfolgte bei 220 nm (Detektor UV-Detektor 785, bai, Bensheim), die Chromatogramme wurden mittels eines Thermoschreibers (Gynkotek C-R 6A Chromatopac, Gynkotek, Germering) bei einer Schreibergeschwindigkeit von 2mm/min aufgezeichnet. Der Probenauftrag erfolgte mittels eines Autosamplers (Alcott Modell 738, Bischoff Analystechnik, Leonberg) in einem Volumen von 100 µl.

3.4 Strukturaufklärung

Die aus Gießen erhaltenen Proben wurden in München mittels ^1H - und ^{13}C -NMR (600MHz), Massenspektroskopie (HRMS) sowie FT-IR-Spektroskopie analysiert. Zur Aufnahme geeigneter Massenspektren standen verschiedene Ionisationsmethoden zur Verfügung (EI, ESI, FAB und CI).

Abbildung 5 zeigt zusammenfassend die verwendeten Methoden von der Anzucht der Pilzkulturen über die Rohextraktgewinnung bis zur Strukturaufklärung der Reinsubstanzen.

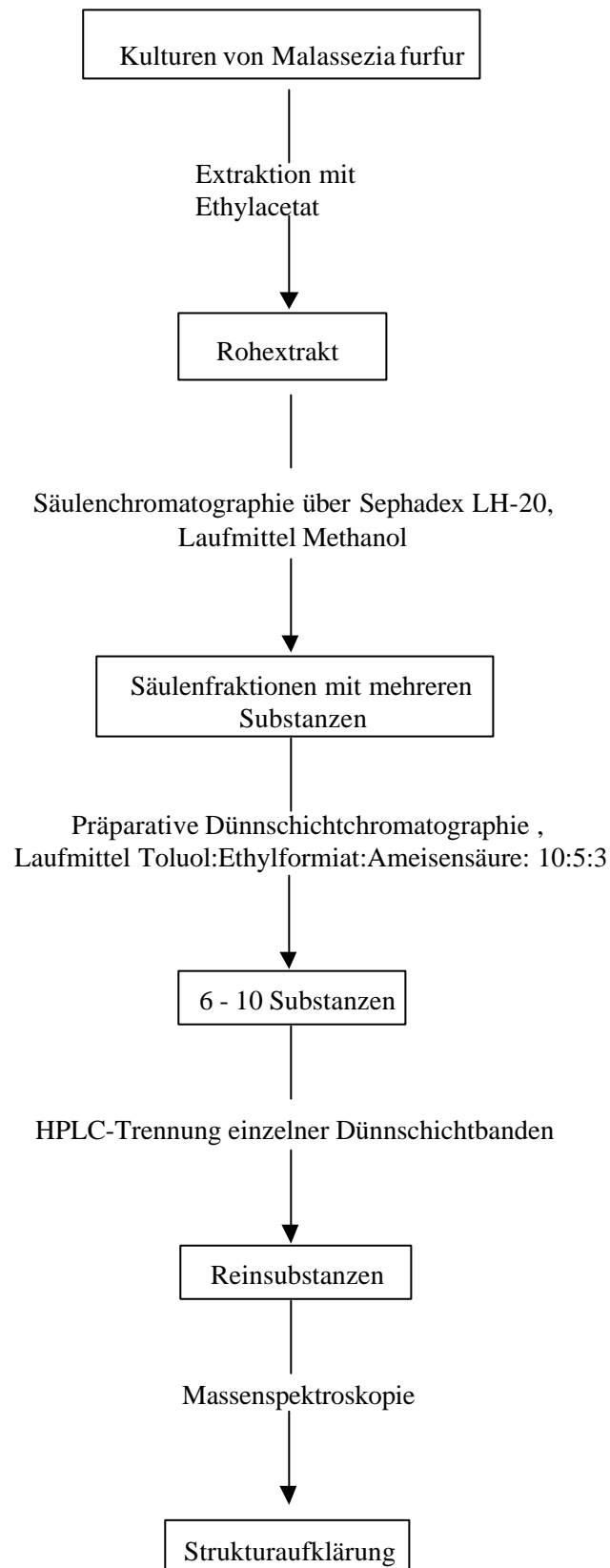


Abbildung 5: Zusammenfassung der verwendeten Methoden von der Anzucht der Pilzkulturen über die Gewinnung des Rohextraktes bis zur strukturellen Aufklärung der Reinsubstanzen.

3.5 Vorschlag zur Biosynthese

Neben der Strukturaufklärung der im Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur* entstehenden Substanzen wurden auch Vorschläge zum Syntheseweg der Pigmente und Fluorochrome aus dem Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur* erarbeitet (Irlinger et al. 2000).

Unterstützt wurden die Vorschläge zur Biosynthese durch die Verwendung $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Tryptophan zur Induktion der Pigmentbildung: nach Aufreinigung des Rohextraktes konnte der Verbleib des markierten Kohlenstoffatoms in den Reinsubstanzen bestimmt werden.

3.6 Absorptionsspektren

Vom Rohextrakt sowie den gelb-grün fluoreszierenden Substanzen der verschiedenen Aufreinigungsstufen wurden Absorptionsspektren in Ethanol (96%, Merck) erstellt (Beckmann DU-68 Spectrophotometer).

3.7 Fluoreszenzspektrum von Pityrialacton

Aus einer besonders stark fluoreszierenden DC-Bande konnte über HPLC ein Fluorochrom isoliert und strukturell analysiert werden: Pityrialacton.

Von dieser Substanz wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Wallbott (Institut für Chemie an der JLU Giessen) Anregungs- und Fluoreszenzspektren mittels eines Spektralphotometers PMQII (Zeiss, Oberkochen) mit einem Fluoreszenzansatz ZFM 4 erstellt.

Die Messung der gelösten Substanz (Konzentration $3,4 \times 10^{-5}$ mol/l) erfolgte in einer Quartzkuvette mit einer optischen Weglänge von 1cm. Als Strahlungsquelle des Lumineszenzspektrometers diente eine Xenonlampe, deren Spektrum durch einen Monochromator (Erregermonochromator) zerlegt wurde. Das durch den Erregermonochromator zur Probe gelangende Licht wurde zur Anregung des Fluoreszenzprozesses in der Probe verwendet. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wurde durch einen zweiten Monochromator, den Emissionsmonochromator spektral zerlegt.

Aufnahme des Anregungsspektrums

Der Meßmonochromator wurde auf die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums eingestellt. Zu jeder Wellenlänge des Erregermonochromators wurde der Intensitätswert festgestellt. Die erhaltene Kurve stellt das Produkt aus spektraler Energieverteilung der Xenonlampe, reziproker linearer Dispersion des Monochromators, spektraler Durchlässigkeit der gesamten Optik und der spektralen Anregungsfunktion des Meßguts dar. Die Meßkurve wurde nicht weiter korrigiert und anstelle der eigentlichen Anregungsfunktion benutzt.

Aufnahme des Fluoreszenzspektrums

Der Erregermonochromator wurde auf die Wellenlänge des Anregungsmaximums eingestellt, das annähernd dem Absorptionsmaximum der fluoreszierenden Substanz entspricht. Der Meßmonochromator wurde durchgeföhren und anhand der korrespondierenden Intensitätswerte das Fluoreszenzspektrum ermittelt.

3.8 Funktion der Pigmente und Fluorochrome – Schutz vor ultravioletter Strahlung

3.8.1 Methoden der Keimzahlbestimmung und Erstellung von Eichkurven

Nach 6tägiger Inkubation bei 32 °C werden die Pilzzellen mit einer ausgeglöhnten Platinöse vorsichtig vom Agar abgelöst und in einem sterilen Mörser zur Verminderung von Klumpenbildung sorgfältig zerkleinert. Die Pilze werden einmalig in je 5 ml 0,9% NaCl in der Zentrifuge 3 min lang bei 3000 Umdrehungen/min (Hettich Zentrifuge, Rotana, RP) gewaschen und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Das Pellet wird erneut mit einer definierten Menge 0,9% NaCl aufgeschüttet und mit einem Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2TM) gut vermischt, so dass eine gleichmäßige Suspension entsteht. Diese wird mit einer Eppendorf –Pipette in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und nach Erythrozytenmodus (5 Gruppenquadrate) unter dem Phasenkontrastmikroskop (Dialux, Leitz, Wetzlar) ausgezählt.

Die Zellzahl in der Ausgangssuspension errechnet sich nach folgender Formel:

$$\begin{aligned}
 n/\mu\text{l} &= S/(V_k \times N_k) \\
 &= S/(0,25 \times 10^{-3} \mu\text{l} \times 80) \\
 &= S/(20 \times 10^{-3}) \\
 &= S \times 50/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Weiterhin wird mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert.

$N/\mu\text{l}$ = Anzahl der Zellen pro Mikroliter Suspension

S = Summe der ausgezählten Zellen in fünf Gruppenquadraten

V_k = Volumen über einem Kleinstquadrat ($0,25 \times 10^{-3} \mu\text{l}$)

N_k = Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate ($16 \times 5 = 80$)

Erstellung von Eichkurven

Aus einer auf 10^6 CFU/ μl eingestellten Pilzsuspension mit Zellen von mDixon-Agar bzw. von mDixon-Agar, bei dem die Stickstoffquelle Pepton durch entsprechende Mengen Tryptophan bzw. Arginin ersetzt worden war, wurden Proben von 25, 50, 75, 100, 150, 200 und 250 μl in Reagenzgläser gefüllt, deren Leergewicht zuvor mit einer elektronischen Halb-Mikrowaage der Firma Sartorius, Modell R 180 D bestimmt worden war. Nach 3minütiger Zentrifugation bei 3000 Umdrehungen/min wird der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Pilze werden 24 h bei 65°C in einem Techne DriBlock DB 3 (Thermo Dux, Heidelberg) getrocknet. Danach werden die Reagenzgläser erneut gewogen und durch Differenzbildung zwischen Endwert und Leerwert das Gewicht der Pilzkulturen bestimmt. Für jede Zellzahl wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 3: Eichkurve zur Gewichtsbestimmung von *M. furfur* CBS 1878 (mDix)

Millionen	mg	mg	mg	Mittelwert	SD
0	0	0	0	0	0
25	0,54	0,53	0,52	0,53	0,01
50	1,1	1,11	1,21	1,14	0,06
75	1,65	1,69	1,65	1,66	0,02
100	2,31	2,24	2,31	2,29	0,04
150	3,31	2,79	3,29	3,14	0,3
200	3,98	3,83	4,01	3,94	0,1
250	5,1	4,98	5,07	5,05	0,06

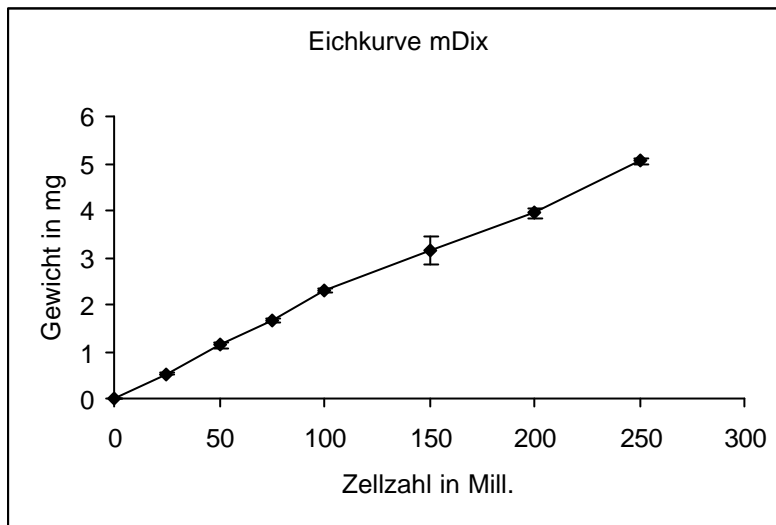


Abbildung 6: Eichkurve zur Gewichtsbestimmung von *M. furfur* CBS 1878 (mDix)

Tabelle 4: Eichkurve zur Gewichtsbestimmung von CBS 1878 *M. furfur* (Dix/Trp)

Millionen	mg	mg	mg	Mittelwert	SD
0	0	0	0	0	0
25	0,47	0,57	0,56	0,53	0,06
50	1,12	1,07	0,95	1,05	0,09
75	1,46	1,44	1,73	1,54	0,16
100	1,73	1,98	1,96	1,89	0,14
150	2,66	2,88	3,18	2,9	0,26
200	3,91	3,99	3,95	3,95	0,04
250	5,01	4,98	4,92	4,97	0,046

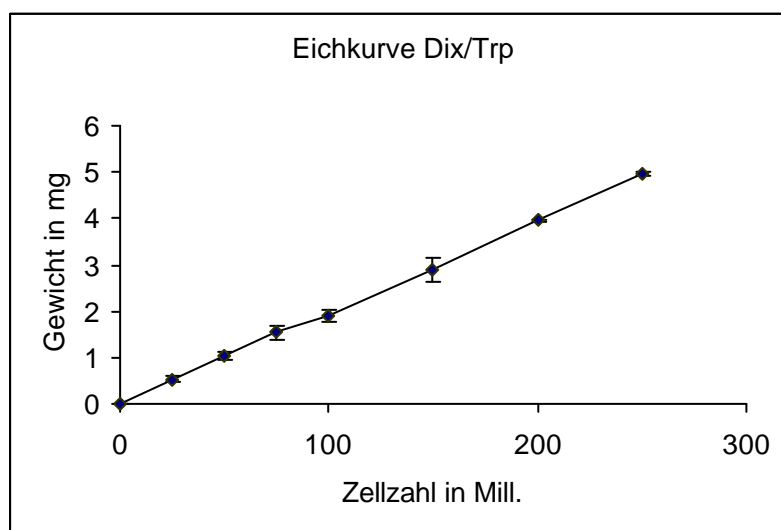
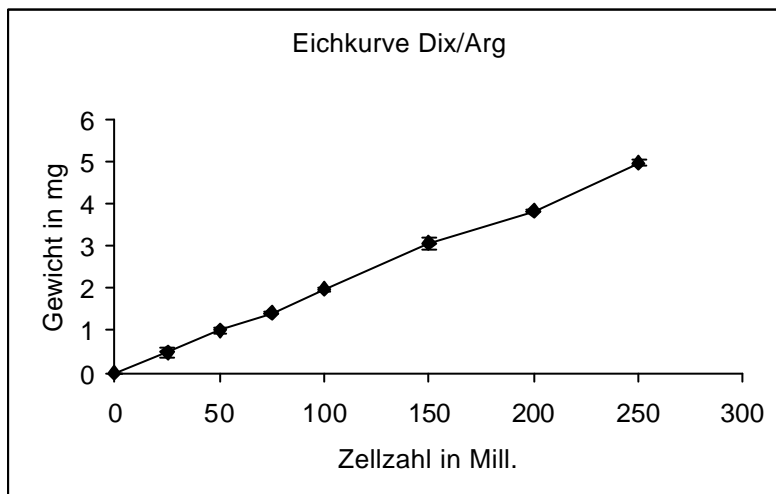


Abbildung 7: Eichkurve zur Gewichtsbestimmung von *M. furfur* CBS 1878 (Dix/Trp)

Tabelle 5: Eichkurve zur Gewichtsbestimmung von *M. furfur* CBS 1878 (Dix/Arg)

Millionen	mg	mg	mg	Mittelwert	SD
0	0	0	0	0	0
25	0,58	0,47	0,38	0,48	0,1
50	0,93	1,08	0,96	0,99	0,08
75	1,43	1,38	1,45	1,42	0,04
100	1,97	2,02	1,94	1,98	0,04
150	3,06	3,21	2,93	3,07	0,14
200	3,84	3,83	3,78	3,82	0,03
250	4,98	5,01	4,87	4,95	0,07

**Abbildung 8: Eichkurve zur Gewichtsbestimmung von *M. furfur* CBS 1878 (Dix/Arg)**

3.8.2 Untersuchung der UV-protektiven Wirkung verschiedener Rohextraktbestandteile

Durch die Synthese von Tryptophanderivaten gewinnt *M. furfur* einen potenten Lichtschutz im UVA- und UVB-Bereich. Sowohl der Vergleich der Wachstumsraten von Kulturen mit Tryptophan bzw. Arginin als einziger Stickstoffquelle nach einmaliger UV-Exposition als auch die topische Applikation des Rohextraktes auf menschlicher Haut haben dies gezeigt (Mayser und Pape, 1998).

Weitere Untersuchungen sollten die Frage klären, ob es sich dabei um einen Summationseffekt verschiedener im Rohextrakt enthaltener Stoffe handelt oder die UV-protektive Wirkung einer einzelnen Substanz zuzuschreiben ist.

Dazu wurden erneut die Wachstumsraten von Kulturen mit Tryptophan bzw. Arginin als einziger Stickstoffquelle verglichen, jedoch wurden die Pilze vor UV-Exposition jeweils mit Rohextrakt, einzelnen Säulenfraktionen sowie DC-Banden behandelt.

3.8.2.1 Einfluß von DMSO auf das Wachstumsverhalten von *M. furfur*

Die Wirkung des zum Lösen der Pilzpigmente verwendeten DMSO auf das Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 wurde vor Beginn der Bestrahlungsversuche in einer Verdünnungsreihe überprüft.

Inokulationspunkte à 2µl einer 10⁶ CFU/µl enthaltenden Pilzsuspension mit auf tryptophan- bzw. argininhaltigem mDixonagar gewachsenen Zellen (0%, 10%, 25%, 50% und 100% DMSO, Rest jeweils NaCl) werden auf eine mDixonagarplatte pipettiert und 5 Tage bei 32° C inkubiert. Aberntung und Gewichtsbestimmung erfolgte wie in 3.7.3.3 beschrieben. Es wurden jeweils drei Werte ermittelt.

Tabelle 6: DMSO-Verdünnungsreihe

	mg	mg	mg	Mittelwert (Trp)	SD
NaCl	4,51	4,93	3,27	4,24	0,86
10%	4,68	3,54	3,62	3,95	0,64
25%	4,58	4,31	3,81	4,23	0,39
50%	4,27	3,34	3,97	3,86	0,47
100%	0,35	0	0,05	0,13	0,19

	mg	mg	mg	Mittelwert (Arg)	SD
NaCl	4,02	4,02	3,95	4,0	0,04
10%	4,87	4,68	3,34	4,3	0,83
25%	4,37	4,2	4,33	4,3	0,05
50%	3,52	3,28	3,68	3,49	0,2
100%	0,15	0,09	0,07	0,1	0,04

DMSO bewirkt mit Zunahme der eingesetzten Konzentration eine Reduktion der Wachstumsraten der Pilzkulturen. Im folgenden wurden Pilzsuspensionen mit 10% DMSO und 90% NaCl verwendet.

3.8.2.2 Einfluß der Pilzpigmente auf das Wachstumsverhalten von *M. furfur*

Vor Beginn der Bestrahlungsversuche wurde weiterhin ausgeschlossen, dass Inhaltsstoffe des Rohextraktes einen wachstumsfördernden Einfluß auf CBS 1878 haben bzw. erneute Pigmentbildung induzieren. Dazu wurde CBS 1878 auf Pigmentagar, bei dem die Stickstoffquelle Tryptophan durch Rohextrakt ersetzt worden war, ausgestrichen, 2 Wochen bei 32° C inkubiert und anschließend das Wachstum beurteilt.

Nach 14 Tagen zeigte sich kein Wachstum von CBS 1878, so dass man einen wachstumsfördernden oder die Pigmentbildung induzierenden Effekt des Rohextraktes auf *M. furfur* ausschließen kann.

3.8.3 Bestrahlungsversuche

Das Schema zeigt zusammenfassend den Versuchsaufbau der Bestrahlungsversuche. Erläuterungen zu den einzelnen Schritten finden sich nachfolgenden Text.

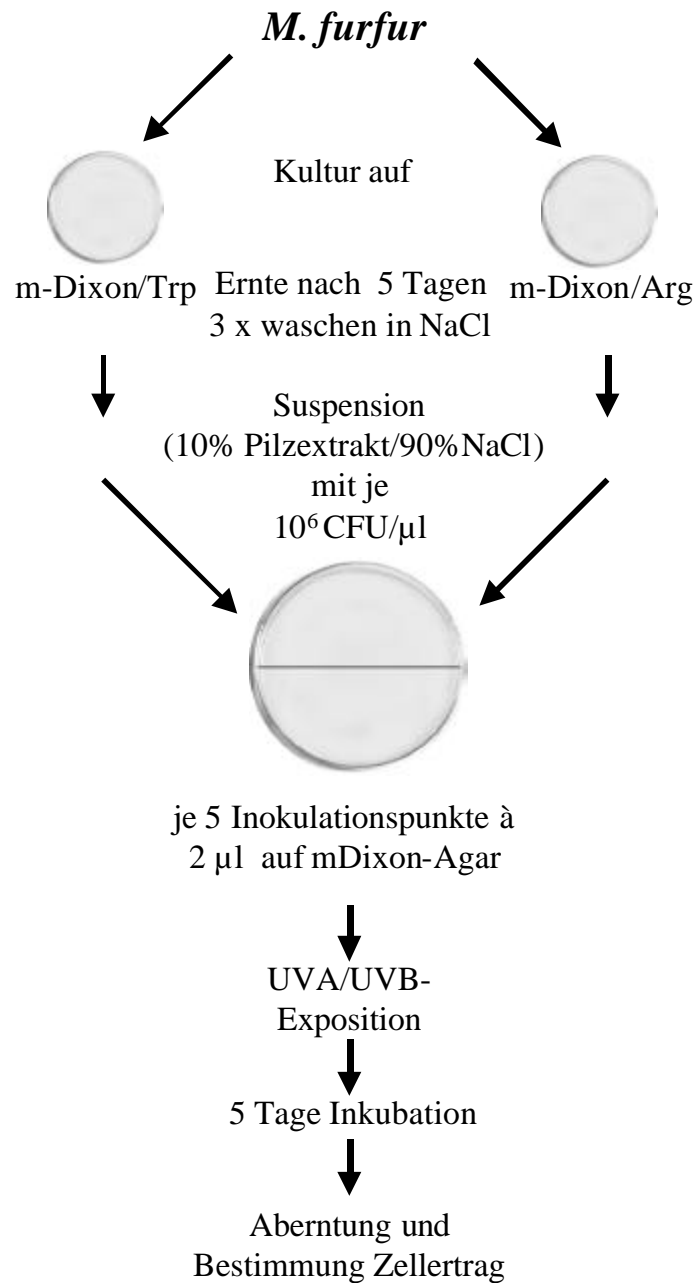


Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Überprüfung der Wirkung des Rohextraktes und seiner Bestandteile auf das Wachstum von *M. furfur* nach UV-Exposition

3.8.3.1 Anzucht und Nährmedien

Der Standard-Nährboden mDixon-Agar nach Guého 1996 wurde weiter modifiziert: die Stickstoffquelle Pepton wurde durch eine entsprechende Menge Tryptophan (Sigma) oder Arginin (Sigma) ersetzt. Arginin wurde ausgewählt, da die Wachstumsraten der Kulturen ohne UV-Bestrahlung mit denen der auf Trp-haltigem Nährboden gewachsenen Hefen vergleichbar waren (Generationszeit je 19 h) (Mayser 1998).

Die Pilze werden 5 Tage auf Trp- bzw. Arg-haltigem mDixonagar bei 32° C inkubiert, getrennt geerntet, in 0,9% NaCl gewaschen, in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und auf Lösungen mit 10⁶ CFU/μl eingestellt.

3.8.3.2 Vorbehandlung mit Pilzpigmenten (Rohextrakt bzw. Säulenfraktionen)

Es wurde je eine Lösung von auf Trp- bzw. Arg-haltigem Agar gewachsenen Zellen mit 10⁶ CFU/μl erstellt, die zu 10% in DMSO gelöstes Pilzextrakt und zu 90 % NaCl (0,9%) enthielt.

Um gleiche Wachstumsbedingungen zu gewährleisten wurden nach einer halben Stunde Einwirkzeit auf eine mDixon-Agarplatte mit Pepton mit einer Eppendorf-Pipette jeweils 5 Inokulationspunkte à 2μl der mit Arginin bzw. Tryptophan gefütterten Pilze aufpipettiert.

Kontrollen ohne Behandlung mit Pilzextrakt wurden jeweils mitgeführt.

3.8.3.3 Bestrahlung

Direkt nach der Inokulation wurden die Platten entsprechend den Vorarbeiten von Mayser und Pape 1998 einmalig mit 100 bzw. 200 J/cm² UVA- bzw. 500, 1000 bzw. 2000 mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt.

Als UVA-Quelle wurde ein Sellamed 4000-Gerät (Sellas Sunlight, Gevelsberg, Germany) benutzt. Das Bestrahlungsspektrum liegt zwischen 320 – 440 nm mit einem Maximum bei 365 nm. Die Bestrahlung mit UVB erfolgte mit UV/Puva 800 (Waldmann, Schweningen, Germany) mit Philips TL 20W/12 Lampen, das Emissionsspektrum liegt hier zwischen 285 und 350 nm mit einem Maximum bei 315 nm.

Mit einem UV-Meter (Waldmann Lichttechnik) wurde die Strahlungsintensität in mW/cm² gemessen und die für die gewünschte Dosis erforderliche Bestrahlungszeit ermittelt.

Im UVA-Bereich erfolgte die Ermittlung der Bestrahlungszeiten nach folgender Formel:

$$\text{Bestrahlungszeit (sec.)} = \frac{\text{gewünschteUV - Dosis (J / m}^2\text{)}}{\text{gemesseneIntensität (mW / cm}^2\text{)}} \times 1000$$

Dabei wurde bei verschiedenen Versuchsansätzen jeweils eine Intensität von 124 mW/cm² eingestellt.

Für die UVB-Bestrahlung wurde nach Einstellung einer Intensität von 2,05 mW/cm² folgende Tabelle zur Ermittlung der Bestrahlungszeiten benutzt:

Bestrahlungszeit (sec.)	Dosis (mJ/cm ²)
6	12,5
24	50
240	500
480	1000
960	2000

Die Platten wurden bei geöffnetem Deckel mit Sellamed 4000 (UVA) mit einer Einmaldosis von 100 bzw. 200 J/cm² bestrahlt, im UVB-Bereich wurden Dosen von 500, 1000 bzw. 2000 mJ/cm² verwendet.

Nach der Bestrahlung wurden die Platten wieder verschlossen und bei 32° C inkubiert, ebenso identisch angelegte, aber nicht bestrahlte Platten mit bzw. ohne Vorbehandlung mit Rohextrakt bzw. dessen Bestandteilen.

Aberntung und Gewichtsbestimmung

Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Kulturen der einzelnen Inokulationspunkte mit einer Platinöse vorsichtig vom Agar abgenommen und in Reagenzgläschen mit 1 ml 0,9% NaCl gegeben. Das Ausgangsgewicht des Reagenzgläschens war zuvor bestimmt worden. Nach 3 min Zentrifugation bei 3000 Umdrehungen/min wird der Überstand ohne Mitnahme von Zellen abgesaugt. Nach 24stündiger Trocknung des Pellets bei 65°C im TechneDriBlock werden die Gläschen nach Abkühlung auf Zimmertemperatur erneut gewogen und über Differenzbildung das Gewicht der Pilzkulturen bestimmt. Die ermittelten Massen wurden anhand von Eichkurven in absolute Zellzahlen überführt.

Für jeden Ansatz wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt, wobei pro Versuch in jeder Gruppe jeweils drei Werte ermittelt wurden.

3.8.3.4 Statistik

Die Erfassung der Daten sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte mit Microsoft Excel 97. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS für Windows Version 6.1.3 in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informatik an der JLU Giessen (Leiter Prof. Dr. J. Dudeck) durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe von Mittelwert und Standardabweichung (siehe Tabellenanhang) beschrieben und graphisch dargestellt. Normalverteilung kann vorausgesetzt werden. Der Einfluss der UV-Bestrahlung sowie der Vorbehandlung der Kulturen durch Pilzextrakt wurde mit Hilfe der 2faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) beurteilt. Die Datenanalyse hat explorativen Charakter. Kriterium für die Beurteilung von Effekten ist die jeweils berechnete Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art, das Signifikanzniveau wurde bei einem zweiseitigen p von $<0,05$ festgesetzt.

3.8.3.5 Modifizierung des Versuchsansatzes

Im weiteren Verlauf wurde eine Modifizierung des oben beschriebenen Versuchsaufbaus notwendig.

Im UVA-Bereich konnte durch Behandlung mit dem Rohextrakt kein signifikanter Lichtschutz der Kulturen erzielt werden, jedoch waren die Wachstumsraten der behandelten Zellen etwas höher als die der unbehandelten. Bei Einsatz der Fraktionen 2 und 3 konnte dies

nicht beobachtet werden, eher könnte man hier eine zellschädigende Wirkung der Substanzen diskutieren. So wurde im folgenden auf weitere Versuche mit UVA-Bestrahlung verzichtet.

Durch die Vorbehandlung der Zellen mit Rohextrakt vor UVB-Exposition konnten signifikant höhere Wachstumsraten als bei den unbehandelten Kontrollgruppen erzielt werden. Wurden die stark fluoreszierenden Säulenfraktionen 2 bzw. 3 verwendet, konnte dieser Effekt nur noch bei den auf argininhaltigem Nährboden gewachsenen Zellen, besonders ausgeprägt bei 500 bzw. 1000 mJ/cm², beobachtet werden.

Für die weiteren Versuche wurden nur noch die auf argininhaltigem Nährboden gewachsenen Kulturen verwendet und auf das Mitführen der auf tryptophanhaltigem Nährboden gewachsenen Kulturen verzichtet. Die Vorbehandlung der Kulturen vor Bestrahlung erfolgte nicht mehr mit einer 10%igen Pilzextraktlösung, sondern es wurden höhere Konzentrationen verwendet (25% bzw. 50%). Die Bestrahlung erfolgte ausschließlich mit 1000 mJ/cm² UVB. Kontrollen wurden mitgeführt, pro Gruppe wurden drei Werte ermittelt.

	Pilzextrakt (in DMSO)	NaCl
Fraktion 2	25%	75%
Fraktion 2	50%	50%
Fraktion 3	25%	75%
Fraktion 3	50%	50%

3.8.4 Auftropfversuche

3.8.4.1 Vorbehandlung mit Pilzpigmenten (DC-Banden)

Die Bestrahlungsversuche mit Rohextrakt und Säulenfraktionen zeigten, dass mit steigendem Aufreinigungsgrad des Pigmentes höhere Konzentrationen erforderlich waren, um einen Lichtschutz der Kulturen durch das Pilzextrakt zu erzielen. Diese Tatsache und die recht aufwendige Herstellung ausreichender Mengen hochaufgereinigter Pilzpigmente führten dazu, dass die über Dünnschichtchromatographie aufgereinigten Banden in einem anderen Verfahren in kleinen, aber hochkonzentrierten Mengen auf ihre eventuelle lichtschützende Wirkung überprüft wurden.

Auf eine mDixon-Agarplatte wurden mit einer Eppendorf-Pipette je 5 Inokulationspunkte à 2 µl der in DMSO gelösten DC-Bande pipettiert. Kontrollen mit reinem DMSO wurden mitgeführt.

Nach einer halben Stunde werden die Inokulationspunkte (Ø 0,7 cm) mit 2 µl einer 10⁶ CFU/µl enthaltenden Pilzsuspension (10% DMSO, 90% NaCl) überschichtet. Dabei werden nur Zellen von mDixon-Agar mit Arginin verwendet. Sofort nach Inokulation wurden die Platten einmalig mit 1000 mJ/cm² UVB bestrahlt. Inkubation, Aberntung und Gewichtsbestimmung erfolgt wie in 3.7.3.3 beschrieben.

3.8.4.2 Vorbehandlung von *M.furfur* CBS 1878 mit handelsüblichem Lichtschutzmittel

Zum Abschätzen der UV-protectiven Potenz der getesteten Fluorochrome wurde dieser Versuch auch mit handelsüblichen Lichtschutzmitteln durchgeführt.

Dazu wurden je 0,4 g Sonnencreme mit Breitbandfilter (Anthélios, La Roche-Posay, Frankreich¹) mit LSF 20 bzw. 60 verwendet, die in jeweils 1 ml 0,9% NaCl gelöst worden waren.

¹Inhaltsstoffe:

Mexoryl ® SX

Octocrylene

Titanoxid

Butylmethoxydibenoylmethan

Thermalwasser Roche-Posay

3.8.4.3 Vorbehandlung von *Candida albicans* mit Pilzextrakten und handelsüblichem Lichtschutzmittel

Die UV-protective Wirkung des Rohextraktes und seiner Bestandteile sowie der handelsüblichen Lichtschutzmittel wurde auch an einem Wildstamm von *Candida albicans* getestet. Nach dreitägiger Inkubation von *Candida albicans* bei 32° auf Sabouraud-Agar wurden die Zellen geerntet, gewaschen und eine Pilzsuspension (10% DMSO, 90% NaCl) mit 10⁶ CFU/μl eingestellt. Es wurde weiter wie in 3.7.4.1 und 3.7.4.2 verfahren.

3.8.4.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Bestrahlungsversuche mit höheren Konzentrationen der Säulenfraktionen (3.8.3.6) bzw. der Auftropfversuche (3.8.4) erfolgte mittels Man-Whitney-Test bzw. dem student's t-test für unverbundene Stichproben bei einem zweiseitigen p von 0,05.

4 Ergebnisse

4.1 Bildung von Pigmenten und Fluorochromen

4.1.1 Säulenchromatographie

Der Rohextrakt wurde zur weiteren Bestimmung seiner Bestandteile zunächst über Sephadex LH 20 Gelpermeationschromatographie unter UV-Licht (254 und 366 nm) aufgetrennt. Dabei wandern großen Moleküle relativ schnell über die Säule, während die kleineren Moleküle in den Poren des Gels hängenbleiben und später eluiert werden.

Mit dieser Methode konnte der Rohextrakt in eine Vielzahl farbiger und fluoreszierender Fraktionen aufgetrennt werden. Tabelle 7 zeigt das verwendete Trennschema.

Tabelle 7: Trennschema zur Aufbereitung des Rohextraktes über Sephadex LH 20

Fraktion	Farbe im UV-Licht	Volumen in ml
Vorlauf	Keine sinnvolle Trennung möglich	300 ml
Fraktion 1	Braun	50 ml
Fraktion 2	Fluoreszierendes Goldgelb	100 ml
Fraktion 3	Fluoreszierendes Hellgelb	100 ml
Fraktion 4	Braun	100 ml
Fraktion 5	Orange	200 ml
Fraktion 6	Blau	150 ml

Mit dem Ziel, die gelb-grüne Fluoreszenz der Pityriasis versicolor und eine mögliche Lichtschutzwirkung durch diese fluoreszierenden Stoffe in den depigmentierten Hautarealen bei der Pityriasis versicolor alba zu erklären, wurden die früh eluierenden, stark gelb-grün fluoreszierenden Fraktionen 2 und 3 weiter aufbereitet.

4.1.2 Dünnschichtchromatographie

Die durch Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen wurden über präparative Dünnschichtchromatographie weiter aufgearbeitet, durch die eine Vielzahl von Pigmenten und Fluorochromen als Bestandteile des Rohextraktes nachgewiesen werden konnten.

Die Tabellen beschreiben die Farbgebung einzelner Komponenten der stark fluoreszierenden Säulenfraktionen 2 und 3 nach präparativer Dünnschichtchromatographie mit dazugehörigen R_f -Werten im sichtbaren sowie im UV-Licht.

Tabelle 8: Zusammensetzung von Fraktion 2 nach Dünnschichtchromatographie

R _f -Wert	Farbe im sichtbaren Licht	Farbe im UV-Licht
0,54		heller Streifen
0,52 - 0,45		Lila-Blau-Töne
0,44	schwach rosa	heller Streifen
0,43	kräftig gelborange	
0,42		braun
0,4		heller Streifen
0,39	hellgelb	
0,38	schwach rosa	
0,37		lila
0,35		hellblau fluoreszierend
0,34 - 0,26	gelb	hellbraun
0,25	pink	pink
0,23		hellbraun
0,23 - 0,08	Gelbtöne	
0,2		Fluoreszierendes gelb
0,19	schwach lila	
0,17		schwach braunrosa
0,145		Fluoreszierendes gelb
0,12		hellblau fluoreszierend
0,08	rosa	schwach lila fluoreszierend
0,08 - 0	gelbbraun	Bräunlich
0,06		schwach grün fluoreszierend

Tabelle 9: Zusammensetzung von Fraktion 3 nach Dünnschichtchromatographie

R _f -Wert	Farbe im sichtbaren Licht	Farbe im UV-Licht
0,63 - 0,49		Lila
0,48		heller Streifen
0,47	braunrosa	Rosa
0,46		heller Streifen
0,44	rosa	Orangegelb
0,43	gelb	
0,42		hellgelb fluoreszierend
0,39	schwach lilagrau	
0,4 - 0,38		Lila
0,36	rosa	Rosa
0,34 - 0,26	Gelbtöne	
0,34		fluoreszierendes gelb
0,33		Braun
0,29		hellgelb fluoreszierend
0,28		Orange
0,26	pink	Pink
0,24 - 0,2	Gelbtöne	
0,23		Braun
0,21		fluoreszierendes gelb
0,2 - 0,16	bläulich	Blaugrau
0,16	orange mit gelb	Orange
0,15		fluoreszierendes gelb
0,13 - 0,07	braungelb	
0,07	rosa	hellblau fluoreszierend
0,07 - 0	braun	helle Streifen

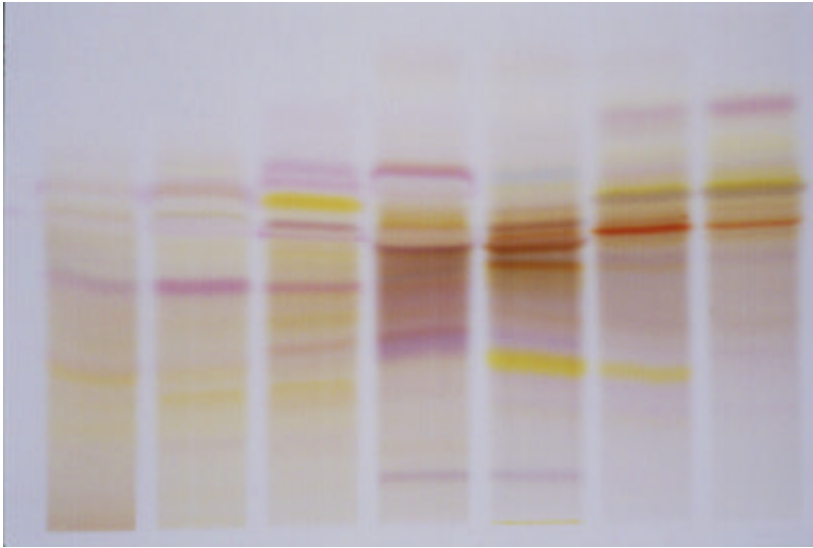


Abbildung 10: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Säulenfraktionen

Besonders auffällig traten in den Fraktionen 2 und 3 die im sichtbaren Licht gelb erscheinenden, im UV-Licht gelbgrün fluoreszierenden Banden mit den R_f -Werten 0,15 bzw. 0,2 hervor. Eine pH-Abhängigkeit der Farbgebung, die durch Bedampfen mit NH_3 bzw. HCl nachgeprüft wurde, konnte bei diesen Substanzen nicht beobachtet werden.

Im Allgemeinen stellten sich die Substanzen auf den DC-Platten als instabil heraus. Bei Lagerung bei Zimmertemperatur und an Luft stellte sich eine deutliche Braunverfärbung sowie ein Fluoreszenzverlust der Substanzen ein, was eine Aufbewahrung der Platten bei -20°C erforderlich machte.

4.1.3 HPLC

4.1.3.1 Analytische HPLC

Die im UV-Licht besonders stark gelb-grün fluoreszierenden Banden aus den Säulenfraktionen 2 und 3 mit den R_f -Werten 0,15 bzw. 0,2 wurden mittels analytischer HPLC weitergehend auf ihre Bestandteile untersucht.

Orientierend wurde zunächst eine Chromatographie mit $10 \mu\text{l}$ der Bande mit dem R_f -Wert 0,2 mit einem Gradienten von 15 bis 60% Acetonitril durchgeführt.

Dabei zeigte das Chromatogramm (UV-Detektor) deutliche Peaks bei ca. 13, 33 und 40 min sowie zahlreiche kleinere Peaks. Das mit dem Fluoreszenzdetektors ermittelte HPLC-Muster wies – neben vielen kleinen – deutliche Ausschläge bei ca. 18, 24 und 31 min sowie einen sehr hervorstechenden Peak bei 33 min auf.

Isokratisch wurde die beste Auftrennung der Bande mit 50% Acetonitril erzielt. Dabei zeigten sich bei der Analyse mit dem Fluoreszenzdetektor der aus verschiedenen Säulenchromatographien hervorgehenden Einzelproben nahezu identische HPLC-Muster mit nur geringfügig differierenden Elutionszeiten der einzelnen Peaks.

Die vom UV-Detektor abgeleiteten Chromatogramme zeigten kein eindeutig übertragbares Muster.

Daher wurde im folgenden die gelbgrün fluoreszierende Bande anhand des vom Fluoreszenzdetektor abgeleiteten HPLC-Musters in vier Fraktionen aufgetrennt:

	Elutionszeit
Fraktion 1	Peak 1 bei ca. 2 min
Fraktion 2	Peak 2 bei ca. 4,5 min
Fraktion 3	Viele kleine Peaks zwischen 4,5 und 20 min
Fraktion 4	Hervorstechender Peak 4 bei ca. 20 min

4.1.3.2 Präparative HPLC

Die präparative Aufreinigung der gelbgrün fluoreszierenden Bande erfolgte isokratisch bei 50% Acetonitril nach oben beschriebener Muster. Insgesamt wurden etwa 10 ml der in 30% Acetonitril / 70% Wasser gelösten Bande aufgereinigt.

Nach Abrotieren des Acetonitrilanteils mittels Rotationsverdampfer und Lyophilisierung erscheinen die aufgereinigten Substanzen wie folgt:

	Sichtbares Licht (pulvrige Trockensubstanz)	UV-Licht (Substanzen in Ethanol gelöst)
Peak 1	Orange-gelb	Grün-gelb fluoreszierend
Peak 2	Schwach orange-gelb	Schwach grün-gelb fluoreszierend
Fraktion 3	Schwach orange-gelb	Schwach grün-gelb fluoreszierend
Peak 4	hellgelb	Schwach grün-gelb fluoreszierend, bläulicher Einschlag

4.1.3.3 Optimierung des HPLC Verfahrens

Erste Versuche zur Strukturanalyse von Peak 1 bzw. Peak 4 in München zeigten, dass die Reinheit der über HPLC aufgereinigten Substanzen noch verbessert werden mußte. Durch eine Optimierung des HPLC-Verfahrens konnte dies erreicht werden.

Nach Auftragen der Dünnschichtbande mit dem R_f -Wert 0,2 auf die präparative Säule ergab sich ein kontinuierliches Elutionsband von 30 bis 160 Minuten, kleinere einzelne Peaks konnten nur am Anfang der Chromatographie sowie gegen Ende aufgelöst werden. Durch Bestrahlung der gesammelten Fraktionen mittels UV-Lampe (366 nm) konnten fluoreszierende Komponenten ausfindig gemacht werden. Dabei stellte sich im Bereich der Fraktionen 60 - 80 eine fluoreszierende Hauptkomponente dar (gelbgrüne Fluoreszenz), die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und einer erneuten präparativen Chromatographie mit einem gespreizten Gradientenprofil unterzogen. Jetzt kam ein Hauptpeak zur Darstellung im Bereich der Fraktionen 90 - 110. Diese Fraktionen zeigten intensive gelbgrüne Fluoreszenz, weitere zur Darstellung kommende erheblich kleinere Peaks zeigten weder Eigenfarbe und Fluoreszenz und wurden verworfen. Die Fraktionen 90 - 110 wurden vereinigt, lyophilisiert und mittels analytischer HPLC auf Reinheit überprüft. Dabei kam ein einzelner Peak (FO22) mit der Elutionszeit von 22 Minuten zur Darstellung (Abbildung 11).

Den Münchner Kooperationspartnern gelang mit dieser gereinigten Substanz die Strukturaufklärung.

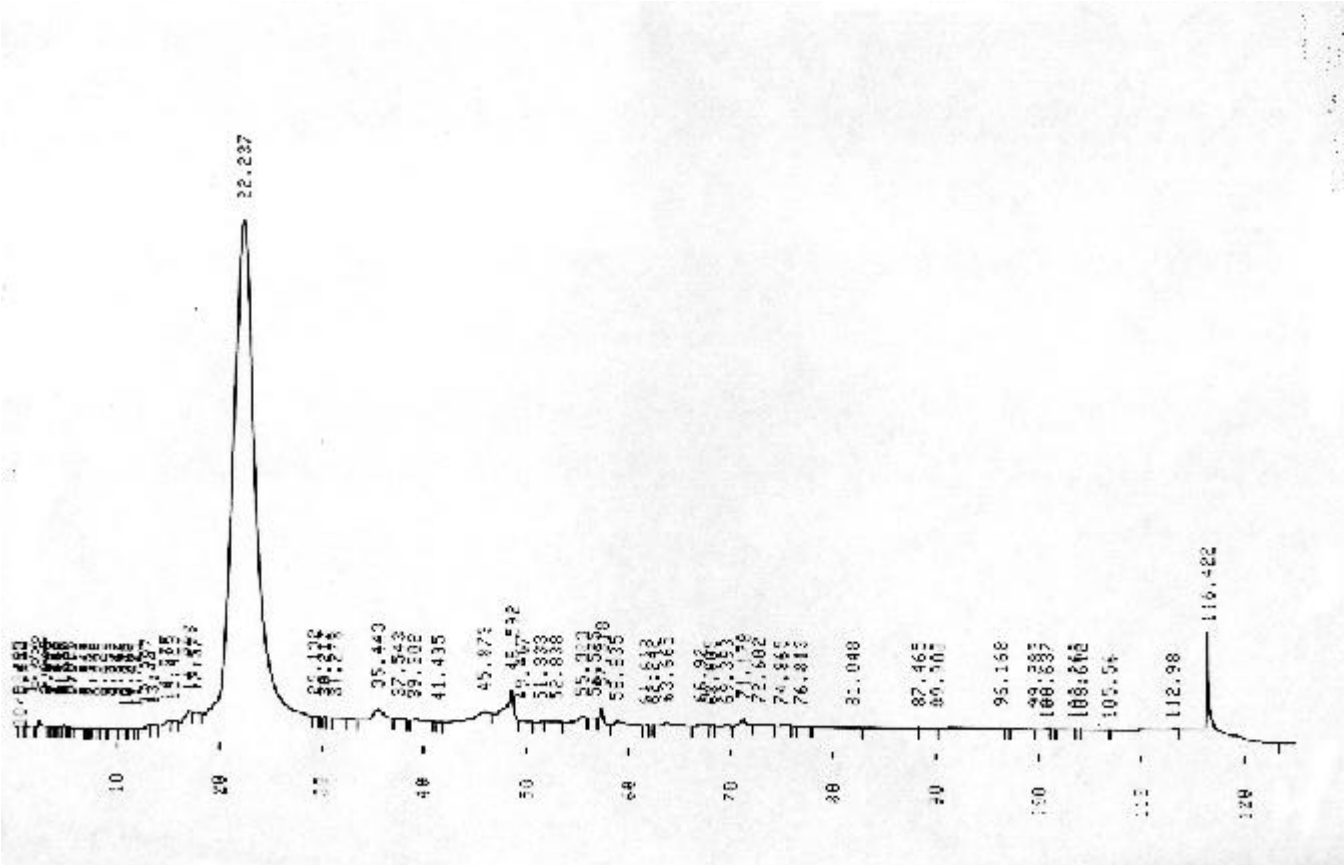


Abbildung 11: Chromatogramm von FO22

4.2 Strukturaufklärung

Aus dem aus 800 Agarplatten gewonnenen Rohextrakt konnte mit Hilfe der beschriebenen chromatographischen Verfahren (Säulen- und Dünnschichtchromatographie sowie HPLC) 0,8 mg FO22 isoliert werden.

Nach Lyophilisation imponiert die Trockensubstanz im sichtbaren Licht als gelbliches Pulver. In Lösung ist im UV-Licht gelblichgrüne Fluoreszenz zu beobachten, die bei längerer Bestrahlung ins bläuliche übergeht und Hinweis auf eine photochemische Reaktion der Verbindung sein kann (Abb. 12).

In Zusammenarbeit mit dem Institut für organische Chemie in München konnte die Struktur des aufgereinigten FO22 geklärt werden. Es handelt sich dabei um eine bisher nicht beschriebene Substanz mit der Summenformel $C_{20}H_{12}N_2O_3$ (Molekulargewicht 328,33). Neben zwei Indolgruppen beinhaltet die Verbindung auch eine Lactonstruktur und wurde daher Pityrialacton genannt (Abb. 13).



Abbildung 12: Fluoreszenzerscheinungen von Pityrialacton

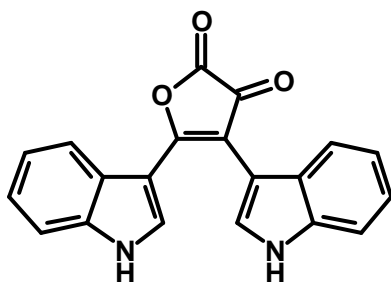


Abbildung 13: Strukturformel von Pityrialacton

4.3 Vorschlag zur Biosynthese

Neben der Aufklärung der Struktur der Substanzen wurde auch ein möglicher Syntheseweg, den *M. furfur* bei der Bildung von Pigmenten und Fluorochromen einschlägt, erstellt.

Zur Induktion der Pigmentbildung wurde ein Nährmedium mit ^{13}C -Tryptophan verwendet, die Markierung erfolgte am Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe (Abb.14). Der Rohextrakt wurde aus den Agarplatten extrahiert und über Säulen-, Dünnschichtchromatographie und HPLC erneut FO22 (Pityrialacton) isoliert.

Im Falle des FO22 (Pityrialacton) ist eine ^{13}C -Isotopenanreicherung an der Carboxyleinheit zu beobachten (Abb.15).

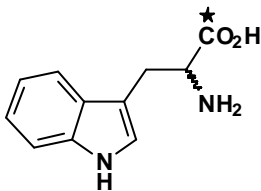


Abbildung 14: ^{13}C -markiertes Tryptophan

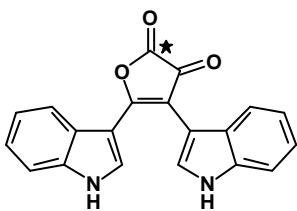


Abbildung 15: ^{13}C -markiertes Pityrialacton

Der Verbleib des markierten C-Atoms in den tryptophanabhängig von *M. furfur* synthetisierten Substanzen lässt Rückschlüsse auf den eingeschlagenen Syntheseweg zu.

Ausgehend vom Einbaumuster des Tryptophan in die synthetisierten Indolverbindungen wurde vom Münchner Kooperationspartner ein Vorschlag zur Biosynthese des Pityrialacton ausgearbeitet (Abb.16).

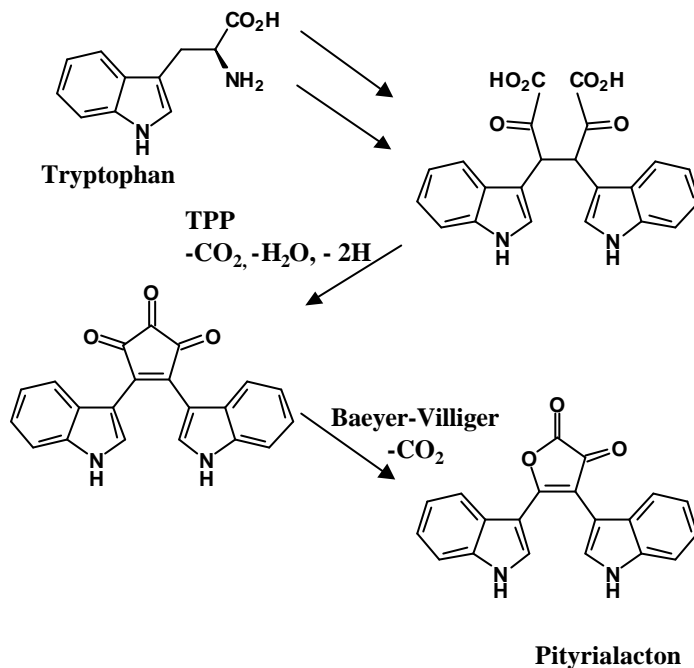


Abbildung 16: Vorschlag zur Biosynthese des Pityrialacton

Dabei kommt es nach oxidativer Dimerisierung zweier Indolylbrenztraubensäuren durch Angriff von Thiaminpyrophosphat (TPP) und Decarboxylierung zur Bildung eines nucleophilen Aldehydäquivalentes. Durch Reaktion mit der aktivierten Carboxylgruppe könnte der Ringschluß zum Fünfring erfolgen, der anschließend dehydriert wird.

Ausgehend von diesem Triketon als zentraler Biosynthesestufe könnte es zur Bildung der verschiedenen Naturstoffe kommen.

Der für die Synthese des Pityrialacton ausgehend vom Triketon eingeschlagene Weg könnte mit der Baeyer-Villiger-Reaktion übereinstimmen. Diese beschreibt die Oxidation von Carbonylgruppen unter Einfluß von Wasserstoffperoxid oder Persäuren zu Estern bzw. Lactonen, den inneren Estern der Hydroxycarbonsäuren (Hassall 1953, Beyer 1991). Auch auf andere Substanzen, die aus dem Rohextrakt isoliert werden konnten, z. B. Bisindolylmaleinsäureanhydrid, könnte dieser Syntheseweg zutreffen.

4.4 Absorptionsspektren

Die vom Rohextrakt bzw. von den gelbgrün fluoreszierenden Substanzen erstellten Absorptionsspektren (200 – 700 nm) weisen deutlich UV-absorbierende Eigenschaften auf.

Absorptionsmaxima zeigen sich vor allem im UVA- und unteren UVB-Bereich.

Tabelle 10 zeigt beispielhaft die Absorptionsmaxima des Rohextraktes sowie der stark gelbgrün fluoreszierenden Säulenfraktionen bzw. DC-Banden. In Abbildung 17 wird das Absorptionsspektrum des Pityrialacton (FO22) dargestellt.

Tabelle 10: Absorptionsmaxima vom Rohextrakt und seinen Bestandteilen (in Ethanol 96%, Merck)

	$\lambda_{\max 1}$	$\lambda_{\max 2}$
Rohextrakt	484	336
Fraktion 2	341	289
Fraktion 3	367	280
DC-Bande (R_f 0,2)	355	269
DC-Bande (R_f 0,15)	346	287

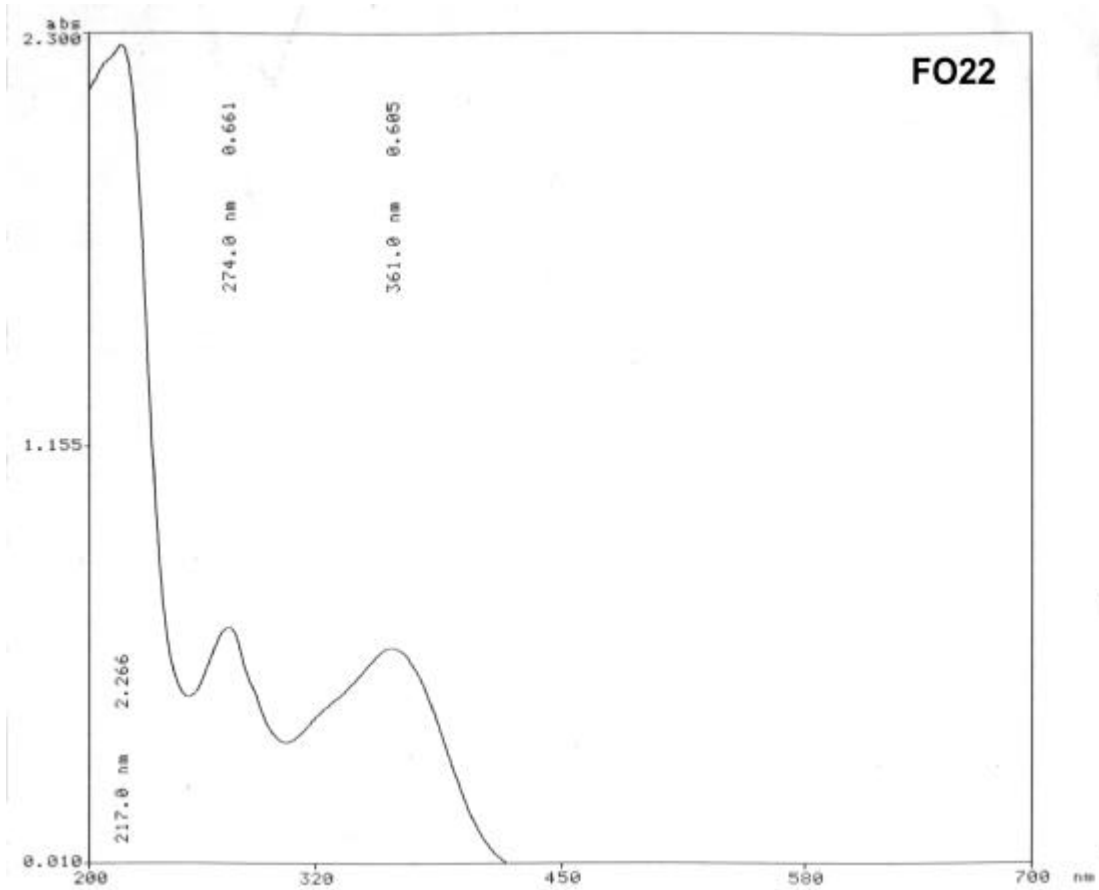


Abbildung 17: Das Absorptionsspektrum des Pityrialacton (FO22) (Ethanol 96%, Merck) zeigt Maxima bei 361 nm sowie bei 274 nm.

4.5 Fluoreszenzspektrum

Von Pityrialacton wurde ein Fluoreszenzspektrum erstellt. In Wasser zeigt Pityrialacton schwachgelbe Fluoreszenz, das Anregungsmaximum liegt bei 366 nm. Im lipophileren Acetonitril liegt das Anregungsmaximum von Pityrialacton bei einer geringfügig niedrigeren Wellenlänge und die Substanz erscheint bläulich (Abb.18).

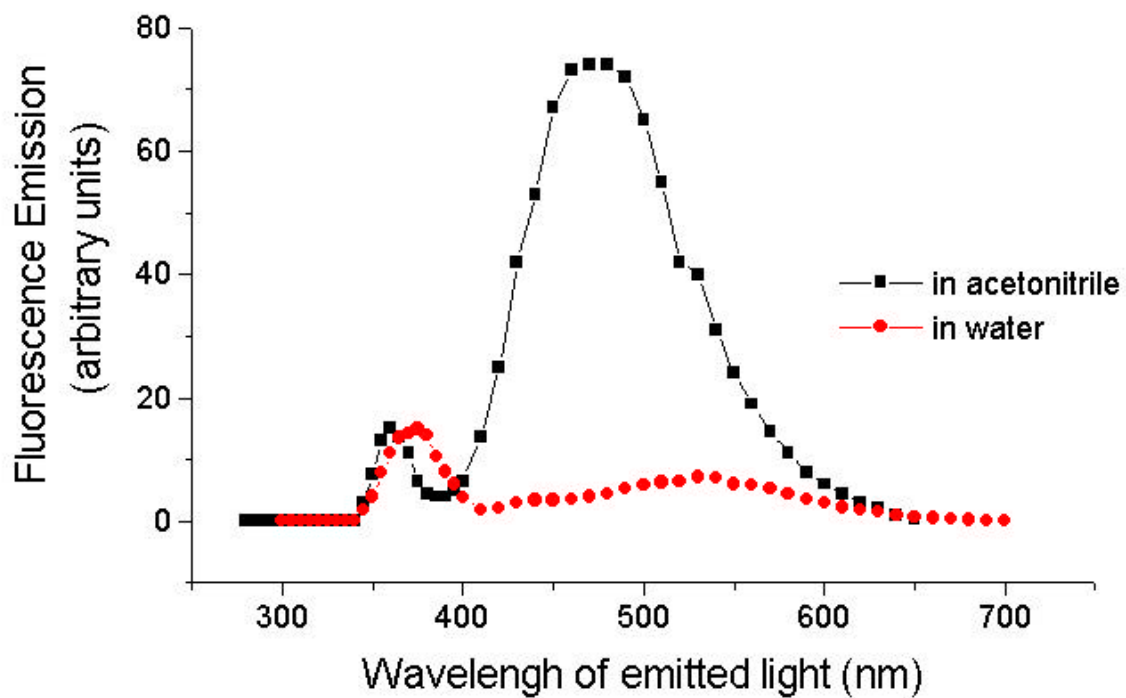


Abbildung 18: Fluoreszenzspektrum von Pityrialacton

4.6 Bestrahlungsversuche

4.6.1 Wachstumsraten ohne UV-Exposition

Die Wachstumsraten ohne UV-Exposition der auf arginin- bzw. tryptophanhaltigem Medium angezüchteten Pilzkulturen mit und ohne Vorbehandlung durch Pilzextrakte wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

4.6.2 Wachstumsraten nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)

Betrachtet man den Effekt des Rohextraktes auf das Kulturwachstum unabhängig von der UV-Exposition, so unterscheiden sich die Wachstumsraten der unbehandelten Kulturen [(Trp) bzw. (Arg), (Abb. 19)] von den Wachstumsraten der mit Rohextrakt vorbehandelten Kulturen [(Trp(R) bzw. Arg(R)] nicht signifikant [$p(\text{Trp})=0,4$ bzw. $p(\text{Arg})=0,5$].

Durch UVA-Bestrahlung wurde das Wachstum der unbehandelten Pilzkulturen [(Arg) bzw. (Trp)] sowie der mit Rohextrakt vorbehandelten Pilzkulturen [(Arg(R) bzw. (Trp(R)] insbesondere durch die hohe Dosis von 200 J/cm^2 deutlich geschwächt (jeweils $p < 0,001$). Entsprechend den Vorarbeiten auf diesem Gebiet (Mayser und Pape 1998) findet man bei den auf argininhaltigem Nährboden gewachsenen Kulturen eine stärkere Wachstumsreduktion durch die Bestrahlung als bei den auf tryptophanhaltigem Nährboden gewachsenen Zellen. Dabei konnte der Bestrahlungseffekt durch die Vorbehandlung mit Pilzextrakten nicht deutlich verändert werden: die mit Rohextrakt vorbehandelten Pilzkulturen [Trp(R) bzw. Arg(R)] zeigten kein signifikant kräftigeres Wachstum als die unbehandelten Kulturen ($p=0,1$ bzw. $p=0,11$) (Abb. 19).

Betrachtet man jedoch die absoluten Zellzahlen sowie die relative Reduktion der Wachstumsraten nach UVA-Bestrahlung (Tab. 11), so zeigen die mit Rohextrakt vorbehandelten Kulturen insbesondere bei 200 J/cm^2 kräftigeres Wachstum als die unbehandelten Vergleichsgruppen.

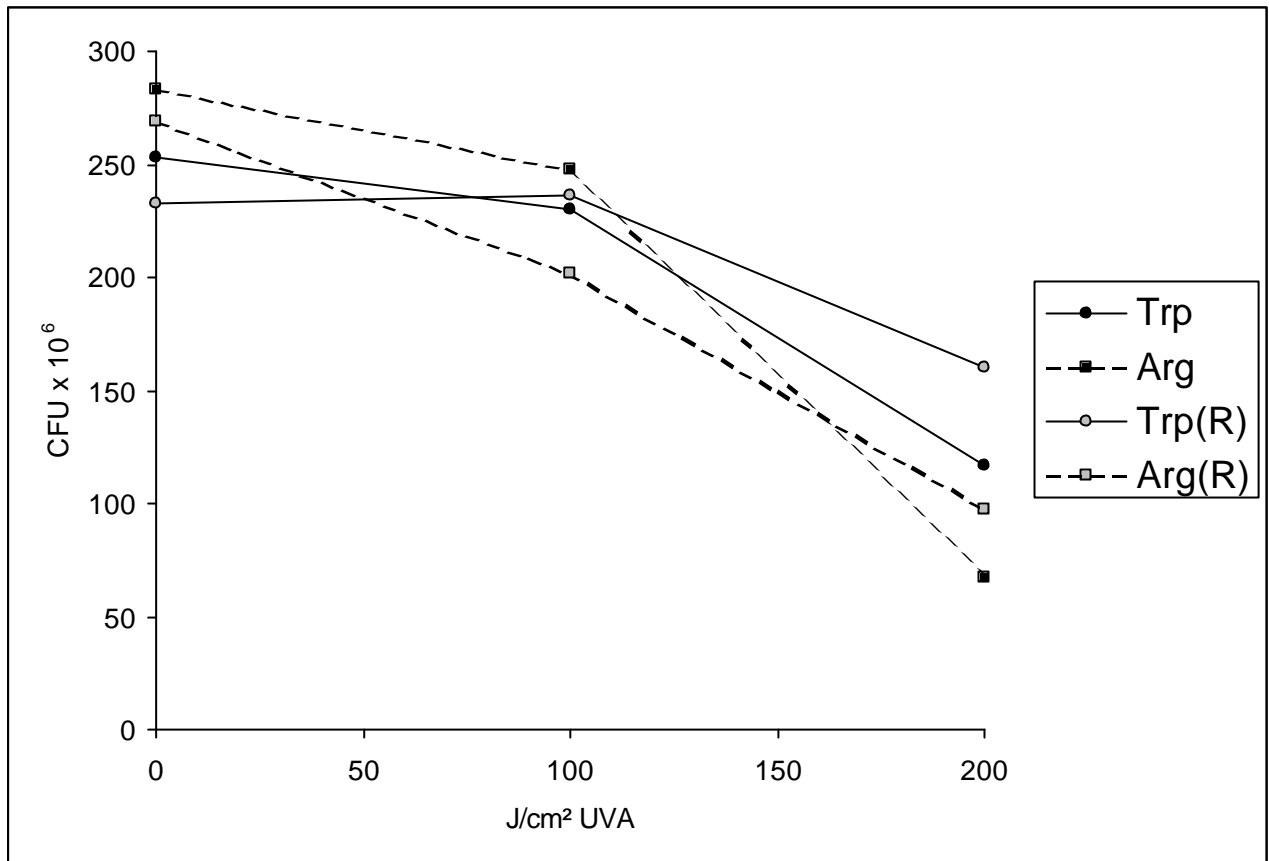


Abbildung 19: Wachstum von CBS 1878 *M. furfur* nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)

Tabelle 11: Relative Reduktion der Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)

	UVA (J/cm ²)	
	100	200
Trp	9,1%	53,8%
Trp(R)	+1,3%	31,1%
Arg	12,7%	76,4%
Arg(R)	25,1%	63,9%

4.6.3 Wachstumsraten nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktionen (10%)

Durch die Behandlung der Kulturen mit den Säulenfraktionen 2 und 3 [Trp(2),Trp(3) bzw. Arg(2), Arg(3), Abb. 20 und Abb. 21] wurden insgesamt keine wesentlichen Veränderungen der Wachstumsraten im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen [(Trp) bzw. (Arg)] hervorgerufen ($p(\text{Trp})=0,1$ bzw. $p(\text{Arg})=0,5$).

Die bereits oben beschriebene Wirkung der UVA-Bestrahlung auf die Pilzkulturen wurde erneut bestätigt, es zeigten sich signifikant reduzierte Wachstumsraten bei allen Ansätzen (jeweils $p<0,001$) (Abb. 20, 21).

Bei den auf tryptophanhaltigem Nährboden gewachsenen Kulturen wirkt die UV-Bestrahlung unabhängig von der Vorbehandlung mit Säulenfraktionen: die Wachstumsraten wurde durch Vorbehandlung mit Säulenfraktionen [Trp(2) bzw. (3)] gegenüber den unbehandelten Kulturen (Trp) zwar reduziert, jedoch nicht signifikant ($p=0,403$).

Bei den auf argininhaltigem Nährboden angezüchteten Kulturen zeigten die mit Säulenfraktionen vorbehandelten Kulturen [Arg (2) bzw. (3)] tendenziell schwächeres Wachstum als die unbehandelten Kulturen ($p=0,05$), eine Wechselwirkung zwischen UV-Bestrahlung und Vorbehandlung mit Säulenfraktionen kann hier vermutet werden.

Die Betrachtung der absoluten Zellzahlen und relativen Reduktion der Wachstumsraten zeigt im Gegensatz zu den mit Rohextrakt vorbehandelten Zellen insgesamt einen Rückgang des Pilzwachstums unter UVA-Bestrahlung bei Vorbehandlung mit Säulenfraktionen (Abb. 19 und Tab. 11). Dieser Effekt ist sowohl bei den auf tryptophan- als auch auf argininhaltigem Nährmedium gewachsenen Kulturen zu beobachten und scheint bei Säulenfraktion 2 stärker ausgeprägt zu sein als bei Säulenfraktion 3 (Tab. 12).

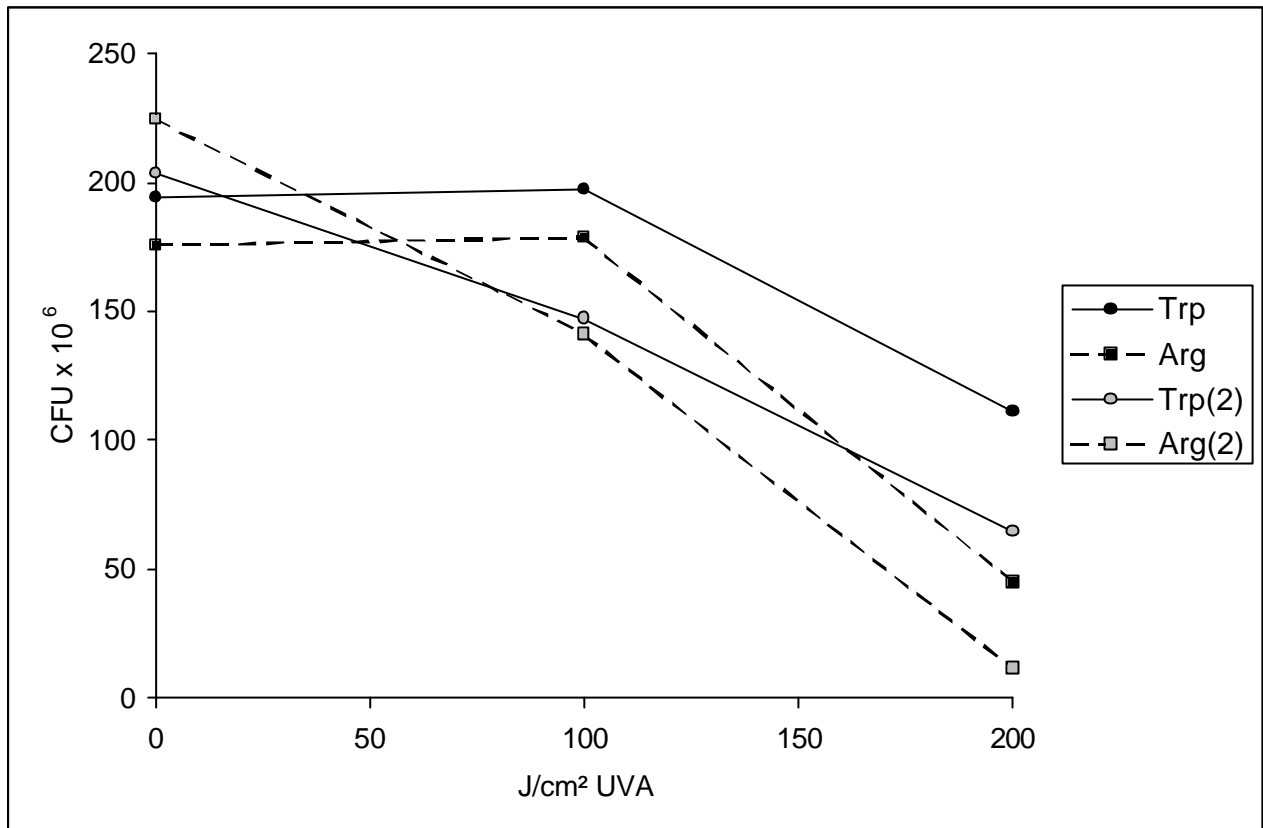


Abbildung 20: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktion (2)

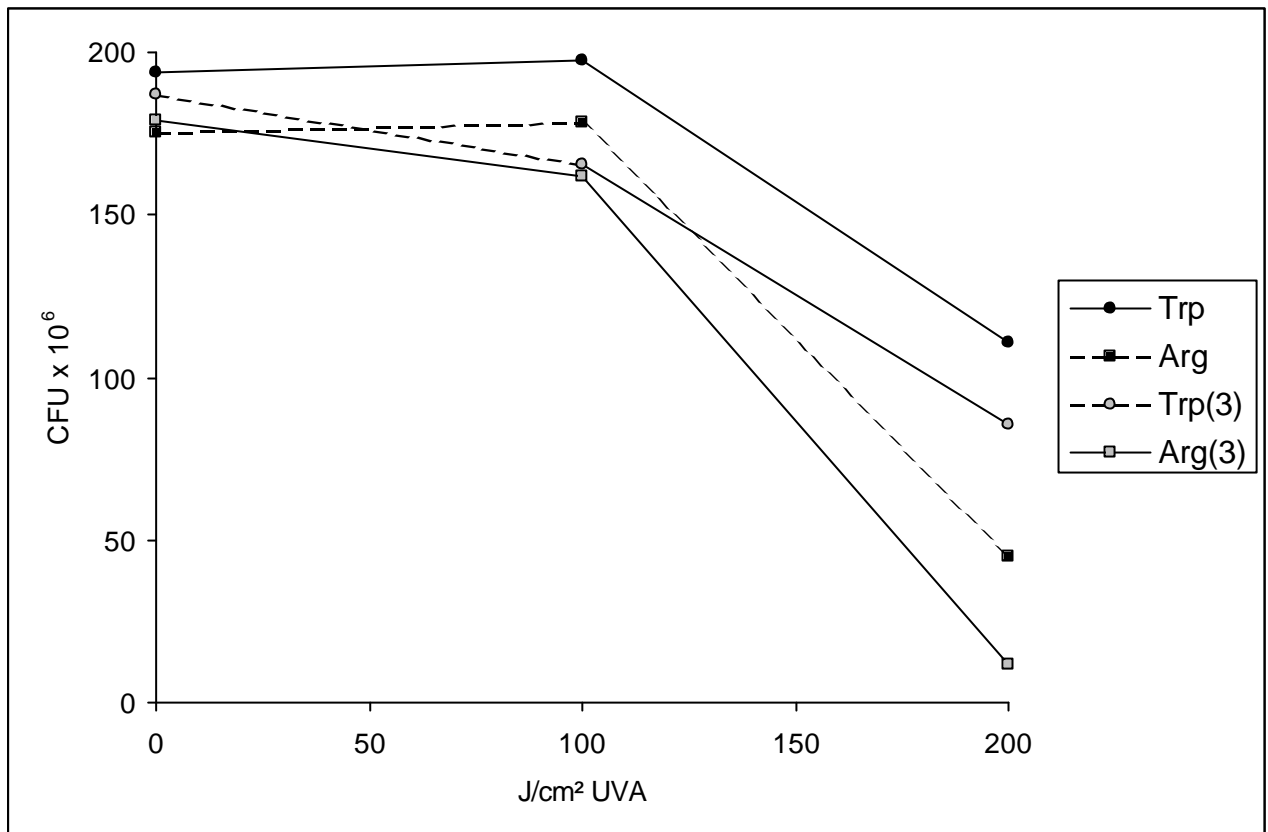


Abbildung 21: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktion (3)

Tabelle 12: Relative Reduktion der Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktion 2 bzw. 3

	UVA (J/cm ²)	
	100	200
Trp	+1,8%	42,8%
Trp(2)	27,8%	68,3%
Trp(3)	11,5%	54,3%
Arg	+1,7%	74,4%
Arg(2)	37,2%	94,9%
Arg(3)	9,5%	93,6%

4.6.4 Wachstumsraten nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)

Die UVB-Bestrahlung mit 500, 1000 und 2000 mJ/cm² wirkt auf die Pilzkulturen signifikant wachstumsreduzierend (jeweils $p < 0,001$ bei den Zellen von Dix/Trp bzw. Dix/Arg). Der Rückgang der Zellzahlen abhängig von der Bestrahlungsdosis ist erwartungsgemäß bei den auf argininhaltigem Nährboden gewachsenen Kulturen stärker ausgeprägt.

Die vor Inokulation und Bestrahlung in Pilzextrakt gebadeten Zellen [(Trp(R), Arg(R))] zeigen nach der 5-tägigen Inkubation ein deutlich kräftigeres Wachstum als die unbehandelten Kulturen von tryptophan- bzw. argininhaltigem Nährboden (jeweils $p < 0,001$).

Zwischen den Einflußgrößen Bestrahlungsdosis und Zugabe von Pilzextrakt besteht hier eine signifikante Wechselwirkung: bei Vorbehandlung mit Rohextrakt kann der wachstumsvermindernde Einfluß der UVB-Bestrahlung auf die Pilzkulturen stark abgeschwächt werden ($p(\text{Trp})=0,002$ bzw. $p(\text{Arg})=0,001$), was sich im flacheren Kurvenverlauf in der graphischen Darstellung (Abb. 22) als auch in der geringeren Reduktion der Wachstumsraten (Abb. 22 und Tab. 13) widerspiegelt.

Dabei ist die lichtschützende Wirkung durch das von außen zugeführte Rohextrakt bei den Kulturen von argininhaltigem Nährboden stärker ausgeprägt. Die Differenzen der Koloniegrößen der Kulturen von tryptophan- und argininhaltigem Medium nehmen deutlich ab: [(Trp)- (Arg)] > Trp(R)-Arg(R)]

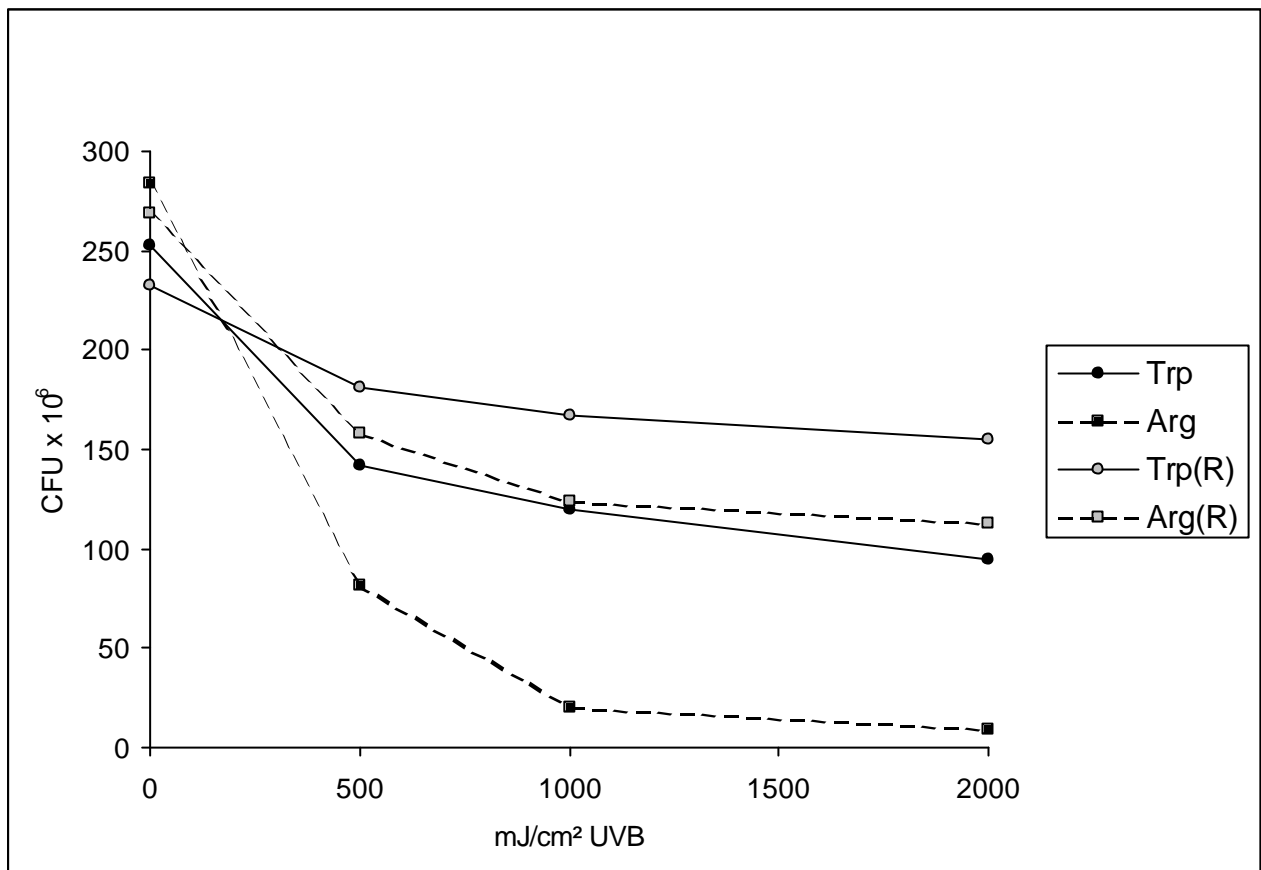


Abbildung 22: Wachstums von *M. furfur* CBS 1878 nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)

Tabelle 13: Relative Reduktion der Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)

	UVB (mJ/cm ²)		
	500	1000	2000
Trp	44,1%	52,8%	62,45%
Trp(R)	22,1%	28,1%	33,3%
Arg	71,3%	92,8%	96,6%
Arg(R)	41,1%	54,1%	58,8%

4.6.5 Wachstumsraten nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktionen (10%)

Die UVB-Exposition wirkt auf die auf tryptophan- bzw. argininhaltigem Nährmedium angezüchteten Pilzkolonien signifikant wachstumsreduzierend (jeweils $p < 0,001$). Während die Vorbehandlung der auf tryptophanhaltigem Nährboden gewachsenen Zellen mit den Säulenfraktionen 2 und 3 [Trp(2),(3)] zu keinen signifikanten Veränderungen des Wachstumsverhaltens führt ($p = 0,74$), zeigen sich bei den auf argininhaltigem Nährboden gewachsenen Zellen signifikant höhere Wachstumsraten ($p = 0,001$) unter Zusatz der Säulenfraktionen [Arg(2),(3)]. Die schädigende Auswirkung der Bestrahlungsdosis auf das Zellwachstum kann hier durch den Zusatz der Pilzextrakte, vor allem bei 500 und 1000 mJ/cm^2 , vermindert werden (Abb. 23 und 24, Tab. 14).

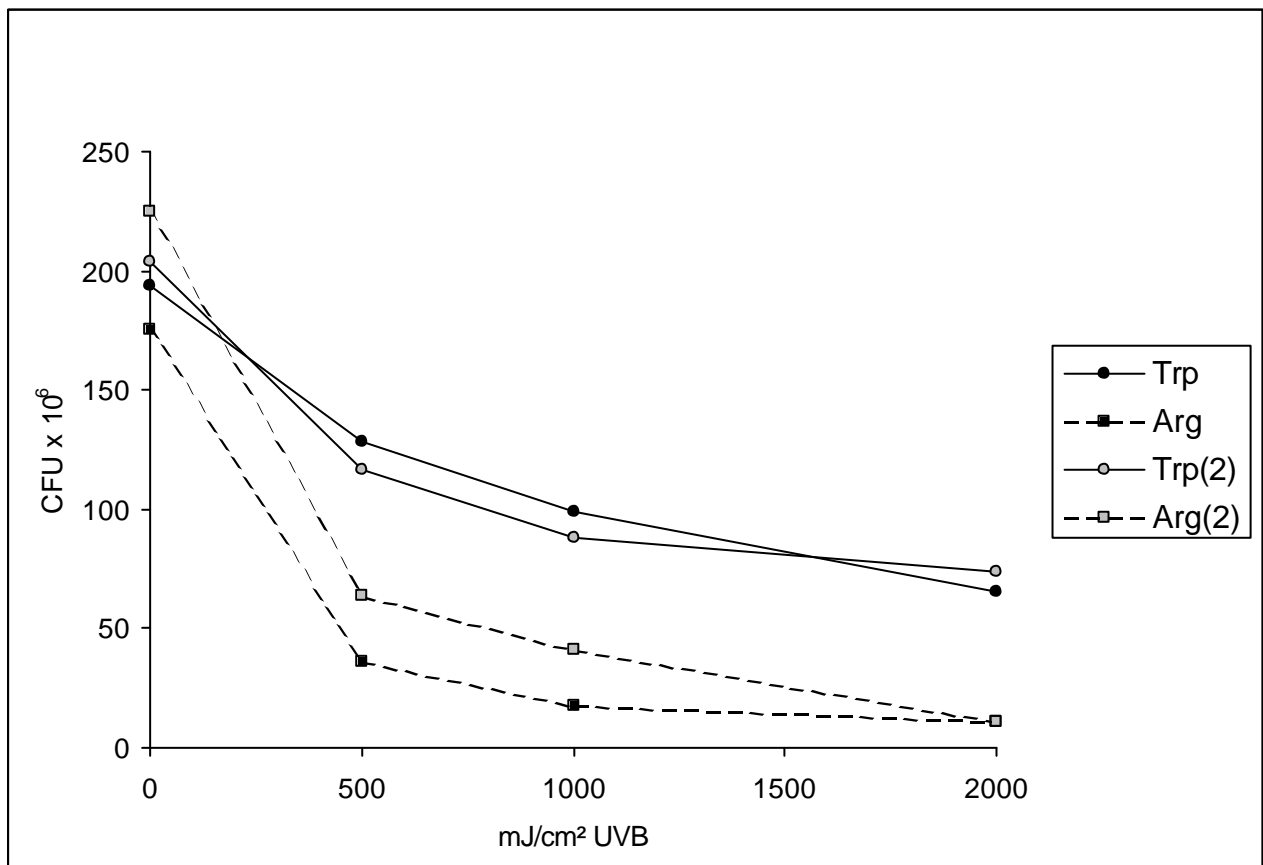


Abbildung 23: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 nach UVB -Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktion 2

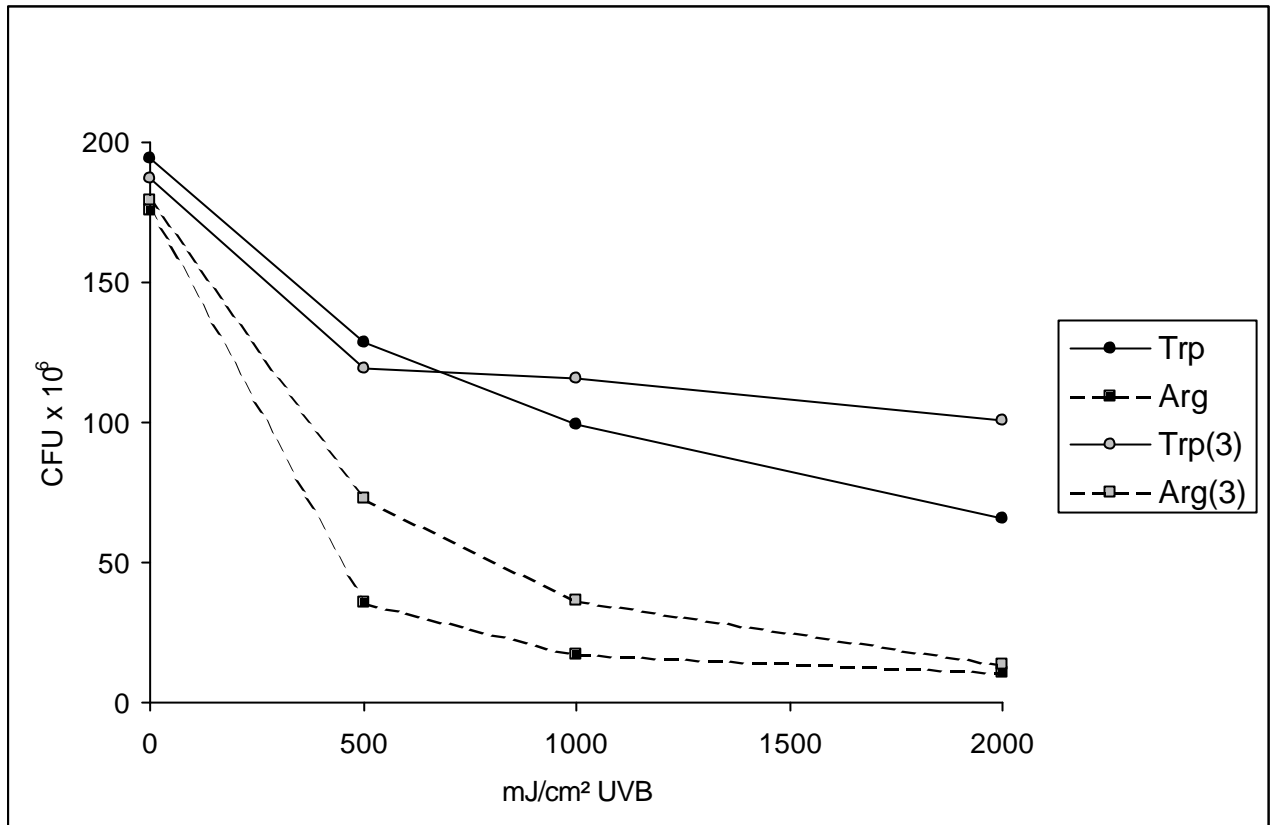


Abbildung 24: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktion 3

Tabelle 14: Relative Reduktion der Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit den Säulenfraktionen 2 bzw. 3

	UVB (mJ/cm ²)		
	500	1000	2000
Trp	33,8%	48,9%	66,3%
Trp(2)	42,5%	56,5%	63,6%
Trp(3)	36,1%	38,2%	46,0%
Arg	79,5%	90,0%	94,0%
Arg(2)	71,5%	81,5%	93,5%
Arg(3)	59,2%	79,6%	92,5%

4.6.6 Wachstumsraten nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB und Vorbehandlung der Pilzkulturen mit Säulenfraktionen (25% bzw. 50%)

Durch Vorbehandlung mit Säulenfraktion 2 (25% Fraktion 2 in DMSO/ 75%NaCl) und Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB wurde das Wachstum der Pilzkulturen gegenüber den unbestrahlten Zellen um 91,9% geschwächt, bei Verwendung von Säulenfraktion 2 (50% Fraktion 2 in DMSO/50%NaCl) betrug die Reduktion der Wachstumsrate nur 75%. Durch Baden der Pilze in Säulenfraktion 3 (25% bzw. 50%) vor Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB werden die Wachstumsraten nur um 14,83% bzw. 28,5% reduziert (Tab. 15).

Die Aussagekraft dieser Beobachtungen bleibt im Zusammenhang mit der kleinen Probengröße bei diesem Versuch (jeweils 3 Werte) und der ungeklärten genauen Zusammensetzung der Säulenfraktionen fraglich. Von einer deutlichen Konzentrationsabhängigkeit der Lichtschutzwirkung kann noch nicht gesprochen werden, Tendenzen in diese Richtung können – bei Säulenfraktion 3 hier stärker ausgeprägt als bei Säulenfraktion 2 – vermutet werden.

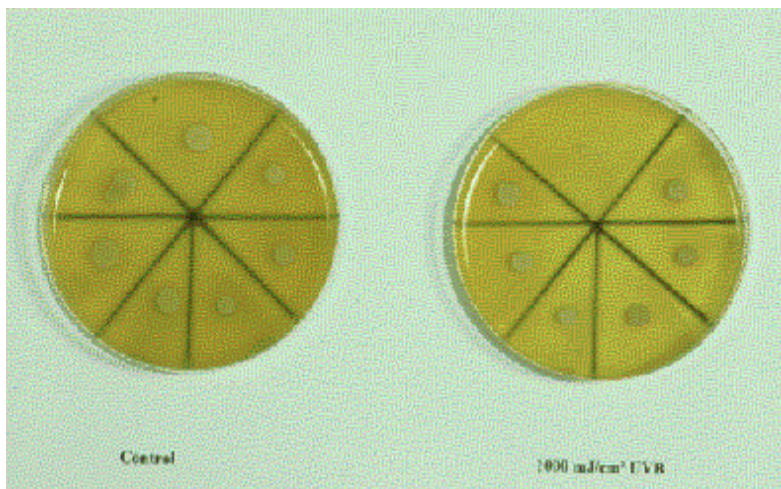
Tabelle 15: Relative Reduktion der Wachstumsraten nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB und Vorbehandlung der Pilzkulturen mit Säulenfraktionen (25% bzw. 50%)

	1000 mJ/cm ² UVB	
	25%	50%
Arg	95%	96.28%
Arg(2)	91,9%	75%
Arg(3)	14,83%	28,5%

4.6.7 Auftropfversuche

4.6.7.1 Vorbehandlung mit Pilzpigmenten (DC-Banden)

Durch die Auftropfversuche konnte die lichtschützende Wirkung verschiedener Säulenfraktionen und DC-Banden vor allem qualitativ, teilweise auch quantitativ dargestellt werden. Die vorbehandelten Kulturen zeigten dabei nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB deutlich kräftigeres Wachstum als die Kontrollen. Dies konnte auch in entsprechenden



Versuchen mit *Candida albicans* beobachtet werden. (Abb. 25 - 27)

Abbildung 25: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 (Dix/Arg) nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB

Oben: Kontrolle

Gegen den Uhrzeigersinn: Säulenfraktionen 1 – 6

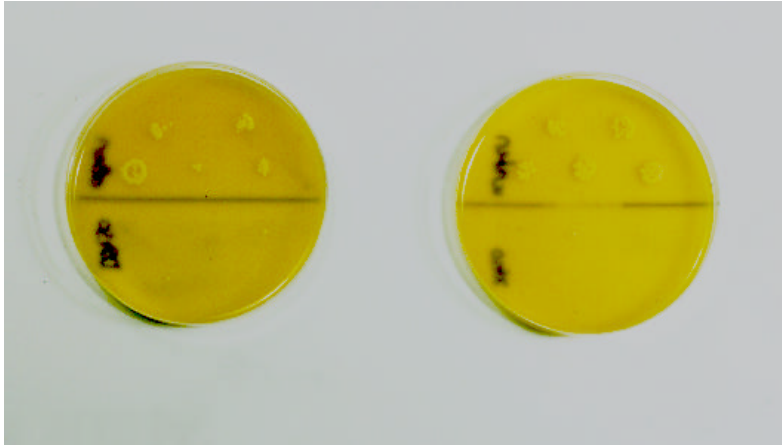


Abbildung 26: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 (Dix/Arg) nach Vorbehandlung mit DC-Banden und Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB

Oben: RF = 0,2 bzw. 0,15

Unten: Kontrolle

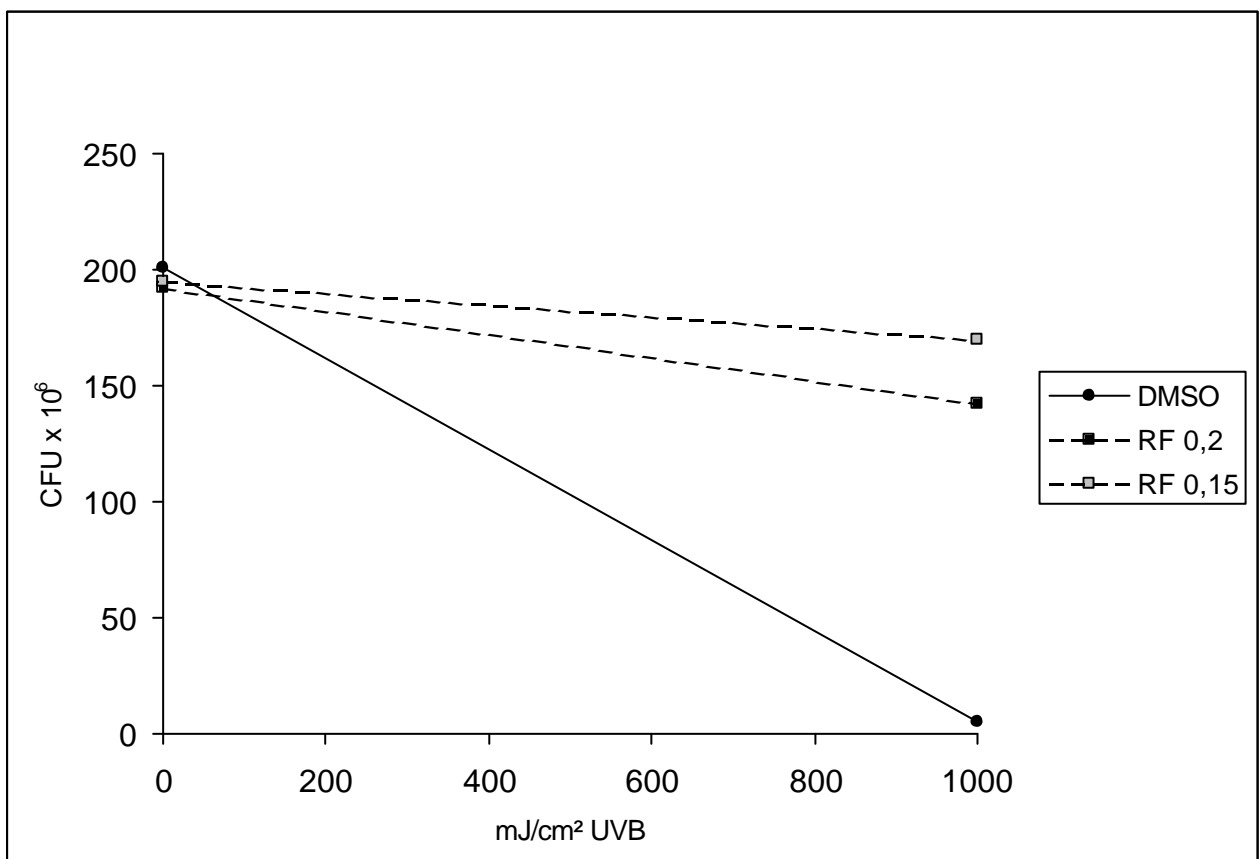


Abbildung 27: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 (Dix/Arg) nach Vorbehandlung mit DC-Banden (Rf= 0,2 bzw. Rf=0,15) und Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB

Die Abbildungen 26 und 27 zeigen, daß durch die dünnschichtchromatographisch aufgereinigten fluoreszierenden Banden ein deutlicher Lichtschutz auf die auf argininhaltigem Nährboden angezüchteten Zellen bei Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB ausgeübt wird. Die Wachstumsraten der durch Pilzextrakt (DC-Bande mit RF= 0,2 bzw. 0,15) vorbehandelten Zellen ist gegenüber den mit reinem DMSO behandelten Kulturen signifikant höher (jeweils p= 0,0022).

Die Wirkung der UV-Bestrahlung auf das Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 konnte auch bei Ersatz der Pilzextrakte durch handelsübliche Sonnenschutzmittel mit LSF 20 und 60 reduziert werden. Auch das Wachstum von Zellen von *Candida albicans* war bei Vorbehandlung mit Rohextrakt bzw. den Säulenfraktionen 2 bzw. 3 sowie handelsüblichen Sonnenschutzmitteln höher als das der unbehandelten Kulturen (Abb. 28 - 30).

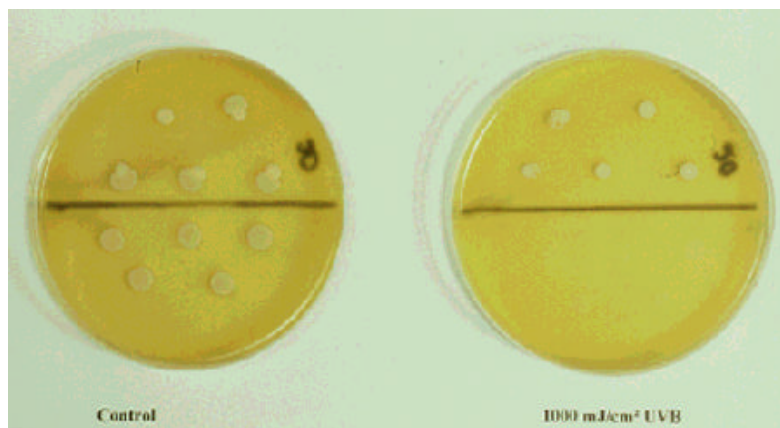


Abbildung 28: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 ohne Bestrahlung (links) bzw. nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB (rechts)

Oben: mit Sonnenschutzmittel LSF 20

Unten: Kontrolle

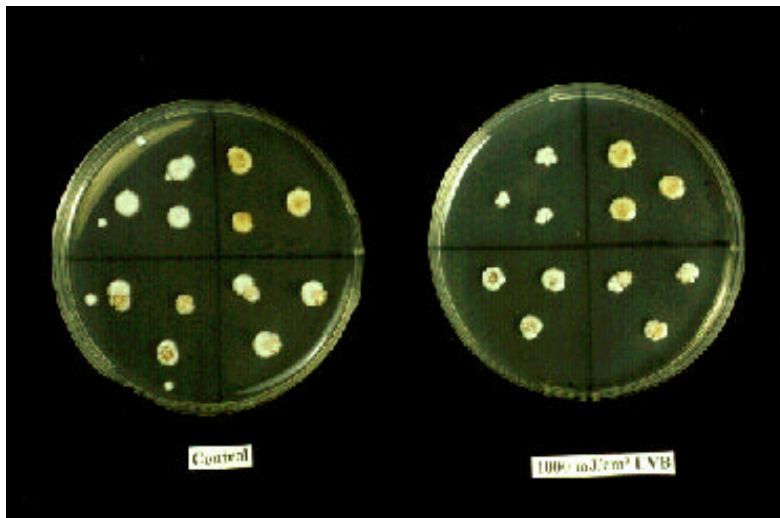


Abbildung 29: Wachstum von *Candida albicans* ohne Bestrahlung (links) bzw. nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB (rechts)

Links oben: Kontrolle mit DMSO, im Uhrzeigersinn: Rohextrakt, Fraktion 2, Fraktion 3

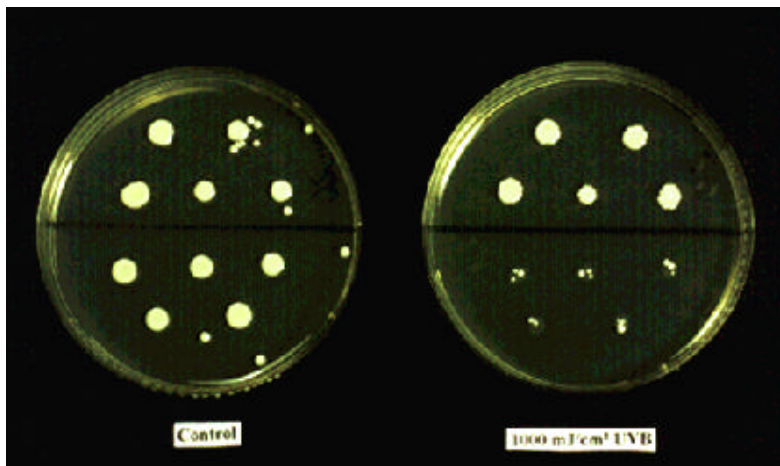


Abbildung 30: Wachstum von *Candida albicans* ohne Bestrahlung (links) bzw. nach Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB (rechts)

Oben: mit Sonnenschutzmittel LSF 20

Unten: Kontrolle

5 Diskussion

Obligat lipophile Hefen der Gattung *Malassezia* gehören zur residenten Keimflora der menschlichen Haut. Unter bestimmten Bedingungen kommt es zur Manifestation der Pityriasis versicolor, einer der häufigsten erregerbedingten Hauterkrankungen. Eine große Bedeutung wird unter den verschiedenen beschriebenen Prädispositionsfaktoren einem feuchtwarmen Makroklima und einer erhöhten Schweißneigung zugeschrieben. Entsprechend ihrem Beinamen „versicolor“ ist die Krankheit charakterisiert durch pityriasiform schuppende, z.T. großflächig konfluierende Läsionen unterschiedlichster Farbgebung: die Palette reicht von schwarz über dunkelbraun bis milchkaffeefarben, auch ins gelbe und rötliche gehende Hautveränderungen werden beschrieben (Castellani 1913, Ruete 1933, Hay 1996). Dabei wird ein Zusammenhang der Farbe der Hautveränderungen mit dem Krankheitsstadium vermutet: frische Läsionen zeigen eher eine rosa-rote Eigenfarbe, während sich ältere Veränderungen in verschiedenen Brauntönen darstellen (Ruete 1933). Bevorzugt unter UV-Bestrahlung, aber auch an bedeckten Körperstellen können sich die hyperpigmentierten in depigmentierte Areale umwandeln. Die Entstehung der depigmentierten Areale kann durch den Nachweis von Tyrosinase-Inhibitoren aus dem Rohextrakt erklärt werden (Thoma 2001) und stützt neben Überlegungen zu einer postinflammatorischen Hypopigmentierung (Castellani 1913) und dem Vorliegen eines Pseudoleukoderms (Lutz 1892; Kistiakovky 1927, Lewis 1936, Wertheim 1928) die Hypothese von der Depigmentierung zugrundeliegenden toxischen Einflüssen auf die Melaninsynthese (Ruete 1933, Sulzberger in Lewis 1935, El-Gothamy 1975, Jung 1976).

Neben Hyper- und Depigmentierung stellen die als blaß-gelb, rötlichgelb und gelblichgrün beschriebenen Fluoreszenzerscheinungen im Woodlicht ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Läsionen im Rahmen der Pityriasis versicolor dar (Roberts 1969, Hay 1996, Braun-Falco 1996). Bereits zu Anfang des 20. Jahrhunderts wurde beobachtet, dass die Sonnenbrandneigung in den depigmentierten Arealen erstaunlicherweise nicht erhöht ist (Ruete 1933). Schon damals wurde dieses Phänomen mit den von *M. furfur* gebildeten fluoreszierenden Substanzen in Zusammenhang gebracht (Kistiakovsky 1927).

In vitro ist auf einem Minimalmedium mit einer Lipidquelle und der Aminosäure Tryptophan die Bildung eines rot-braunen Substanzgemisches induzierbar. Es handelt sich um eine Vielzahl von Pigmenten und Fluorochromen, die einen Erklärungsansatz zur Pathogenese der für die Pityriasis versicolor charakteristischen Läsionen darstellen können (Mayser 1998).

Mayser und Pape konnten 1998 zeigen, dass *M. furfur* durch die Bildung dieses Substanzgemisches einen potenten Lichtschutz im UVA- und UVB-Bereich gewinnt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden speziell die auffällig gelbgrün fluoreszierenden Substanzen unter den schon eingangs formulierten Fragestellungen untersucht. Ziel war es,

- 1) die Substanzen strukturell aufzuklären und in einen möglichen Syntheseweg einzubetten,
- 2) durch die Identifizierung dieser Substanzen einen Erklärungsansatz der fluoreszierenden Hautläsionen bei der Pityriasis versicolor zu gewinnen sowie
- 3) die Funktion der Fluorochrome hinsichtlich ihrer möglichen Lichtschutzwirkung zu überprüfen.

Durch säulen- und dünnschichtchromatographische Aufreinigung des tryptophanabhängig gebildeten rot-braunen Pigmentes konnte gezeigt werden, dass dieses aus einer Vielzahl von Pigmenten und Fluorochromen besteht.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der stark fluoreszierender Säulenfraktionen 2 und 3 zeigte zwei hervorstechend gelbgrün fluoreszierende Banden. Aus der Bande mit dem R_f -Wert 0,2 konnte über HPLC ein erstes Fluorochrom, das FO22, isoliert werden. Dabei konnte aus 800 Agarplatten nur eine verhältnismäßig geringe Menge (0,8 mg) FO22 rein dargestellt werden. Dennoch scheint es maßgeblich an der gelbgrünen Fluoreszenz der Säulenfraktion 2 und 3, die ein Substanzgemisch aus vielen Komponenten darstellen, beteiligt zu sein. Im sichtbaren Licht ist die Trockensubstanz hellgelb und zeigt in Lösung gelbgrüne Fluoreszenz. Ähnliche Farbgebungen wurden auch bei den übrigen, noch nicht weitergehend aufgeklärten Inhaltsstoffen dieser Bande (R_f -Wert 0,2) beobachtet.

Das FO22 erweist sich unter UV-Bestrahlung als instabil, was sich in einem Farbumschlag von der gelbgrünen in eine bläuliche Fluoreszenz äußert. Die Instabilität der Fluorochrome wurde schon früher durch TRT-Technik nachgewiesen (Mayser 1998) und findet auch in der Klinik der Pityriasis versicolor ein Korrelat: die Hautläsionen zeigen im Wood-Licht Fluoreszenzerscheinungen in unterschiedlichen Farbschattierungen. Auch Läsionen, die im sichtbaren Licht nicht zu erkennen waren, treten dabei hervor. Zum anderen zeigen nicht alle im sichtbaren Licht nachweisbaren Herde Fluoreszenzerscheinungen (Roberts 1969). Ein Zusammenhang mit der Aktivität der Erkrankung wird hier vermutet.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für organische Chemie, LMU München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Steglich, konnte die Struktur des FO22 aufgeklärt werden. Die bisher unbekannte Substanz mit der Summenformel $C_{20}H_{12}N_2O_3$ besteht aus zwei Indolgruppen, die über einen Fünfring mit einer Lactoneinheit verbunden sind und wurde dementsprechend Pityrialacton (Abb. 12) genannt (Stapelkamp 2001).

Im Fluoreszenzspektrum liegt das Anregungsmaximum von in Wasser gelöstem Pityrialacton interessanterweise bei 366 nm, entsprechend der Wellenlänge des Wood-Lichtes. Das Anregungsmaximum in Acetonitril liegt etwas niedriger. In wässriger Lösung fluoresziert Pityrialacton blaßgelb und in Acetonitril bläulich. Auf der Haut kommen ebenfalls sowohl wässrige als auch lipophilere Substanzen als Lösungsmittel vor. Abhängig von der Schweiß- und Talgproduktion des Patienten könnten so die Farbvariationen der fluoreszierenden Läsionen bei der Pityriasis versicolor (Tab. 2) erklärt werden (Mayser 2003).

Als möglicher Syntheseweg des Pityrialactons wird ausgehend von Tryptophan zunächst die Bildung einer zentralen Biosynthesestufe vermutet. Ausgehend vom Triketon könnte anschließend das Pityrialacton über einen der Baeyer-Villiger-Reaktion entsprechenden Mechanismus entstehen (Abb. 16).

Dieser Mechanismus wird auch bei einer anderen aus dem Rohextrakt isolierten Substanz, dem Pityriaanhydrid, vermutet. Pityriaanhydrid (Summenformel $C_{20}H_{12}N_2O_3$) ist ein Strukturisomer von Pityrialacton und zeigt anstelle der Lacton- eine Anhydridstruktur. Als Trockensubstanz ist Pityriaanhydrid (R_f -Wert 0,46, Fraktion 4) rötlichorange und fluoresziert in Lösung nicht. Untersuchungen zur Funktion des Pityriaanhydrids stehen noch aus. Wie Pityrialacton wurde Pityriaanhydrid Substanz (Abb. 31) bisher nicht als Naturstoff beschrieben, tritt aber als Zwischenstufe bei der Synthese der Bisindolylmaleimide, Inhibitoren der Proteinkinase C, auf.



Abbildung 31: Pityrialacton (links) und Pityriaanhydrid (rechts): die beiden Substanzen unterscheiden sich nur durch die Lacton – bzw. Anhydridgruppe.

Aus den Fruchtkörpern des Schleimpilzes *Arcyria denudata* konnten dem Pityriaanhydrid verwandte Substanzen, die Arcyriarubine A – C isoliert werden. Auch die Arcyriarubine zeigen ausgeprägte strukturelle Verwandtschaften zu den Bisindolylmaleimiden (Steglich et al. 1980).

Weitere strukturverwandte aus dem Rohextrakt isolierte leuchtendrote Substanzen stellen die Pityriarubine dar. Auch die Pityriarubine haben eine enge strukturelle Beziehung zu den Bisindolylmaleimiden und zeigen Wirkung als Proteinkinase-C-Hemmer im Nanomolbereich (Krämer 2001), was die gering ausgeprägte Entzündungsreaktion bei der Pityriasis versicolor erklären könnte (Hay 1996).

Der Vorschlag zur Biosynthese der isolierten Substanzen kann durch das Einbaumuster des markierten Kohlenstoffatoms nach Verfütterungsexperimenten von $[1-^{13}\text{C}]$ -Tryptophan unterstützt werden: die ^{13}C -Isotopenanreicherung ist an den Carboxyleinheiten zu beobachten (Abb. 32). Dieses Einbaumuster stimmt mit dem Biosynthesevorschlag überein.



Abbildung 32: ^{13}C markiertes Pitariolacton

Insgesamt könnte die Isolierung und strukturelle Aufklärung der tryptophanabhängig gebildeten Substanzen dazu beitragen, komplexe Stoffwechselwege von *Malassezia furfur* und die Pathogenese der Pityriasis versicolor aufzuklären.

Bei der Baeyer-Villiger-Reaktion im Speziellen handelt es sich um einen Reaktionsweg aus der organischen Chemie, bei dem es durch Oxidation von Carbonylgruppen unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid- oder Persäureäquivalenten zur Bildung von Estern bzw. Lactonen, den inneren Estern der Hydroxycarbonsäuren (Hassall 1953, Beyer 1991) kommt (Abb. 33).

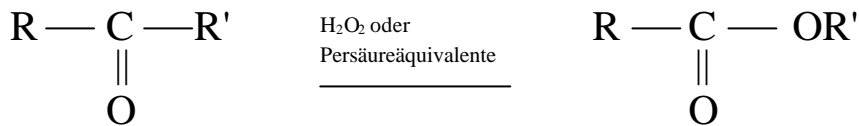


Abbildung 33: Baeyer-Villiger-Reaktion

Übertragen auf die Hautoberfläche könnte sich neben der Synthese von stark UV-absorbierenden Substanzen, die weiter unten diskutiert wird, aus diesem tryptophanabhängig von *M. furfur* eingeschlagenen Stoffwechselweg ein weiterer Nutzen ergeben.

Unter starker UV-Bestrahlung, der die mit PV befallene Haut durch ihr gehäuftes Auftreten in tropischen Gebieten bzw. den Sommermonaten in gemäßigten Zonen zumeist ausgesetzt ist, kommt es in der Haut zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Dieser Vorgang wird zu einem großen Teil durch UVA-Strahlung, aber auch von durch UVB-Strahlung aktiviertem Tryptophan getriggert und kann zu zellschädigenden Wirkungen führen. Das Ausschöpfen dermalen und epidermalen Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress kann schließlich zur Entstehung einer UV-induzierten Entzündungsreaktion der Haut, klinisch sichtbar in der Ausbildung eines Lichterythems, beitragen (Babu 1992, Hruza 1993, Young 1998, Yasui 2000).

Bei dem von *Malassezia furfur* eingeschlagenen Stoffwechselweg könnte es zum einen durch Verbrauch von Tryptophan zur verminderten Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen kommen. Zum anderen könnten die mesomeren Systeme der tryptophanabhängig gebildeten Verbindungen als Radikalfänger wirken. So könnte die Pigmentbildung einen Abbau von oxidativem Stress für *Malassezia*-Hefen unter veränderten Umgebungsbedingungen auf der Haut bedeuten. Das verminderte Auftreten von reaktiven Sauerstoffverbindungen unter UV-Belastung in der Haut könnte neben den weiter unten diskutierten UV-absorbierenden Substanzen die nicht erhöhte Sonnenbrandneigung in den depigmentierten Arealen bei der Pityriasis versicolor alba erklären. ROS (reactive oxygen species) stellen einen wichtigen Triggerfaktor bei der Bildung von Entzündungsmediatoren im Rahmen eines Lichterythems dar, histologisch findet sich jedoch in den Läsionen der Pityriasis versicolor kein bzw. ein nur minimal ausgebildetes Entzündungsinfiltrat (Hay 1996).

Dieses für *Malassezia furfur* neu postulierte Modell findet Korrelate bei anderen Pilzarten, die durch Pigmentbildung die Fähigkeit zur Umwandlung von reaktiven Sauerstoffverbindungen, die auf Wirtsseite einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen mikrobielle Besiedlung darstellen, erlangen. Die Konidien des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* sind durch

Bildung eines grau-grünen Pigmentes gegen ROS geschützt, während ein genetisch veränderter nicht zur Pigmentbildung fähiger *Aspergillus fumigatus*-Stamm anfälliger gegenüber diesen Substanzen ist. Weiterhin konnte eine deutlich geringere Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch Phagozyten und polymorphkernige Neutrophile nach Inkubation mit pigmentbildenden Konidien von *A. fumigatus* gegenüber dem nicht-pigmentbildenden Stamm gezeigt werden (Jahn 1997, Langfelder 1998).

Durch Schwächung der Immunreaktion auf Wirtsseite stellt die Pigmentbildung damit einen wichtigen Virulenzfaktor von *A. fumigatus* da. Eben solche Wirkungen konnten auch dem von *Cryptococcus neoformans* gebildeten Melanin zugeschrieben werden (Jacobson 1995, Wang 1995).

Die gebildeten Pigmente und Fluorochrome selbst tragen durch ihre UV-absorbierenden Eigenschaften ebenfalls zum Überleben der oberflächlich im Stratum corneum angesiedelten *Malassezia*-Hefen unter UV-Belastung bei. In vitro konnte bereits eine Empfindlichkeit der Pilze gegenüber UV-Licht nachgewiesen werden. Faergemann fand 1987 eine gegenüber anderen häufig auf der menschlichen Haut nachweisbaren Keimen deutlich stärker ausgeprägte Empfindlichkeit der Hefen gegenüber UV-Bestrahlung, mit besonderer Ausprägung im UVB-Bereich bei Bestrahlungsdosen zwischen 65 und 900 mJ/cm². Im UVA-Bereich (Bestrahlungsdosen von 5 - 80 J/cm², verschiedene Emissionsspektren) zeigte sich allein bei *Pityrosporum*-Zellen eine signifikante Reduktion der Zellzahlen.

Wikler et al konnten 1990 eine signifikante Wachstumsreduktion von mit 25, 50 und 75 J/cm² UVA bzw. 900 mJ/cm² UVB bestrahlten *Malassezia*-Hefen sowie eine Veränderung der Ultrastruktur der Zellen demonstrieren. Im Rahmen einer Doppelblindstudie (Rivers et al. 1989) konnte die Besiedlungsdichte mit *Malassezia*-Hefen in den seborrhoischen Arealen des oberen Rückens durch UVA-Bestrahlung mit einem geringen UVB-Anteil bzw. sichtbarem Licht reduziert werden.

Sinnvoll erscheint die Interpretation der Pigmentbildung als potenter Lichtschutz auch durch das Erscheinungsbild der Pityriasis versicolor alba im Vergleich zu anderen mit hypopigmentierten Hautläsionen einhergehenden Erkrankungen. Im Gegensatz zur Vitiligo, in deren Läsionen durch einen autoimmunologisch bedingten Melanozytenverlust gehäuft vom Auftreten von Sonnenbränden berichtet wird, wird von der Ausbildung eines Lichterythems in den depigmentierten Arealen der Pityriasis versicolor selten berichtet (Lewis 1936), obwohl die Melaninsynthese durch Tyrosinaseinhibition gestört ist (Thoma 2000). Schon 1927 wurde durch Kistiakovsky vermutet, dass *M. furfur* ein gelbliches Pigment zur

Verfügung stehen würde, durch dessen stark lichtbrechende Eigenschaften die Ausbildung eines Sonnenbrands in den mit Pilzrasen bedeckten Arealen verhindert wird.

Die topische Anwendung des Rohextraktes an freiwilligen Testpersonen und der Vergleich der Wachstumsraten von auf arginin- bzw. tryptophanhaltigem Medium angezüchteten Pilzkulturen nach einmaliger UVA- bzw. UVB-Exposition konnten die Lichtschutzwirkung durch die Pigmentbildung bestätigen (Maysner und Pape 1998).

Die Weiterführung dieses Modells sollte die Rolle der fluoreszierenden Substanzen im Tryptophan-Stoffwechsel von *M. furfur* näher beleuchten.

Bei der Fluoreszenz wird die Energie des absorbierten Lichtes zu einem großen Teil als Photon emittiert, nur ein geringer Teil wird in Wärme umgewandelt. Fluorochrome stellen damit einen sinnvollen Mechanismus dar, zelluläre Schäden durch photobiologische Effekte der UV-Exposition zu begrenzen.

Vor einmaliger UV-Bestrahlung mit 100 bzw. 200 J/cm² UVA bzw. 500, 1000 sowie 2000 mJ/cm² UVB wurden die Hefezellen in Rohextrakt bzw. dessen fluoreszierenden Bestandteilen gebadet. Die Wachstumsraten der nicht bestrahlten Kulturen nach fünf Tagen Inokulation waren unabhängig von der Stickstoffquelle Trp bzw. Arg sowie der Vorbehandlung mit Pilzextrakten und zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Das Zellwachstum wurde durch UVA- bzw. UVB-Exposition vor allen Dingen bei den höheren Dosen signifikant reduziert, mit jeweils höherem Zellertrag von den auf tryptophanhaltigem Nährmedium angezüchteten Kulturen.

Durch Baden der Zellen in Rohextrakt (10%) vor Verimpfung und Bestrahlung konnten im UVB-Bereich signifikant höhere Wachstumsraten der Pilzkulturen erzielt werden. Bei UVA-Exposition waren die Zellerträge nur absolut höher. Dieser Effekt betraf unabhängig von der Stickstoffquelle im Anzuchtmedium alle Populationen, d.h. der durch die Anzucht auf tryptophanhaltigem Nährmedium schon bestehende Lichtschutz konnte durch Vorbehandlung mit Rohextrakt noch gesteigert werden.

Bei Verwendung der stark fluoreszierenden Säulenfraktionen 2 bzw. 3 (10%) wurde nur noch im UVB-Bereich bei den auf argininhaltigem Nährmedium angezüchteten Zellen ein signifikant stärkeres Pilzwachstum, ausgeprägt vor allem bei 500 und 1000 mJ/cm², erreicht.

Im Rahmen dieses Modells durchgeführte Versuche mit höher konzentrierten Fraktionen lassen eine Konzentrationsabhängigkeit des Lichtschutzes vermuten.

Nach direktem Aufbringen der hochkonzentrierten Säulenfraktionen 1 – 6 auf mDixon-Agar und Überschichtung der Inokulationspunkte mit 2×10^6 Zellen von argininhaltigem Nährboden vor einmaliger Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² war das Wachstum der Kolonien bei

allen Fraktionen deutlich kräftiger als bei der unbehandelten Gruppe. Gezielte Testung der hochkonzentrierten DC-Banden mit starker gelbgrüner Fluoreszenz ($R_f = 0,2$ bzw. $0,15$) mit diesem Modell ergab jeweils gegenüber der Kontrollgruppe signifikante kräftigere Zellpopulationen ($p=0,0022$).

Der Nachweis der Wirkung des aufgereinigten FO22 steht aufgrund der aufwendigen Herstellung ausreichender Mengen noch aus. Auch eine Resynthese des FO22 war bisher nicht möglich.

Insgesamt kann man davon ausgehen, dass das tryptophanabhängig von *M. furfur* gebildete Rohextrakt eine Vielzahl potenter Lichtschutzfaktoren beinhaltet. Der Nachweis und die strukturelle Aufklärung einer weiteren lichtschützenden, nicht fluoreszierenden Substanz bekräftigt diese Vermutung: Pityriacitrin ist ein lipophiles, gelbes Indolalkaloid, dessen UV-protective Wirkung sowohl im Hefe-Modell als auch in der Anwendung am Menschen nachgewiesen werden konnte (Maysner 2002).

Die Lichtschutzwirkung der tryptophanabhängig von *Malassezia furfur* gebildeten Substanzen ist auch auf Zellen anderer Gattungen übertragbar: Vorbehandlung von Zellen der Species *Candida albicans* mit Rohextrakt bzw. den Fraktionen 2 bzw. 3 führten zu einer deutlich reduzierten Minderung der Wachstumsraten nach einmaliger UVB-Bestrahlung mit 1000 mJ/cm^2 gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Absorptionsspektren des Rohextraktes, der Säulenfraktionen, der DC-Banden sowie des FO22 mit Absorptionsmaxima im UVA- und vor allem im UVB-Bereich stützen die Ergebnisse der Bestrahlungsversuche. (Tabelle 10, Abb. 17)

Neben kompletter Meidung von UV-Strahlen und der Entwicklung von Reparaturmechanismen stellt die Synthese UV-absorbierender Substanzen im Rahmen der Evolution einen Anpassungsvorgang vieler Mikroorganismen an ihre Umgebung dar. Diese Substanzen haben zumeist ein gemeinsames chemisches Korrelat: das π -Elektronensystem.

π -Elektronensysteme werden unter anderen in Aromaten, Indolen sowie linearen Molekülen mit Doppelbindungen gefunden. Die sehr effizienten UV-absorbierenden Eigenschaften werden beeinflusst von den Eigenschaften des mesomeren Systems. Dabei spielen die Anzahl konjugierter Bindungen, die Molekülgröße sowie verschiedenen Substituenten eine Rolle (Cockell 1998 und 1999).

Dieses System scheint auch von *M. furfur* durch die Verstoffwechslung von Tryptophan mit Bildung von fluoreszierenden Substanzen genutzt zu werden.

Die Indolstruktur des Tryptophans, dem schon in der frühen Entwicklungsgeschichte der Erde eine mögliche Rolle als lichtschützende Substanz zugeschrieben (Sagan 1972) wird und das

neben Nucleinsäuren, Urocaninsäure und Melanin in der Gruppe der aromatischen Aminosäuren zu den wichtigsten epidermalen Chromophoren, gehört (Hruza 1993), bildet in den neugebildeten Substanzen das Grundgerüst der komplexen Ringstrukturen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen.

Das Absorptionsspektrum des Tryptophans weist Absorptionsmaxima bei 280 nm und 220 nm auf (Abb. 34), die aus dem Rohextrakt und seinen Bestandteilen erstellten Spektren zeigen variierende Absorptionsmaxima im UVA- und UVB-Bereich (Abb. 17, Tab. 10).

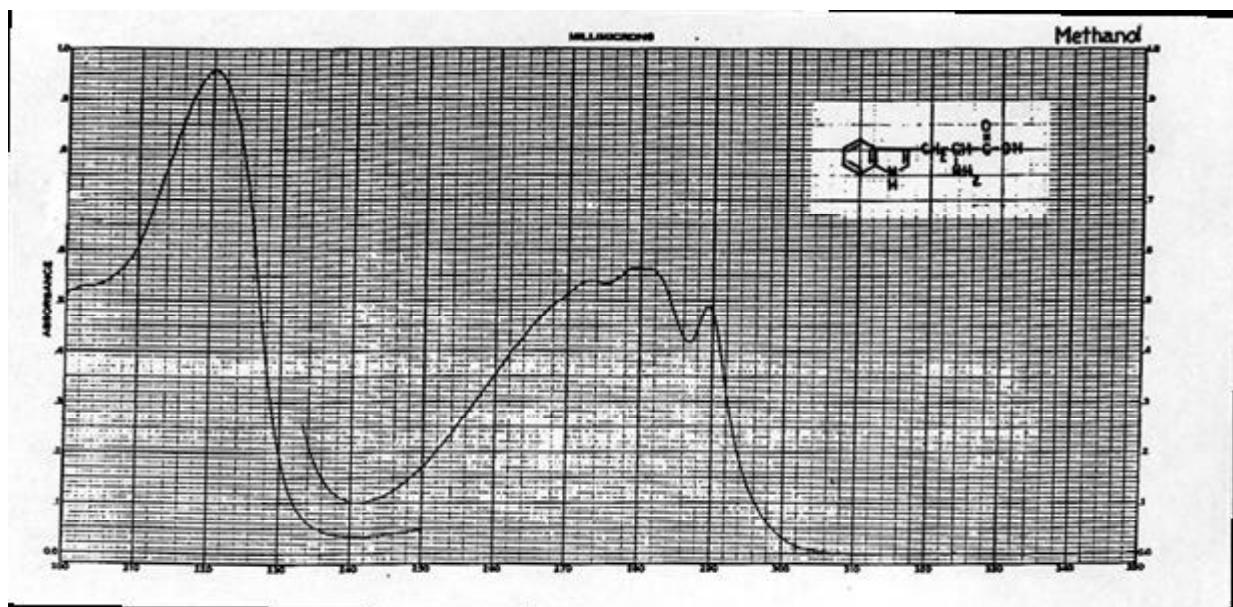


Abbildung 34: Absorptionsspektrum von Tryptophan

Entsprechend den Mycosporine-like amino acids (MAAs) wäre es denkbar, dass *M. furfur* sich durch die Bildung einer Vielzahl von UV-absorbierenden Substanzen auf Tryptophan-Basis ein sehr breit angelegtes Lichtschutzsystem aufbaut. MAAs sind farblose, wasserlösliche Substanzen, denen eine Cyclohexanon- bzw. Cyclohexeniminstruktur zugrunde liegt und die durch eine hohe Variabilität der Substituenten das Absorptionsverhalten des π -Elektronensystems der aromatischen Ringstruktur verändern. Sie können als natürlicher UV-Schutz im Zytoplasma verschiedenster Mikroorganismen, z. B. in Cyanobakterien, mit Absorptionmaxima zwischen 310 und 360 nm nachgewiesen werden (Cockell 1999, Dunlap 1998). Mit dem Vorliegen charakteristischer Absorptionsspektren, der Induzierbarkeit der Bildung von MAAs durch UV-Strahlung, der Möglichkeit, ihre Screeningkapazität zu schätzen sowie der Nachweis der Wirksamkeit der Substanzen unter physiologisch inaktiven Zuständen der produzierenden Organismen erfüllen MAAs die

Anforderungen, die an eine Substanz mit lichtschützenden Eigenschaften gestellt werden (Garcia-Pichel, Wingard und Castenholz 1993).

Entsprechendes gilt für das Scytonemin (Abb. 35), einem gelbgrünen Pigment, das aus der Hülle von Cyanobakterien isoliert, strukturell analysiert und als UV-absorbierende Substanz in über 30 Species in verschiedensten geographischen Gebieten, die einer hohen UV-Bestrahlung ausgesetzt sind, nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei um ein lipophiles dimerisches Molekül (544Da) mit einer indolischen sowie einer phenolischen Untereinheit mit stark lichtschützenden Eigenschaften im Bereich von 325 – 425 nm sowie im UVB- und UVC-Bereich (Proteau et al 1993).

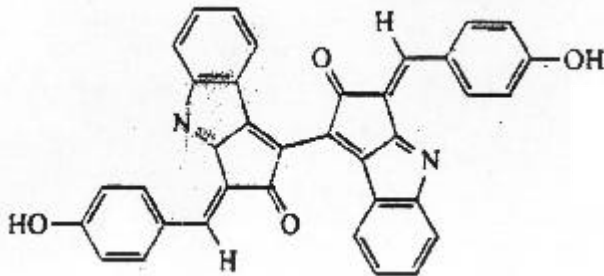


Abbildung 35 : Scytonemin

Die aus dem Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur* hervorgehenden verschiedenen Substanzen auf Indolbasis weisen deutliche Parallelen zu den als potente Lichtschutzfaktoren beschriebenen MAAs sowie dem Scytonemin auf. Die Anwendbarkeit der für lichtschützende Substanzen geforderten Eigenschaften auf Bestandteile des Rohextraktes ist daher zu prüfen.

Die Absorptionsspektren verschiedener Bestandteile des Rohextraktes, darunter das Spektrum des aus einer gelbgrün fluoreszierenden Dünnschichtbande (R_f -Wert 0,2) isolierten Pityrialacton mit Maxima bei 274 und 361 nm, lassen deutlich die UV-absorbierenden Eigenschaften der Substanzen erkennen. Die signifikant höheren Wachstumsraten der Pilzkulturen vor allem nach UVB-Exposition bei Vorbehandlung mit Pilzextrakten weisen die lichtschützende Wirkung der Substanzen nach, die genaue Bestimmung der Screeningkapazität ist aufgrund der noch nicht vorhandenen Kenntnisse über die genauen Inhaltsstoffe noch nicht möglich bzw. steht bei einzelnen schon identifizierten Substanzen wie dem Pityrialacton noch aus.

Die Forderung nach Wirksamkeit unter physiologisch inaktiven Bedingungen und damit der Charakterisierung als passiver Lichtschutzfaktor wird in den Bestrahlungsversuchen ebenfalls annähernd erfüllt: die UV-Exposition der Kulturen erfolgt nach externer Applikation der entsprechenden Pilzextrakte direkt nach Inokulation auf mDixonAgar, also an Zellen, deren physiologischen Funktionen zwar voll erhalten aber kurzfristig heruntergefahren sind. Das Einwirken anderer lichtschützender Mechanismen im Rahmen des Zellstoffwechsels kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, die Bedeutung wird jedoch durch das Mitführen der Kontrollgruppe ohne Behandlung mit Pilzextrakten relativiert. Weiterhin konnte die Wirksamkeit durch die topische Applikation des Rohextraktes an menschlicher Haut sowie an Zellen von *Candida albicans* nachgewiesen werden.

Die Frage nach der Induzierbarkeit der Pigmentbildung durch UV-Bestrahlung ist eng mit der Frage nach der Pathogenese der Pityriasis versicolor verbunden. Tatsache ist, dass *Malassezia*-Hefen durch die Synthese von Tryptophanderivaten einen potenten UV-Schutz erlangen. Allerdings wird der dazu notwendige Stoffwechselweg von den zur residenten Hautflora gehörenden Hefen nur unter bestimmten, noch genauer zu klärenden Bedingungen eingeschlagen. Das auslösende Moment dafür könnte die Anreicherung von der zur Pigmentbildung notwendigen Aminosäure Tryptophan im Stickstoffangebot auf der Haut sein. Tryptophan konnte epidermal in nur geringen Konzentrationen nachgewiesen werden (Burke 1962/63 und 1966), die aber ausreichend für die Pigmentsynthese zu sein scheinen (Mayser 1998). Eine in vivo Studie von Brancalion et al. 1999 zeigte einen Anstieg epidermaler Fluoreszenzerscheinungen nach UV-Exposition, hervorgerufen durch ein Chromophor mit den spektralen Eigenschaften von Tryptophan-Derivaten. Die stärkste Ausprägung dieses Phänomens fand sich bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm, übereinstimmend mit den Maxima der Aktionsspektren von photobiologischen Prozessen in der menschlichen Haut wie Erythem, Pigmentierung und Karzinogenese (Parrish et al. 1982). Entsprechend Beobachtungen, bei denen es im Zusammenhang mit starker UV-Belastung und Schwitzen zu Ablagerungen von Urcoaninsäure, die wie Tryptophan zu den wichtigsten epidermalen Chromophoren gehört und der eine Rolle als „endogener Sonnenschutz“ zugesprochen wird (Zeniske 1953, Everett 1961, Anderson 1979), könnte es unter solchen klimatischen Bedingungen auch zu einer Anreicherung von Tryptophan auf der Hautoberfläche zur Ergänzung der nicht-melanozytären, vor UV-Strahlung schützenden Mechanismen der Haut kommen. Gleichzeitig wären damit die Voraussetzungen zur Pigmentsynthese durch *M. furfur* geschaffen.

Die Unterdrückbarkeit dieses Stoffwechselweges durch andere Aminosäuren läßt bei Auftreten von Pigmentbildung eine Veränderung der Konzentrationsverhältnisse im Hautmilieu zugunsten des Tryptophans, das aufgrund seiner aromatischen Ringstruktur hydrophobe Eigenschaften besitzt, vermuten. Eine solche Konstellation ist unter starkem Schwitzen, bei dem es zum Verlust der meisten hydrophilen Aminosäuren kommt, Tryptophan jedoch nur in verhältnismäßig kleinen Mengen im Schweiß nachgewiesen werden konnte, denkbar (Burke 1966, Hadorn 1967, Liappis 1980).

Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung des Schweißes könnten weiterhin dazu beitragen, dass es nicht bei allen Menschen trotz Prävalenz des Erregers auf der Haut zur Ausbildung einer Pityriasis versicolor kommt; der genaue Pathogenitätsmechanismus bedarf weiterer Klärung.

Insgesamt ist durch Veränderungen des Tryptophanangebotes auf der Haut unter Wärme und UV-Belastung ein Zusammenhang mit der Bildung von UV-absorbierenden Substanzen durch *Malassezia furfur* zu erkennen. Auch bei anderen Pilzen werden Anpassungsvorgänge an starke UV-Exposition beschrieben.

Die sogenannten „Schwärzepilze“, Ascomyzeten aus der Familie der *Herpotrichiellaceae* und der *Pleosporaceae*, mit dauerhafter schwarz-brauner Pigmentierung gewinnen durch die Produktion von Melanin einen Schutz vor ultravioletter Strahlung, weiterhin vermindert diese als pathogenes Prinzip die Anfälligkeit gegenüber phagozytotischen Prozessen (Polak 1990, de Hoog 1995, Mayser 1996).

Cryptococcus neoformans, wie *Malassezia*-Hefen zur Klasse der Basidiomyzeten gerechnet, ist mittels einer Phenoloxidase ebenfalls zur Melaninproduktion mit der Erlangung eines UV-Schutzes sowie einer höheren Pathogenität fähig (Wang 1994, Polacheck 1988, Polak 1990).

Analog zum Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur* wird dieser Syntheseweg nur passager unter bestimmten nutritiven Voraussetzungen eingeschlagen (Polacheck 1982).

In den Korallen des Great-Barrier-Korallenriffs in Australien wurde die Produktion von gelbgrün fluoreszierenden Pigmenten mit lichtschützenden Eigenschaften durch Fluoreszenz und Streuung nachgewiesen. Abhängig vom einwirkenden UV-Stress ist die Produktion in flacheren Gewässern höher, Anpassung erfolgt weiterhin durch Konzentrationsveränderung der intrazellulär in Granula bzw. intra- und interzellulär frei vorkommenden fluoreszierenden Pigmente durch Polypenkontraktion bzw. -expansion (Salih 2000).

Ansteigendes Tryptophanangebot auf der Haut unter starker UV-Exposition und Schwitzen könnten auch für *M. furfur* Signal zu einer verstärkten Pigmentbildung sein. Die von

Castellani 1905 beschriebene Pityriasis nigra mit dem Vorkommen von schwarz-braunen bis schwarzen Läsionen könnte Ausdruck einer maximalen Pigmentbildung sein. Die schwarze Verfärbung der Kulturplatten bei übermäßigem Tryptophanangebot in vitro unterstützt diese Vermutung. Über die Lokalisation der Substanzen in den Zellen und damit die Ausprägung der UV-schützenden Wirkung auf einzelne Zellbestandteile ist noch nichts bekannt. Die Diffusion der Tryptophanderivate in den Agar weist zusätzlich auf ein extrazelluläres Vorkommen durch Ausscheidung der Substanzen hin.

In der Summe ist festzustellen, dass *M. furfur* durch die Verstoffwechslung von Tryptophan ein Lichtschutzsystem nutzen kann, an dem verschiedene Substanzen aus dem Rohextrakt wie die Fluorochrome und das Pityriacitrin und wahrscheinlich noch weitere beteiligt sind. Ob die Produktion der lichtschützenden Substanzen tatsächlich mit diesem Ziel geschieht, kann noch nicht endgültig festgelegt werden. Viele Faktoren, z. B. die Lichtempfindlichkeit der *Malassezia*-Hefen und auch der Vergleich der Substanzen mit Lichtschutzsystemen anderer Mikroorganismen stützen diese These. Jedoch kann auch ein zufälliger lichtschützender Nebeneffekt durch diese Substanzen nicht völlig ausgeschlossen werden. Das Einschlagen des tryptophanabhängigen Stoffwechselweges könnte auch Überlebensstrategie von *Malassezia furfur* zum Erhalt eines günstigen Hautmilieus bei verändertem Nährstoffangebot sein.

Abschließend können die eingangs gestellten Fragen wie folgt beantwortet werden.

1) Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Isolierung und strukturelle Aufklärung einer gelbgrün fluoreszierenden Substanz aus dem tryptophanabhängig von *M. furfur* gebildeten Pigment.

Pityrialacton ($C_{20}H_{12}N_2O_3$) ist eine bisher unbekannte Substanz, die aus zwei Indolringen und einer Lactoneinheit besteht. Weiterhin konnte ein Vorschlag zur Biosynthese von Pityrialacton und anderer verwandter Substanzen wie Pityriaanhydrid erstellt werden.

Die Synthese dieser mesomeren Substanzen könnte als Abwehrmechanismus von *M. furfur* gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies auf der Haut dienen. So könnte die tryptophanabhängige Pigmentsynthese eine Überlebensstrategie von *M. furfur* auf der Haut darstellen und gleichzeitig die gering ausgeprägte Entzündungsreaktion bei der Pityriasis versicolor erklären. Mit dem Pityriaanhydrid konnte zudem ein Strukturisomer des Pityrialacton isoliert werden, welches Parallelen zu Acyriafarbstoffen aufzeigt.

2) Der Nachweis der gelb-grün fluoreszierenden Substanzen im tryptophanabhängig von *M. furfur* gebildeten Rohextrakt und die strukturelle Aufklärung einer ersten fluoreszierenden

Substanz, dem Pityrialacton, stellen einen Erklärungsansatz für die Fluoreszenzerscheinungen der Pityriasis versicolor auf der Haut dar. Sowohl das Fluoreszenzspektrum von Pityrialacton mit einem Anregungsmaximum bei 366 nm (entsprechend der Wellenlänge des Wood-Lichtes) als auch die variierende Farbgebung der Substanz abhängig vom Lösungsmittel (gelbe Fluoreszenz in Wasser, bläuliche Fluoreszenz in Acetonitril) machen einen Zusammenhang dieser Substanzen mit den gelbgrün fluoreszierenden Hautläsionen bei der Pityriasis versicolor wahrscheinlich. Die in der Literatur als sehr variabel beschriebenen Farbgebungen der fluoreszierenden Läsionen auf der Haut könnten durch eine variierende Talg- und Schweißproduktion erklärt werden.

3) *M. furfur* gewinnt durch die Synthese von Pigmenten und Fluorochromen mit zugrundeliegender Indolstruktur ein breit angelegtes Lichtschutzsystem mit Wirkungsmaxima im UVB-Bereich, was die verminderte Sonnenbrandneigung in den depigmentierten Arealen bei der Pityriasis versicolor alba erklären kann. Dabei ist die Lichtschutzwirkung nicht einer einzigen Substanz aus dem Rohextrakt zuzuordnen, sondern es sind verschiedene Substanzen aus den gelbgrün fluoreszierenden Fraktionen und auch nicht fluoreszierende Substanzen wie das Pityriacitrin daran beteiligt.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson, H.G.: Pityriasis versicolor with subsequent leukodermic patches. *Brit. J. Derm.* 61: 322-322, 1949
- Allen, H.B., Charles, C.R., Johnson, B.L.: Hyperpigmented tinea versicolor. *Arch. Dermatol.* 112: 1110-1112, 1972
- Anderson, R.R., Parrish, J.A.: The Optics of Human Skin. *J. Invest. Derm.* 77: 13 – 19, 1981
- Ashbee, R., Evans, E.G. V.: Immunology of Diseases associated with *Malassezia* Species. *Clin. Microbiol. Rev.:* 21 - 57, Jan 2002
- Babu, V., Joshi, P.-C.: Tryptophan as an endogenous photosensitizer to elicit harmful effects of ultraviolet B, *Indian J. Biochem. Biophys.* 29(3): 296 – 298, Jun 1992
- Baillon, E.H.: *Traité de botanique médicale cryptogamique suivi du tableau.* Paris, Faculté de Médecine de Paris: p. 234, 1889
- Barfatani, M., Munn, R.J., Schjeide, O. A.: An ultrastructure study of *Pityrosporum orbiculare*. *J. Invest. Derm.* 43: 231-233, 1964
- Beyer, H., Walter, W.: *Lehrbuch der organischen Chemie*, 22. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart 1991
- Blumenthal, H.: Tinea versicolor of the penis. *Arch. Derm.* 103: 461-462, 1971
- Bojanovsky, A., Bohnert, E., Jung, E.G.: *Pityrosporum orbiculare*: Erreger verschiedener klinischer Bilder und Model einer Depigmentierungsart. *Akt. Derm.* 5: 19-25, 1979
- Borelli, D., Jacobs, P.H., Nall, L.: Tinea versicolor: epidemiological, clinical and therapeutic aspects. *J. Am. Acad. Dermatol.* 25: 300-305, 1991
- Brancaleon, L., Lin, G., Kollias, N.: The In Vivo Fluorescence of Tryptophan Moieties in Human Skin increases with UV Exposure and is a Marker for Epidermal Proliferation. *J. Invest. Derm.* 113(6): 977 – 982, 1999
- Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.: *Dermatologie und Venerologie*, 4. Auflage, Springer, 1996
- Breathnach, A.S., Gross, M., Martin, B.: Freeze-fracture replications of cultured *Pityrosporum orbiculare*. *Sabouraudia* 14: 105-113, 1976
- Breathnach, A.S., Nazzaro-Porro, M, Martin, B.: Ultrastructure of skin in pityriasis versicolor. *Giorn. Ital. Derm.* 110: 457-469, 1975
- Burke, R.C., Lee, T.H., Buettner-Janusch, V.: Free amino acids and water soluble peptides in stratum corneum and skin surface film in human beings. *Yale J. Biol. Med.* 38: 355 – 373, 1966

- Burke, R.C.: Investigations in tinea versicolor: Lipid and aminoacid studies. *Yale J. Biol. Med.* 35: 206-221, 1962/63
- Burke, R.C.: Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infections in human beings. *J. Invest. Derm.* 36: 389-401, 1961
- Caprilli, F., Mercantini, R.: Aspetti clinici ed epidemiologici della Pityriasis versicolor. *Giorn. e Min. Derm.* 113: 249-253, 1978
- Caprilli, F., Mercantini, R.: Morphological and cultural aspects of *Pityrosporum (Malassezia) furfur*. *Mykosen* 21, Suppl. 1: 1137-140, 1978
- Castellani, A., Chalmers, A.: *Manual of tropical medicine*, 2nd edition, London, Baillière Tindall & Cox 1913
- Castellani, A.: Tropical forms of pityriasis versicolor. *Br. Med. J.* ii: 1271-1272, 1905.
- Charles, C.R., Sire, D.J., Johnson, B.L., Beidler, J.G.: Hypopigmentation in tinea versicolor: A histochemical and electronmicroscopic study. *Int. J. Derm.* 12, 48-58, 1973
- Chetty, G.N., Kamalam, A., Thambiah, A.S.: Pityriasis versicolor - a study of 200 cases in a tropical skin clinic. *Mykosen* 22: 234-246, 1979
- Cockell, C.S.: Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74: 311 – 345, 1999
- Cockell, C.S.: Ultraviolet radiation, evolution and the π -electron system. *Biological Journal of the Linnean Society* 63: 449 – 457, 1998
- Dorn, M., Roehnert, K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Derm.* 69: 224-248, 1977
- Dotz, W.I.: Tinea versicolor: a light and electron microscopic study of hyperpigmented skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 12: 37-44, 1985
- Dunlap, W. C., Shick, J. M.: Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* 34: 418 – 430 1998
- Eichstedt, C.F.: Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Forstier's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde* 853: 270-271, 1846
- El-Gothamy, Z., Abdel-Fattah, A., A.F.: Tinea versicolor hypopigmentation: histochemical and therapeutic studies. *Int. J. Derm.* 14: 510-515, 1975
- Everett, M.A., Anglin J.H., Bever A.T.: Ultraviolet-induced biochemical alterations in skin. *Arch. Dermatol.* 84: 717 – 724, 1961
- Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Adherence of *Pityrosporum orbiculare* to Human Stratum Corneum Cells. *Arch. Dermatol. Res.* 275(4): 246-250, 1983

- Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Growth and Filament Production of *Pityrosporum orbiculare* and *Pityrosporum ovale* on Human Stratum Corneum in vitro. Acta Derm. Venereol. (Stockh) 63: 388-392, 1983
- Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Quantitative Variations in Distribution of *Pityrosporum orbiculare* on Clinically Normal Skin. Acta Derm. Venereol. (Stockh) 63: 346-348, 1983
- Faergemann, J., Aly, R., Wilson, D.R., Maibach, H.I.: Skin occlusion: effect on *Pityrosporum orbiculare*, skin PCO₂, pH, transepidermal water loss, and water content. Arch. Dermatol. Res. 275: 383-387, 1983
- Faergemann, J., Fredriksson, T.: Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. Acta Derm. Venereol. 60: 531-33, 1980
- Faergemann, J., Fredriksson, T.: Tinea versicolor: Some new aspects on etiology, pathogenesis, and treatment. Int. J. Derm. 21: 8-11, 1982
- Faergemann, J., Larko, O.: The effect of UV-light on human skin microorganisms. Acta Derm. Venereol. 67: 69-72, 1987
- Faergemann, J.: Lipophilic Yeasts in Skin Disease. Semin. Dermatol. 4: 173-184, 1985
- Garcia-Pichel, F., Wingard, C. E., Castenholz, R. W.: Evidence Regarding the UV Sunscreen Role of a Mycosporine-Like Compound in the Cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. Appl. Env. Microbiol: 170 – 176, 1993
- Götz, H.: Pityriasis versicolor. In: Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermatophyten. Handbuch für Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg.: A. Marchionini, H. Götz). Erg. Bd. IV/3, Heidelberg: Springer Verlag, 352-360, 1962
- Götz, H.: Verzicht auf Sauna bei Pityriasis versicolor? Med. Klinik 75: 6-7, 1980
- Grigoriu, D., Delacrétaz, J., Borelli, D.: Lehrbuch der medizinischen Mykologie. Verlag Hans Huber Bern, 1984
- Guého, E., Boekhout, T., Ashbee, H.R., Guillot, J., Van Belkum, A., Faergemann, J.: The role of the *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. Med. Mycol 36: 1220 – 1229, 1998
- Guého, E., Midgley, G., Guillot, J.: The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 69: 337-355, 1996
- Guillot, J., Guého, E., Lesourd, M., Midgley, G., Chévrier, G., Dupont, B.: Identification of *Malassezia* Species, A practical approach. J. Mycol. Méd. 6: 103-110, 1996
- Guillot, J., Guého, E.: The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. Antonie van Leeuwenhoek 67: 297-314, 1995

- Gupta, A. K., Bluhm, R., Summerbell, R.: Pityriasis versicolor. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 16 (1): 19 - 33, 2002
- Hadorn, B. Hanimann, F., Anders, P. Curtius H.-Ch., Halverson, R.: Free amino acids in human sweat from different parts of the body. *Nature* 215: 416 – 417, 1967
- Hagler, A.N., Ahearn, D.G.: Rapid diazonium blue B test to detect basidiomycetous yeasts.
- Hassall, C. H.: The Baeyer-Villiger oxidation of aldehydes and ketones, *Org. Reactions* 9: 73 - 106, 1957
- Hay, R.J., Moore, M.: Pityriasis versicolor. In: *Textbook of Dermatology* (Rook, Wilkinson, Ebling, eds) 6th edn., Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications: pp. 1287 -1289, 1996
- Hoog, G.S. de, Guarro, J.: *Atlas of clinical fungi*. 1.ed., Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995
- Hruza, L., Pentland, A. P.: Mechanisms of uv-induced inflammation, *J. Invest. Derm.* 100(1), 35S – 41S, 1993
- Ingham, E., Cunningham, A.C.: *Malassezia furfur*. *J. Vet. Med. Mycol.* 31: 265-288, 1993
- Int. J. Syst. Bacteriol.* 31: 204-208, 1981
- Irlinger, B., Steglich, W., Mayser, P., Krämer, H.-J.: Neue biologisch aktive Indolalkaloide aus der lipophilen Hefe *Malassezia furfur*. *Irseer Naturstofftage 2001*, 26.02.-28.02.2001, Bad Irsee
- Jacobson, E.S., Hove, E., Emery, H.S.: Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infection and Immunity* 63: 4944 – 5, 1995
- Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G., Gehringer, H., Bhakdi, S., Brakhage, A.A.: Isolation and Characterization of a Pigmentless-Conidium Mutant of *Aspergillus fumigatus* with Altered Conidial Surface and Reduced Virulence. *Infection and Immunity*: 5110 – 5117, 1997
- Jeliffe, D.B., Jacobson, F.W.: The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. *J. Trop. Med. Hyg.* 57: 290-293, 1954
- Jung, E.G., Bohnert, E.: Mechanism of depigmentation on pityriasis versicolor alba (Pva). *Derm. Res.* 256: 333-334, 1976
- Karaoui, R., Bou-Resli, M., Al-Zaid, N.S., Mousa, A.: Tinea versicolor: Ultrastructural studies on hypopigmented and hyperpigmented skin. *Dermatologica* 162: 69-85, 1981
- Keddie, F.M.: Electron microscopy of *Malassezia furfur* in tinea versicolor. *Sabouraudia* 5:134-137, 1966

- Kistiakovsky, E.V.: Pityriasis versicolor and ultraviolet rays. Arch. Derm. Syph. 15: 685-689, 1927
- Korting, H.C., Loferer, S., Hamm, N.: The detergent scrub method for quantitative determination of *Malassezia furfur* on chest and back skin: comparative evaluation of three different media. Mycoses 34: 267-271, 1991
- Krämer, H.-J., Krisch, A., Cramer, E., Irlinger, B., Steglich, W., Mayser, P.: Potente neue Protein Kinase C-Inhibitoren als anti-inflammatorisches Prinzip von *Malassezia furfur*. Mycoses 44: 237, 2001
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E.: Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, pp. 170-182, 1992
- Labows, J.N., McGinley, K.J., Leyden, J.J.: Characteristic gamma-lactone odor production of the genus *Pityrosporum*. Appl. Environm. Microbiol. 38: 412-415, 1975
- Langfelder, K., Jahn, B., Gehringer, H. Schmidt, A., Wanner, G., Brakhage, A.A.: Identification of a polyketide synthase gene (pksP of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. Med. Microbiol. Immunol. 187: 79 – 89, 1998
- Leeming, J.P., Notman, F.H., Holland, K.T.: The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. J. Appl. Bacteriol. 67: 47-52, 1989
- Leeming, J.P., Notman, F.H.: Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. J. Appl. Bacteriol. 25: 2017-2019, 1987
- Lewis, G.M., Hopper, M.E.: Pseudoachromia of tinea versicolor. Arch. Derm. Syph. 34: 850-861, 1936
- Lewis, G.M.: Tinea versicolor (white). Arch. Derm. Syph. 31: 911-913, 1935
- Liappis, N., Kochbeck, E., Eckhardt, G., Hahne, H., Kessler, K., Bantzer, P.: Aminosäurenverluste im menschlichen Schweiß. Arch. Dermatol. Res. 269: 311-323, 1980
- Lockshin, N.A.: Tinea versicolor masquerading as vitiligo. Cutis 12: 245-247, 1973
- Lutz, A.: Korrespondenz. Honolulu, September 1891. Mh. Prakt. Dermatol. 14: 152-155, 1892
- Marples, M.J.: The genus *Pityrosporum*. In: The Ecology of the Human Skin. Springfield: C.C. Thomas, pp. 408-422, 1965
- Martin-Scott, I: The *Pityrosporum ovale*. Brit. J. Derm. 64: 257-273, 1952
- Mayser, P., Pape, B.: Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophane derivatives. Antonie van Leeuwenhoek 73: 315 – 319, 1998

- Mayser, P., Schäfer, U., Krämer, H.-J., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityriacitrin - an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malasseia furfur*. Arch Dermatol Res 294: 131 - 134, 2002
- Mayser, P., Stapelkamp, H., Krämer, H.-J., Podobinska, M., Wallbott, W., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityrialactone – a new fluorochrome from the tryptophane metabolism of *M. furfur*. Antonie van Leeuwenhoek 84,185 – 191, 2003
- Mayser, P., Wille, G., Imkamp, A., Thoma, W., Arnold, N., Monsees, T.: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. Mycoses 41 (7-8): 265 – 71, 1998
- Mayser, P.: Beiträge zur Differenzierung der Gattung *Malassezia* und der Pathogenese der Pityriasis versicolor, Habilitationsschrift, 1998
- Mayser, P: *Malassezia* spp. assoziierte Krankheitsbilder- Pathogenese, Klinik und aktuelle Therapie. Der Deutsche Dermatologe 44: 1091-1097 (Teil 1), 1182-1192 (Teil 2), 1996
- Mc Ginley, K.J., Lantis, L.R., Marples, R.R.: Microbiology of tinea versicolor. Arch. Dermatol. 102:168-171, 1970
- Michalowski, R., Rodziewicz, H.: Pityriasis versicolor in the aged. Brit. J. Derm. 77: 388-390, 1965
- Mittag, H.: Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. I. Size and shape of the yeast cells and a consideration of their ploidy. Mycoses 37: 393-399, 1994
- Mittag, H.: Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. Mycoses 38: 13-21, 1995
- Moynahan, E.J.: Pityriasis versicolor alba (speckled torso syndrome) and mediterranean holidays. Lancet 2: 471-472, 1976
- Nazzaro Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Nazzaro, P., Morpurgo, G.: Growth requirement and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. J. Invest. Derm. 66: 178-82, 1976
- Nenoff, P., Reinl, P., Haustein U.-F.: Der Hefepilz *Malassezia* – Erreger, Pathogenese und Therapie. Hautarzt.52: 73 – 86, 2001
- Noble, W.C., Microbiology of Human Skin. London: Lloyd-Duke. pp. 3-65; 263-268, 1981
- Noble, W.C., Midgley, G.: Scalp carriage of *Pityrosporum* species: The effect of physiological maturity, sex and race. Sabouraudia 16: 229 – 232, 1978
- Ota, M., Huang, P.T.: Sur les champignons du genre *Pityrosporum* Sabouraud. Ann. Parasit. Hum. Com. 11: 49-58, 1933
- Parrish, J.A., Jaenicke, K.F., Anderson, R.R.: Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. Photochem. Photobiol. 36: 187 – 191, 1982

- Pierard, J., Dockx, P.: The ultrastructure of tinea versicolor and *Malassezia furfur*. Int. J. Derm. 11: 116-124, 1972
- Polacheck, I., Hearing, V.J., Kwon-Chung, K.J.: Biochemical studies on phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. J. Bacteriol. 150: 1212-1220, 1982
- Polacheck, I., Kwon-Chung, K.J.: Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. J. Gen. Microbiol. 134: 1037-1041, 1988
- Polak, A.: Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. Mycoses 33: 215-224, 1990
- Proteau, P.J., Gerwick, W.H., Garcia-Pichel, F., Castenholz, R.: The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. Experientia 49: 825 – 829, 1993
- Randjandiche, M.: Frequence de *Pityrosporum ovale* dans l'oreille humaine. Dermatologica 151: 100-103, 1975
- Razack, E.M.A., Thambiah, A.S.: A clinical study pityriasis versicolor in Madras. Sabouraudia 15: 305-311, 1977
- Reed, W.B., Pidgeon, J., Becker, S.W.: Patients with spinal cord injury. Clinical cutaneous studies. Arch. Derm. 83: 379-385, 1961
- Rieth, H.: Pityriasis alba, eine kosmetisch besonders störende Pilzkrankung der Haut. Kosmetologie 3: 58-63, 1973
- Rivers, J.K., Norris, P.G., Murphy, G.M., Chu, A.C., Midgley, G., Morris, J., Morris, R.W., Young, A.R., Hawk, J.L.: UVA sunbeds: tanning, photoprotection, acute adverse effects and immunological changes. Br. J. Derm. 120: 767-777, 1989
- Roberts, S.O.B.: Pityriasis versicolor: A clinical and mycological investigation. Br. J. Derm. 81: 315-326, 1969
- Roberts, S.O.B.: *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. Br. J. Derm. 81: 264-269, 1969
- Robin, C.: Histoire naturelle des vegetaux parasites. Paris: JB Baillière, 1853
- Ruete, A.: Pityriasis versicolor. In: Jadassohns Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg.: J. Jadassohn). Bd. XI., Berlin: Springer Verlag, pp. 696-710, 1928
- Ruete, A.E.: Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor. Derm. Wochenschr. 96: 333-6, 1933
- Sagan, C.: Ultraviolet Selection Pressure on the Earliest Organisms. J. theor. Bio. 39: 195 – 200, 1973

- Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kühl, M., Hoegh-Guldberg, O.: Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408: 850 – 853, 2000
- Shifrine, M., Marr, A.G.: The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*. *J. Gen. Microbiol.* 32:263-270, 1963
- Simmons, R.B., Ahearn, D.G.: Cell wall ultrastructure and diazonium blue B reaction of *Sporopachydermia quercum*, *Bullera tsugae*, and *Malassezia* spp. *Mycologia* 79: 38-43, 1987
- Simmons, R.B., Gueho, E.: A new species of *Malassezia*. *Mycol. Res.* 94: 1146-1149, 1990
- Slooff, W.Ch.: Genus *Pityrosporum* Sabouraud. In: *The Yeasts - A Taxonomic Study* (Hrsg. J. Lodder) 2nd edition, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, pp. 1167-1186, 1970
- Spoor, H.J., Traub, E.F., Bell, M.: *Pityrosporum ovale* types cultured from normal and seborrheic subjects. *Arch. Dermatol. Syphilol.* 69: 323-330, 1954
- Stapelkamp, H., Krämer, H.-J., Steglich, W., Irlinger, B., Mayser, P.: Pityrialacton – ein neues Fluorochrom als Stoffwechselprodukt von *M. furfur*. *Mycoses* 44(6): 238, 2001
- Steglich W., Steffan, B., Kopanski, L., Eckhardt, G.: Indolfarbstoffe aus Fruchtkörpern des Schleimpilzes *Arcyria denudata*. *Angew Chem Int Ed Engl* 19: 359 – 460. 1980
- Stefanovic, M., Stefanovic, M., Medicijan, M.: Die Verbreitung der Pityriasis versicolor bei der Sportjugend. *Castellania* 4: 29-31, 1976
- Swift, J.A., Dunbar, S.F.: The ultrastructure of *Pityrosporum ovale* and *Pityrosporum canis*. *Nature* 206:1174-1175, 1965
- Thoma, W., Dahms, K., Krämer, H.-J., Steglich, W., Irlinger, B., Mayser, P.: Tyrosinase-Inhibition durch KO27 – einen Stoffwechselmetaboliten von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 44: 238, 2001
- Thoma, W., Trinkaus, M., Schill, W.-B., Mayser, P.: Tyrosinaseinhibition durch Stoffwechselmetabolite von *M. furfur*. *H + G* 75:473, 2000
- Thompson, E., Colvin, J.R.: Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani & Chalmers. *Can. J. Microbiol.* 16: 263-265, 1970.
- Tosti, A., Villardita, S., Fazzini, M.L.: The parasitic colonization of the horny layer in tinea versicolor. *J. Invest. Derm.* 59: 223-237, 1972
- Van Abbe, N.J.: The investigation of dandruff. *J. Soc. Cosm. Chemists* 15: 609-630, 1964
- Wang, Y., Aisen, P., Casadevall, A.: *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect. Immun.* 63: 3131 – 3136, Aug 1995
- Wang, Y., Casadevall, A.: Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV-light. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3864-66, 1994

- Wertheim, L.: Über Lichtwirkung und Leukoderma bei Pityriasis versicolor. *Derm. Zeitschr.* 38: 343-354, 1928
- Wigger-Alberti, W., Elsner, P.: Fluoreszenz im Wood-Licht. *Hautarzt* 48: 523 – 527, 1997
- Wikler, J.R., Janssen, N., Bruynzeel, D.P., Nieboer, C.: The Effect of UV-light on *Pityrosporum* Yeasts: Ultrastructural Changes and Inhibition of Growth. *Acta Derm. Venereol.* 70: 69-71, 1990
- Wilde, P.F., Stewart, P.S.: A study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*. *Biochem. J.* 108: 225-231, 1968
- Willan, R.: Description and treatment of the cutaneous diseases. Order II. Scaly diseases of the skin, London: pp.192-196, 1801
- Yarrow, D., Ahearn, D.G.: *Malassezia* Baillon. In: The yeasts: A taxonomic study (Kreger van Rij NJW, ed), 3rd edn., Amsterdam: North Holland Publishing Company. pp. 882-5, 1984
- Yasui, H., Skurai, H.: Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to uva, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 131 – 136, 2000
- Young, A. R.: The molecular and genetic effects of ultraviolet radiation exposure on skin cells. In: *Photodermatology* (Hawk, J.L.M. ed), Chapman & Hall. pp 25 – 42, 1998
- Zeniske, A., Krahl, J.A.: The occurrence of urocanic acid in sweat. *Biochim. Biophys. Acta* 12: 479 – 484, 1953

7 Tabellenanhang

Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVA-Exposition**Tabelle 1: Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)**

Zellzahl in 10 ⁶ CFU/μl				
Bestrahlungs- dosis in J/cm ²	Trp	SD Trp	Arg	SD Arg
0	253	28,09	283,5	57,34
100	230	56,44	247,5	25,93
200	117	15,82	67	41,7
	Trp(R)	SD Trp(R)	Arg(R)	SD Arg(R)
0	233	16,4	269	43,91
100	236	34,25	201,5	25,36
200	160,5	14,62	97	28,09

Tabelle 2: Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVA-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktionen 2 bzw. 3 (10%)

Zellzahl in 10 ⁶ CFU/μl				
Bestrahlungs- dosis in J/cm ²	Trp	SD Trp	Arg	SD Arg
0	194	30,79	175,5	33,06
100	197,5	21,81	178,5	32,3
200	111	15,25	45	39,88
	Trp (2)	SD Trp (2)	Arg (2)	SD Arg (2)
0	224,5	105,65	203,5	36,57
100	141	10,29	147	46,67
200	11,5	6,87	64,5	53,13
	Trp (3)	SD Trp (3)	Arg (3)	SD Arg (3)
0	179	33,88	187	48,68
100	162	70,88	165,5	43,02
200	11,5	9,33	85,5	19,13

Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVB-Exposition

Tabelle 3: Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Rohextrakt (10%)

Zellzahl in 10 ⁶ CFU/μl				
Bestrahlungs- dosis in mJ/cm ²	Trp	SD Trp	Arg	SD Arg
0	253	28,09	283,5	57,34
500	141,5	23,07	81,5	32,69
1000	119,5	15,89	20,5	14,65
2000	95	24,42	9,5	11,41
	Trp (R)	SD Trp(R)	Arg (R)	SD Arg(R)
0	233	16,4	269	43,91
500	181,5	20,78	158,5	15,2
1000	167,5	17,51	123,5	24,11
2000	155,5	30,12	112,5	32,99

Tabelle 4: Wachstumsraten von *M. furfur* CBS 1878 nach UVB-Exposition und Vorbehandlung mit Säulenfraktionen 2 und 3 (10%)

Zellzahl in 10 ⁶ CFU/μl				
Bestrahlungs- dosis in mJ/cm ²	Trp	SD Trp	Arg	SD Arg
0	194	30,79	175,5	33,06
500	128,5	24,69	36	16,64
1000	99	49,13	17,5	16,23
2000	65,5	48,96	10,5	8,32
	Trp (2)	SD Trp(2)	Arg (2)	SD Arg(2)
0	203,5	36,57	224,5	105,65
500	117	54,29	64	19,23
1000	88,5	69,12	41,5	19,58
2000	74	70,23	10,5	6,2
	Trp (3)	SD Trp(3)	Arg (3)	SD Arg(3)
0	187	48,68	179	33,88
500	119,5	13,95	73	15,5
1000	115,5	13,99	36,5	17,77
2000	101	16,28	13,5	9,45

Tabelle 5: Wachstum von *M. furfur* CBS 1878 (Dix/Arg) nach Vorbehandlung mit DC-Banden (Rf 0,2 bzw. Rf 0,15) und Bestrahlung mit 1000 mJ/cm² UVB

Zellzahl in 10 ⁶ CFU/μl						
Bestrahlungs- dosis in mJ/cm ²	DMSO	SD DMSO	Rf 0,2	SD Rf 0,2	Rf 0,15	SD Rf 0,15
0	201	63,85	192,1	51,3	194,9	9,52
1000	5	6,63	142,6	43,7	169,4	27,24

Tabelle 6: Pityrialacton – physikalische und spektrometrische Daten

Schmelzpunkt	>250 °C
R _f -Wert	0.2 (Kieselgel 60 Platten, Toluol:Ethylformiat:Ameisensäure 10:5:3)
UV	(Methanol): λ_{\max} (log ϵ) = 224 (4.07), 276 (3.63), 292 (sh, 3.55), 356 nm (3.55).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ = 3402 (ss, br), 2926 (w), 2855 (w), 1736 (s), 1639 (ss), 1536 (m), 1491 (w), 1458 (m), 1424 (m), 1365 (m), 1341 (m), 1244 (m), 1209 (m), 1127 (w), 1105 (w), 1024 (w), 1010 (w), 955 (w), 744 (s), 585 cm ⁻¹ (w).
¹ H-NMR	Siehe Tabelle 7
¹³ C-NMR	Siehe Tabelle 7
EI-MS	m/z (%) = 329 (15), 328 (92) [M] ⁺ , 315 (15), 314 (64), 270 (16), 269 (22), 258 (11), 257 (38), 256 (100), 255 (38), 228 (8), 227 (9), 207 (59), 144 (14), 130 (13), 128 (20), 117 (13), 57 (13), 51 (12), 45 (14).
HR-EI-MS	[M] ⁺ calcd. 328.0848, found 328.0866.

Tabelle 7: ¹H and ¹³C NMR-Daten von Pityrialacton (1) in [D₆]DMSO

C-atom	δ_C [ppm]	δ_H [ppm]	m	J_{HH} [Hz]
2	168.10			
3	172.84			
4	117.28			
5	151.94			
2'	128.06	7.57	s	
3'	108.36			
3a'	125.37			
4'	121.43	6.65	m	
5'	119.11	6.48	dd	7.44, 7.44
6'	121.35	6.88	dd	7.44, 7.44
7'	111.49	7.27	d	7.44
7a'	136.16			
2''	126.37	7.41	d	2.28
3''	107.00			
3a''	126.37			

4''	120.75	7.00	d	8.22
5''	118.65	6.65	m	
6''	121.13	6.94	dd	8.22, 8.22
7''	111.56	7.32	d	8.22
7a''	135.82			
1' NH		11.48	s	
1'' NH		11.24	s	

¹H, ¹H COSY, HMQC and HMBC-Messungen

8 Zusammenfassung

M. furfur synthetisiert tryptophanabhängig ein braunes Pigment („Rohextrakt“), das aus einer Vielzahl von Pigmenten und Fluorochromen besteht.

Mit Hilfe chromatographischer Verfahren konnte aus dem Rohextrakt eine in der Natur bisher nicht beschriebene Substanz, das Pityrialacton ($C_{20}H_{12}N_2O_3$) isoliert werden. Pityrialacton besteht aus zwei über einen Fünfring mit einer Lactoneinheit verbundenen Indolgruppen und fluoresziert in Lösung gelbgrün. Das parallel isolierte Pityriaanhydrid ($C_{20}H_{12}N_2O_3$) ist ein Strukturisomer von Pityrialacton. Auch Pityriaanhydrid wurde bisher nicht als Naturstoff beschrieben, tritt aber als Zwischenstufe bei der Synthese von einer Gruppe von Proteinkinase C-Inhibitoren, den Bisindolylmaleimiden, auf. Eine regulierende Wirkung auf Entzündungsprozesse in der Haut könnte also für Pityriaanhydrid vermutet werden. Weiterhin könnten die gebildeten mesomeren Substanzen einen Abwehrmechanismus gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies auf der Haut darstellen und damit dem Erhalt eines für *M. furfur* günstigen Hautmilieus dienen. Die nur gering ausgeprägte Entzündungsreaktion bei der Pityriasis versicolor auf der Haut könnte so erklärt werden.

Das gelbgrün fluoreszierende Pityrialacton mit einem Anregungsmaximum von 366 nm im wässrigen Milieu (Fluoreszenzspektrum) stellt einen Erklärungsansatz für die Fluoreszenzerscheinungen der Pityriasis versicolor im Wood-Licht (366 nm) dar. Dabei könnten sich die in der Literatur beschriebenen Farbunterschiede der fluoreszierenden Hautläsionen entsprechend den Farbvariationen des Pityrialacton in wässrigem oder lipophilerem Milieu aus einem individuell unterschiedlichen Hautmilieu (abhängig von der Schweiß- bzw. Talgproduktion) ergeben.

Weiterhin kann durch die Bildung von UV-schützenden Substanzen die verminderte Sonnenbrandneigung in den depigmentierten Arealen bei der Pityriasis versicolor alba erklärt werden. Die Beteiligung der fluoreszierenden Bestandteile des Rohextraktes an dieser Wirkung konnte nachgewiesen werden und findet im Charakter der Fluoreszenz, nämlich der Abgabe von absorbierter Energie in Form von Licht mit einem kleinen Wärmeanteil ihr Korrelat. Ferner sind auch andere nicht fluoreszierende Substanzen wie das Pityriacitrin an der Lichtschutzwirkung beteiligt.

Zusammenfassend konnten durch die Identifizierung der ersten Substanzen aus dem Rohextrakt Erklärungsansätze für verschiedene klinische Phänomene bei der Pityriasis versicolor geschaffen werden. Weitere Untersuchungen könnten dazu beitragen, neue Erkenntnisse über Stoffwechselprozesse bei *M. furfur* und die Pathogenese der Pityriasis versicolor zu gewinnen.

8 Summary

With tryptophane as the main nitrogen source *M. furfur* produces a brownish pigment (“crude extract”), that consists of many pigments and fluorochromes. With means of chromatography, a compound hitherto unknown in nature was isolated from the crude extract: pityrialactone (C₂₀H₁₂N₂O₃). It is a new bisindolyl compound which shows green-yellow fluorescence in solution. Pityrialactone is accompanied by an isomeric bisindolylmaleic anhydride: pityriaanhydride (C₂₀H₁₂N₂O₃) - it has also not been described as a natural product but is an intermediate in the synthesis of a group of proteinkinase-C-inhibitors, the bisindolylmaleimids. Therefore a regulatory effect on inflammation processes in the skin by pityriaanhydrid could be assumed.

Further, the synthesized mesomeric substances could serve as a free radical trap. This could explain the mild inflammation of the skin in pityriasis versicolor.

The green-yellow fluorescence of pityrialactone can explain the hitherto unelucidated fluorescence phenomena in pityriasis versicolor. Interestingly, excitation maxima of pityrialacton dissolved in water (366 nm) are exactly within the Wood’s lamp emission range. According to the different colours from pityrialactone in a watery or in a lipophilic milieu, the different colours of the skin lesions in pityriasis versicolor could result from a varying skin environment (dependent on the production of sweat and sebum).

The production of uv-protective agents could explain the decreased sunburn risk in the depigmented areas in pityriasis versicolor alba. The protective properties of the fluorescing substances could be shown in this work. During fluorescence, a large part of absorbed light energy is emitted as photon, only a small part is converted to heat. Thus, fluorochromes provide a reasonable mechanism to limit cellular damage by UV exposure. It appears that other non-fluorescing metabolites as the pityriacitrin also have UV-protective protective properties.

The identification of the first compounds of the crude extract could explain different clinical phenomena in pityriasis versicolor. Further investigations could elucidate metabolic processes of *M. furfur* and pathogenesis of pityriasis versicolor.

9 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Peter Mayser bedanken. Er stellte mir das interessante Dissertationsthema zur Verfügung und ermöglichte mir die Durchführung des experimentellen Teils in den mykologischen Labors der Hautklinik. Sowohl während des experimentellen Teils als auch bei der Verfassung der Doktorarbeit stand er einem stets mit großem Engagement und vielen guten Ideen zur Seite.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Hans-Joachim Krämer für die Unterstützung bei der Durchführung der HPLC bedanken. Durch seine Hilfe trug er entscheidend zur Abrundung der vorliegenden Arbeit bei. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Thomas Monsees der mich zu Beginn des experimentellen Teils in die Methode der HPLC eingeführt hat. In diesem Zusammenhang ist auch den Kooperationspartner in München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Steglich zu danken, durch ihre Hilfe konnte die Strukturaufklärung der isolierten Substanzen gelingen.

Ein besonderer Dank gilt auch den anderen Doktoranden des mykologischen Labors. Durch das sehr angenehme, freundliche Arbeitsklima mit gegenseitiger Unterstützung konnte so manche Durststrecke gemeistert werden.

Eine große Hilfe war auch Frau Ursula Förste, die einen in die Kunst des Agarkochens eingeführt und mit vielen guten Tips unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinen Eltern für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht während des Studiums und der Doktorarbeit bedanken.

10 Lebenslauf

Name: Heike Maria Voß geb. Stapelkamp

Geboren: 10. September 1974

In: Dinslaken

Schulbildung

1981 – 1985

Gemeinschaftsgrundschule an der Gartenstraße, Dinslaken

1985 – 1994

Theodor-Heuss-Gymnasium, Dinslaken, Abschluss mit Abitur

Studium

1994 – 2001

Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen

21.08.1996

ärztliche Vorprüfung

28.08.1997

erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

11.04.2000

zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

05/2000 – 04/2001

Praktisches Jahr

1. Tertial: Zentrum für Dermatologie und Andrologie an der JLU Giessen
2. Tertial: Innere Medizin am UMC St. Radboud, Nijmegen, Niederlande
3. Tertial: Chirurgie am Klinikum Wetzlar/Braunfels

29.05.2001

dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion

SS 1998 – SS 2000 Durchführung des experimentellen Teils in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Peter Mayser in den mykologischen Labors des Zentrums für Dermatologie und Andrologie an der JLU Giessen

Ärztliche Tätigkeit

September 2001 – Februar 2003: Ärztin im Praktikum am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der JLU Giessen

Seit März 2003: Assistenzärztin am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der JLU Giessen

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, einhalten.

Gießen, im November 2003