Tryptophan-abhängige Pigmentbildung bei *Ustilago maydis* sowie der Mutante *UV31* im Vergleich zu *Malassezia furfur*

Inauguraldissertation
zur Erlangung eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von Philipp Ernst Schering
aus Buchholz in der Nordheide

Giessen 2007

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. P. Mayser
des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Mayser
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. E. Beck

Tag der Disputation: 05.10.2007

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

Abstracts:

Schering, P., Ying, W., Schirawski, J., Krämer, H.-J., Spiteller, P., Mayser, P.: Tryptophanabhängige Pigmentbildung bei *U. maydis* sowie verschiedenen Mutanten, Mycoses, September 2005 - Vol. 48 Issue 5 Page 275-vii

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ARG	Arginin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HCl	Salzsäure
HPLC	high liquid performance chromatography
LEU	Leucin
M. furfur	*Malassezia furfur*
NaCl	Kochsalzlösung
NH_3	Ammoniak
PAL	Phenylalanin ammonia-lyase
PHE	Phenylalanin
SD	Standardabweichung
R_f	relative Wanderungsgeschwindigkeit
ROS	reactive oxygen species
TRP	Tryptophan
U. maydis	*Ustilago maydis*
UV	ultraviolett
UV31	UV-induzierte Mutante 31 von *U. maydis*

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 *Malassezia furfur* 1

1.2 *Ustilago maydis* – ein Überblick 4

1.3 Einsatz von *U. maydis* im Labor und als Modell 7

1.4 Verbindung zwischen *M. furfur* und *U. maydis* 7

1.5 UV-Strahlung und ihre Wirkungen 9

1.6 Oxidativer Stress 11

2 HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG 13

3 MATERIAL UND METHODEN 15

3.1. Referenzstamm 15

3.2. Anzucht und Nährmedien 15

3.3. Gewinnung des Rohextraktes 17

3.4. Säulenchromatographie 17

3.5. Dünnschichtchromatographie 18

3.6. Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie 19

3.6.1 Präparative HPLC 19

3.6.2 Analytische HPLC 20

3.7 Weitere chemisch-analytische Methoden 20

3.8 Bestrahlungsversuche 21

3.8.1 Keimzahlbestimmung 21

3.8.2 Eichkurvenerstellung 24

3.8.3 Bestrahlung 27

3.8.4 Statistik 29

4 ERGEBNISSE 31

4.1 *U. maydis* 31

4.1.1 Makroskopie 31

4.1.2 Säulenchromatographie 32

4.1.3 Dünnschichtchromatographie 32

4.1.3.1 *U. maydis* Fraktionen 2-6 33

4.1.4 HPLC 36
4.1.5 Strukturaufklärung 36
4.1.6 Absorptionsspektrum 38
4.1.7 Bestrahlungsversuche 39
4.1.7.1 Wachstumsraten ohne UV-Exposition 39
4.1.7.2 Wachstumsraten nach UV-A Exposition 40
4.1.7.3 Wachstumsraten nach UV-B Exposition 42
4.2 UV-induzierte Mutanten von *U. maydis* 47
4.2.1 Makroskopie 47
4.2.2 Säulenchromatographie 48
4.2.3 Dünnschichtchromatographie 48
4.2.3.1 *UV31* Fraktionen 1-2 49
4.2.3.2 *UV31* Fraktionen 1-2 vs. *U. maydis* Fraktionen 1-3 52
4.2.3.3 *UV31* Fraktionen 1-2 vs. Standards 56

5 DISKUSSION 59

6 ZUSAMMENFASSUNG 74

7 SUMMARY 76

8 LITERATURVERZEICHNIS 78

9 ANHANG 86
9.1 Dünnschichtchromatographie *U. maydis* Fraktionen 2-6 86
9.2 Dünnschichtchromatographie *UV31* Fraktionen 1-2 88
9.3 Dünnschichtchromatographie *UV31* Fraktionen 1-2 vs. *U. maydis* Fraktionen 1-3 91
9.4 Dünnschichtchromatographie *UV31* Fraktionen 1-2 vs. Standards 93
9.5 Tabellen Bestrahlungsversuche 96

10 ERKLÄRUNG 102

11 DANKSAGUNG 103

12 LEBENSLAUF 104

1 EINLEITUNG

1.1 *Malassezia (M.) furfur*

M. furfur ist ein schon seit über 100 Jahren bekannter Hefe-Pilz, der häufig in der menschlichen Hautflora zu finden ist und seit langer Zeit als Erreger der Pityriasis versicolor gilt. Auch bei anderen Warmblütern wurde er bereits beobachtet (Guého et al., 1998). Außer *M. pachydermatis* ist die Familie der Malasseziales von der Versorgung mit längerkettigen Fettsäuren abhängig (Kwon-Chung 1992, Ingham 1993), wie sie unter anderem auf der Haut vorkommen. Entsprechend beobachtet man die nach neueren Erkenntnissen wahrscheinlich von *M. globosa* beim Menschen ausgelöste Pityriasis versicolor (Crespo et al., 2000) hauptsächlich im Erwachsenenalter, wenn die Talgdrüsen am aktivsten sind (Gupta et al. 2003). Auch Aminosäuren können von *M. furfur* verstoffwechselt werden (Mayser und Imkampe 1998), wobei unverzweigte wie etwa ARG besser verstoffwechselt werden können als verzweigte (z.B. LEU), aromatische (z.B. PHE) und heterozyklische (z.B. TRP). Die Pityriasis versicolor ist eine auf die Epidermis beschränkte, nicht-entzündliche Mykose. Begünstigt wird ihre Entstehung durch Hyperhidrose sowie Haut-Okklusion und der damit verbundenen lokal erhöhten Temperatur. Es wird auch über ein gehäuftes Vorkommen der Pityriasis versicolor in tropischen Gebieten berichtet. Gehäuft tritt die Pityriasis versicolor in Deutschland daher auch in den heißen Sommermonaten auf. Das Auftreten ist zumeist im Brustbereich oder der Rückenmitte, wo kleine bräunliche, schuppende und nicht konfluierende Herde beobachtet werden. Die Herde können sich von den Primärlokalisationen weiter ausbreiten und auch konfluieren. Bei UV-Exposition kommt es nicht zur Bräunung der betroffenen Hautareale. Es findet im Gegenteil ein relativer Farbumschlag statt, der die Herde weiß erscheinen lässt. Bis vor kurzem wurden dabei vor allem zwei mögliche Pathomechanismen diskutiert. Zum einen sollen die bei der Pityriasis versicolor auftretenden Schuppen eine UV protektive Wirkung haben (Lutz 1892, Kistiakovsky 1927, Lewis und Hopper 1936). Zum anderen wird auch die Hemmung der Melaninsynthese durch *M. furfur* in Erwägung gezogen (Ruete 1933, Charles 1973, Jung 1976, Bojanovsky 1979), was auch durch das Auftreten bei dunkelhäutigen Menschen unterstützt wird. Neueren Erkenntnissen zufolge wird jedoch besonders dem vom Pilz unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle selbst produzierten UV Filter Pityriacitrin eine entscheidende Bedeutung zugesprochen (Mayser et al. 1998, 2002). Interessanterweise wird dieser UV-Schutz nur unter diesen Bedingungen gebildet. Darüber hinaus wird *M. furfur* auch mit der Pityrosporum-

Follikulitis sowie dem seborrhoischem und dem atopischen Exzem in Verbindung gebracht (Mayser et al. 1996).

Bei der Auswertung verschiedener Gensequenzen mit Hilfe von Gendatenbanken durch Begerow und Bauer vom Botanischen Institut der Universität Tübingen (2000) fand sich *Malassezia furfur* erstaunlicherweise unter den Brandpilzen wieder, die eigentlich für ihre Phytopathogenität bekannt sind (http://www.uni-tuebingen.de/uni/qvo/at/attempto8/text8/att8-28.html). Bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist *Ustilago maydis*, Erreger des Maisbeulenbrandes. Basierend auf diesen Daten wurde *M. furfur* von Begerow und Bauer taxonomisch neu zugeordnet. Demnach bildet die *Malassezia* Spezies, zu der neben *M. furfur* auch *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* und *M. sloofficae* zählen, eine eigene Familie (Malasseziales), die den Exobasidiomycetidae (Ustilaginomycetes) angehört (Abb. 1).

Während besonders *M. pachydermatis*, *M. furfur* und *M. sympodialis* unter anderem bei Hunden und Katzen (Nardoni et al 2004, 2005), Hühnern (Gründer, Mayser, Redmann, Kaleta 2005) und sogar Seelöwen (Nakagi et al. 2000) beschrieben wurden und als Auslöser von Dermatitiden vermutet werden, bleibt die Pityriasis versicolor einzig auf den Menschen beschränkt. Auch beim genetisch eng verwandten Schimpansen ist sie nicht anzutreffen. Wie es zu diesem selektiven Auftreten kommt, ist bisher unklar. Durch die Ergebnisse von Mayser et al. (1998, 2002) wird die Erkrankung jedoch mit dem TRP-abhängigen Sekundärmetabolismus in Verbindung gebracht, welcher offenbar bei Mangel von favorisierteren Aminosäuren einsetzt. Ein solcher Mangelzustand ist beim schwitzenden Menschen denkbar, wohingegen andere Lebewesen nicht in der Lage sind, am ganzen Körper zu schwitzen. Im Schweiß selbst konnten bisher zwar nur geringe Mengen TRP nachgewiesen werden (Burke 1966, Hadorn 1967), jedoch ist eine Verstoffwechselung von TRP nach Verbrauch sämtlicher anderer Quellen durch *M. furfur* vorstellbar. Zu dieser Situation kann es durch die fehlende Transpiration bei Tieren nicht kommen, so dass dies das einzigartige Auftreten der Pityriasis versicolor beim Menschen erklären könnte.

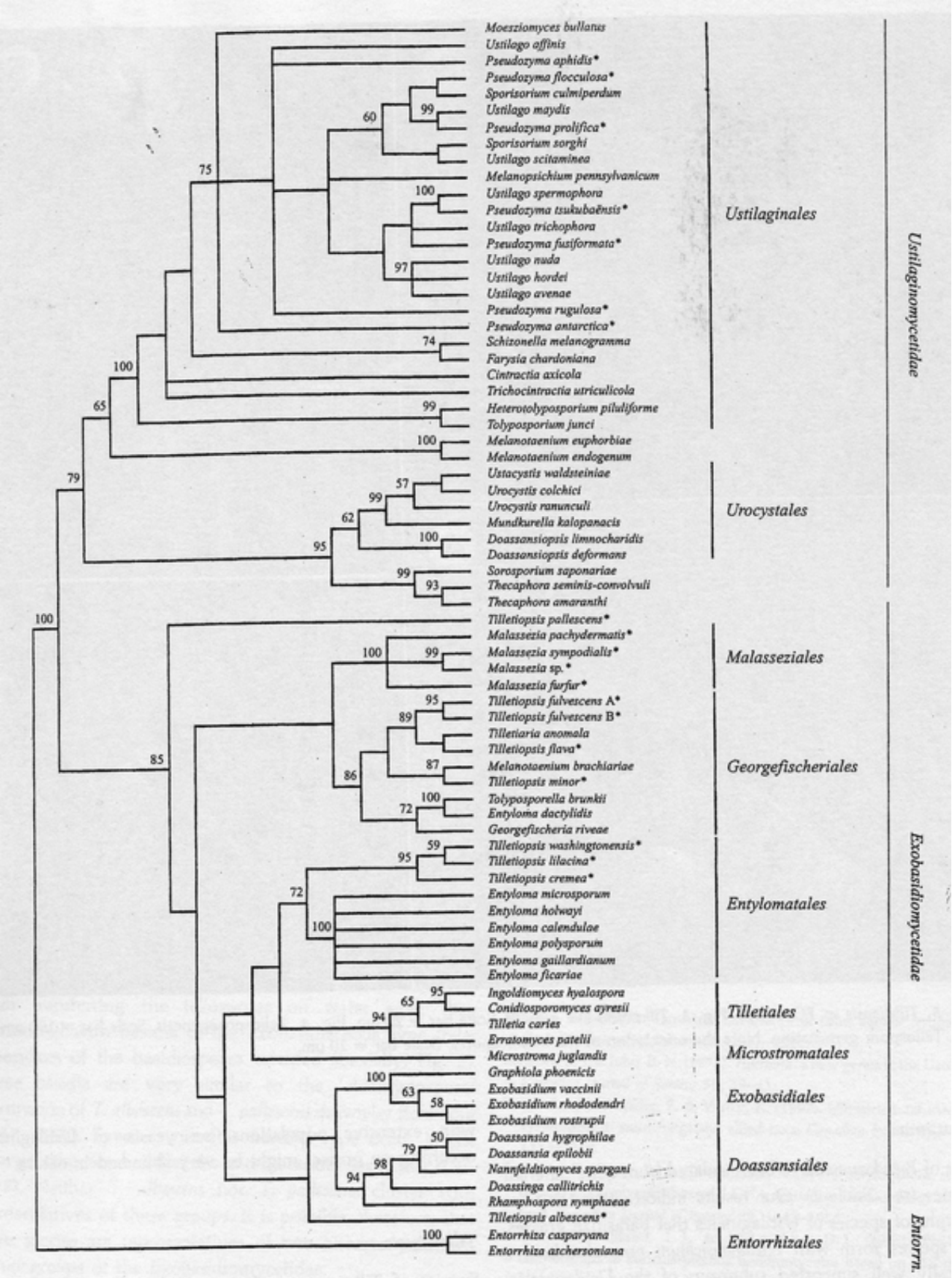


Abb. 1: *Stammbaum zur Verwandtschaft der Malasseziales zu den Ustilaginales. Aus Begerow, D., Bauer, R. (2000) Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences, Mycol. Res. 104 (1): 53-60*

1.2 *Ustilago maydis* – ein Überblick

U. maydis (ustilago [lat.] = brennen) ist ein Pilz aus der Abteilung der Basidienpilze (*Basidiomycota*). Er gehört zur Klasse der Brandpilze (*Ustilaginomycetes*) und ist Erreger des Maisbeulenbrandes, im angloamerikanischem Raum corn smut genannt. Befallen werden die Maispflanze (*Zea mays*) sowie dessen Wildform Teosinte (*Z. mays ssp. parviglumis* und *ssp. mexicana*). Wie die Pflanze selbst ist auch die Krankheit in Amerika beheimatet. Im 16. Jahrhundert wurde Mais, den die Spanier von ihren Kreuzfahrten mitbrachten, erstmals in Andalusien angebaut, (http://www.biosicherheit.de/mais/121.doku.html). Die Krankheit trat erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts in Mitteleuropa auf und ist mittlerweile in fast allen Teilen der Welt zu finden. Während der Maisbeulenbrand in Deutschland selten ist und überwiegend im süddeutschen Raum auftritt, ist er in Südosteuropa als einer der wichtigsten Maiserkrankungen anzusehen (Hoffmann, Schmutterer 1999). Die ideale Wachstumtemperatur liegt zwischen 26 und 28° Celsius. Trockenperioden können das Ausmaß des Befalls noch verstärken. Regenfälle oder Beregnen der Pflanzen kann hingegen zu einer Verminderung des Auftretens der Krankheit führen. Zudem kann der Erreger bis zu 10 Jahre ohne Wirtspflanze in Form von Sporen im Boden überleben. (Heitefuss, König, Obst, Reschke 2000). *U. maydis* ist in der Lage, die oberirdischen Anteile der Maispflanze zu infizieren, wobei besonders eine Vorschädigung der Pflanze durch Schädlinge wie die Fritfliege oder Wetterschäden eine Infektion begünstigt. Die Primärinfektion im Frühjahr geschieht über noch im Boden oder an der Bodenoberfläche befindlichen haploide Sporen. Diese keimen aus, bilden ein vierzelliges Promycel und fusionieren paarweise zu einem Dikaryon, was über den so genannten *a* Kreuzungtyp-Locus gesteuert wird, der für die Zell-Zell-Erkennung zuständig ist und von dem bisher 2 Allele bekannt sind (Abb. 2). Der ebenfalls vorhandene *b* Kreuzungstyp-Locus, von dem 33 Allele bekannt sind, ist für die weitere sexuelle Entwicklung sowie durch kombinatorische Interaktion für die Pathogenität zuständig (Banuett, F., Herskowitz, I. 1989, 1996; Kahmann, R., Romeis, T., Bölker, M., Kämper, J. 1995). Voraussetzung für die Bildung eines pathogenen Dikaryons ist das Vorhandensein von Heterozygotie in *a* und *b* oder Homozygotie in *a* notwendig. Ein solches Dikaryon ist für Wachstum und Differenzierung auf die Wirtspflanze angewiesen (http://www.uni-marburg.de/fb17/forschung/fobericht/kahmann). Falls *b* oder *a* und *b* homozygot sind, entsteht eine apathogene Form, die ein hefeartiges Wachstum zeigt. Nach Infektion mit dem pathogenen Typ entsteht an der Pflanze ein so genanntes weiches Gallengewebe. Dieses kann sich an Blättern, Stängeln, Kolben und Rispen befinden (Abb. 3).

Zunehmend füllen sich dann die Gallen mit dunklen Sporenmassen, wobei eine einzelne Spore ca. 10 µm groß ist.. Zunächst werden die wachsenden Gallen, die einen Durchmesser von bis zu 10 cm erreichen können, von Gewebshaut des Wirts überzogen. Reißt diese ein, werden die Sporen freigesetzt und können durch Wind, Regen, Insekten etc. weiterverbreitet werden.

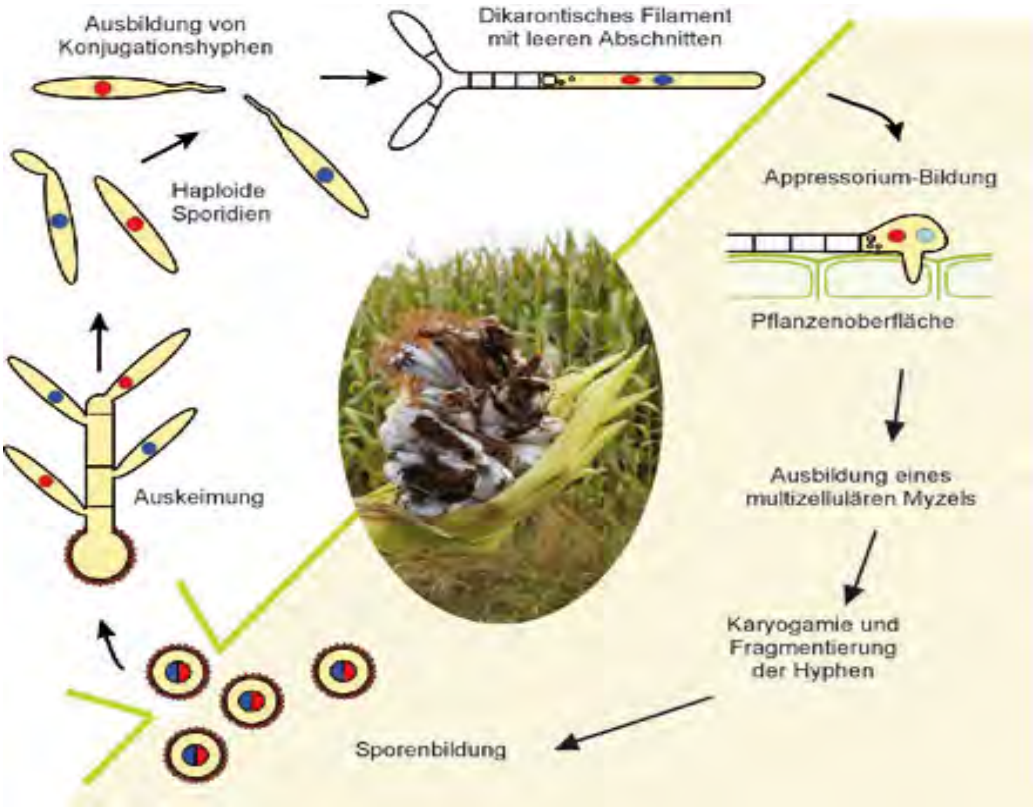


Abb. 2: *Der pflanzenabhängige Lebenszyklus von U. maydis. Haploide Sporen keimen aus, bilden ein 4-zelliges Promycel und fusionieren paarweise zu einem Diakaryon. Darauf erfolgt die Infektion der Wirtspflanze und die Ausbildung eines multizellulären Myzels. Über Karyogamie und Fragmentierung der Hyphen kommt es zur erneuten Sporenbildung Schema: MPI terr. Mikrobiologie / Feldbrügge*

Die humanpathogene Bedeutung von *U. maydis* gilt nicht als abschließend gesichert. Es wird über einen Fall einer Infektion eines zentralen Venenkatheters durch *Ustilago* berichtet (Patel, R., Roberts, G. D., Kelly, D. G., Walker, R. C. 1995). Leider liegen dazu keine näheren Informationen vor. Berichtet wird zudem über Infektionen mit Basidiomyceten wie eben *U. maydis*, speziell seit dem Auftreten von AIDS. Genannt werden neben chronischer Sinusitis auch Läsionen der Mundschleimhaut, cerebrale Abszesse, Onychomykose sowie Endokarditis (Lacaz, Heins-Vaccari, De Melo, Hernandez-Arriagada 1996). Häufiger wird jedoch über eine Wehen induzierende oder abortive Wirkung berichtet (z.B.:

http://en.wikipedia.org/wiki/Corn_smut), im Bereich der Homöopathie auch wiederholt von der therapeutischen Wirkung bei gynäkologischen Problemen (z.B.: http://www.bunkahle.com/Homoeopathie/matmed/apotheke.html.). Gesicherte Studien oder Daten gibt es dazu jedoch nicht. In der Diskussion steht jedoch, dass *U. maydis* Sporen Alkaloide enthalten können, die eine ähnliche Wirkung wie Mutterkornalkaloide haben sollen (Hoffmann, Schmutterer 1999). Dabei handelt es sich um Verbindungen, die vom *Claviceps purpurea* bekannt sind, einem Pilz, der vornehmlich die hiesigen Getreidearten befällt. Mutterkornalkaloide (z.B. Ergotamin, Ergometrin) werden bereits seit langem unter anderem in der Kardiologie und der Gynäkologie eingesetzt. Von Vergiftungen durch *U. maydis* ist in dieser Hinsicht jedoch nichts bekannt. Im Gegenteil, werden doch die an den Pflanzen gewachsenen, mit Sporen gefüllten Gallen in Mexiko als Delikatesse angesehen, als „Cuitlacoche“ oder auch „Huitlacoche“ verehrt und auch im Ausland unter anderem als „Mexican truffle“ und „Caviar azteca“ angeboten.

Abb. 3: *Maisbrand auf einem Maiskolben.*
Foto: http://www.javiergimenez.com/setas/Images/Ustilago20maydis.jpg

1.3 Einsatz von *U. maydis* im Labor und als Modell

U. maydis ist in seiner apathogenen Form als Reinkultur auf verschiedenen Nährmedien gut anzüchtbar. Das hefeartige Wachstum der apathogenen Form ist dabei von großem Vorteil. Dem Stamm 521 kommt eine besondere Rolle zu. Nachdem Bayer CropScience dessen Genomsequenz bestimmen konnte, war es möglich DNA Chips mit 90 % der geschätzten 7000 Gene zu produzieren. Seit Juli 2003 sind alle Sequenzinformationen öffentlich zugänglich (Forschungsbericht Genetik AG Kahmann, Philipps-Universität Marburg 2005). Dadurch wird es möglich, die Interaktionen zwischen *U. maydis* und seinem Wirt, der Maispflanze, näher zu betrachten. Durch die Möglichkeit der genetischen Modifikation sowie das Wissen um fast die komplette DNA Sequenz ist Forschung auf molekularer Ebene möglich. Dabei kommt *U. maydis* ein Modellcharakter zu. Das bedeutet, dass man zum einen die phytopathologische Komponente betrachten kann. Zum anderen können aber ebenfalls genetisch kontrollierte Vorgänge untersucht werden, die unter anderem auch im menschlichen Organismus ablaufen. So wurden und werden z.B. DNA Reparatur Prozesse und die diese steuernden Gene untersucht. Eines dieser Gene in *U. maydis* ist das Brh2, welches als homolog dem BRCA2 des Menschen anzusehen ist (Kojic et al. 2002, 2003, 2005). BRCA2 ist im Chromosom 13q lokalisiert. Eine Mutation in diesem Gen erhöht beim Menschen das Risiko, an Mammakarzinom und Ovarialkarzinom zu erkranken (z.B. Roth et al. 1998). Die Arbeit mit *U. maydis* hat dabei mit einem großen Anteil zum Verständnis des BRCA2 Gens beigetragen. Weiterhin werden auch eine Vielzahl anderer Gene untersucht. Dabei werden unter anderem auch *U. maydis* Mutanten erstellt, um den Einfluss und die Funktion verschiedener Gene näher untersuchen zu können.

1.4 Verbindung zwischen *M. furfur* und *U. maydis*

Wie vor dem Hintergrund unterschiedlicher Habitate und Wirtsspezifitäten die enge genetische Verwandtschaft zwischen *M. furfur* und *U. maydis* erklärt werden kann, ist bisher weitgehend unklar. Berichte über das Auftreten von *M. furfur* auf Pflanzen gibt es nicht. Dennoch wird spekuliert, dass auch *M. furfur* ein pflanzenparasitäres Stadium haben könnte (Begerow, Bauer 2000) beziehungsweise aus dem phytopathogenen Bereich kommend auf den Menschen übergesiedelt ist. Maßgeblich ist jedoch die Tatsache, dass bei *M. furfur* im Gegensatz zu *U. maydis* keine haploide (apathogene) und diploide (pathogene) Form beobachtet wird. Dementsprechend weisen *M. furfur* und *U. maydis* Unterschiede in der

Entwicklung ihrer Pathogenität auf. Dennoch ist eine evolutionsgeschichtlich gemeinsame Entwicklung möglich, in deren Verlauf sich beide Pilze auf andere Wirte spezialisiert und angepasst haben könnten. In diesem Zusammenhang ist die mutmaßliche Evolution der Phytopathogenität bei Pilzen (Prell 1996) zu beachten, nach der sich vermutlich auch *U. maydis* und *M. furfur* entwickelt haben. Dabei werden 4 Stufen unterschieden, die sich durch einen immer höheren Grad der Spezialisierung auszeichnen. Auf der erste Stufe stehen die Saprophyten, die sich von totem organischem Material ernähren. Dies kann sich auch auf lebenden Pflanzen befinden. Ein Auftreten als pathogenes Agens gegenüber lebenden Pflanzen ist den Saprophyten nicht möglich. Auf der zweiten Stufe folgen die Saprophyten mit ersten eigenen phytopathogenen Mechanismen. Das bedeutet, dass diese Pilze bereits in der Lage sind lebende Pflanzen anzugreifen. Diese sind in der Regel jedoch schon vorgeschädigt oder anderweitig geschwächt (z.B. Alter). Demnach hat diese weiterentwickelte Gruppe der Saprophyten nur eine geringe Virulenz. Diskutiert wird jedoch über weiter spezialisierte Saprophyten, die bereits über Mechanismen verfügen, bestimmte Angriffspunkte (Defekte etc.) zu erkennen sowie spezielle Penetrationsmechanismen zu entwickeln, um in den jeweiligen Wirt einzudringen. Im Allgemeinen verfügen Pflanzen über eine sogenannte Basisresistenz um sich vor Pathogenen zu schützen. Dazu besitzt die Pflanze Rezeptoren, an die Elicitoren binden können. Es handelt sich dabei um Pathomechanismen, die von allen phytopathogenen Pilzen verwendet werden. Da die Basisresistenz bei geschwächten Pflanzen reduziert ist, ist es für die Pathogene der zweiten Stufe entsprechend einfacher, diese zu überwinden. Der dritten Stufe der Spezialisierung gehören dann die pertrophen Pathogene an. Diese ernähren sich nur noch gelegentlich saprophytär, da sie primär pflanzenpathogen sind. Damit sind auch sie in der Lage lebende Pflanzen anzugreifen. Sie beginnen ihren Zyklus in der Pflanze, um dann bei Absterben derselben in den toten Überresten zu überwintern. Die pertrophen Pathogene zeichnen sich bereits durch Wirtsspezifität, Penetrationsmechanismen sowie der Entwicklung spezieller Mechanismen zur Umgehung der Basisresistenz aus (z.B. Suppression). Zudem können sie Enzyme (z.B. Cellulasen) und Toxine produzieren, wobei letztere bereits sehr selektiv über entsprechende Rezeptoren auf eine bestimmte Wirtsspezies wirken können. Manche Pflanzen sind jedoch auch hier noch in der Lage, sich durch verschiedene Enzyme vor den Toxinen zu schützen. Der Großteil der derzeit bekannten phytopathogenen Pilze gehört der dritten Stufe an. Die vierte und derzeit höchste Stufe der Spezialisierung wird von den sich biotroph ernährenden Parasiten gebildet, die sich aus dem laufenden Stoffwechsel der Wirtszelle ernähren. Dabei sind sie bereits in der Lage, bestimmte benötigte Stoffwechselprozesse durch den Wirt

durchführen zu lassen. Dabei stellt sich durch die hohe Spezialisierung auch eine hohe Abhängigkeit des Parasiten vom Wirt dar. Bei allen 4 Spezialisierungsstufen sind fließende Übergänge anzunehmen. So soll es auch die Möglichkeit von Übergangsformen, speziell zwischen den Stufen 3 und 4 geben, die so genannte Hemibiotrophie. Auf die Einteilung und die Bedeutung dieses Modells für *U. maydis* und *M. furfur* wird im Verlauf der Diskussion nochmals eingegangen.

U. maydis gilt als einer der bekanntesten und relativ weit erforschten phytopathogenen Brandpilze. Er kann damit als Modell dienen, um mehr Informationen über *M. furfur* zu gewinnen und Gemeinsamkeiten oder Unterschiede, speziell vor dem evolutionsgeschichtlichen Hintergrund, hervorzuheben und zu verstehen. Dabei könnte neben der engen genetischen Verwandtschaft der Nachweis ähnlicher Stoffwechselprozesse und Abwehrstrategien Aufschluss darüber geben, wie es *M. furfu*r gelungen seien könnte, humanpathogen zu werden, ohne jedoch bei anderen Lebewesen die Pityriasis versicolor verursachen zu können.

1.5 UV-Strahlung und ihre Wirkungen

Ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung) in höherer Dosis stellt für viele Lebewesen, so auch für Pilze, ein potentiell vitales Risiko dar. Unter UV-Strahlung versteht man elektromagnetische Wellen mit einer Wellenlänge von 10 bis 400 nm. Das sichtbare Licht liegt etwa zwischen 400 und 760 nm. Als Infrarot-Strahlung bezeichnet man dann nicht mehr sichtbares Licht mit Wellenlängen über 760 nm. Im Allgemeinen werden drei UV Arten unterschieden, UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) und UV-C (200-290 nm). Alle drei können auch von biologischen Molekülen absorbiert werden und sowohl die DNA als auch andere Zellorganellen schädigen. Entsprechend kann der Stoffwechsel der Zellen sich verlangsamen oder ganz zum Erliegen kommen. Zellen verfügen im allgemeinen über DNA Reparatur-Enzyme, welche aber bei zu großer Schädigung fehlerhaft reagieren können. Dadurch kann es dann zu Fehlfunktionen bzw. Fehlinformationen kommen und die Zelle z.B. eigentlich ungewollt zur Proliferation angeregt werden. UV-C Strahlung wird im allgemeinen bereits durch die Ozonschicht abgehalten. Auf der Erde kommt daher besonders UV-A und UV-B eine größere Bedeutung zu. Dabei wird UV-B als die stärkere UV-Strahlung angesehen. Beide Arten sind jedoch in der Lage biochemische Prozesse auszulösen. Dies findet auch in der Haut statt, wo ein Teil der Strahlung reflektiert und ein anderer Teil

absorbiert wird. Die Haut reagiert dabei auf verschiedene Wellenlänge unterschiedlich. So induziert UV-A wesentlich schneller eine Bräunung der Haut (Sofortbräunung), während UV-B zu einer später einsetzenden, dafür stärkeren und länger anhaltenden Bräunung (Spätpigmentierung) sowie eher zu Erythemen (Sonnenbrand) führt. Dabei kommt es neben der Dosis auch auf den Hauttyp an (Tab. 1). Man unterscheidet 4 Typen:

Typ	**Sonnenbrand**	**Bräunung**	**Häufigkeit (%)**	**Eigenschutz (Minuten)**
I	immer	nie	2	5 bis 10
II	häufig	schwach	12	10 bis 20
III	selten	stark	78	20 bis 30
IV	nie	sehr stark	8	40

Tab 1: *Typenklassifizierung der Lichtempfindlichkeit der Haut in Mitteleuropa. Nach Rassner, G., Dermatolgie Lehrbuch und Atlas, 7. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Jena 2002*

Zusätzlich stehen dem Menschen verschiedene Schutzmechanismen zur Verfügung. Zum einen das Pigmentsystem der Melanozyten, dass je nach Rasse bzw. Lebensraum unterschiedlich stark Melanin produziert, welches in der Lage ist UV-Strahlung zu absorbieren. Auch das Stratum corneum kann UV protektiv wirken, wobei besonders die Dicke eine entscheidende Rolle spielt. So sind u.a. Hand- und Fußinnenflächen sehr unempfindlich gegenüber UV-Strahlung. Eigenschutz vor UV-Strahlung ist auch durch Verwendung verschiedener Sonnencremes oder Bedeckung der Haut durch Kleidung möglich. UV Licht ist allerdings nicht nur schädlich für den Menschen, sondern auch essentiell. So wird es besonders zur Vitamin D Synthese benötigt, kann aber auch eine psychologisch positive und antimikrobielle Wirkung haben, sowie der Stimulation des Immunsystems dienen, wobei hohe Dosen jedoch auch zu einer Suppression führen können (Rassner 2002). Auch andere Organismen wie etwa Pilze sind UV-Strahlung ausgesetzt. Bekannt ist, dass kleine Dosen zunächst einen anregenden Effekt auf Hefe- und Schimmelpilze haben können. Dies ist auch bei *U. maydis* bekannt, dessen Sporenkeimung durch UV-A Strahlung angeregt wird (Hoffmann, Schmutterer 1999). Höhere Dosen führen aus den oben genannten Gründen jedoch zum Zelluntergang. Daher sind auch

Mikroorganismen offenbar in der Lage, bestimmte Schutzmechanismen zu entwickeln. So ist von verschiedenen Pilzen (u.a. *Cryptococcus neoformans*) die Bildung von Melanin bzw. Melanin-ähnlichen Stoffen bekannt (Taylor 1987, Wang 1994). Torres et al. berichten 2004 über ein neu entdecktes Mycosporin bei *Collema cristatum*, dass vor UV-B Strahlung schützt. Bei *M. furfur* konnten Mayser et al. (1998, 2002) den schon genannten UV-Filter Pityriacitrin entdecken und nachweisen. Nur unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle produziert *M. furfur* ein dunkelbraunes Pigment, in dem auch Pityriacitrin enthalten ist. In verschiedenen Versuchen konnte dessen Funktion geprüft und belegt werden. Dies geschah zum einen im Vergleich zu gleichwertigen Kulturen, die Arginin (ARG) anstelle von TRP als alleinige Stickstoffquelle erhielten (Stapelkamp 2003), um zu überprüfen, ob ein Lichtschutz tatsächlich nur bei mit TRP angezüchteten Kulturen nachweisbar war. Zum anderen auch mit Bestrahlungsversuchen menschlicher Haut mit und ohne Auftragen des von *M. furfur* produzierten Pigments (Pape 2001). Desweiteren wuden auch schon erste Überlegungen über eine weitere Funktion der von *M. furfur* gebildeten Metabolite als Radikalfänger und somit als Schutzsysteme vor oxidativem Stress diskutiert (Stapelkamp 2003).

1.6 Oxidativer Stress

Im menschlichen Körper wird mit Hilfe der Atmungskette und des Zitratzyklus durch den Abbau von Kohlenhydraten und Fettsäuren ATP gewonnen. Dabei entstehen durch Oxidation von Acetyl-CoA auch CO_2 und H_20. Als Nebenprodukte können freie Radikale entstehen, die auch ROS (reactive oxygen species) genannt werden. Durch den Elektronenmangel sind diese Radikale hochreaktiv und reagieren dann mit anderen sie umgebenden Verbindungen. Kommt es durch diesen Vorgang zu einer Anhäufung von ROS, wird dies als oxidativer Stress bezeichnet, wobei es unter anderem auch zu Schädigung der DNA kommen kann. Durch vermehrte Bildung freier Radikale kann es somit zu beschleunigten Alterungsprozessen kommen. Auch wird die Bedeutung des oxidativen Stresses für die Entstehung zahlreicher Krankheiten bereits seit längerem diskutiert. Dies gilt unter anderem für M. Alzheimer, M. Parkinson und Diabetes mellitus. Auch eine kanzerogene Wirkung wird dem oxidativen Stress nachgesagt. Offenbar können neben der physiologischen Bildung von ROS auch ionisierende Strahlung und ein wässriges Milieu, wie zum Beispiel Schweiß, die Bildung von ROS begünstigen (Zitzler 2004). Dies ist speziell für die Pityriasis versicolor von besonderer Bedeutung, da gerade ein solches Milieu zum Ausbruch der Erkrankung notwendig erscheint.

Verschiedene Mechanismen können jedoch vor den ROS schützen. Dazu gehören unter anderem die Vitamine C und E, die als Radikalfänger wirken.

2 HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG

Mayser und Pape konnten bereits 1998 zeigen, dass der Hefepilz *Malassezia furfur*, welcher in der normalen Hautflora des Menschen vorkommt und als Erreger der Pityriasis versicolor gilt, unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle beginnt, Pigment zu bilden. Dabei handelt es sich um ein Substanzgemisch, welches eine Vielzahl an Farbstoffen und Fluorochromen enthält. Mayser konnte zeigen, dass dieser Mechanismus durch Gabe anderer Aminosäuren unterdrückt werden kann. Bereits 1998 konnte durch verschiedene Bestrahlungsversuche mit UV-A- und UV-B- Strahlung nachgewiesen werden, dass die Pigmente und Fluorochrome es *M. furfur* ermöglichen, sich gegenüber UV-Strahlung zu schützen. Zum Vergleich wurde *M. furfur* anstelle TRP auch ARG angeboten und den gleichen UV-Strahlungen ausgesetzt. ARG wurde gewählt, da das Wachstumsverhalten der entsprechenden Kulturen praktisch mit dem der mit TRP angezüchteten Kulturen identisch war, wie sich in Untersuchungen herausstellte. Die Wachstumsreduktion fiel bei dem mit TRP gewachsenen *M. furfur* nach den Bestrahlungen statistisch signifikant geringer aus als bei dem *M. furfur*, der mit ARG angezüchtet worden war. Im weiteren Verlauf gelang es Mayser, Schäfer et al. 2002 verschiedene dieser Pigmente und Fluorochrome zu identifizieren. Darunter der UV-Filter Pityriacitrin, der auch bereits als UV-Filter in Bakterien nachgewiesen worden ist. Außerdem konnten u.a. auch die Pityriarubine A, B und C nachgewiesen werden, die offenbar den „oxidativen Burst“ von menschlichen Granulozyten unterdrücken. Dies könnte ein Hinweis auf die bemerkenswert schwache granulozytäre Reaktion sein, die man in Läsionen der Pityriasis versicolor klinisch festgestellt hat (Irlinger, Krämer, Mayser, Steglich, 2004).

Vor dem Hintergrund der engen genetischen Verwandtschaft und Neueinordnung von *M. furfur* zu den Brandpilzen sollten am Modell des *U. maydis* folgende Fragestellungen im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden:

1. Kann auch der phytopathogene Brandpilz *U. maydis* unter Verwendung von TRP als alleinige Stickstoffquelle Pigmente und Fluorochrome, insbesondere das Pityriacitrin und die Pityriarubine bilden ?
2. Kann sich *U. maydis* unter Verwendung von TRP als alleiniger Stickstoffquelle besser vor UV-Strahlung schützen als mit ARG ?

3. Können mit den gewonnen Ergebnissen Rückschlüsse auf die Herkunft und Evolution von *M. furfur* gewonnen werden ?

Im zweiten Teil wurden zudem die vom Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg genetisch veränderten UV-induzierten Mutanten von *U. maydis* - *UV31*, *UV33*, *UV36*, *UV310*, *UV312* und *UV333* - untersucht. Dabei wurden schwerpunktmäßig folgende Fragestellungen behandelt:

4. Hat die genetische Veränderung Einfluss auf den Metabolismus von *U. maydis* unter Verwendung von TRP als alleiniger Stickstoffquelle ?
5. Lässt sich ein Unterschied in der Pigmentbildung, speziell von Pityriacitrin und den Pityriarubinen A, B und C, im Vergleich zum *U. maydis* Wildtyp feststellen und was für eine Bedeutung hat dies für die Entschlüsselung der genetischen Regulation der Pigmentbildung ?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1. Referenzstamm

Es wurde zunächst der Stamm *Ustilago maydis WT 521 Holiday* aufgrund seiner engen genetischen Verwandtschaft zu *M. furfur* untersucht. Entscheidend war, dass dieser Stamm bereits weit erforscht und zu großen Teilen genetisch sequenziert ist. Im weiteren Verlauf kamen die vom Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg genetisch veränderten UV-induzierten Mutanten von *U. maydis* - *UV 31*, *UV 33*,*UV 36*, *UV 310*, *UV 312* und *UV 333* - hinzu. Die genetische Veränderung in Marburg erfolgte über Bestrahlung mit einem UV-Stratalinker (52 mJ/cm²). Die Arbeiten wurden unter Rot-Licht durchgeführt, um UV-Reparaturmechanismen zu unterdrücken. Es folgte eine Inkubation im Dunkeln für 12-20 Tage, wobei regelmäßig die Pigmentierung der Kulturen überprüft wurde.

3.2 Anzucht und Nährmedien

Die Stammhaltung der verschiedenen Stämme erfolgte auf einem Kartoffel Glucose Agar der Firma Merck (Darmstadt) bei 32° C im Brutschrank. Wöchentlich fand eine Weiterverimpfung auf frischen Agar statt. Der Kartoffel Glucose Agar hatte folgende Zusammensetzung (g/Liter): Kartoffelinfus 4,0 (Infus aus 200 g Kartoffeln); D(+)-Glucose 20,0; Agar-Agar 15,0

Mischung für 100 ml Kartoffel Glucose Agar:

3,9 g Kartoffel Glucose Agar (Merck, Darmstadt)
100 ml Aqua dest. (Baxter, Unterschleißheim)

Mischen mit Magnetrührer (Ikamag RCT)

Autoklavieren bei 1 bar über 30 min (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin, FRG)

Die Anzucht der verschiedenen Stämme zur Versuchsdurchführung erfolgte auf frisch zubereitetem pigmentinduzierendem Agar (Ib-Glucose-Agar), der sich aus Agar (Merck, Darmstadt), Glucose (Merck, Darmstadt), Tween 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 0,3 g L-

Tryptophan (Fluka, Buchs, Schweiz) bzw. Arginin (Fluka, Buchs, Schweiz) zusammensetzte und wie folgt hergestellt wurde:

Mischung für 100 ml Ib-Glucose-Agar:

2 g Agar (Merck, Darmstadt)
1 g Glucose (Merck, Darmstadt)
100 ml Aqua dest. (Baxter, Unterschleißheim)

Mischen mit Magnetrührer (Ikamag RCT)

Autoklavieren bei 1 bar über 30 min (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin, FRG)

Hinzugabe von 3 ml Tween 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 0,3 g L-Tryptophan (Fluka, Buchs, Schweiz)

Für die Bestrahlungsversuche wurde zusätzlich Agar hergestellt, dem anstelle von Tryptophan die gleiche Menge (0,3 g) an L-Arginin (Sigma-Aldrich, Steinheim) zugesetzt wurde. Die mit TRP und ARG angezüchteten *U. maydis* Kulturen wurden dann im weiteren Verlauf auf unterschiedliche Wachstumsreduktion nach Bestrahlung untersucht (siehe Abschnitt 3.8 Bestrahlungsversuche). ARG wurde aufgrund von Untersuchungen an *M. furfur* (Mayser und Pape 1998, Stapelkamp 2003) ausgewählt, da es eine etwa identische Wachstumskinetik erzeugt. Damals konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsreduktion bei dem mit TRP gewachsenen *M. furfur* nach Bestrahlung statistisch signifikant geringer ausfiel als bei *M. furfur*, der mit ARG angezüchtet worden war.

Anschließend wurden unter einer Uniflow Biohazard Laminar Flow Sicherheitsarbeitsbank (Gerätetyp UVUB 1200, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried, FRG) jeweils 15 ml Nährboden in Petrischalen (Nunc, Roskilde, DK, 10 cm Durchmesser) gegossen. Daraufhin wurden Kulturen von *Ustilago maydis WT 521 Holiday* bzw. die UV-induzierten Mutanten *UV 31, UV 33,UV 36, UV 310, UV 312* und *UV 333* mit Hilfe von sterilen Wattestäbchen von ihren jeweiligen Nährmedien abgehoben und auf dem Agar ausgestrichen. Die Petrischalen

wurden dann mit einem Deckel und Klebeband verschlossen und 3 Wochen bei 32° C im Brutschrank inkubiert.

3.3 Gewinnung des Rohextraktes

Basierend auf Untersuchungen von *M. furfur* (Mayser, Pape, Stapelkamp et al.) wurden die Petrischalen nach 3 Wochen aus dem Brutschrank genommen und die gewachsenen *U. maydis* Kulturen abgeerntet. Dafür wurde der Agar samt Kultur aus der Petrischale herausgelöst und in ein Becherglas (Schott Duran, 2000 ml) überführt. Anschließend wurde der Inhalt des Becherglases mit einem 300 W Rührstab der Marke Braun zerkleinert und in Ethylacetat (Merck, Darmstadt) eingeweicht. Nun wurde das Becherglas verschlossen und 24 h inkubiert. Es folgte die Abfiltrierung mit Hilfe von Glaswolle in einem Glastrichter. Die gewonnene Flüssigkeit wurde mit Aqua dest. (Baxter, Unterschleißheim) in einem Scheidetrichter gemischt, was zur Bildung von 2 Phasen führte. Die untere Wasserphase wurde verworfen. Die obere Ethylacetatphase wurde mit Natriumsulfat ($NaSO_4$, Merck, Darmstadt) versetzt, um Reste von H_2O zu binden. Es folgte erneut eine Filtration über Glaswolle im Glastrichter. Der gewonnenen Flüssigkeit wurde nun in einem Rotationsverdampfer das Ethylacetat entzogen. Zur Aufnahme wurde das sehr visköse Extrakt mit Ethanol leicht verdünnt und in ein Glasfläschchen überführt.

3.4 Säulenchromatographie

Der gewonnene Rohextrakt wurde nun auf eine Gelsäule (Länge ca. 50 cm) aufgetragen, welche aus lipohilem Sephadex LH 20 mit der Porengröße 25-100 µ bestand. Laut Henke (1995) ist Sephadex LH 20 ein hydroxyproliertes Derivat des Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und wird für die Gelpermeationschromatographie, die Normalphasenverteilungs- und Adsorptionschromatographie von z.B. Lipiden, Steroiden, Fettsäuren, Hormonen und Vitaminen verwendet. Dabei laufen größere Moleküle schneller durch das Gel als kleinere. Diese bleiben zunächst hängen und laufen dementsprechend langsamer. Als Laufmittel diente Methanol (Merck), welches sich sowohl in der Säule als auch in der aufgesetzten Flash-Birne (Schott Duran, 1000 ml) befand. Druck wurde durch einen angeschlossenen Gummiball erzeugt. Die Auftrennung der Fraktionen erfolgte im verdunkelten Raum unter Zuhilfenahme einer UV Lampe (254 nm) zur Beurteilung der Fluoreszenz (Desaga GmbH, Heidelberg, Type 131200). Die jeweils nach unterschiedlicher

Farbe und/ oder Fluoreszenz aufgefangenen Fraktionen wurden nun im Rotationsverdampfer vom Methanol getrennt, mit Ethanol aufgenommen und jeweils in eigene Glasfläschchen überführt. Nach etwa 150 Minuten war die Säulenchromatographie beendet. Anschließend wurde die Säule mit Methanol durchgespült, um eine Verunreinigung und Beeinträchtigung der nachfolgenden Versuche zu vermeiden.

3.5 Dünnschichtchromatographie

Im Anschluss an die Säulenchromatographie wurden die gewonnenen Fraktionen mit einem Camag Linomat IV (Camag, Muttenz, Schweiz) auf Dünnschichtchromatographie - Platten Kieselgel 60 der Marke Merck aufgetragen. Anschließend wurden diese Platten in mit Laufmittel gesättigte Laufkammern der Marke Desaga, Heidelberg gestellt, die zuvor mit einem Filterpapier (20 x 20 cm, Camag, Muttenz, Schweiz) bestückt sowie mit Laufmittel befüllt wurden. Das Laufmittel war zuvor im Verhältnis 10:5:3 (Toluol : Ethylformiat : Ameisensäure, alle Merck, Darmstadt) angesetzt worden. Das Laufmittel wurde im gleichen Verhältnis bei vergleichbaren Untersuchungen von *M. furfur* verwendet (Mayser, Pape, Stapelkamp et al.). Die DC-Platten wurden vor dem Einstellen in die Kammern in Höhe von 17,5 cm markiert, um später eine Auswertung mit dem Camag Reprostar 3 (Camag, Muttenz, Schweiz) und dem Computerprogramm Camag winCATS zu vereinfachen. Nachdem das Laufmittel die 17,5 cm Marke erreicht hatte, wurden die Platten wieder herausgenommen und getrocknet. Die Fraktionen zeigten nun verschiedene Spektren mit unterschiedlichen Banden, die jeweils als Verbindungen zu interpretieren waren. Danach erfolgte eine Analyse der Platten im Camag Reprostar 3. Dabei handelt es sich um Gerät, in dem die Aufnahme von Dünnschichtplatten unter verschiedenen Lichtverhältnissen (sichtbares Licht, UV Licht 254 nm, UV Licht 366 nm) mit einer Digitalkamera möglich ist. Desweiteren können über eine Computerverbindung und dem Computerprogramm Camag winCATS die R_f Werte (Laufstrecke der gewünschten Verbindung/ Gesamtlaufstrecke) der verschiedenen Banden bestimmt werden. Zunächst wurden die Platten bei sichtbarem Licht fotografiert. Es folgte ein Bild mit 254 nm UV Licht sowie ein weiteres mit 366 nm UV Licht. Danach folgte eine Ansäuerung mit HCl Dampf und erneute Aufnahmen mit sichtbarem und 254 nm UV Licht. Schließlich folgte eine Alkalisierung mit NH_3 Dampf sowie ebenfalls Aufnahmen in sichtbarem und 254 nm UV Licht. Für sämtliche Aufnahmen wurde eine Canon Digitalkamera verwendet und bei den UV Aufnahmen jeweils ein UV Filter zwischen der jeweiligen Platte und der Kamera installiert. Mit Hilfe der Bilder und des

Computerprogrammes Camag winCATS war es nun möglich, für sämtliche Banden die R_f Werte (Laufstrecke der gewünschten Verbindung/ Gesamtlaufstrecke) zu bestimmen. Zum präparativen Nachweis der gewünschten Stoffe wurden neue DC-Platten mit der Fraktion, in der die gewünschten Banden erschienen war, wie oben beschrieben erstellt. Anschließend wurden die entsprechenden Banden mit einem Einmalskalpell ausgekratzt, zerkleinert, mit Ethylacetat übergossen und der Überstand ohne das Kieselgel abpipettiert. Die gewonnene Lösung wurde dann im Rotationsverdampfer vom Ethylacetat getrennt und mittels HPLC weiter aufgetrennt. Für *UV31* wurde zudem eine Dünnschichtplatte mit den aus biologischen Vergleichsproben erstellten Reinsubstanzen für Pityriacitrin, Pityriaanhydrid sowie Pityriarubin A, B und C als Standards angefertigt.

3.6 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Zur Isolierung der Bestandteile der Sephadex-Säulen-Fraktionen wurde die präparative HPLC angewendet. Die erhaltenen Unter-Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC auf Reinheit untersucht.

3.6.1 Präparative HPLC

Durch präparative HPLC können die trotz Vorreinigung noch recht komplexen Sephadex-Säulen-Fraktionen (durchschnittlich 5 – 10 Komponenten) über einen Gradienten mit einer LiChrospher-RP8 Säule (Merck, Darmstadt, 30 x 250mm) mit entsprechender Vorsäule getrennt und in grösseren Mengen rein dargestellt werden. Als Gradientenpumpe dient die Gilson Masterpumpe M305 gekoppelt mit einer Pumpe Gilson Modell 302 (Gilson, USA) mit jeweils einem präparativen 50 ml/min Pumpenkopf, gesteuert von einem Gilson 802-Modul. Die Detektion erfolgt mittels UV-Detektor (Holochrome, Gilson) bei 220 nm, Die Chromatogramme werden mittels XY-Schreiber (LKB, Schweden) aufgezeichnet. Der verwendete lineare Gradient (180 min) läuft von 0 – 100 % Acetonitril bzw. 100 – 0 % Wasser (Lösungsmittel sind Gradient Grade von Merck, Darmstadt). Die Flussrate beträgt 5 ml/min, Die eluierenden Verbindungen werden mittels Fraktionensammler (Super Frac, Pharmacia Biotech) in 180 Fraktionen von je 5 ml aufgefangen und anschliessend lyophilisiert (Lyovac GT2). Die Fraktion wurden nach Chromatogrammverlauf, Farbe und Fluoreszenz kombiniert, lyophilisiert und nach analytischer HPLC eines Aliquots nochmals mittels eines im Verlauf flacheren und gespreizten Gradienten weiter aufgetrennt. Auch hier

wurden entsprechende Fraktionen vereinigt und erneut lyophilisiert. Anschliessend wurde ein Aliquot zur analytischen HPLC verwendet und bei ausreichender Reinheit per Express unter Stickstoffatmosphäre auf Trockeneis zur Strukturaufklärung mittels ^{1}H- und ^{13}C-NMR (600MHz), Massenspektroskopie (HRMS) sowie FT-IR-Spektroskopie an den Kooperationspartner in München (AK Dr. Peter Spiteller, Organ. Chemie und Biochemie II, TU München) geschickt (siehe 3.7).

3.6.2 Analytische HPLC

Zur analytischen HPLC wird 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 erfolgt mittels Hochdruck-Gradienten (Gynkotek Gradientenpumpe 480, Gynkotek, Germering). Als mobile Phase wird 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 erfolgt bei 220 nm (Detektor UV-Detektor 785, bai, Bensheim), die Chromatogramme werden mittels eines Thermoschreibers (Gynkotek C-R 6A Chromatopac, Gynkotek, Germering) bei einer Schreibergeschwindigkeit von 2 mm/min aufgezeichnet. Der Probenauftrag erfolgt mittels eines Autosamplers (Alcott Modell 738, Bischoff Analysentechnik, Leonberg) in einem Volumen von 100 µl.

3.7 Weitere chemisch-analytische Methoden/ Strukturaufklärung in München (AK Dr Peter Spiteller, Organ. Chemie und Biochemie II, TU München)

Die aus Gießen erhaltenen Proben werden in München mittels ^{1}H- und ^{13}C-NMR (600MHz), Massenspektroskopie (HRMS) sowie FT-IR-Spektroskopie analysiert. Zur Aufnahme geeigneter Massenspektren stehen verschiedene Ionisationsmethoden zur Verfügung (EI, ESI, FAB und CI). Zur Strukturaufklärung sollten die Proben ausreichend rein sein und eine Mindestmenge von 0,5 mg nicht unterschreiten.

3.8 Bestrahlungsversuche

In den Bestrahlungsversuchen sollte überprüft werden, ob sich *U. maydis* unter Verwendung von TRP als alleiniger Stickstoffquelle besser vor UV-Strahlung schützen kann als mit ARG. Dies konnte bereits 1998 von Mayser und Pape bei *M. furfur* nachgewiesen und im Verlauf der UV-Filter Pityriacitrin identifiziert werden (Mayser, Schäfer et al. 2002). In Bestrahlungsversuchen mit *M. furfur* (Mayser und Pape 1998, Stapelkamp 2003) konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsreduktion bei dem mit TRP gewachsenen *M. furfur* nach Bestrahlung statistisch signifikant geringer ausfiel als bei *M. furfur*, der mit ARG angezüchtet worden war.

3.8.1 Keimzahlbestimmung

Zunächst wurde *U. maydis* auf 10 Ib-Glucose-Agar Platten (je 5 Platten enthielten Arginin und je 5 Platten Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle) sowie 5 Platten mit Kartoffel-Glucose Agar ausgestrichen. Sämtliche Platten wurden dann bei 32°C inkubiert.

Wie bei den Untersuchungen von *M. furfur* (Mayser und Pape 1998, Stapelkamp 2003), wurden die Pilzzellen nach 6 Tagen mit Hilfe einer sterilen Platinöse vorsichtig vom Agar abgehoben und in 3 ebenfalls sterile Mörser überführt. Die Zellen, die auf Ib-Glucose + ARG Agar gewachsen waren, wurden in einen und die Zellen, die auf Ib-Glucose + TRP Agar gewachsen waren in einen anderen Mörser überführt und jeweils sorgfältig zerkleinert. Dies war notwendig, um die aneinander haftenden Pilzzellen zu vereinzeln und im weiteren Verlauf genaue Zellkonzentrationen festlegen zu können. Die auf Ib-Glucose + ARG- und die auf Ib-Glucose + TRP Agar gewachsenen Kulturen wurden getrennt untersucht, um eine Vergleichbarkeit zwischen diesen zu erreichen. Auch die Zellen, die auf dem Kartoffel Glucose Agar gewachsen waren, wurden in einen eigenen Mörser überführt und zerkleinert. Alle 3 Zellgruppen wurden nun in jeweils 1 Reagenzglas überführt und es wurden jeweils 5 ml 0,9% NaCl hinzugefügt. Danach wurden die Pilze 3 min bei 3000 U/min zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Rotana, RP) und gewaschen. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dann wurde erneut eine definierte Menge NaCl hinzugefügt und mit dem Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2^{TM}) jeweils eine homogene Suspension erzeugt. Als nächstes wurden jeweils 10 µl Suspension mit 90 µl 0,9% NaCl versetzt. Davon wurden wiederum 10µl mit 90 µl 0,9% NaCl versetzt. Diese Mischung wurde dann in eine

Neubauer-Zählkammer pipettiert (Eppendorf – Pipette) und nach Erythrozytenmodus (5 Gruppenquadrate) unter dem Mikroskop (Dialux, Leitz, Wetzlar) ausgezählt. Die Lösung wurde auf 1 Millionen Zellen/µl Suspension eingestellt (Abb.4).

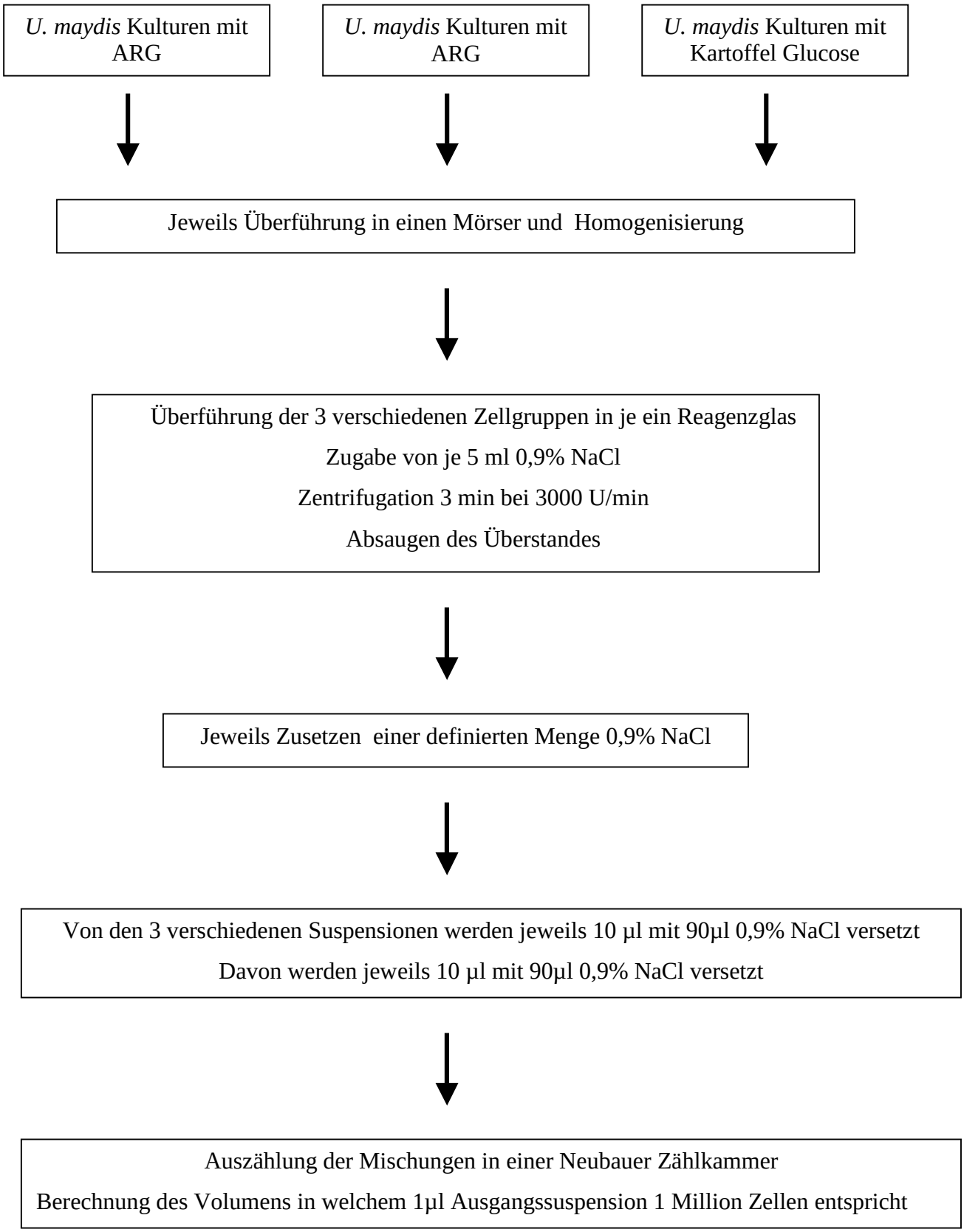


Abb. 4.: *Schematische Darstellung der Keimzahlbestimmung zur Eichkurvenerstellung im Rahmen der Bestrahlungsversuche. Die Keimzahlen werden jeweils für auf Kartoffel Glucose Agar, Ib-Glucose+TRP Agar und Ib-Glucose+ARG Agar angezüchtete U. maydis Kulturen bestimmt.*

Zur Berechnung des Volumens war wie in Vorversuchen von Stapelkamp (2003) folgende Formel notwendig:

$N/\mu l = S/(V_k \times N_k)$

$= S/(0{,}25 \times 10^{-3}\ \mu l \times 80)$

$= S/(20 \times 10^{-3})$

$= S \times 50/\mu l$

Zudem musste noch mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor (entspricht zugeführter Menge 0,9% NaCl) multipliziert werden.

N/µl = Anzahl der Zellen pro Mikroliter Suspension
S = Summe der ausgezählten Zellen in 5 Gruppenquadraten
V_k = Volumen über dem Kleinstquadrat ($0{,}25 \times 10^{-3}$ µl)
N_k = Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate (16 x 5 = 80)

Je nach ermitteltem Wert musste mehr 0,9% NaCl hinzugegeben werden.

3.8.2 Eichkurvenerstellung

Wie oben beschrieben, wurden die Suspensionen so behandelt, dass 1µl 1 Million Zellen entsprach. Es wurden Proben von jeweils 25, 50, 75, 100, 150, 200 und 250 µl in Reagenzgläser überführt, deren Leergewicht zuvor bestimmt worden war (Halb-Mikrowaage Sartorius, Modell 180 D). Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (3 min bei 3000 U/min) und ebenfalls ein Absaugen des Überstandes. Danach wurden die Reagenzgläser 24 h bei 65°C in einen Wärmeblock (Techne DriBlock DB3, Thermo Dux, Heidelberg) gestellt und die Pilzmassen somit getrocknet. Danach wurde durch erneutes Wiegen der Reagenzgläser und Differenzbildung mit den Ausgangswerten die Gewichte der Biomasse bestimmt. Es erfolgten pro Zellzahl 3 unabhängige Versuche. Wie in vorangegangenen Bestrahlungsversuchen mit *M. furfur* (Mayser und Pape 1998, Staplkamp 2003) wurde dann nach Bestimmung der Mittelwerte jeweils eine Eichkurve angefertigt. Mit Hilfe einer Trendlinie wurde dann noch die Steigung berechnet, um später bei den Bestrahlungsversuchen aus den gemessenen Pilzmassen die absoluten Zellzahlen berechnen zu können.

Zellen (10^6)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Mittelwert (mg)	SD
0	0	0	0	0	0
25	0,28	0,24	0,23	0,25	0,03
50	0,58	0,47	0,56	0,54	0,06
75	0,82	0,87	0,81	0,83	0,03
100	1,02	0,56	1,23	0,94	0,34
150	1,78	1,77	1,75	1,77	0,02
200	2,79	2,71	2,73	2,74	0,04
250	3,01	2,89	3,02	2,97	0,07

Tab. 2: *Gewichtsbestimmung inklusive Mittelwert und Standardabweichung (SD) von U. maydis auf Ib-Glucose + ARG Agar in je 3 unabhängigen Versuchen*

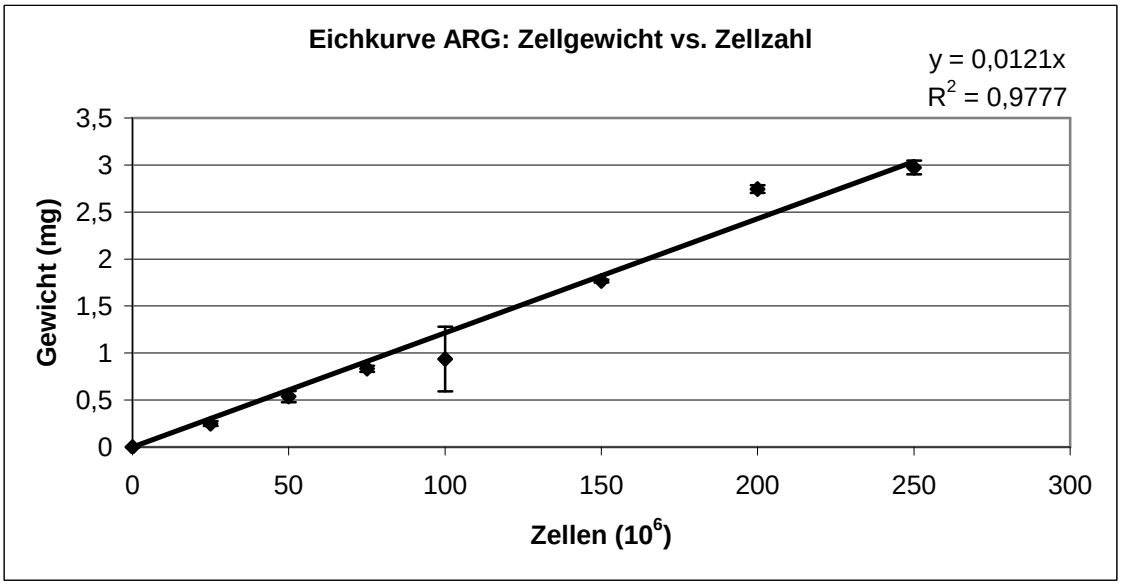


Abb. 5: *Eichkurve von U. maydis auf Ib-Glucose + ARG Agar inklusive Standardabweichungen sowie Trendlinie zur Bestimmung der Steigung y.*

Zellen (10^6)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Mittelwert (mg)	SD
0	0	0	0	0	0
25	0,23	0,22	0,3	0,25	0,04
50	0,42	0,63	0,67	0,57	0,13
75	0,75	0,79	1,23	0,92	0,27
100	0,73	1,17	1,29	1,06	0,29
150	1,73	1,74	1,77	1,75	0,02
200	2,69	2,66	2,74	2,70	0,04
250	2,89	2,72	3,28	2,96	0,29

Tab. 3: *Gewichtsbestimmung inklusive Mittelwert und Standardabweichung (SD) von U. maydis auf Ib-Glucose + TRP Agar in je 3 unabhängigen Versuchen*

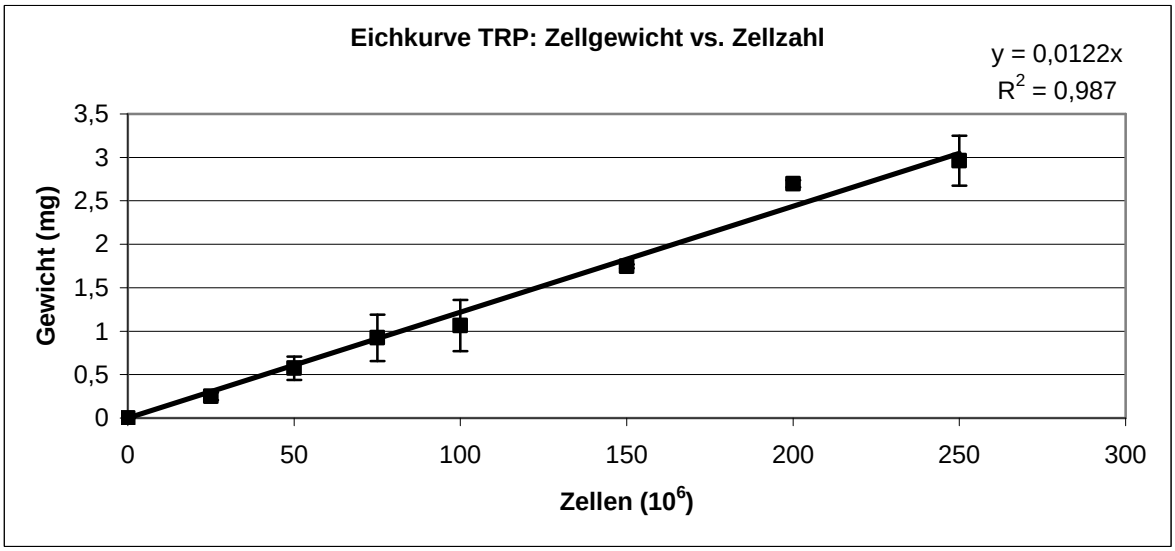


Abb. 6: *Eichkurve von U. maydis auf Ib-Glucose + TRP Agar inklusive Standardabweichungen sowie Trendlinie zur Bestimmung der Steigung y.*

Die Steigungen der Eichkurven von *U. maydis* auf Ib-Glucose + ARG Agar (y = 0,0121) und *U. maydis* auf Ib-Glucose + TRP Agar (y = 0,0122) sind nahezu identisch. Dies spricht für ein gleichwertiges Wachstum auf beiden Nährböden und bietet damit eine hohe Vergleichbarkeit.

Zellen (10^6)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Gewicht (mg)	Mittelwert (mg)	SD
0	0	0	0	0	0
25	0,24	0,27	0,21	0,24	0,03
50	0,25	0,62	0,57	0,48	0,20
75	0,98	0,87	0,89	0,91	0,06
100	1,16	1,09	0,48	0,91	0,37
150	1,69	1,64	1,92	1,75	0,15
200	2,16	2,27	2,33	2,25	0,09
250	2,62	2,64	3,1	2,79	0,27

Tab. 4: *Gewichtsbestimmung inklusive Mittelwert und Standardabweichung (SD) von U. maydis auf Kartoffel Glucose Agar in je 3 unabhängigen Versuchen*

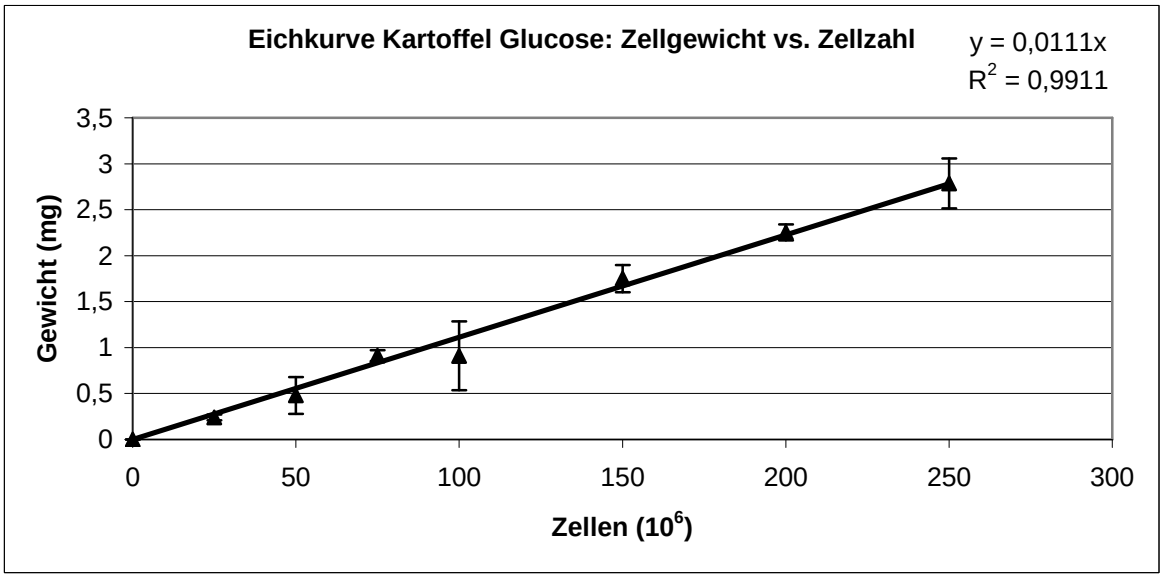


Abb. 7: *Eichkurve von U. maydis auf Kartoffel Glucose Agar inklusive Standardabweichungen sowie Trendlinie zur Bestimmung der Steigung y.*

Die Steigung der Eichkurve von *U. maydis* auf Kartoffel Glucose Agar (y = 0,0111) fällt im Vergleich zu den vorherigen etwas ab. Das Wachstum von *U. maydis* auf Kartoffel Glucose Agar stellt sich damit im Vergleich etwas geringer dar.

3.8.3 Bestrahlung

Erneut wurde *U. maydis* auf 10 Ib-Glucose-Agar Platten (5 Platten enthielten Arginin und 5 Platten Tryptophan) ausgestrichen und bei 32°C inkubiert. Auf das Anzüchten auf dem

Kartoffel Glucose Agar wurde in diesem Fall verzichtet. Nach 6 Tagen wurde dann wie oben beschrieben geerntet und die Suspensionen so eingestellt, dass 1 µl 1 Million Zellen entsprach. Auf Kartoffel Glucose Agar Platten wurden dann mit einer Eppendorf – Pipette jeweils 5 Inokulationspunkte à 2 µl der mit Arginin beziehungsweise Tryptophan gewachsenen Pilze gesetzt. Auf einer Seite der Platte befanden sich somit die Pilze, die mit Arginin, und auf der anderen die Pilze, die mit Tryptophan gewachsen waren. Es wurden pro Versuch 6 dieser Platten vorbereitet. Jeweils 1 Platte wurde dann einmalig mit 100 bzw. 200 J/cm^2 UV-A- bzw. 500, 1000 bzw. 2000 mJ/cm^2 UV-B- Licht bestrahlt. Die jeweils sechste Platte diente als Kontrolle und wurde nicht bestrahlt.

UV-A: Es wurde ein Sellamed 4000 Gerät (Sellas Sunlight, Gevelsberg, Germany) verwendet, dass ein Bestrahlungsspektrum zwischen 320 – 440 nm mit einem Maximum bei 365 nm bot. Die Intensität wurde vor dem Versuch mit Hilfe eines UV-Meters (Waldmann Lichttechnik) gemessen und auf 124 mW/cm² eingestellt. Die Dosis betrug wie oben erwähnt 100 bzw. 200 J/cm².
Mit Hilfe von Intensität und Dosis ließ sich dann die Bestrahlungszeit unter Anwendung folgender Formel berechnen:

$$\text{Bestrahlungszeit (sec.)} = \frac{\text{gewünschte UV-Dosis (J/cm}^2\text{)}}{\text{gemessene Intensität (mW/cm}^2\text{)}} \times 1000$$

UV-B: Für die UV-B Bestrahlung wurde ein UV/Puva 800 Gerät (Waldmann, Schwenningen, Germany) mit Philips TL 20W/12 Lampen benutzt, dass ein Bestrahlungsspektrum zwischen 285 – 350 nm mit einem Maximum bei 315 nm bot. Auch hier wurde die Intensität mit dem selben UV Meter gemessen und auf 2,05 mW/cm² eingestellt. Die Bestrahlungszeit wurde folgender Tabelle entnommen (Tab. 5):

Bestrahlungszeit (sec.)	**Dosis (mJ/cm2)**
6	13,5
24	50
240	500
480	1000
960	2000

Tab.5: *UV-B-Bestrahlungszeiten und -dosen*

Die Platten wurden mit den entsprechenden Strahlungsdosen bei geöffnetem Deckel bestrahlt und nach Beendigung wieder verschlossen. Schließlich wurden sie zusammen mit der nicht bestrahlten Kontrollplatte bei 32°C erneut inkubiert.

Nach 5 Tagen erfolgte dann die Aberntung der Kulturen, die aus den einzelnen Inokulationspunkten hervorgegangen waren. Von den jeweils 5 Punkten pro Plattenhälfte wurden dabei wie bei Vorversuchen von Stapelkamp, Pape et al. die größten 3 Punkte ausgesucht und ein jeder in ein eigenes Reagenzglas mit 1 ml 0,9% NaCl gegeben um jeweils drei Werte ermitteln zu können. Das Leergewicht der Reagenzgläser war vorher bestimmt worden. Es wurde erneut bei 3000 U/min 3 min lang zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es erfolgte die Trocknung für 24 h im Wärmeblock bei 65°C. Der gesamte Prozess wurde auch mit der nicht bestrahlten Kontrollplatte durchgeführt. Nach der Trocknung wurden die Reagenzgläser erneut gewogen und durch Differenzbildung die Pilzmassen errechnet. Durch die bereits erstellten Eichkurven war dann eine Umrechnung in absolute Zellzahlen möglich. Abb. 8 zeigt den Versuchsablauf noch einmal schematisch.
Es wurden 6 unabhängige Versuche durchgeführt, bei denen jeweils 3 Werte für die mit Arginin und die mit Tryptophan gewachsenen Kulturen ermittelt wurden.

3.8.4 Statistik

Die statistische Auswertung der ermittelten Ergebnisse erfolgte mit Unterstützung der Arbeitsgruppe Statistik (Leiter Dr. R.-H. Bödeker) des Institutes für medizinische Informatik (Komissarischer Leiter Prof. Dr. G. Weiler) des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen. Dabei wurden die Computerprogramme Microsoft Excel 2000 und SPSS für Windows Version 6.1.3 eingesetzt. Beim Vergleich der jeweiligen Gruppen wurde der t-Test angewandt, wobei das Signifikanzniveau als $< 0,05$ festgelegt wurde.

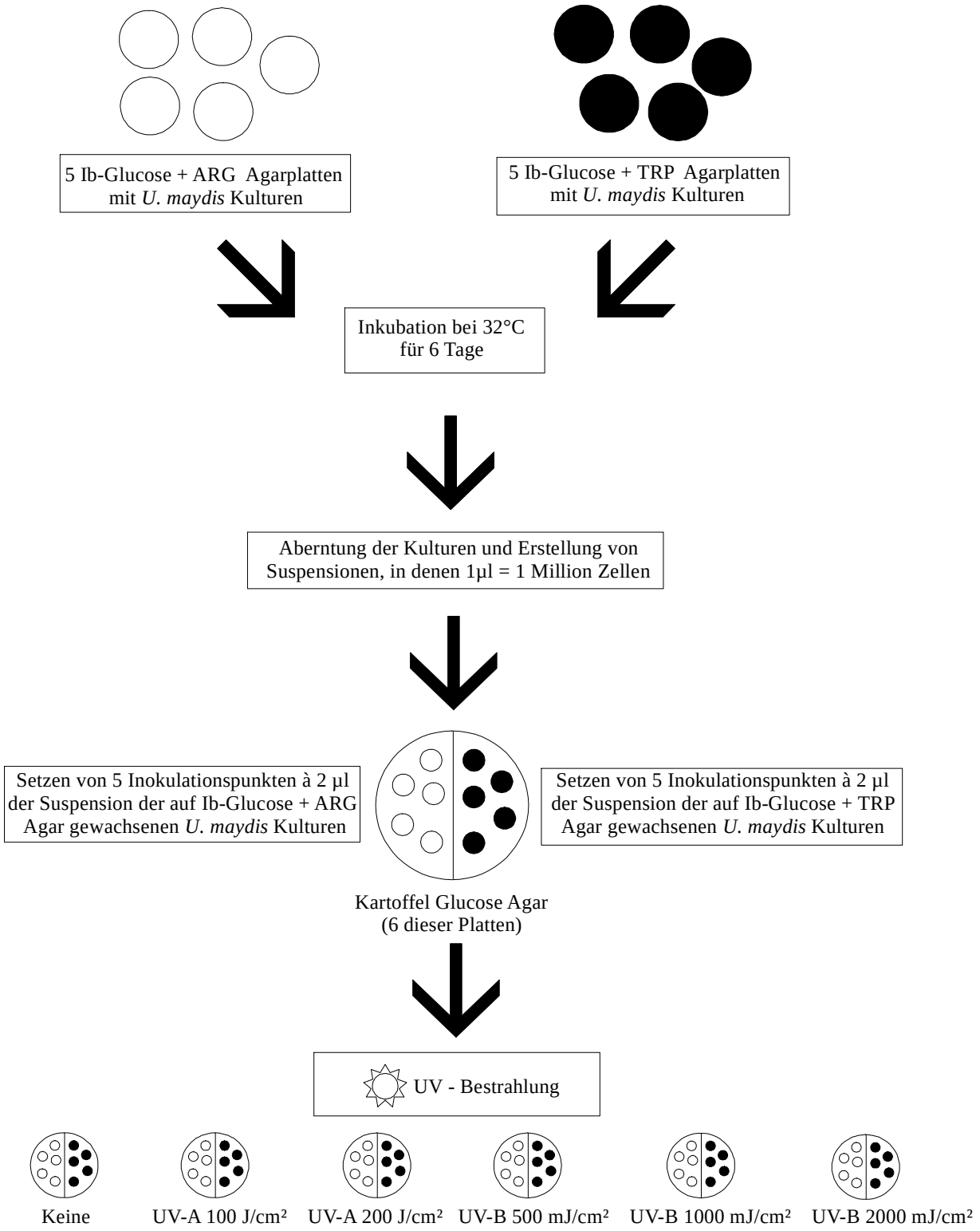


Abb. 8: *Darstellung der Bestrahlungsversuche. Nach Gewinnungen der Suspensionen für die mit ARG bzw. TRP angezüchteten Kulturen, erfolgte die Beimpfung von 6 Kartoffel Glucose Agarplatten auf einer Seite mit ARG- und auf der anderen mit TRP Suspension (je 5 Punkte). Nach Bestrahlung und 5-tägiger Inkubation wurden wie bei Vorversuchen von Stapelkamp, Pape et al. pro Platte und Seite die 3 größten Punkte geerntet und zur vergleichenden Gewichtsbestimmung herangezogen.*

4 ERGEBNISSE

4.1. *U. maydis*

Zunächst wurde *U. maydis* auf Ib-Glucose + TRP und Ib-Glucose + ARG Agar angezüchtet und auf makroskopische Unterschiede untersucht. Sie zeigten sich als Dunkelfärbung der auf Ib-Glucose + TRP angezüchteten Kulturen. Nach Extraktion des gebildeten Pigments erfolgte über die Säulenchromatographie eine Auftrennung in 7 Fraktionen. Diese wurden auf Dünnschichtbanden aufgetragen und besonders prominente bzw. bei *M. furfur* mit ähnlichem R_f-Wert aufgetretene Banden wurden aufgereinigt und auf ihre Bestandteile untersucht. Es konnten dabei die von *M. furfur* bekannten Verbindungen Pityriacitrin (UV-Filter), Pityriarubin B, Pityriarubin C, Malasseziaindol A sowie Pityriaanhydrid isoliert werden. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch *U. maydis* wie *M. furfur* unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle beginnt, ein Pigment zu bilden, dass die genannten Verbindungen des bei *M. furfur* erstmalig beschriebenen Stoffwechselweges beinhaltet. In den Bestrahlungsversuchen konnte auch erstmalig die von *M. furfur* bekannte UV-protektive Funktion unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle bei *U. maydis* gezeigt werden.

4.1.1 Makroskopie

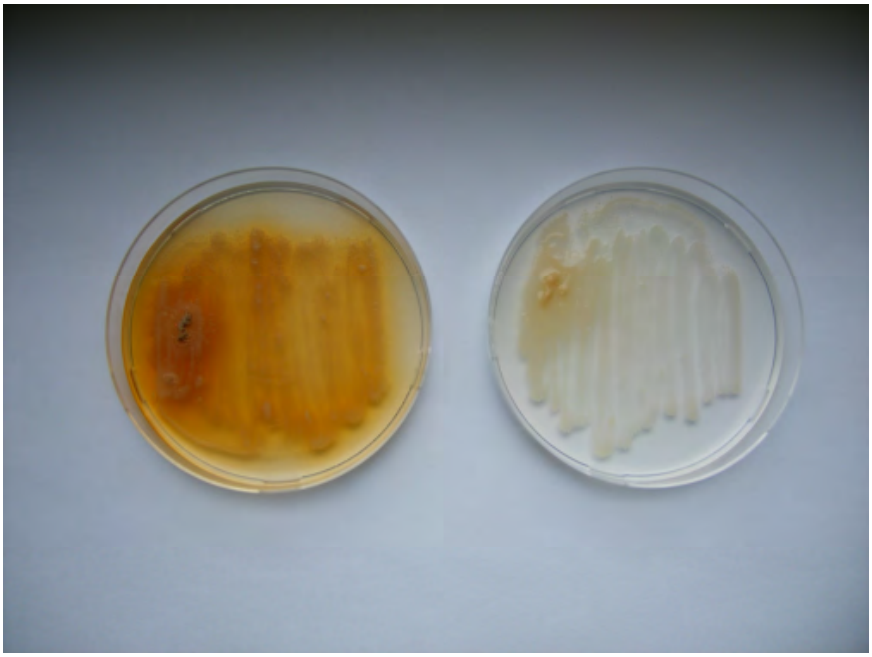


Abb. 9: *U. maydis auf Ib-Glucose + TRP Agar (links) im Vergleich zu U. maydis auf Ib-Glucose + ARG Agar (rechts) nach 5 Tagen. Deutliche Pigmentbildung auf Ib-Glucose + TRP Agar.*

Bereits nach 5 Tagen ließ sich makroskopisch ein Unterschied zwischen *U. maydis* auf Ib-Glucose + TRP Agar zu *U. maydis* auf Ib-Glucose + ARG Agar feststellen. Auf Ib-Glucose + TRP Agar stellte sich die Kultur deutlich dunkler dar (Abb. 9). Damit zeigte *U. maydis* das gleiche Verhalten unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle wie von Mayser bei *M. furfur* beschrieben.

4.1.2 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie diente der Auftrennung des gewonnenen Rohextraktes. Nach Einlaufen in die Säule wurden im UV-Licht verschiedene fluoreszierende Fraktionen beobachtet, die getrennt aufgefangen wurden. Dabei gelang es 7 Fraktionen zu gewinnen, von denen die erste als Vorlauffraktion verworfen wurde. Die Vorlauffraktion sollte die Sauberkeit der Gelsäule und damit die Reinheit der späteren gewonnenen Fraktionen gewährleisten.

4.1.3 Dünnschichtchromatographie

Mit den 7 respektive 6 Fraktionen konnte eine Dünnschichtchromatographie - Platte angefertigt werden. Dadurch war eine weitere Auftrennung der gewonnenen Fraktionen möglich. Die Bilder zeigen die Dünnschichtplatte in sichtbarem Licht (Abb. 10) und UV-Licht (254 nm; Abb. 11). Die übrigen Bilder (UV-Licht 366 nm, sichtbares Licht nach Ansäuerung mit HCl Dampf, UV-Licht 254 nm nach Ansäuerung mit HCl Dampf, sichtbares Licht nach Alkalisierung mit NH_3 sowie UV-Licht 254 nm nach Alkalisierung mit NH_3) befinden sich im Anhang (Abb. 30-34). Die dazugehörige Tabelle (Tab. 6) gibt Aufschluss über die Farben verschiedener Banden und ihre R_f - Werte.

4.1.3.1 *U. maydis* Fraktionen 2-6

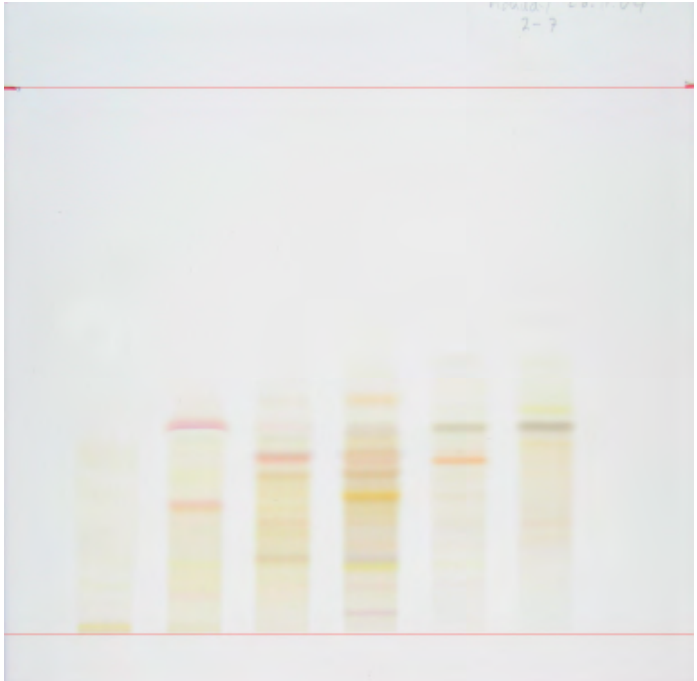


Abb. 10: *Dargestellt sind die in der Säulenchromatographie gewonnenen U. maydis Fraktionen 2-6 im sichtbaren Licht. Besonderes Interesse erweckten die Banden mit den R_f – Werten 0,12 (gelb, Fraktion 5), 0,23 (rot, Fraktion 3), 0,25 (orange, Fraktion 5), 0,32 (rot, Fraktion 4), 0,32 (orange, Fraktion 6) und 0,43 (orange, Fraktion 5). Rotmarkiert: Laufmittelfront*

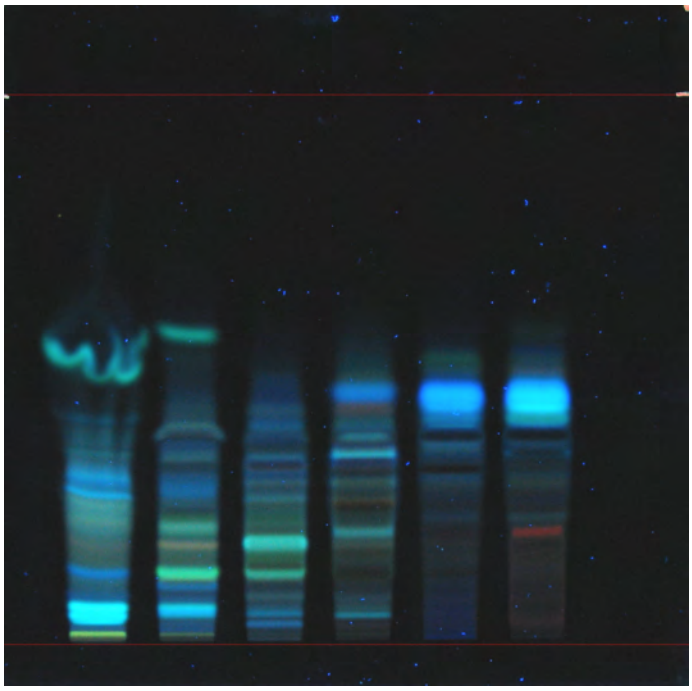


Abb. 11: *U. maydis Fraktionen 2-6 im UV-Licht (254 nm). UV-Absorbtion bei R_f - Wert 0,12 (schwarz, Fraktion 5) erkennbar.*

Fraktion	R_f-Wert	Farbe in sichtbarem Licht	Farbe in UV-Licht 254 nm	Farbe in UV-Licht 366 nm	Farbe in sichtbarem Licht nach HCl	Farbe in UV-Licht 254 nm nach HCl	Farbe in sichtbarem Licht nach NH_3	Farbe in UV-Licht 254 nm nach NH_3	Vermutung basierend auf Erfahrungen von *M. furfur*
2	0,02	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	
2	0,04		grün	blau		grün		blau	
2	0,09			blau				blau	
2	0,13		blau	blau		blau		blau	
2	0,27		blau	blau		blau		blau	
2	0,31		blau			blau			
2	0,52		gelb			grün		blau	
3	0,02		gelb						
3	0,03			blau					
3	0,06		blau	blau		blau		blau	
3	0,07	rot			rot				
3	0,11		blau			blau		blau	
3	0,12	gelb			gelb				
3	0,13		grün	gelb		grün		gelb	
3	0,18		orange			orange			
3	0,22		grün			grün			
3	**0,23**	**rot**			**rot**		**rotorange**		**Pityriarubin A**
3	0,29		blau						
3	0,35			blau					
3	0,38	rot			rot		rotorange		
3	0,56		gelb			grün			
4	0,04		blau	blau		blau		blau	
4	0,06		blau			blau			
4	0,13			gelb		grün	orange	grün	
4	0,14	graublau	grün		graublau				
4	0,19		grün		orange	grün		grün	
4	0,29	braun					orange		
4	**0,32**	**rot**							**Pityriarubin C**
4	0,33				rotblau		orange		
4	0,38				rosa				
5	0,04	graublau	grün		graublau	grün	rot		
5	0,08				rosa				
5	**0,12**	**gelb**			**gelb**		**gelb**		**Pityriacitrin**
5	0,14	graublau			graublau				
5	0,17				rosa				
5	0,21		grün						
5	**0,25**	**orange**			**orange**	**orange**	**orange**		**Pityriarubin B**

5	0,30	braun			braun		orange		
5	0,32	rotbraun			rotbraun		braun		
5	0,35		grün		orange	blau		grün	
5	0,37	graublau			graublau		rotbraun		
5	**0,43**	**orange**			**orange**	**orange**			**Pityriaanhydrid**
5	0,45		blau	blau		blau		blau	
6	0,13	blassgelb			blassgelb				
6	**0,32**	**orange**			**orange**		**orange**		**Malasseziaindol A**
6	0,38	graublau			graublau		graublau		
6	0,45		blau	blau		blau		blau	
7	0,20	blassrot	rot		blassrot	rot			
7	0,27				graublau				
7	0,35	blassrot			blassorange				
7	0,38	graublau			graublau		graublau		
7	0,41	gelb			gelb		gelb		
7	0,43		gelb	gelb		gelb			
7	0,45		blau	blau		blau		blau	

Tab. 6: *Zusammensetzung der Fraktionen 2-7 von U. maydis nach Dünnschichtchromatographie. Aufgeführt sind die beobachteten Banden und ihre R_f-Werte in unterschiedlichen Belichtungen und nach Behandlung mit HCl bzw. NH_3 sowie den vermuteten Verbindungen.*

Besonderes Interesse erweckten die Banden mit den R_f – Werten 0,12 (gelb, Fraktion 5), 0,23 (rot, Fraktion 3), 0,25 (orange, Fraktion 5), 0,32 (rot, Fraktion 4), 0,32 (orange, Fraktion 6) und 0,43 (orange, Fraktion 5).

Die Fraktionen 3, 4, 5 und 6 mit den interessierenden Banden wurden jeweils einzeln auf gesonderte Dünnschichtplatten aufgetragen, um die entsprechenden Banden zu gewinnen und in der HPLC weiter zu analysieren. Dazu wurden initial 800 Agarplatten von *U. maydis* benötigt.

4.1.4 HPLC

Die gewonnenen Banden wurden nun in der HPLC weiter untersucht. Zunächst wurde die gelbe Bande aus Fraktion 5 (R_f – Wert 0,12) analysiert. Dabei wurde ein deutlicher Peak bei 60,65 min festgestellt, der unten exemplarisch abgebildet ist (Abb. 12).

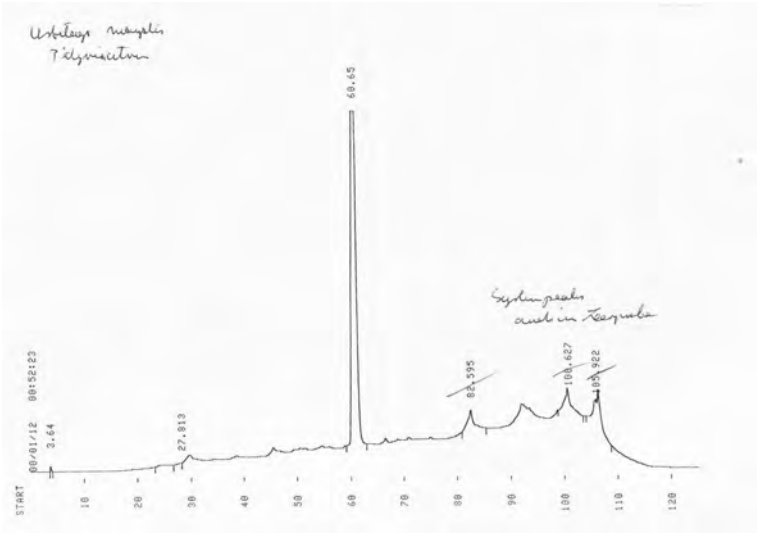


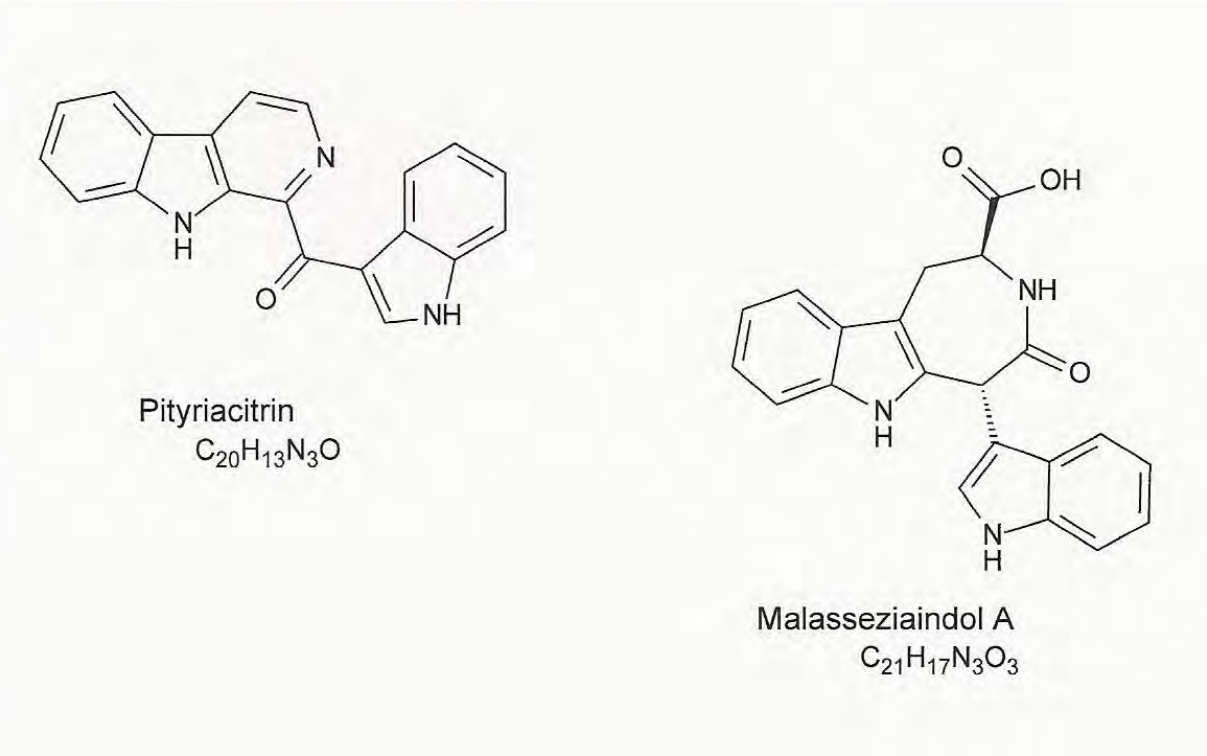
Abb. 12: *HPLC Chromatogramm von R_f-Wert 0,12 (gelb, Fraktion 5)*

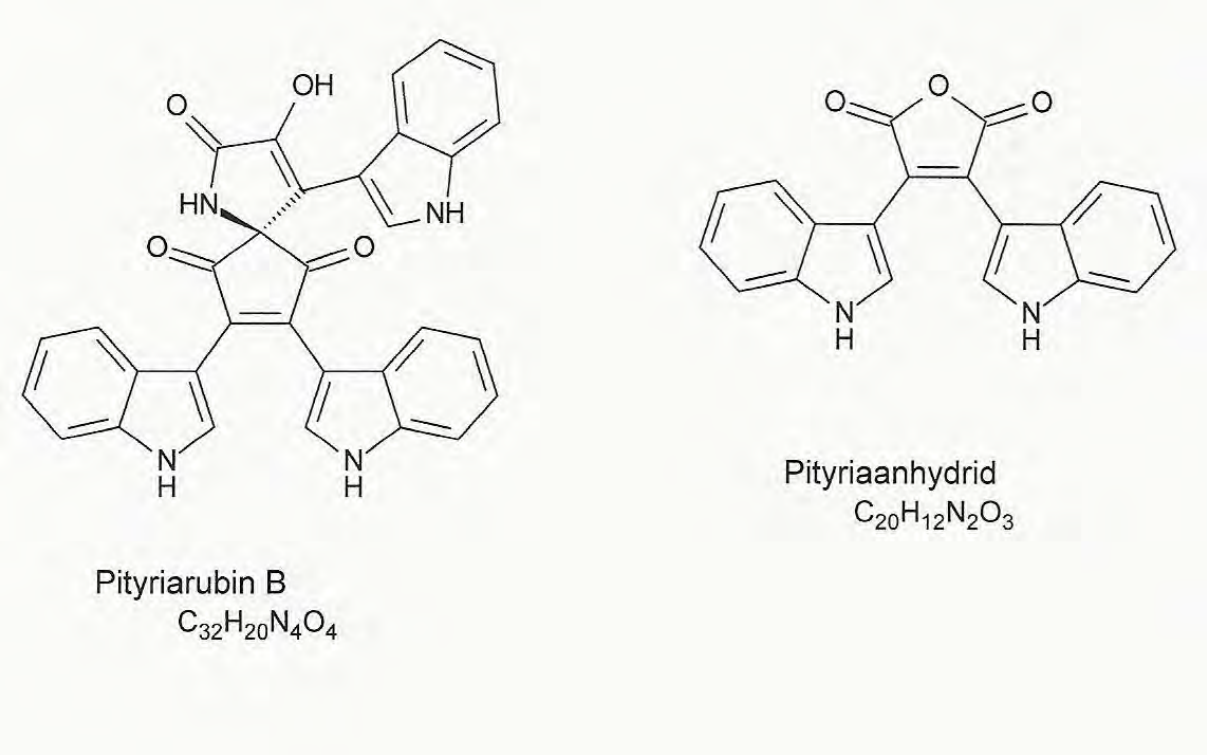
Für die übrigen zu untersuchenden Banden wurden ebenfalls HPLC Untersuchungen durchgeführt, die unterschiedliche Peaks aufwiesen. Zur abschließenden Strukturaufklärung wurden die aus 800 Agarplatten gewonnenen Substanzen nach der HPLC zur Überprüfung der angestellten Überlegungen nach München geschickt.

4.1.5 Strukturaufklärung

In München konnten die eigenen Vermutungen bestätigt werden, da für den Großteil der untersuchten Substanzen eine Zuordnung gelang. Nur bei R_f-Wert 0,23 (rot, Fraktion 3) gelang keine Strukturaufklärung, da nicht genug Substanz gewonnen werden konnte. Die Identifikation von R_f-Wert 0,12 (gelb, Fraktion 5) ergab den UV-Filter Pityriacitrin. Dieser wurde wie bereits eingangs erwähnt erstmals bei *M. furfur* unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle entdeckt (Mayser, Schäfer et al., 2002). Der R_f-Wert 0,25 (orange, Fraktion 5) stellte sich als Pityriarubin B und R_f-Wert 0,32 (rot, Fraktion 4) als Pityriarubin C heraus. Auch dabei handelte es sich um von *M. furfur* bekannte Strukturen, bei denen eine Suppression der granulozytären Funktion diskutiert wird (Irlinger, Krämer, Mayser, Steglich,

2004, Krämer et al. 2005). Der R_f-Wert 0,32 (orange, Fraktion 6) beinhaltete das farblose Malasseziaindol A und der R_f-Wert 0,43 (orange, Fraktion 5) das Pityriaanhydrid. Beide Strukturen sind ebenfalls erstmals bei *M. furfur* beschrieben worden (Mayser et al. 2001, 2003).





4.1.6 Absorptionsspektrum

Von R_f-Wert 0,12 (gelb, Fraktion 5, Pityriacitrin) wurde zusätzlich noch ein Absorptionsspektrum erstellt. Dabei stellten sich UV-absorbierende Peaks bei 216 nm (UV-C), 288 nm (Übergang UV-A und UV-B) und 385 nm (UV-A) dar (Abb. 13).

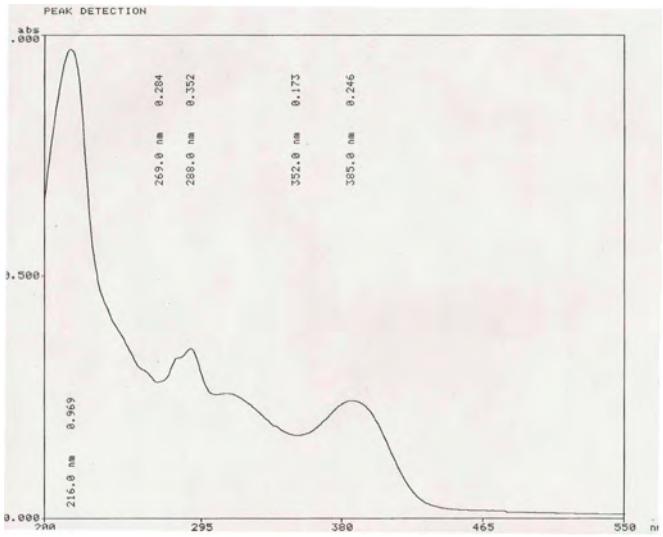


Abb. 13: *Absorptionsspektrum von Pityriacitrin (gelb, Fraktion 5, R_f-Wert 0,12). UV-absorbierende Peaks stellen sich bei 216 nm (UV-C), 288 nm (Übergang UV-A und UV-B) und 385 nm (UV-A) dar.*

4.1.7 Bestrahlungsversuche

Nach dem Nachweis von Pityriacitrin in den *U. maydis* Kulturen wurde auch dessen Funktion in Bestrahlungsversuchen untersucht. Dazu wurden wie oben beschrieben 6 Kartoffel Glucose Agarplatten mit den Suspensionen des mit ARG angezüchteten bzw. des mit TRP angezüchteten *U. maydis* beimpft und schließlich je 1 Platte folgenden UV-Intensitäten ausgesetzt (Tab. 7):

1 x	keine Bestrahlung	
1 x	UV-A	100 J/cm²
1 x	UV-A	200 J/cm²
1 x	UV-B	500 mJ/cm²
1 x	UV-B	1000 mJ/cm²
1 x	UV-B	2000mJ/cm²

Tab. 7: *UV-Intensitäten bei den Bestrahlungsversuchen. Je 1 Platte wurde einer Intensität ausgesetzt. Insgesamt wurden 6 dieser Versuche unabhängig voneinander durchgeführt.*

Durch Wiegen der nach Bestrahlung gewachsenen Kulturen konnten wie in vorherigen Versuchen von Stapelkamp, Pape et al. nach 5 Tagen die Wachstumsunterschiede zwischen den 2 zu untersuchenden Gruppen bestimmt werden.

4.1.7.1 Wachstumsraten ohne UV-Exposition

Ohne UV-Bestrahlung waren die Wachstumsraten der mit TRP angezüchteten Kulturen auf Kartoffel Glucose Agar mit denen mit ARG angezüchteten Kulturen auf Kartoffel Glucose Agar nahezu identisch bei leicht stärkerem Wachstum der mit TRP angezüchteten Kulturen.

4.1.7.2 Wachstumsraten nach UV-A Exposition

Bereits bei den absoluten Zellzahlen stellte man bei einer UV-Exposition von 100 J/cm² einen Unterschied im Wachstum (331,01 Mio vs. 167,22 Mio) mit einem Trend zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen gegenüber den mit ARG angezüchteten Kulturen fest (p = 0,108). Bei 200 J/cm² war nur bei den mit TRP angezüchteten Kulturen noch ein geringes Wachstum feststellbar (12,75 Mio vs. 0; Abb. 14).

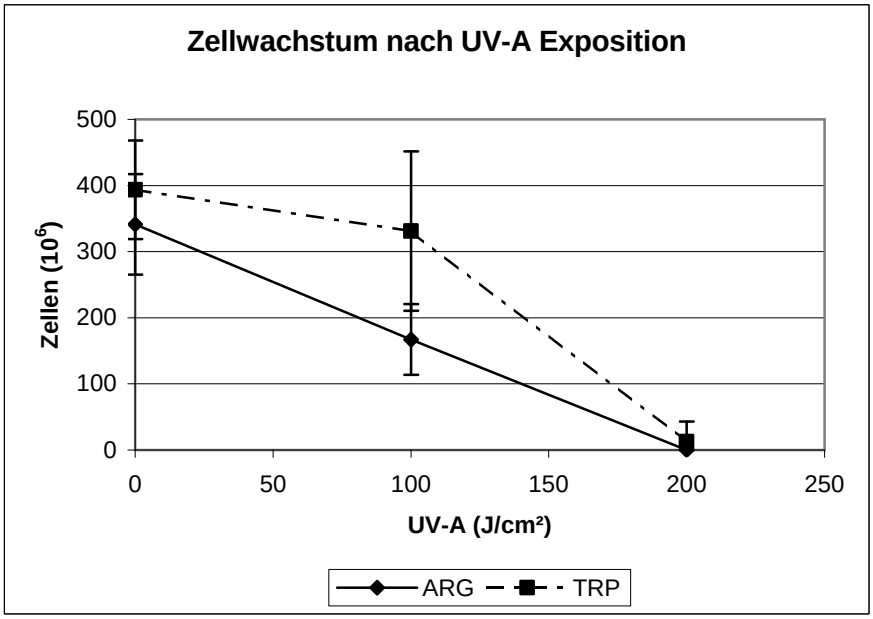


Abb. 14: *absolutes Zellwachstum von U. maydis mit ARG und TRP nach UV-A Exposition (n = 6). Zusätzlich sind die Standardabweichungen dargestellt.*

	keine Bestrahlung	UVA (J/cm²)	
		100	200
ARG_{1-6} (10^6Zellen)	341,23	167,22	0
TRP_{1-6} (10^6 Zellen)	393,62	331,01	12,75

Tab. 8: *absolutes Zellwachstum von U. maydis mit ARG und TRP nach UV-A Exposition (n = 6). Wachstum fällt bei mit ARG angezüchteten Kulturen deutlich stärker ab. Es sind jeweils die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen aufgeführt.*

Bei betrachten der relativen Zahlen in Prozent fiel der Trend zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen bei 100 J/cm² stärker aus (p = 0,09). Bei 200 J/cm² war bei den mit ARG angezüchteten Kulturen kein und bei den mit TRP angezüchteten Kulturen nur sehr geringes Wachstum zu beobachten (Abb. 15).

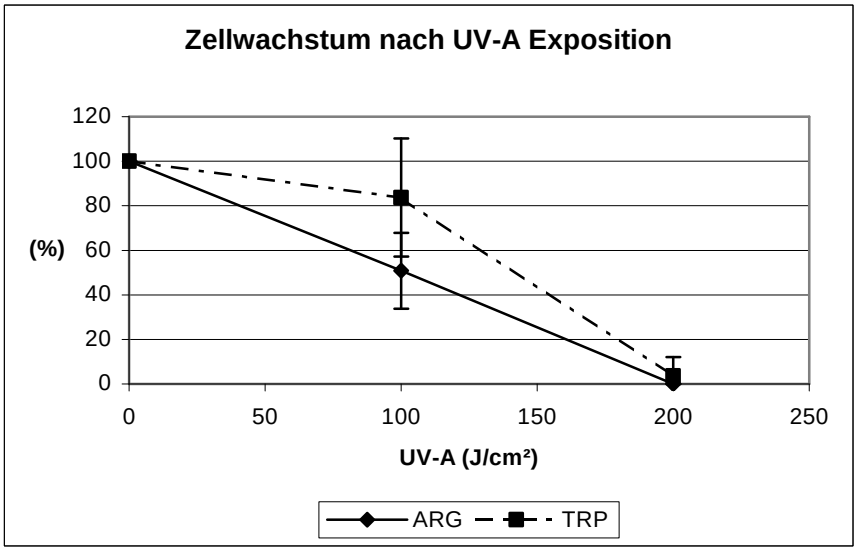


Abb. 15: *relatives Zellwachstum von U. maydis mit ARG und TRP nach UV-A Exposition (n = 6). Zusätzlich sind die Standardabweichungen dargestellt.*

	keine Bestrahlung	**UVA (J/cm²)**	
		100	200
ARG_{1-6} (%)	100	50,8	0
TRP_{1-6} (%)	100	83,7	3,6

Tab. 9: *relatives Zellwachstum von U. maydis mit ARG und TRP nach UV-A Exposition (n = 6). Wachstum fällt bei mit ARG angezüchteten Kulturen deutlich stärker ab. Es sind jeweils die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen aufgeführt.*

Bei *U. maydis* zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Wachstum bei Bestrahlung mit 100 J/cm² mit einem Trend zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen gegenüber den mit ARG angezüchteten Kulturen (p = 0,108) sowie noch geringes Wachstum nach Bestrahlung mit 200 J/cm². Dieser Eindruck bestätigte sich nach Betrachten der relativen Zahlen, die einen noch deutlicheren Trend zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen (p = 0,09) bei Bestrahlung mit 100 J/cm² aufwiesen. Nach Bestrahlung betrug das Wachstum 83,7 % vs. 50,8 % (bei 100 J/cm²) bzw. 3,6 % vs. 0 % (bei 200 J/cm²) zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen.

Abb. 16: *Wachstum von U. maydis nach UV-A 100 J/cm² Exposition, links die mit TRP angezüchteten, rechts die mit ARG angezüchteten Kulturen nach 5 Tagen*

Auch optisch konnte man den Wachstumsunterschied erkennen. Die mit TRP angezüchteten Kulturen stellten sich 5 Tage nach UV-A 100 J/cm² Exposition bereits ansatzweise größer dar, als die mit ARG angezüchteten Kulturen (Abb. 16). Ein solcher Trend konnte wie oben beschrieben durch die absoluten Zahlen ebenfalls angenommen werden. Die relativen Zahlen bestätigten diesen Eindruck.

4.1.7.3 Wachstumsraten nach UV-B Exposition

Auch unter UV-B Exposition konnte man ein stärker eingeschränktes Wachstum bei den mit ARG angezüchteten Kulturen gegenüber den mit TRP angezüchteten Kulturen feststellen. Während bei 2000 mJ/cm² bei beiden Kulturen kein Wachstum zu erkennen war, zeigte sich jedoch bei 500 mJ/cm² eine hohe Signifikanz ($p = 0{,}01$) zugunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen (270,58 Mio. vs. 103,72 Mio.). Bei 1000 mJ/cm² zeigte sich ebenfalls ein Wachstum der mit TRP angezüchteten Kulturen (52,50 Mio.), wohingegen bei den mit ARG gewachsenen Kulturen kein Wachstum mehr vorlag ($p = 0{,}993$; Abb. 17).

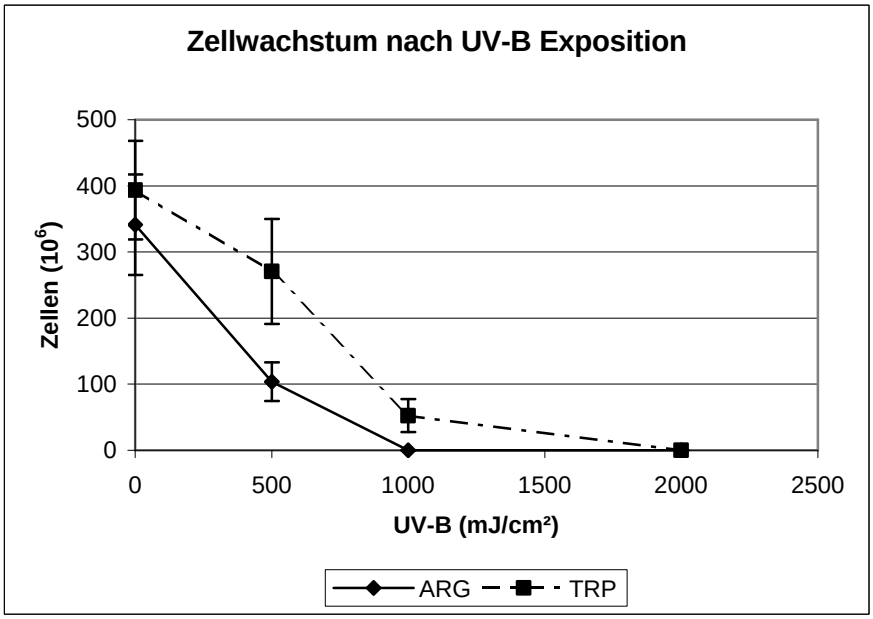


Abb. 17: *absolutes Zellwachstum von U. maydis mit ARG und TRP nach UV-B Exposition (n = 6). Zusätzlich sind die Standardabweichungen dargestellt.*

	keine Bestrahlung	**UVB (mJ/cm²)**		
		500	1000	2000
ARG_{1-6} (10^6Zellen)	341,23	103,72	0	0
TRP_{1-6} (10^6 Zellen)	393,62	270,58	52,50	0

Tab. 10: *absolutes Zellwachstum von U. maydis mit ARG und TRP nach UV-B Exposition (n = 6). Wachstum fällt bei mit ARG angezüchteten Kulturen deutlich stärker ab. Es sind jeweils die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen aufgeführt.*

Bei den Prozentzahlen fielen die Signifikanzen zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen größer aus. Während bei einer Bestrahlung mit 2000 mJ/cm² bei beiden Kulturen wiederum kein Wachstum zu finden war, zeigte sich ein deutlicher Unterschied mit starkem Vorteil für die mit TRP angezüchteten Kulturen bei 500 mJ/cm² ($p = 0{,}002$) und 1000 mJ/cm² ($p = 0{,}003$; Abb. 18).

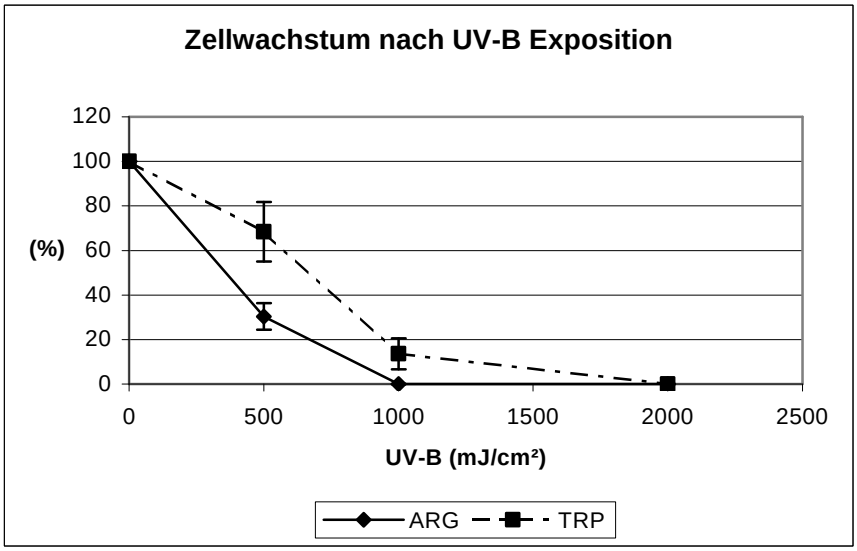


Abb. 18: *relatives Zellwachstum von U. maydis mit ARG und TRP nach UV-B Exposition (n = 6). Zusätzlich sind die Standardabweichungen dargestellt.*

	keine Bestrahlung	**UVB (mJ/cm²)**		
		500	1000	2000
ARG_{1-6} (%)	100	30,4	0	0
TRP_{1-6} (%)	100	68,4	13,6	0

Tab. 11: *relatives Zellwachstum von U. maydis mit ARG und TRP nach UV-B Exposition (n = 6). Es sind jeweils die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen aufgeführt.*

Signifikant zeigte sich das Wachstum zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen bei *U. maydis* vor allem nach Bestrahlung mit 500 mJ/cm² (p = 0,01). Wie oben berichtet konnte aber auch nach einer Exposition von 1000 mJ/cm² noch ein Wachstum beobachtet werden (p = 0,993). Die absoluten Zahlen konnten diesen Trend mit hohen Signifikanzen nach Bestrahlung mit 500 mJ/cm² (p = 0,002) und 1000 (p = 0,003) bestätigen. Nach Bestrahlung betrug das Wachstum 68,4 % vs. 30,4 % (bei 500 m J/cm²) bzw. 13,6 % vs. 0 % (bei 1000 mJ/cm²) zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen.

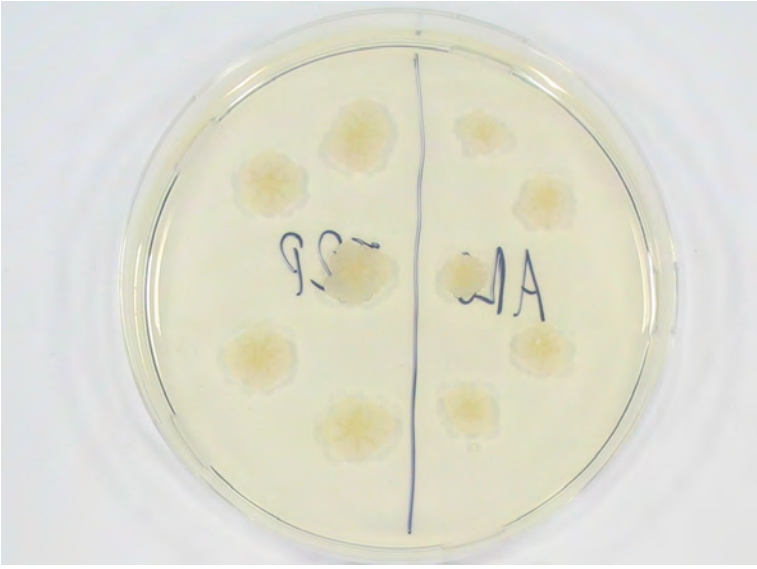


Abb. 19: *Zellwachstum von U. maydis nach UV-B 500 mJ/cm² Exposition, links die mit TRP gewachsenen, rechts die mit ARG angezüchteten Kulturen nach 5 Tagen*

Auf dem gezeigten Bild (Abb. 19) ist der Unterschied optisch schon sehr deutlich zu erkennen. Die mit TRP angezüchteten Kulturen stellten sich 5 Tage nach UV-B 500 mJ/cm² Exposition deutlich größer dar, als die mit ARG angezüchteten Kulturen. Diese Beobachtung wird durch die absoluten und relativen Zahlen bestätigt.

Abb. 20: *Zellwachstum von U. maydis nach UV-B 1000 mJ/cm² Exposition, links die mit TRP, rechts die mit ARG angezüchteten Kulturen nach 5 Tagen*

Bei genauer Begutachtung des Bildes (Abb. 20) lässt sich auch hier bereits optisch ein Unterschied erkennen. Die mit TRP angezüchteten Kulturen zeigten 5 Tage nach UV-B 1000 mJ/cm² Exposition noch geringes Wachstum. In diesem Fall ging dieses aus dem oberen und den 2 unteren Inokulationspunkten hervor.

4.2 UV-induzierte Mutanten von *U. maydis*

Im zweiten Teil wurden die vom Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg hergestellten Mutanten von *U. maydis* - *UV31*, *UV33*, *UV36*, *UV310*, *UV312* und *UV333* - untersucht. Die genetischen Veränderungen wurden hierbei durch UV- Mutagenese hervorgerufen. Neben makroskopischen Unterschieden sollten die Mutanten vor allem auf mögliche Veränderungen in ihrem Metabolismus untersucht werden und dies speziell bei Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle. Ziel war es zu überprüfen, ob bei den genetischen Veränderungen ein für den TRP abhängigen Sekundärmetabolismus benötigtes Gen getroffen wurde. Dementsprechend wurde auch auf Unterschiede in der Pigmentbildung und das Vorhandensein von den erstmals bei *U. maydis* entdeckten und bereits von *M. furfur* bekannten Verbindungen Pityriacitrin und Pityriarubin A, B und C geachtet. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass vor allem *UV31* im TRP abhängigen Sekundärmetabolismus Unterschiede zum Wildtyp von *U. maydis* aufwies, wo hingegen die übrigen Mutanten sich nur makroskopisch hiervon unterschieden. Es konnte gezeigt werden, dass *UV31* weniger Pigment produzierte und zudem die Pityriarubine und das Pityriaanhydrid offenbar nicht vorhanden waren.

4.2.1 Makroskopie

Abb. 21: *U. maydis (links) im Vergleich zur Mutante UV 31 nach 5 Tagen auf Ib-Glucose + TRP Agar. UV31 weist im Vergleich zu U. maydis praktisch keine Pigmentbildung auf. Das Bild wurde freundlicherweise von Katja Zuther zur Verfügung gestellt.*

Nachdem sowohl *U. maydis* als auch die Varianten *UV31, UV 33, UV 36, UV 310, UV 312* und *UV 333* auf Ib-Glucose + TRP Agar angezüchtet worden waren, konnte bereits nach 5 Tagen ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Während sich *U. maydis* erwartungsgemäß dunkel darstellte, erschien besonders *UV31* auffällig hell (Abb. 21). *UV310* erschien etwas heller als der Wildtyp, während die übrigen Varianten keine deutlichen makroskopischen Unterschiede aufwiesen.

4.2.2 Säulenchromatographie

Zur Übersicht wurde zunächst von *UV 31, UV 33, UV 36, UV 310, UV 312* und *UV 333* keine Säulenchromatographie angefertigt, sondern die Rohextrakte in einer Dünnschichtchromatographie verglichen. Im Verlauf wurde von *UV310* und *UV36* je eine Säulenchromatographie durchgeführt, bei der jeweils 2 Fraktionen gewonnen wurden. Wie bereits durch die Färbung der Kulturplatten vermutet, produzierte *UV31* nur mäßig Rohextrakt. Nach erneutem Anzüchten von 600 Agar-Platten, konnte eine Säulenchromatographie durchgeführt werden, bei der ebenfalls 2 Fraktionen gewonnen wurden.

4.2.3 Dünnschichtchromatographie

Es wurde eine Dünnschichtplatte mit den Rohextrakten von *UV 31, UV 33, UV 36, UV 310, UV 312* und *UV 333* im Vergleich erstellt. Dabei erschien es zunächst, als würde die Bande für den UV-Filter Pityriacitrin bei *UV310* und *UV36* fehlen, worauf dann jeweils wie oben beschrieben eine Säulenchromatographie durchgeführt wurde. Dabei konnte sich der Verdacht nicht erhärten, da die gesuchte Bande für Pityriacitrin sich nun darstellte. Nachdem bei *UV31*, der nur sehr geringe Mengen Rohextrakt produzierte, keine Aussage gemacht werden konnte, fiel nach Anzüchtung von weiteren 600 Agar-Platten und anschließender Säulenchromatographie auf, dass zwar die Bande für Pityriacitrin vorhanden war, nicht jedoch die Banden für Pityriaanhydrid und die Pityriarubine A, B und C (Abb. 22). Dies wurde auch durch den Vergleich der gewonnenen Fraktionen mit den entsprechenden Standards des Pityriaanhydrids, der Pityriarubine und des Pityriacitrins verdeutlicht.

4.2.3.1 *UV31* Fraktionen 1-2

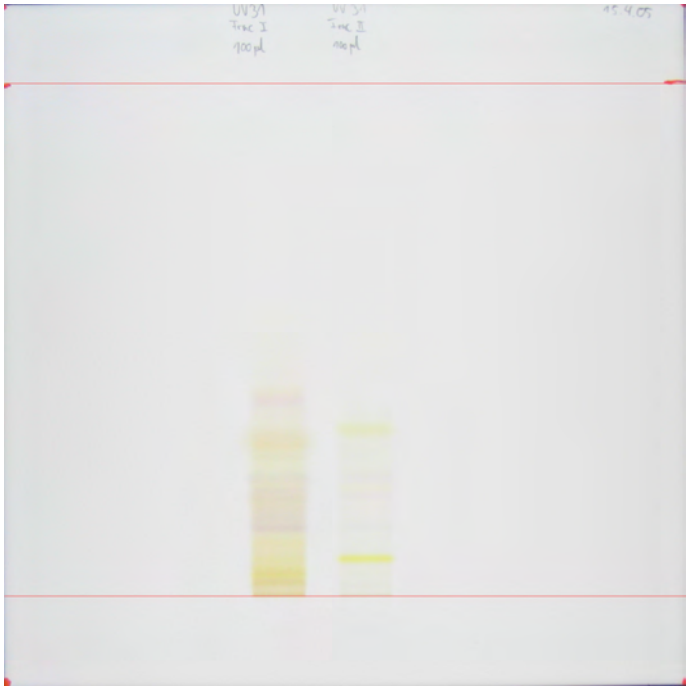


Abb. 22: *UV31 Fraktionen 1 und 2 im sichtbaren Licht. Die 2 Fraktionen wurden aus dem Rohextrakt gewonnen. In Fraktion 2 (R_f-Wert 0,07) lässt sich deutlich die gelbe Bande des Pityriacitrins erkennen. Die bei U. maydis vorhandenen Banden für Pityriaanhydrid und die Pityriarubine A, B und C fehlen offenbar.*

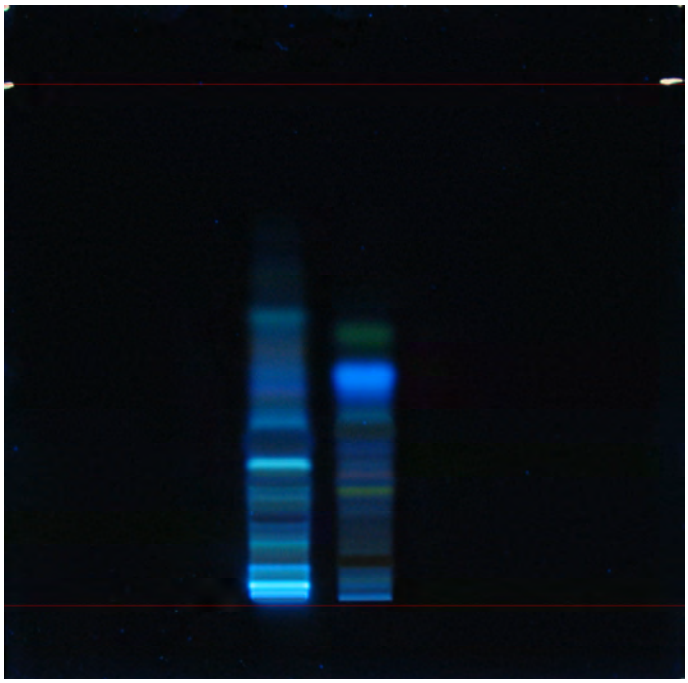


Abb. 23: *UV31 Fraktionen 1 und 2 im UV-Licht (254 nm). Die UV-Absorption von Pityriacitrin lässt sich deutlich in Fraktion 2 erkennen („schwarze“ Bande, Rf-Wert 0,07).*

Fraktion	R_f-Wert	Farbe in sichtbarem Licht	Farbe in UV-Licht 254 nm	Farbe in UV-Licht 366 nm	Farbe in sichtbarem Licht nach HCl	Farbe in UV-Licht 254 nm nach HCl	Farbe in sichtbarem Licht nach NH_3	Farbe in UV-Licht 254 nm nach NH_3	Vermutung basierend auf Erfahrung von *U. maydis*
1	0,02		blau	blau					
1	0,03	braun				blau			
1	0,04		blau		braun				
1	0,07		blau					blau	
1	0,10							gelb	
1	0,12		grün						
1	0,13	blau							
1	0,14				lila				
1	0,19	blau							
1	0,20				lila				
1	0,21		grün						
1	0,22				lila				
1	0,23	blau			lila		orange		
1	0,26				gelb				
1	0,27		blau						
1	0,28				orange				
1	0,29	gelbbraun							
1	0,32							blau	
1	0,35				rotorange				
1	0,38	blaurot			blaurot				
1	0,42							blau	
2	0,02			blau					
2	**0,07**	**gelb**			**gelb**		**gelb**		**Pityriacitrin**
2	0,13	blau							
2	0,14				lila				
2	0,19	blau							
2	0,20				lila				
2	0,22		gelb				gelb	gelb	
2	0,23	blau			lila				
2	0,32						gelb		
2	0,33	gelb			gelb				
2	0,43					blau			
2	0,44		blau	blau				blau	
2	0,52		gelb	gelb					

Tab. 12: *Zusammensetzung der Fraktionen 1 und 2 von UV31 nach Dünnschichtchromatographie. In Fraktion 2 (R_f-Wert 0,07) lässt sich die gelbe Bande des Pityriacitrins erkennen. Die bei U. maydis vorhandenen Banden für Pityriaanhydrid und die Pityriarubine A, B und C fehlen offenbar.*

Auf die erste Dünnschichtplatte von *UV31* wurde von den beiden in der Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen jeweils 100 µl aufgetragen. In der Dünnschichtchromatographie zeigte *UV31* bereits ein anderes Bild als der Wildtyp. Während zwar in der 2. Fraktion eine stark ausgeprägte Bande zu sehen war, die am ehesten dem Pityriacitrin entsprach (R_f-Wert 0,07; im UV-Licht zudem absorbierend), konnten keine orangen Banden, äquivalent denen der Pityriarubine A, B und C oder des Pityriaanhydrids beobachtet werden. Da *UV31* nur sehr geringe Mengen Pigment bildete, mussten etwa 300 Agarplatten angesetzt werden um die gleiche Menge an Rohextrakt zu gewinnnen für die bei *U. maydis* Wildtyp nur etwa 60 Agarplatten nötig waren. Aus dem aus der neuen Anzucht von *UV31* gewonnenen Rohextrakt wurden erneut 2 Fraktionen gewonnen und als nächstes ein Vergleich mit *U. maydis* durchgeführt, der diesmal zur Übersicht in 3 Fraktionen unterteilt wurde (Abb. 24, 25, 26).

4.2.3.2 *UV31* Fraktionen 1-2 vs. *U. maydis* Fraktionen 1-3

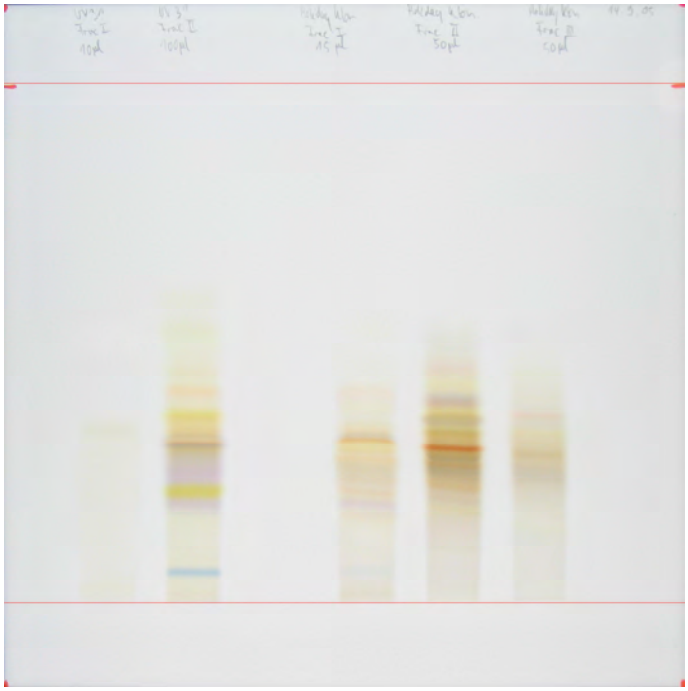


Abb. 24: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Ustilago maydis Fraktionen 1-3 im sichtbaren Licht. Erneut zeigte sich eine starke gelbe Bande bei Fraktion 2 von UV31 (diesmal R_f-Wert 0,22; erneut UV-Absorption) und diesmal ebenfalls eine orange Bande bei 0,41. Die beim U. maydis stark auffälligen orangen bzw. rotorangen Banden in den Fraktionen 1 (0,21; 0,31), 2 (0,30) und 3 (0,36), die am ehesten den Pityriarubinen entsprachen, waren bei UV31 nicht zu erkennen.*

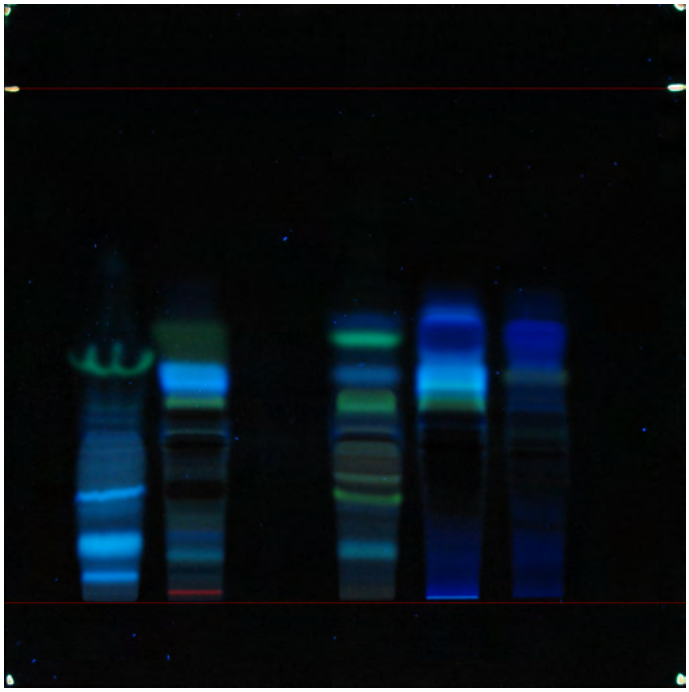


Abb. 25: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Ustilago maydis Fraktionen 1-3 im UV-Licht (254 nm). Erneute UV-Absorption in Fraktion 2 von UV31 spricht für Pityriacitrin (R_f Wert 0,22).*

Fraktion	R_f-Wert	Farbe in sichtbarem Licht	Farbe in UV-Licht 254 nm	Farbe in UV-Licht 366 nm	Farbe in sichtbarem Licht nach HCl	Farbe in UV-Licht 254 nm nach HCl	Farbe in sichtbarem Licht nach NH_3	Farbe in UV-Licht 254 nm nach NH_3	Vermutung basierend auf Erfahrung von *U. maydis*
1	0,05		blau	blau		blau		blau	
1	0,11		blau	blau		blau		blau	
1	0,22		blau	blau		blau		blau	
1	0,32				blaugrau		blaugrau		
1	0,46		gelb			gelb		gelb	
2	0,02		rot			rot		rot	
2	0,06	blau			blau		blau		
2	0,09		grün			grün		grün	
2	0,13			blau					
2	0,19	lila							
2	**0,22**	**gelb**			**gelb**		**gelb**		**Pityriacitrin**
2	0,25	lila							
2	0,31	braun			blaugrau		blaugrau		
2	0,32	blaugrau			blau		blau		
2	0,34				blassorange		blassorange		
2	0,36	gelb			gelb		gelb		
2	0,39		gelb	gelb		gelb		gelb	
2	0,41	orange			orange		orange		
2	0,43		blau	blau		blau		blau	
2	0,52		gelb	gelb		gelb		gelb	

Tab. 13: *Zusammensetzung der Fraktionen 1 und 2 von UV31 nach Dünnschicht-chromatographie Vergleich mit U. maydis. Erneut zeigte sich die prominente gelbe Bande des Pityriacitrins (R_f-Wert 0,22). Die beim U. maydis Wildtyp vorhandenen Banden für Pityriaanhydrid und die Pityriarubine A, B und C fehlen offenbar.*

Fraktion	R_f-Wert	Farbe in sichtbarem Licht	Farbe in UV-Licht 254 nm	Farbe in UV-Licht 366 nm	Farbe in sichtbarem Licht nach HCl	Farbe in UV-Licht 254 nm nach HCl	Farbe in sichtbarem Licht nach NH_3	Farbe in UV-Licht 254 nm nach NH_3	Vermutung
1	0,06	blau			blau				
1	0,10		grün			grün		grün	
1	0,19	lila			lila		lila		
1	0,20		gelb			gelb		gelb	
1	**0,21**	**orange**			**orange**		**orange**		**Pityriarubin A**
1	0,25		gelb						
1	0,27	orange			orange				
1	**0,31**	**rotorange**			**rotorange**		**rotorange**		**Pityriarubin B**
1	0,33				blau		blau		
1	0,34				orange				
1	0,39		gelb	gelb		gelb		gelb	
1	0,44		blau			blau		blau	
1	0,52		gelb			gelb		gelb	
2	**0,22**	**gelb**			**gelb**		**gelb**		**Pityriacitrin**
2	0,23	orange			orange				
2	**0,30**	**rotorange**			**rotorange**		**rotorange**		**Pityriarubin B**
2	0,36	blaugrau			blaugrau		blaugrau		
2	0,38	rot		gelb		gelb		gelb	
2	0,40	blau	gelb						
2	0,44	rot	blau	blau		blau		blau	
2	0,56		blau	blau		blau		blau	
2	0,43				gelb		gelb		
2	0,45				orange		orange		
2	0,39						lila		
3	0,26	braun							
3	0,29	braun			braun		braun		
3	**0,36**	**orange**			**orange**		**orange**		**Pityriarubin C**
3	0,44		gelb						

Tab. 14: *Zusammensetzung der Fraktionen 1, 2 und 3 von U. maydis nach Dünnschicht-chromatographie-Vergleich mit UV31. U. maydis zeigt die typischen Banden in den Fraktionen 1 (0,21 Pityriarubin A; 0,31 Pityriarubin B), 2 (0,30 Pityriarubin B; 0,22 Pityriacitrin) und 3 (0,36 Pityriarubin C).*

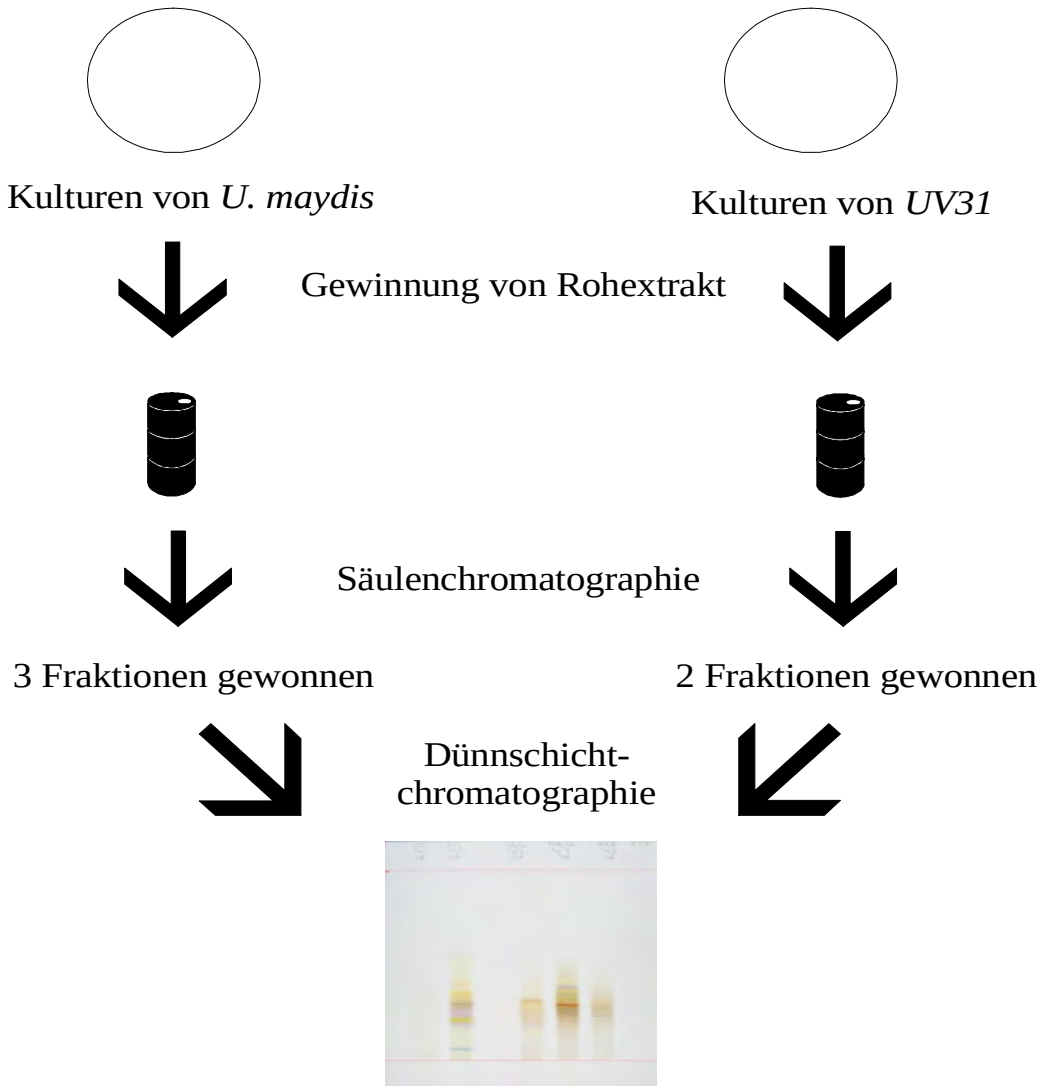


Abb. 26: *Zum Vergleich UV31 vs. U. maydis musste erneut Rohextrakt gewonnen und in Fraktionen aufgeteilt werden. Wie im vorherigen Versuch wurden bei UV31 zwei Fraktionen gewonnen, bei U. maydis fand jedoch nur eine Auftrennung in drei und nicht wie in vorherigen Versuchen 7 Fraktionen statt. Dies geschah, da in diesem Versuch vor allem die bekannten Banden (Pityriacitrin etc.) untersucht werden sollten, die man auch bereits bei einer Auftrennung in 3 Fraktionen beobachten konnte.*

Erneut zeigte sich bei *UV31* eine starke gelbe Bande (diesmal R_f-Wert 0,22; erneut UV-Absorption) und diesmal ebenfalls eine orange Bande bei 0,41. Die beim *U. maydis* stark auffälligen orangen bzw. rotorangen Banden in den Fraktionen 1 (0,21; 0,31), 2 (0,30) und 3 (0,36), die am ehesten den Pityriarubinen entsprachen, waren bei *UV31* nicht zu erkennen. Deshalb wurde noch eine weitere Dünnschichtplatte mit den Fraktionen 1-2 von *UV31* im Vergleich mit den Standards für die Pityriarubine A, B und C sowie dem Pityriaanhydrid angefertigt (Abb. 27). Dabei wurden jeweils 15 µl aufgetragen.

4.2.3.3 *UV31* Fraktionen 1-2 vs. Standards

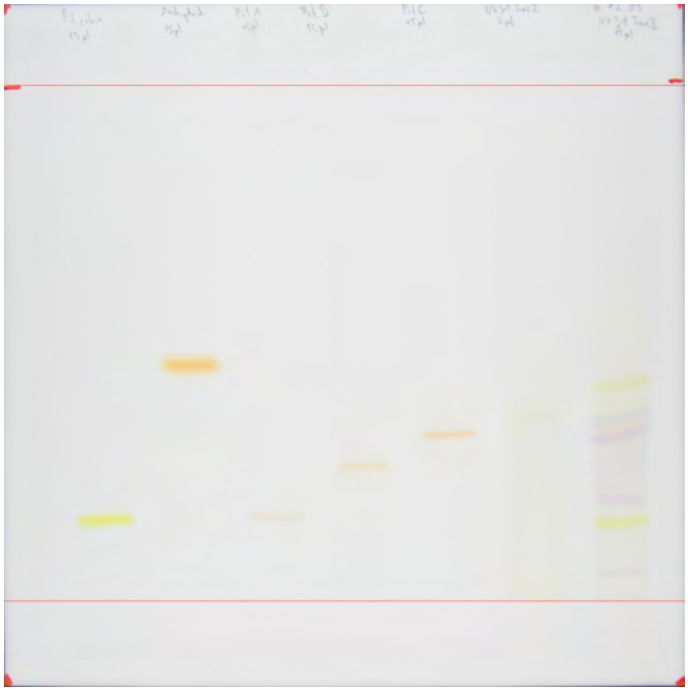


Abb. 27: *UV31Fraktionen 1-2 vs. Standards im sichtbaren Licht. Von links nach rechts sind zuerst die Standards für Pityriacitrin, Pityriaanhydrid, Pityriarubin A, B und C aufgetragen. Auf der rechten Seite befinden sich Fraktion 1 und 2 von UV31. Die Bande für Pityriacitrin (R_f-Wert 0,20) ist in Fraktion 2 gut zu erkennen.*

Abb. 28: *Vergrößerung UV31Fraktionen 1-2 vs. Standards im sichtbaren Licht. Von links nach rechts sind zuerst die Standards für Pityriacitrin, Pityriaanhydrid, Pityriarubin A, B und C aufgetragen. Auf der rechten Seite befinden sich Fraktion 1 und 2 von UV31. Die Bande für Pityriacitrin (R_f-Wert 0,20) ist in Fraktion 2 gut zu erkennen.*

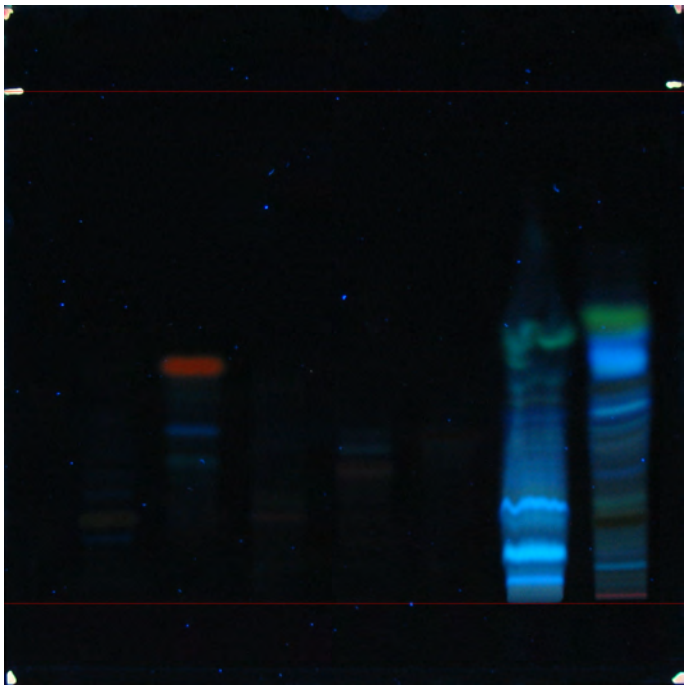


Abb. 29: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Standards im UV-Licht (254 nm) . Die Bande für Pityriacitrin (R_f-Wert 0,20) ist in Fraktion 2 gut zu erkennen (dunkel gefärbt wegen UV-Absorption).*

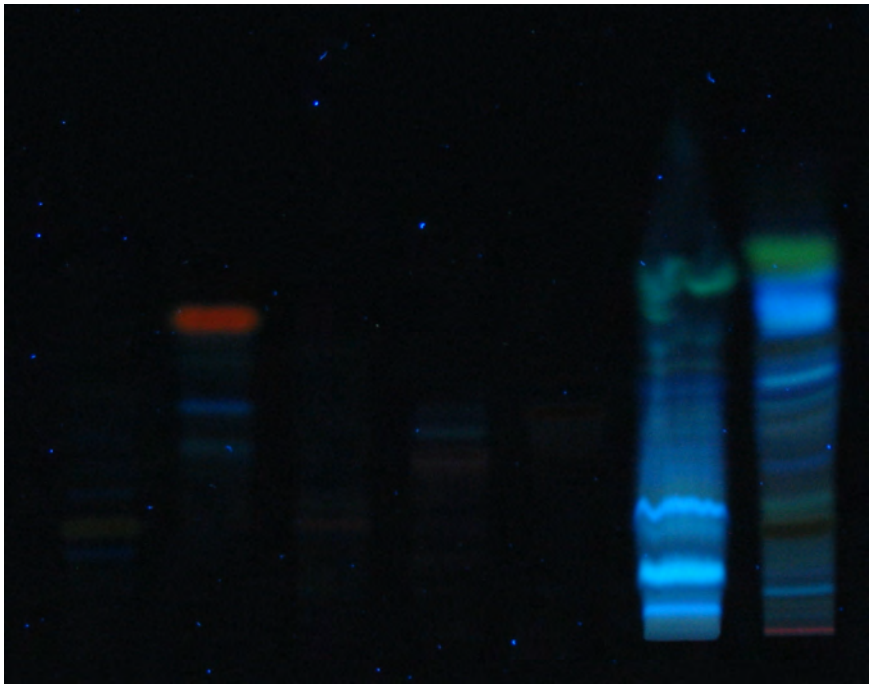


Abb. 30: *Vergrößerung UV31 Fraktionen 1-2 vs. Standards im UV-Licht (254 nm) . Die Bande für Pityriacitrin (R_f-Wert 0,20) ist in Fraktion 2 gut zu erkennen (dunkel gefärbt wegen UV-Absorption).*

Fraktion	R_f-Wert	Farbe in sichtbarem Licht	Farbe in UV-Licht 254 nm	Farbe in UV-Licht 366 nm	Farbe in sichtbarem Licht nach HCl	Farbe in UV-Licht 254 nm nach HCl	Farbe in sichtbarem Licht nach NH_3	Farbe in UV-Licht 254 nm nach NH_3
Pityriacitrin	**0,20**	**gelb**			**gelb**		**gelb**	
Pityriaanhydrid	0,46	orange	rot	rot	orange	rot	orange	rot
Pityriarubin A	0,19	blassrot			blassrot		blassrot	
Pityriarubin B	0,30	blassorange			blassorange		blassorange	
Pityriarubin C	**0,34**	**rotorange**			**rotorange**		**rotorange**	
1	0,05		blau	blau		blau		blau
1	0,11		blau	blau		blau		blau
1	0,22		blau	blau		blau		blau
1	0,32				blaugrau		blaugrau	
1	0,46		gelb			gelb		gelb
2	0,02		rot			rot		rot
2	0,06	blau			blau		blau	
2	0,09		grün			grün		grün
2	0,13			blau				
2*	**0,20**	**gelb**			**gelb**		**gelb**	
2	0,25	lila						
2	0,31	braun			blaugrau		blaugrau	
2	0,32	blaugrau			blau		blau	
2**	**0,34**				**blassorange**		**blassorange**	
2	0,36	gelb			gelb		gelb	
2	0,39		gelb	gelb		gelb		gelb
2	0,41	orange			orange		orange	
2	0,43		blau	blau		blau		blau
2	0,52		gelb	gelb		gelb		gelb

Tab. 15: *Zusammensetzung der Fraktionen 1 und 2 von UV31 im Vergleich zu den Standards für Pityriacitrin, Pityriaanhydrid und die Pityriarubine A, B und C nach Dünnschichtchromatographie.* ***Pityriacitrin** *ist offenbar in UV31 vorhanden. Die starke gelbe Bande in Fraktion 2 zeigt den gleichen R_f-Wert wie der Pityriacitrin Standard (0,20).* ***Die Bande in Fraktion 2 mit dem R_f-Wert 0,34 könnte **Pityriarubin C** sein.*

Im Vergleich mit den Standards konnte erneut gezeigt werden, dass Pityriacitrin offenbar in *UV31* vorhanden ist (R_f-Wert 0,20). Das Vorhandensein der Pityriarubine und des Pityriaanhydrids scheint hingegen fraglich zu sein. Keine dieser Verbindungen kann eindeutig in *UV31* festgemacht werden, auch wenn ansatzweise Spuren vorhanden zu sein scheinen (R_f-Wert 0,34, Fraktion 2).

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass *U. maydis* unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle ein braunes Pigment produziert. Dieses Phänomen war von Mayser et al. zunächst nur bei *M. furfur* beobachtet worden. Vermutet wurde, dass aufgrund der engen phylogentischen Verwandtschaft zwischen *M. furfur* und *U. maydis* die TRP-abhängige Pigmentproduktion auch bei letzterem wahrscheinlich ist. Die nachfolgende, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Aufreinigung und Analytik der von *U. maydis* gebildeten Pigmente zeigte, dass *U. maydis* ebenfalls die bei *M. furfur* nachgewiesenen, bisher unbekannten Indolverbindungen Pityriarubin B, Pityriarubin C, Malasseziaindol A, Pityriaanhydrid sowie den UV-Filter Pityriacitrin synthetisieren kann. Die UV-protektive Funktion der Pigmentbildung bei *M. furfur* konnte schon mehrfach von Mayser et al. (1998, 2002, 2003) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte in mehreren Versuchen mit verschiedenen UV-A (100 J/cm², 200 J/cm²) und UV-B (500 mJ/cm², 1000 mJ/cm², 2000 mJ/cm²) Expositionen gezeigt werden, dass *U. maydis*, der mit TRP angezüchtet worden war, wesentlich strahlenunempfindlicher war, als mit ARG angezüchtete *U. maydis* Kulturen. Erste Einblicke in die Regulation des TRP-abhängigen Pigmentweges erlaubte die Untersuchung einer Mutante von *U. maydis* (*UV31),* die unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle nur sehr wenig Pigment produzierte. Die Untersuchung des Rohextraktes zeigte dann, dass das Pityriacitrin verstärkt produziert wurde, wohingegen die Pityriarubine sowie das Pityriaanhydrid nicht nachweisbar waren. Dies deutet stark darauf hin, dass ein für den TRP-abhängigen Sekundärmetabolismus wichtiges Gen bei der Mutante getroffen wurde.
Diese Untersuchungen an *U. maydis* könnten auch Rückschlüsse auf die Regulation der Pigmentsynthese in *M. furfur* ermöglichen.
Nachdem Begerow und Bauer im Jahr 2000 die enge genetische Verwandtschaft zwischen *M. furfur* und den phytopathogenen Brandpilzen festgestellt hatten, stellten auch sie sich die Frage, wie es zu dieser Verbindung kommen konnte. Erste Hypothesen waren ein eventuelles Auftreten von *M. furfur* auf Pflanzen oder ein Ursprung des Pilzes aus Pflanzenparasiten (Begerow und Bauer 2000). Auf Pflanzen konnte *M. furfur* jedoch bisher nicht isoliert werden. Wie andere Lebewesen haben auch phytopathogene Pilze im Laufe der Evolution verschiedene Stadien durchlaufen und sich teilweise immer stärker spezialisiert. Dabei werden nach Prell (1996) Saprophyten, Saprophyten mit ersten eigenen phytopathogenen Mechanismen, pertrophe Pathogene sowie die sich biotroph ernährenden Parasiten unterschieden, die immer höhere Evolutionsstufen darstellen. Interessanterweise gibt es

zwischen den genannten Evolutionsstufen auch Übergangsformen (Prell 1996). Vor diesem Hintergrund könnte eine Untersuchung des vermeintlich aus dem phytopathogenen Bereich kommenden *M. furfur* bzw. dessen nächsten Verwandten wie *U. maydis* Hinweise auf derartige Pathomechanismen geben und zur weiteren Aufklärung der Entstehung der Pityriasis versicolor beitragen. *M. furfur* kommt häufig in der menschlichen Hautflora vor, ohne Hauterkrankungen zu verursachen. Offenbar ist es dem Pilz möglich, nur unter bestimmten Grundvoraussetzungen ein humanpathogenes Stadium zu erreichen. Dazu zählen unter anderem besonders die Hyperhidrose, Okklusion und eine lokal erhöhte Temperatur. Mayser et al. entdeckten in ihren Forschungen einen TRP-abhängigen Sekundärmetabolismus von *M. furfur*, bei dem unter anderem der UV-Filter Pityriacitrin produziert wird. Dies könnte mit einem veränderten TRP Angebot auf der Haut unter den oben genannten Bedingungen in Zusammenhang stehen (Stapelkamp, 2003).

Da es sich bei *U. maydis* um den bekanntesten und sehr weit erforschten Vertreter der Brandpilze handelt, sollte nun überprüft werden, ob sich Parallelen zwischen *U. maydis* und *M. furfur* entdecken lassen, um damit auch eventuelle Rückschlüsse auf die Evolution von *M. furfur* ziehen zu können. Von großem Interesse war zunächst, ob auch *U. maydis* unter TRP Gabe als alleiniger Stickstoffquelle beginnt, den von *M. furfur* bekannten Sekundärmetabolismus einzuschlagen. Dies sollte mit dem Nachweis von Substanzen geschehen, die bei dem genannten Sekundärmetabolismus von *M. furfur* erstmalig beobachtet wurden. Im weiteren Verlauf wurde dann die vom Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg genetisch veränderte *Ustilago* Variante *UV31* untersucht, da sie auf Ib-Glucose + TRP Agar im Vergleich zum Wildtyp fast keinerlei Pigmentbildung aufwies. Hierbei wurde überprüft, ob verschiedene im Sekundärmetabolismus gebildete Substanzen fehlten. Diese Untersuchung erfolgte, um gegebenenfalls mehr Informationen über die den Sekundärmetabolismus steuernden Gene zu erfahren. Die daran anschließenden genetischen Analysen wurden dabei vom Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg durchgeführt.

Tatsächlich begann *U. maydis* mit TRP als alleiniger Stickstoffquelle ein dunkles Pigment zu bilden. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und anschließender HPLC konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* Stoffe produziert, die bei *M. furfur* erstmalig - ebenfalls unter TRP Gabe - beschrieben wurden (Mayser et al. 1998, 2002). Dabei handelt es sich um die Pityriarubine B und C, das Malasseziaindol A, das Pityriaanhydrid sowie insbesondere das

Pityriacitrin. Dieses ist vermutlich die Hauptkomponente der UV-protektiven Wirkung der Pigmentinduktion. Die UV-protektive Wirkung wurde darauf in Bestrahlungsversuchen erfolgreich untersucht. Während bei einer UV-A Exposition von 200 J/cm² sowohl bei den mit TRP als auch bei den mit ARG gezüchteten Kulturen kein Wachstum mehr feststellbar war, so konnte man doch bei einer Exposition von 100 J/cm² bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen zumindest einen Trend zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen gegenüber den mit ARG angezüchteten Kulturen feststellen ($p = 0{,}108$). Dieser Trend stellte sich bei Auswertung der relativen Prozentzahlen etwas stärker dar ($p = 0{,}09$). Pape konnte 2001 an verschiedenen Stämmen von *M. furfur* bei UV-A Bestrahlung ähnliche Phänomene beobachten. So fand beim Wildstamm 397 bei 200 J/cm² sowohl bei mit TRP angezüchteten als auch bei mit ARG angezüchteten Kulturen kein Wachstum mehr statt. Bei anderen Stämmen (CBS 7019; CBS 6046; CBS 4162, CBS 1878, CBS 6094) konnte jedoch ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0{,}0001$) im Wachstum nach Bestrahlung mit UV-A 200 J/cm² zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen festgestellt werden. Bei geringeren Bestrahlungsstufen berichtete Pape erst ab 150 J/cm² von signifikanten Unterschieden (CBS 1878). Beim Wildstamm 397 konnte Pape keine signifikanten Unterschiede zwischen mit TRP angezüchteten und mit ARG angezüchteten Kulturen feststellen, allerdings zeigte sich dort bei 150 J/cm² ein leicht stärkeres Wachstum der mit TRP angezüchteten Kulturen. *U. maydis* scheint sich damit ähnlich dem *M. furfur* Wildstamm 397 zu verhalten

Bei UV-B Exposition zeigten sich dann in der vorliegenden Arbeit bei *U. maydis* deutlich höhere Signifikanzen. Bei maximaler Dosierung (2000 mJ/cm²) war auch hier bei beiden Kulturen kein Wachstum erkennbar. Bei 500 mJ/cm² zeigte sich dann aber ein signifikanter Vorteil der mit TRP angezüchteten Kulturen gegenüber den mit ARG angezüchteten Kulturen, sowohl absolut ($p = 0{,}01$) als auch prozentual ($p = 0{,}002$). Während bei den absoluten Zahlen für 1000 mJ/cm² wiederum nur ein Trend zu Gunsten der mit TRP gewachsenen Kulturen gezeigt werden konnte ($p = 0{,}993$), stellte sich dies in den Prozentzahlen wesentlich deutlicher dar ($p = 0{,}003$). Pape führte 2001 an verschiedenen Stämmen von *M. furfur* auch UV-B Bestrahlungen durch, wo ebenfalls ähnliche Phänomene wie bei *U. maydis* beobachtet werden konnten. Auch dort fiel bei stärkeren Intensitäten das Wachstum für beide Vergleichsgruppen ab. Jedoch zeigten sämtliche mit TRP angezüchtete Kulturen vor allem in höheren UV-B Bereichen ein signifikant stärkeres Wachstum ($p < 0{,}0001$), als die mit ARG gezüchteten Kulturen. Deutlich signifikante Unterschiede, im Sinne eines stärkeren Wachstums der jeweils mit TRP angezüchteten Kulturen, fanden sich dabei bei sämtlichen untersuchten Stämmen. Bei den Stämmen CBS 7019 und CBS 1878 stellte

sich der Wachstumsunterschied als hochsignifikant dar ($p < 0,0001$). Der Wildstamm 397 wies nach Bestrahlungen mit 1000 mJ/cm² ($p = 0,0029$) und 2000 mJ/cm² ($p = 0,0005$) ebenfalls solche hochsignifikanten Unterschiede auf.
Aus den bei den Bestrahlungsversuchen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lässt sich sagen, dass ein Vorteil der mit TRP angezüchteten Kulturen besonders bei UV-B 500 mJ/cm² vorlag. Bei UV-A 100 J/cm² und UV-B 1000 mJ/cm² lässt sich ebenfalls ein deutlicher Trend zu Gunsten der mit TRP angezüchteten Kulturen feststellen. Die prozentualen Zahlen stellen dies dabei noch stärker dar, als die absoluten. Vor dem Hintergrund der gesammelten Ergebnisse lässt sich eine deutliche Empfindlichkeitsminderung der mit TRP angezüchteten Kulturen gegenüber UV-Licht im Vergleich zu den mit ARG angezüchteten Kulturen feststellen. Damit zeigt sich unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle bei *U. maydis* ein im Vergleich zu *M. furfur* etwas schwächerer aber dennoch nachweisbarer UV-Schutz, der vermutlich durch das Pityriacitrin bewirkt wird, dessen Funktion bei *M. furfur* bereits in mehreren Versuchen gezeigt werden konnte (Mayser und Pape 1998, Pape 2001, Stapelkamp 2003).

Bei makroskopischer Betrachtung des mit TRP angezüchteten *UV31* fiel zunächst dessen „weißliches“ Erscheinungsbild im Vergleich zum *U. maydis* Wildtyp auf. Er bildete also kaum Pigment. Daher waren zur Gewinnung eines gleichwertigen Rohextraktes auch etwa 5 mal so viele Agarplatten notwendig. In der weiteren Untersuchung des Rohextraktes von *UV31* inklusive der dünnschichtchromatographischen Trennung konnte gezeigt werden, dass das Pityriaanhydrid sowie die Pityriarubine A und B nicht mehr vorhanden waren und das Pityriarubin C nicht sicher identifiziert werden konnte. Das Pityriacitrin schien hingegen verstärkt gebildet zu werden. Offenbar wurde bei der genetischen Mutation in Marburg ein für den tryptophanabhängigen Sekundärmetabolismus wichtiges Gen getroffen. Eine Bestätigung dieser Vermutung könnte über gentechnische Untersuchungen gelingen. Diese werden momentan im Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie durchgeführt.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse ergibt sich die Frage, warum *U. maydis* mit TRP als alleiniger Stickstoffquelle den von *M. furfur* bekannten Sekundärmetabolismus einschlägt und welche Rolle speziell Pityriacitrin in diesem Zusammenhang für *U. maydis* und *M. furfur* spielt. Das führt zu der Frage, was diese Pilze darüber hinaus gemeinsam haben. Beide zählen seit der genetischen Analyse von *M. furfur* zu den Brandpilzen, beide kommen bevorzugt in tropischen Gebieten beziehungsweise bei entsprechenden Temperaturen vor und beide haben

ein hefeartiges Wachstum (*U. maydis* nur in der apathogenen Form). Trotz auch vorhandener deutlicher Unterschiede ist also auch eine Reihe signifikanter Gemeinsamkeiten vorhanden. Desweiteren ist besonders der Zusammenhang zwischen Auftreten in warmen Gegenden beziehungsweise unter entsprechenden Temperaturen sowie das Vorhandensein eines UV-Filters (Pityriacitrin) bei beiden Pilzen interessant. Mayser und Imkampe konnten 1998 zeigen, dass *M. furfur* TRP nicht bevorzugt verstoffwechselt, auch wenn er dazu in der Lage ist. Stattdessen werden lipidhaltige Medien und unverzweigte Aminosäuren vorgezogen. Auch von *U. maydis* gibt es keine Berichte über einen bevorzugten TRP Stoffwechsel. Im Gegenteil ist beim Menschen bei der einseitigen Ernährung mit dessen Wirtspflanze, dem Mais, eine Pellagra (pella agra [ital.] = rauhe Haut) genannte Erkrankung bekannt. Da im Mais die essentielle Aminosäure Tryptophan nur in sehr geringen Dosen vorhanden ist, kommt es zu einem Mangel an Niacin, welches für die Freisetzung von Vitamin B notwendig ist. Der folgende Vitamin B Mangel kann mit Dermatitiden, gastrointestinaler Symptomatik (z.B. Diarrhoe, Stomatitis, Glossitis) sowie variablen neurologischen Defiziten (z.B. psychische Symptome, PNP) einhergehen (Rassner 2002, Masuhr 2005). Auch heute tritt diese Erkrankungen noch in südamerikanischen Ländern auf, wo Mais als eines der Hauptnahrungsmittel gilt. Neben dem Kolben wird auch für andere Teile der Maispflanze nicht über einen hohen TRP Gehalt berichtet. Trotzdem ist ein Vorkommen von TRP zumindest auf beziehungsweise in den Blättern der Maispflanze denkbar. Ein UV-Filter wie das Pityriacitrin würde sicherlich sowohl bei *M. furfur* als auch bei *U. maydis* Sinn machen, um sich bei Bedarf vor UV-Strahlung zu schützen. Dies gilt speziell für das bevorzugte Auftreten beider Pilze in tropischen Regionen.

Hinweise auf eine UV-protektive Wirkung von Pityriacitrin bei *U. maydis*, konnten in den Bestrahlungsversuchen gewonnen werden, bei denen Kulturen, die mit ARG angezüchtet worden waren nach UV-Exposition ein deutlich schlechteres Wachstum aufwiesen. Da es sich jedoch bei TRP nicht um die Hauptnahrungsquelle bei beiden Pilzen handelt, bleibt die Frage, wann auf den UV-Schutz zurückgegriffen wird. Da *M. furfur* und *U. maydis* evolutionsgeschichtlich aus dem gleichen Bereich stammen, scheint es sicherlich auch denkbar, dass es sich bei ihnen um hochspezialisierte Nachfahren frühzeitlicher Pilze handelt. Man muss bedenken, dass Pilze nach der Entstehung der Erde vor ca. 4,6 Milliarden Jahren mit die ersten Lebensformen darstellten. Zu diesen Lebensformen gehörten auch die noch heute unter anderem in Meeresplankton und an allen Flechtenstandorten existenten Cyanobakterien, die laut Pflug (2004) in der Evolution der Erde eine wesentliche Rolle

einnehmen. Demnach handelt es sich um Bakterien, die sich bereits in den Anfängen der Evolution durch hohe Anpassungsfähigkeit auf äußere Faktoren sowie eine sehr ausgeprägte UV Resistenz auszeichneten. Schulz-Ehling et al. konnten 1997 eine UV-B induzierte Synthese von photoprotektiven Pigmenten im Cyanobakterium *Nostoc commune* nachweisen. Dabei kam es bei UV-B Exposition unter anderem zur Bildung von Carotinoiden, deren Funktion weiter unten besprochen wird. Die Cyanobakterien waren in den Anfängen der Evolution offenbar auch unter mangelhaften Bedingungen oftmals zu einem Wachstum da fähig, wo dies sämtlichen anderen Organismen verwehrt blieb. Hughes und Lawley konnten 1997 auf eisfreien Felsbrocken in der Antarktis Kolonien von Cyanobakterien und Pilzen nachweisen, unter denen sich auch ein schwarz pigmentierter Pilz befand. Damit zeigt sich eine auch noch heute deutlich vorhandene Robustheit der Cyanobakterien sowie ein Auftreten auf noch nicht erschlossenen Bereichen der Erde. Darüber hinaus hebt Pflug in seinem Buch über die Umweltgeschichte der Erde die Bedeutung von Cyanobakterien als Stickstofflieferant für andere Organismen hervor (Pflug 2004). Da diese in der Lage waren, den in der Atmosphäre vorhandenen Stickstoff zu spalten und anderen Organismen zugänglich zu machen, verwundert es nicht, dass es auch Symbiosen mit Beteiligung der Cyanobakterien gegeben haben soll. Dazu sollen auch Symbiosen mit Pilzen gezählt haben, bei denen der Pilz durch die Cyanobakterien ernährt und die Cyanobakterien wiederum durch den Pilz geschützt wurden. Vor dem Hintergrund der Entdeckung von Hughes und Lawley ist dies durchaus vorstellbar. Man könnte sogar annehmen, dass es sich dabei wiederum um solch eine Symbiose handeln könnte, die bereits bei minimalen Lebensbedingungen eingegangen wird. Laut Pflug sind aus solchen Symbiosen im Laufe der Evolution die Flechten hervorgegangen, die auch heute noch unter einfachsten Bedingungen leben können, unter anderem auf Gestein.

Demnach haben Cyanobakterien bereits frühzeitig solche Symbiosen auch mit Hefepilzen geführt, zu denen heutzutage *M. furfur* und *U. maydis* gezählt werden können. Die Brandpilze, zu denen diese beiden gehören, sind jedoch erst vor etwa 50 Millionen Jahren auf Gräsern und anderen Pflanzen entstanden. Bei den Hefepilzen handelt es sich um relativ einfache Organismen, aus denen sich viele der heutigen Pilze entwickelt haben könnten. Nach

Abb. 31: *Ubiquitär vorkommende Flechte: Bedeutung für die Evolution von M. furfur und U. maydis ?*

Pflug sind Symbiosen zwischen Cyanobakterien und Hefepilzen noch auf vorgelagerten Felsenriffs in küstennahen Flachmeeren zu beobachten, bei denen sie eine Art Rasen bilden, entsprechend auch einer hohen UV-Exposition ausgesetzt sind und somit ein UV-Schutz auch von Vorteil wäre. Auch hier sind Parallelen zu den in der Antarktis gefundenen Kolonien zu sehen. In Gewässern wird Ähnliches auch bei Symbiosen von Algen und den Cyanobakterien beobachtet. Entsprechend ist auch eine parasitäre oder symbiotische Lebensweise von Algen und Pilzen denkbar. Pflug nimmt sogar an, dass die Pilze im Laufe der Evolution mit den Algen auf das Festland übergesiedelt sind. Auch eine Aufnahme der Cyanobakterien durch Pilze und Algen will er nicht ausschließen. Vor diesem Hintergrund könnte man nun annehmen, dass bei diesen symbiotischen Lebensweisen der frühzeitlichen Pilze auch genetische Informationen ausgetauscht wurden. Darunter könnten auch Pigmentsysteme gewesen sein, die in der damaligen Zeit von großer Bedeutung waren. So wurden unter anderem schon in Meteoriten, die das gleiche Alter wie die Erde hatten, gelbrote Pigmente aus der Gruppe der Carotinoide entdeckt (Pflug 2004). Die UV-protektive Funktion von

Carotinoiden wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Fritsch 1976, Stahl 2000). Stahl und Krutmann konnten 2006 sogar zeigen, dass selbst die systemische Anwendung von beta-Carotinoiden (15-30 mg/d) über 10 bis 12 Wochen einen protektiven Effekt gegen das UV-induzierte Lichterythem bewirken konnte. Desweiteren wird auch eine antioxidative Funktion der Carotinoide beschrieben (Bendich und Olson 1989). Auch andere den Carotinoiden ähnliche Pigmente werden als Hilfsmittel zur Lichtabsorption in frühzeitlichen Lebewesen diskutiert, die diese unter anderem zur Durchführung ihrer Photosynthese benötigten. Auch wenn es sich bei Pityriacitrin und den Pityriarubinen um ein anderes Pigmentsystem handelt, zeigt es doch, dass ähnliche Funktionen bereits vor Milliarden von Jahren von Mikroorganismen eingesetzt wurden und offenbar auch noch werden. So ist unter anderem bei *Cryptococcus neoformans* die Bildung von Melanin entdeckt worden, welches den Pilz schützt und damit dessen Virulenz erhöht (Wang 1994). Ähnliches ist auch von den wegen ihrer Dauerpigmentierung Schwärzepilze genannten Pilzen bekannt, die Melanin als UV-Schutz produzieren. Bei *Collema cristatum* ist ein UV-B Schutz in Form eines Mycosporins entdeckt worden (Torres et al. 2004). Es scheint also durchaus möglich, dass *U. maydis* und *M. furfur* Nachfahren frühzeitlicher Hefepilze sein könnten, die dann im weiteren Verlauf andere Entwicklungen genommen haben. Das Pityriacitrin könnte dabei im Laufe der Evolution erworben oder entsprechend aus anderen Systemen modifiziert worden sein. Es scheint sogar möglich, dass es für beide Pilze von essentieller Bedeutung war, wenn man bedenkt, dass die UV-Exposition zeitweise viel höher war als heute und das Nahrungsangebot ein anderes war. Es könnte sich also um ein Relikt aus der Evolution handeln, dass heute keinerlei Relevanz mehr hat. Dagegen spricht jedoch zumindest bei *M. furfur*, dass die depigmentierten Areale bei der Pityriasis versicolor weniger stark auf UV-Licht reagieren, als es die nicht depigmentierten Areale tun wie es bereits von Ruete (1933) und Kistiakovsky (1927) beschrieben wurde und was damit eine Nutzung des UV-protektiven Potentials in Form des Pityriacitrins wahrscheinlich macht. Es könnte natürlich auch bedeuten, dass *U. maydis* und *M. furfur* im Laufe ihrer Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt oder auch beibehalten haben, um ihre jeweilige Pathogenität zu erreichen beziehungsweise dem jeweiligen Wirt anzupassen. Theoretisch könnte auch *U. maydis* von Pityriacitrin profitieren. Andererseits hat der Pilz andere Wege zur Erhaltung der eigenen Art entwickelt, durch die ein UV-Schutz zumindest nicht unbedingt notwendig erscheint. So ist durch seinen Vermehrungszyklus eine Rekombination der genetischen Information sowie durch die äußerst resistenten Sporen eine Weitergabe dieser gesichert. Diese Mechanismen sind zwar von *M. furfur* nicht bekannt, wenn man sich jedoch überlegt, dass die zwei diskutierten Pilze

verschiedene Entwicklungen genommen haben, scheint dieses möglich. Dabei sollte man auch bedenken, dass es sich bereits um hoch spezialisierte Pilze handelt, die sich zwar auch saprophytär ernähren können, aber durchaus in der Lage sind diesen Zustand zu verlassen und pathogene Eigenschaften zu entwickeln, was bei *U. maydis* noch stärker ausgeprägt zu sein scheint, als bei *M. furfur*, der nur unter bestimmten Rahmenbedingungen den saprophytären Zustand aufgibt. Der mutmaßlichen Evolution der Phytopathogenität bei Pilzen (Prell 1996) zu Folge müsste man beide bereits zwischen der dritten und vierten Gruppe einordnen. Das bedeutet, dass sie sich evolutionsgeschichtlich zwischen den pertrophen und biotrophen Pilzen wiederfinden. Sie zeigen also beide Wirtsspezifität, können beide saprophytär auf ihrem Wirt leben, diesen attackieren, ohne dass dieser geschwächt sein muss, bestimmte Basisresistenzen beziehungsweise Abwehrmechanismen des Wirtes umgehen, sich aber offenbar auch in den Metabolismus der Wirtszelle einschalten. Auf dem Weg der Entwicklung solcher spezieller Möglichkeiten sahen sich die Brandpilze sicher häufiger mit zu überwindenden Hürden wie etwa neuen Resistenzen oder Abwehrmechanismen ihrer Wirte konfrontiert. Es galt also neue Strategien zu entwickeln um diese zu umgehen. An dieser Stelle sei noch mal erinnert, dass in den Versuchen dieser Arbeit neben dem Pityriacitrin auch andere Stoffe wie etwa die Pityriarubine B und C nachgewiesen werden konnten. Diese können die granulozytäre Funktion in spezifischer Weise hemmen (Krämer et al. 2005, Irlinger, Krämer, Mayser, Steglich, 2004). Dies würde wiederum Sinn für den Pathomechanismus von *M. furfur* machen, wirft jedoch die Frage auf, wieso diese Stoffe auch bei *U. maydis* auftauchen. Erneut sei hier auf die Evolution verwiesen. Da es unwahrscheinlich erscheint, dass die Brandpilze vom Menschen auf die Pflanzen übergegangen sind, sondern wohl eher das Gegenteil der Fall war, könnte man sich vorstellen, dass die Brandpilze in ihrer Evolution auf Abwehrmechanismen beziehungsweise Zellen stießen, die ähnliche Funktionen oder Eigenschaften heutiger Granulozyten aufwiesen. Es wäre auch denkbar, dass sich die Brandpilze gegen eventuelle Konkurrenten auf ihren Wirten zur Wehr setzen mussten, die granulozytenähnliche Eigenschaften zeigten. Bei diesen Beobachtungen und Überlegungen muss man sich in jedem Fall immer wieder in Erinnerung rufen, in welchem Zeitraum diese ganzen Prozesse abgelaufen sind. Da es sich bei den Hefepilzen mit um die ältesten Organismen handelt, wird hier in einem Rahmen von etwa 4 Milliarden Jahren gesprochen. Während die Entwicklung der Pflanzen vor etwa 2000 Millionen Jahren begann, liegt der Beginn der Entwicklung des Menschen nur etwa 6-7 Millionen Jahre zurück. Die Annahme von Pflug, dass die Pilze im Laufe der Evolution mit den Algen auf das Festland gelangten, war vermutlich der erste Schritt. Die sich zunächst

entwickelnden Pflanzen waren wahrscheinlich die ersten Wirte für solche Pilze, die sich dann mit der Zeit mehr und mehr dem neuen Lebensraum anpassten. Die Brandpilze entwickelten sich dann vor ca. 50 Millionen Jahren. Entsprechend könnte man annehmen, dass es *M. furfur* erst nach bzw. während der Entwicklung des Menschens gelungen sein könnte aus der Pflanzenwelt auf den Menschen überzugehen. Allerdings scheint dieser Zeitraum in Anbetracht der 4 Milliarden Jahre, die Hefepilzen insgesamt zur Entwicklung zur Verfügung standen als relativ kurz. Da *M. furfur* aber nicht nur beim Menschen vorkommt, kann man annehmen, dass er schon wesentlich früher auf andere Wirbeltiere, die Kontakt zu den vorhandenden Gräsern und Pflanzen hatten (z.B. Urpferde), übergegangen sein muss. Obwohl *M. furfur* auch bei Tieren nachgewiesen werden kann, tritt die von ihm ausgelöste Pityriasis versicolor nicht einmal bei den Schimpansen auf, die dem Menschen genetisch am nächsten stehen sollen. Was prädispositioniert den Menschen also für diese Erkrankung ? Normalerweise bevorzugt *M. furfur* kein TRP. Dennoch scheint der unter TRP Einfluss einsetzende Sekundärmetabolismus eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Rahmenbedingungen für das Auftreten einer Pityriasis versicolor wurden bereits genannt, zu ihnen gehören unter anderem die Haut-Okklusion, die Temperaturerhöhung sowie verstärktes Schwitzen. Die Begünstigung durch Temperaturentwicklung kann bereits wieder als Hinweis auf den Ursprung von *M. furfur* aus eher tropischen Regionen gedeutet werden, wo auch *U. maydis* vermehrt auftritt. Die Okklusion sowie das verstärkte Schwitzen könnten neben Sauerstoff- auch zu Stickstoffmangel führen, so dass sich *M. furfur* um alternative Stickstoffquellen wie etwa das TRP bemühen müsste und es dann zu dem Sekundärmetabolismus kommen könnte. Ein entscheidender Unterschied zu den anderen Lebewesen bei denen *M. furfur* nachgewiesen wurde ist, dass der Mensch als einziger zum Schwitzen am gesamten Körper im Stande ist. Allerdings ist auch der Schweiß nicht als ausgeprägte TRP Quelle bekannt, auch wenn es darin in relativ kleinen Mengen nachgewiesen werden konnte (Burke 1966, Hadorn 1967). Dennoch könnte es bei ausreichender Transpiration als Nahrungsquelle geeignet sein, um den Sekundärmetabolismus zu starten, der in der Evolution für den Pilz beziehungsweise seine Vorfahren wahrscheinlich von lebenswichtiger Bedeutung war. Mayser und Imkampe konnten 1998 zeigen, dass *M. furfur* unverzweigte Aminosäuren wie etwa ARG besser verstoffwechseln kann als verzweigte (z.B. LEU), aromatische (z.B. PHE) und heterozyklische (z.B. TRP). Das bedeutet, dass *M. furfur* zunächst andere Nahrungsquellen bevorzugt und nur in einer absoluten Mangelsituation TRP verstoffwechselt. Diese kann durch Haut-Okklusion, die Temperaturerhöhung sowie verstärktes Schwitzen gegeben sein, so dass der Pilz nur noch

TRP zur Verfügung hat. Eine andere Überlegung beruht auf der Tatsache, dass es unter UV-Exposition, speziell durch UV-A Strahlung und durch UV-B aktiviertes TRP, auf der Haut zu verstärkter Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen kommt, die die Haut einem erhöhten oxidativen Stress aussetzt. So wird ein Abbau des TRP durch den Sekundärmetabolismus von *M. furfur* sowie eine Funktion der gebildeten Verbindungen als Radikalfänger und somit ein Schutz für *M. furfur* vor oxidativem Stress diskutiert (Stapelkamp 2003). Ein UV-Schutz wie durch Pityriacitrin würde bei eingeschränkten Lebensbedingungen sicherlich auch Sinn machen, um die ohnehin schwierige metabolische Situation nicht noch durch starke UV-Exposition weiter zu erschweren, zumal die Empfindlichkeit von *M. furfur* auf UV-Strahlung ohne UV-Schutz höher als bei anderen in der natürlichen Hautflora vorhandenen Keimen zu sein scheint, was in Versuchen von Faergmann (1987) deutlich nachgewiesen werden konnte. Für *U. maydis* sind Funktionen zum Schutz vor oxidativem Stress bisher nicht beschrieben. Kim, Kronstad und Ellis konnten jedoch 2001 eine durch Tryptophan induzierte Steigerung der Phenylalanin ammonia-lyase (PAL) Aktivität bei *U. maydis* nachweisen. Bei der PAL handelt es sich um ein von höheren Pflanzen (Minimikawa und Uritani 1965) und Pilzen (Rao, Moore, Towers 1967) bekanntes Enzym, dass die Umwandlung von L-Phenylalanin zu NH_3 und Zimtsäure katalysiert. Es kommt im übrigen auch beim Mais vor (Rosler et al. 1997). Bei Pflanzen wird dadurch ein Sekundärmetabolismus induziert, aus dem unter anderem Flavonoide freigesetzt werden, die als Antioxidantien ebenfalls vor oxidativem Stress schützen können (Graf et al. 2005). Es werden durch Induktion der PAL auch verschiedene andere Substanzen gebildet, die alle dem Schutz der angegriffenen Pflanze dienen (Kim et al. 2001). Bei verschiedenen Pilzen wie *Aspergillus oryzae* konnte die PAL nachgewiesen werden (Juvvadi et al. 2005). Dabei zeigte sich sogar ein den Pflanzen sehr ähnlicher Ablauf des Sekundärmetabolismus mit Bildung von Flavonoiden. Die Mechanismen sind jedoch noch nicht so gut erforscht wie bei den Pflanzen. Dem Namen entsprechend wird die PAL Aktivität durch Anwesenheit von L-Phenylalanin induziert, dies kann in geringem Maße jedoch auch durch andere aromatische Aminosäuren geschehen, wie Kim, Kronstad und Ellis (2001) berichten. Bei *U. maydis* konnten sie jedoch beobachten, dass L-Tryptophan eine deutlich höhere Induktion der PAL Aktivität bewirken konnte als L-Phenylalanin. Das Zellwachstum blieb bei beiden Aminosäuren jeweils relativ konstant. Bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Aminosäuren fiel die PAL Aktivität wesentlich geringer aus als bei alleiniger Anwesenheit von L-Tryptophan. Bei anderen *Ustilago* Arten sowie *Sporisorium relianum*, einem anderen eng verwandten Brandpilz, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Bis zu der Entdeckung

von Kim, Kronstad und Ellis waren bei den wenigen zuvor erforschten Pilzen vor allem L-Phenylalanin und L-Tyrosin als Induktoren der PAL Aktivität bekannt. Unter der Annahme, dass die PAL bei Pilzen und der damit verbundene Sekundärmetabolismus deutliche Ähnlichkeiten zu den Pflanzen aufweist, könnte den von *U. maydis* im tryptophanabhängigen Sekundärmetabolismus gebildeten Substanzen ähnliche Funktion zukommen, wie den Flavonoiden und den Carotinoiden bei den Pflanzen. Damit besteht die Möglichkeit, dass es sich hier erneut um Substanzen handelt, die Schutz vor oxidativem Stress bewirken können. Vor dem Hintergrund der engen Verwandtschaft zwischen *U. maydis* und *M. furfur*, dem nahezu identischen Ablauf des tryptophanabhängigen Sekundärmetabolismus sowie der bereits bei *M. furfur* diskutierten Funktion der in diesem Sekundärmetabolismus gebildeten Substanzen als Radikalfänger, muss gleiches für *U. maydis* angenommen werden. Dabei scheint der Einfluss von Tryptophan auf die PAL von entscheidender Bedeutung zu sein. Speziell UV-A Licht führt auf der Haut zur Bildung von Reactive oxygen species (ROS), was durch das in der Haut gefundene Melanin Phäomelanin (Thody et al. 1991) noch verstärkt wird (Maresca et al. 2006). Demnach kommt es dabei auch zur Bildung von freien Radikalen sowie Einschränkungen von enzymatischen Abwehrmechanismen. Offenbar ist neben Methionin Tryptophan im Verlauf ein bevorzugter Reaktionspartner. Durch den damit verbundenen oxidativen Stress kann es dann zur Zellschädigung kommen. Wie oben bereits berichtet, könnte ein Abbau oder Umbau des Tryptophans auch dem Schutz vor oxidativem Stress dienen. Der produzierte UV-Filter Pityriacitrin könnte den Pilz dann vor weiterer Schädigung durch UV-Licht und Bildung zytotoxischer Verbindungen auf dem Wirt schützen. Ob dies bei *U. maydis* auch in vivo auf der Maispflanze aufgrund des geringen TRP Gehaltes so abläuft, ist nicht ganz klar. Da jedoch die Aktivitätsaktivierung der PAL durch TRP von Kim et al. (2001) bereits bei einem TRP-Gehalt von 30 µM festgestellt werden konnte, scheinen geringe Mengen ausreichend zu sein. Sowohl bei *M. furfur* als auch bei *U. maydis* scheint der Sekundärmetabolismus offenbar durch Veränderung der Lebensbedingungen ausgelöst zu werden. Haut und Maispflanze sind beide nicht für ein üppiges TRP Angebot bekannt. Dennoch scheinen beide Pilze unter gewissen Umständen in eine Situation zu geraten, in denen sie das TRP verstoffwechseln müssen, um das eigene Überleben zu garantieren.

Die Wichtigkeit des UV-Schutzes spiegelt sich in den Untersuchungen von *UV31* wieder. Nach genetischer Mutation wies dieser zwar eine geringe Pigmentbildung und ein Fehlen der Pityriarubine und des Pityriaanhydrids auf, das Pityriacitrin stellte sich hingegen sogar stärker

dar als beim *U. maydis* Wildtyp. Dies könnte bedeuten, dass Pityriacitrin im tryptophan-abhängigen Sekundärmetabolismus eine Schlüsselrolle zufällt. Die Bedeutung ist möglicherweise so essentiell, dass eine genetische Mutation des entsprechenden Gens als eher schwierig einzustufen ist. Dies könnte auch ein weiterer Hinweis auf die Evolution sein, bei der UV-Schutz-Systeme weitestgehend, wenn auch in verschiedenen Formen, vorhanden geblieben sind, während die verschiedenen Pilze ihre Angriffsstrategien je nach Wirt immer wieder verändert haben. Bei *UV31* scheint bei der Mutation ein für den Sekundärmetabolismus wichtiges Gen getroffen worden zu sein, welches für die Synthese der Pityriarubine verantwortlich sein muss. Desweiteren waren für die Gewinnung der gleichen Menge Rohextrakt wie beim Wildtyp 5 mal mehr Agarplatten notwendig. Also scheint durch die Mutation auch die Pigmentsynthese an sich beeinträchtigt worden zu sein. Da der Sekundärmetabolismus bei *U. maydis* praktisch wie bei *M. furfur* abzulaufen scheint, könnte man nun durch Identifizierung des entsprechenden Gens mehr über den Pathomechanismus beider Pilze erfahren. Der große Vorteil liegt in diesem Fall darin, dass *U. maydis* genetisch bereits weitestgehend erforscht ist. Dadurch besteht die Chance, über die Entdeckung der den Sekundärmetabolismus steuernden Gene auch die Pityriasis versicolor besser zu verstehen. Dazu wird allerdings eine Überprüfung und ein Vergleich der Funktionen einzelner Gene in *U. maydis* und *M. furfur* nötig sein.

Die vor dem Hintergrund der genetisch engen Verwandtschaft von *M. furfur* und *U. maydis* eingangs gestellten Fragen, können mit Hilfe der durchgeführten Untersuchungen wie folgt beantwortet werden:

1. Bereits makroskopisch zeigt *U. maydis* unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle die Bildung eines dunklen Pigments. Aus diesem Pigment können erstmals verschiedene Stoffe nachgewiesen werden, die bereits aus dem tryptophanabhängigen Sekundärmetabolismus von *M. furfur* nachgewiesen werden konnten. Dazu zählen neben Pityriaanhydrid und Malasseziaindol A auch die Pityriarubine B und C sowie der UV-Filter Pityriacitrin.
2. *U. maydis* kann sich bei erfolgtem Wachstum mit TRP besser vor UV-Strahlung schützen, als wenn das Wachstum mit ARG erfolgt ist. Dabei zeigt sich ein noch deutlicherer Unterschied bei UV-B als bei UV-A. Damit ist die Funktion der TRP-abhängigen Pigmentsynthese bei *U. maydis* ähnlich einzuschätzen wie bei *M. furfur*.

3. Der tryptophanabhängige Sekundärmetabolismus zeigt deutliche Parallelen zwischen den 2 Pilzen auf. Obwohl beide Pilze andere Wirte besitzen und unter anderen Lebensbedingungen leben, wird durch bestimmte Umstände offenbar ein Sekundärmetabolismus aktiviert, der bei beiden sehr ähnlich abläuft. Offenbar handelt es sich um einen sehr alten Mechanismus, der eventuell bereits von frühzeitlichen Pilzen aktiviert werden konnte. Neben dem UV-Schutz sowie möglicher Entwicklung von Abwehrmechanismen sowie der Überwindung verschiedener Resistenz weisen viele Dinge beim Sekundärmetabolismus auch auf einen Schutzmechanismus vor oxidativem Stress auf dem Wirt hin.
4. Die beschriebene genetische Veränderung des *U. maydis* Wildtypes zeigt deutliche Einschränkungen für den tryptophanabhängigen Stoffwechsel. Bereits makroskopisch lässt sich ein nahezu pigmentfreies Wachstum bei *UV31* erkennen. Zudem ist das Wachstum stark eingeschränkt. Im Vergleich zum Wildtyp ist etwa die fünffache Menge an Agarplatten nötig, um das gleiche Volumen an Rohextrakt zu gewinnen.
5. Es lässt sich ein deutlicher Unterschied in den ablaufenden Prozessen im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Zum einen wird bedeutend weniger Pigment gebildet, zum anderen sind die Pityriarubine und das Pityriaanhydrid nicht nachzuweisen, beziehungsweise ist deren Vorhandensein mehr als fraglich. Das Pityriacitrin stellt sich hingegen deutlich stärker dar, was für eine Schlüsselrolle des UV-Filters im Sekundärmetabolismus spricht.

Abschließend ist zu sagen, dass in dieser Arbeit deutliche Gemeinsamkeiten zwischen dem humanpathogenen *M. furfur* und dem phytopathogenen *U. maydis* aufgezeigt werden konnten. Besonders interessant ist, dass beide unter TRP Gabe nicht nur ähnliche, sondern identische Substanzen bilden. Obgleich die Bedeutung dieser für die Pilze noch nicht ganz geklärt ist, lassen sich verschiedene Ansätze überlegen. Es könnte sein, dass es sich um einen sehr alten Mechanismus handeln, der vor allem im Laufe der Evolution und die damit verbundenen Veränderungen des Lebensraums und der UV-Intensität seine Bedeutung hatte. Aber auch heutzutage könnte er für die Pilze in bestimmten Ausnahmesituationen vor allem bei der Abwehr von oxidativem Stress von immenser Wichtigkeit sein. Sicherlich ist auch eine Kombination der möglichen Mechanismen denkbar. In jedem Fall jedoch zeigt sich einmal mehr, dass solcherlei Prozesse kompliziert sind und nicht von heute auf morgen entstehen. Sicherlich besteht die Möglichkeit, dass frühzeitliche Pilze ähnliche Mechanismen hatten, die sich dann nur anders entwickelt haben und das je nach Bedürfnissen und Lebensbedingungen.

Dafür spricht auch, dass man bei anderen Mikroorganismen ähnliche, wenn auch nicht die gleichen Mechanismen nachweisen konnte. Es ist sicherlich kein Zufall, dass auch andere Pigmentsysteme in der Natur existieren, aus denen z. B. die Carotinoide oder auch die Flavonoide hervorgehen. Bei diesen sind bereits Funktionen als Antioxidantien beschrieben und die tägliche Zufuhr in Form von Gemüse und Obst beim Menschen empfohlen. Bei den von *M. furfur* und nun auch von *U. maydis* produzierten und nachgewiesenen Substanzen werden ähnliche Funktionen diskutiert (Krämer et al. 2005). Um in Zukunft mehr über solche Vorgänge herauszufinden beziehungsweise diese zu verstehen, lohnt ein Blick in die Vergangenheit. Auch wenn sich durch die Vielfalt der Natur vieles in andere Richtungen entwickelt hat, gibt es doch immer wieder Verbindungen und Gemeinsamkeiten, die zu einem besseren Verständnis der bestehenden Prozesse führen können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Jahr 2000 konnte in Untersuchungen von Begerow und Bauer die phylogenetische Verwandtschaft des humanpathogenen *M. furfur* zu den phytopathogenen Brandpilzen festgestellt werden. Um die Verwandtschaft näher zu untersuchen und gegebenenfalls Informationen über den evolutionsgeschichtlichen Hintergrund von *M. furfur* zu gewinnen, wurde der am weitesten erforschte Brandpilz *U. maydis* in dieser Arbeit näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle auch ein braunes Pigment produziert. Dieses Phänomen war erstmals bei *M. furfur* beschrieben worden. Die genauere Untersuchung des Rohextraktes erbrachte den Nachweis der ebenfalls bei *M. furfur* unter den gleichen Bedingungen erstmalig entdeckten Indolderivate Pityriarubin B, Pityriarubin C, Malasseziaindol A, Pityriaanhydrid sowie den UV-Filter Pityriacitrin. Die Funktion des Pityriacitrins konnte bei *M. furfur* schon mehrfach von Mayser et al (1998, 2002, 2003) nachgewiesen werden. Daher erfolgte auch eine Untersuchung des bei *U. maydis* gewonnenen Pityriacitrin-haltigen Rohextraktes. In mehreren Versuchen mit verschiedenen einmaligen UV-A (100 J/cm², 200 J/cm²) und UV-B (500 mJ/cm², 1000 mJ/cm², 2000 mJ/cm²) Expositionen konnte gezeigt werden, dass *U. maydis*, der mit TRP angezüchtet worden war, wesentlich strahlenunempfindlicher war, als mit ARG angezüchtete *U. maydis* Kulturen. Dies galt insbesondere für die Betrahlungen mit UV-A 100 J/cm² (absolut p=0,108; relativ p=0,09) sowie UV-B 500 mJ/cm² (absolut p=0,01; relativ p=0,002) und 1000 mJ/cm² (absolut p=0,993; relativ p=0,003). Bei Bestrahlungen mit UV-A 200 J/cm² sowie UV-B 2000 mJ/cm² kam es sowohl bei mit TRP als auch mit ARG angezüchteten *U. maydis* Kulturen zu keinerlei Wachstum. Desweiteren wurde eine Mutante (*UV31*) des *U. maydis* Wildtypes untersucht, die unter Gabe von TRP als alleiniger Stickstoffquelle nur sehr wenig Pigment produzierte. Die Untersuchung des Rohextraktes zeigte dann, dass das Pityriacitrin verstärkt produziert wurde, wohingegen die Pityriarubine sowie das Pityriaanhydrid nicht nachweisbar waren. Damit ist davon auszugehen, dass ein für den TRP-abhängigen Sekundärmetabolismus wichtiges Gen bei der Mutante getroffen wurde. Die Bedeutung des UV-Schutzes könnte durch starke UV-Exposition und damit erhöhtem Bedarf an UV-protektiven Maßnahmen im Laufe der Evolution bedingt sein. Dem UV-Schutz scheint dabei eine essentielle Rolle zuzukommen, wie auch die vermehrte Produktion in *UV31* zeigt. Außerdem wird eine Funktion der gebildeten Substanzen als Schutz vor oxidativem Stress angesehen, ähnlich den Flavonoiden und Carotinoiden bei den Pflanzen, wobei bereits von Kim et al. 2001 eine Aktivitätssteigerung der Phenylalanin ammino-lyse (PAL) durch TRP bei *U. maydis* und einigen anderen ihm verwandten Pilzen gezeigt werden

konnte. Von Pflanzen ist bekannt, dass dadurch ein Sekundärmetabolismus induziert werden kann, aus dem die Flavonoide hervorgehen, die einen Schutz vor oxidativem Stress bieten. Bei Pilzen wie *U. maydis* und *M. furfur* könnte es sich um einen ähnlichen Vorgang handeln, bei dem andere Substanzen, wie eben die Pityriarubine und das Pityriacitrin, diese Aufgabe erfüllen.

7 SUMMARY

In the year of 2000, genetic examinations of Begerow and Bauer showed the relationship between the human pathogenic *M. furfur* and the phytopathogenic *Ustilaginomycetes*. To get more information about the relationship and possibly about the evolutionary backround of *M. furfur*, the most explored fungus of the *Ustilagomycetes* (*U. maydis*) was examined in this project. It was possible to show that *U. maydis* started producing a brown pigment when it was grown with TRP as the single nitrogen source. This phenomenon was seen first in *M. furfur*. The closer examination of the crude extract showed that there were some substances (piyriarubin B, pityriarubin C, malasseziaindole A, pityriaanhydride and the UV-filter pityriacitrin) included, that were discovered first in *M. furfur* under the same circumstances. The function of pityriacitrin was already shown several times by Mayser et al. (1998, 2002, 2003). In this project there was an examination of the UV-protective function of the crude extract that was found in *U. maydis*, most likely caused by pityriacitrin. Therefore, there were several experiments with UV-A (100 J/cm², 200 J/cm²) and UV-B (500 mJ/cm², 1000 mJ/cm², 2000 mJ/cm²) exposure. It was possible to show that *U. maydis* which was grown with TRP had a higher resistance against UV-light than *U. maydis* which was grown with ARG. This was shown especially under exposure with UV-A 100 J/cm² (total p=0,108; percentage p=0,09) as well as UV-B 500 mJ/cm² (total p=0,01; percentage p=0,002) and 1000 mJ/cm² (total p=0,993; percentage p=0,003). No cultures were growing under exposure with UV-A 200 J/cm² and UV-B 2000 mJ/cm². Furthermore the mutant *UV31* was examined because it produced almost no pigment with TRP as the single nitrogen source. To get the same amount of crude extract as in *U. maydis* there were much more cultures necessary. The examination of the crude extract showed that there was a higher production of pityriacitrin while there were no traces of the pityriarubins and the pityriaanhydride. Most likely a gene which is important for the TRP-depending secondary metabolism was involved in the genetic change. The importance of the UV-protection could be caused by high UV-exposure and increased need in UV-protective solutions during evolution. The UV-protection seems to play an essential role as shown in the increased production of pityriacitrin in *UV31*. A function of the produced substances as a protection against oxidative stress, just like the flavonoids and carotinoids in plants, is being discussed as well. Kim et al (2001) were able to show a TRP-depending increase of the phenylalanin ammonia-lyase (PAL) activity in *U. maydis* and some other related fungi. It is known from plants that the PAL can induce a secondary metabolism with the production of flavonoids which can protect against oxidative stress. Possibly *U. maydis*

and *M. furfur* are having a similar mechanism in which the pityriarubins and the pityriacitrin are fulfilling this function.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Banuett, F. (1992) *Ustilago maydis*, the delightful blight, Trends genet. 8(5): 174-80

Banuett, F., Herskowitz, I. (1989) Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 86, pp. 5878-5882

Banuett, F., Herskowitz, I. (1996) Descrete developmental stages during telispore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*, Development 122(10): 2965-76

Begerow, D., Bauer, R. (2000) Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences, Mycol. Res. 104 (1): 53-60

Begerow, D., Bauer, R., Oberwinkler F. (2002) The Exobasidiales: an evolutionary hypothesis, Mycological Progress 1(2): 187-199

Bendich, A., Olson, J. A. (1989), Biological actions of carotenoids, FASEB J. 3(8): 1927-32

Bojanovsky, A., Bohnert, E., Jung, E. G. (1979), *Pityrosporum orbiculare*: Erreger verschiedener klinischer Bilder und Modell einer Depigmentierungsart, Akt. Derm. 5: 19-25

Burke, R. C., Lee, T. H., Buettner-Janusch, V., Free amino acids and water souble peptides in stratum corneum and skin surface film in human beings (1966), Yale J. Biol. Med. 38: 355-373

Charles, C. R., Sire, D. J., Johnson, B. L., Beidler, J. G. (1973), Hypopigmentation in tinea versicolor : A histochemical and electronmicroscopic study, Int. J. Derm. 12: 48-58

Crespo Erchiga, V., Orjeda Martos, A., Vera Casano, A., Crespo Erchiga, A., Sanchez Farjardo, F. (2000), Malassezia globosa as the causative agent of pityriasis versicolor, Br. J. Dermatol. 143(4): 799-803

Ehling-Schulz, M., Bilger, W., Scherer, S. (1997), UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*, Bacteriol. 179(6): 1940-5

Faergmann, J., Larko, O. (1987), The effect of UV-light on human skin microorganisms, Acta Derm. Venereol. 67: 69-72

Feldbrügge, M. (2005) Die Rolle von RNA-bindenden Proteinen während der pathogenen Entwicklung in *Ustilago maydis*, Tätigkeitsbericht 2005, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie

Fritsch, P., Gschnait, F., Honigsmann, H., Wolff, K. (1976), Protective action of beta-carotene against lethal photosensitization of fibroblasts in vitro, Br. J. Dermatol. 94(3): 263-271

Graf, B. A., Milbury, P. E., Blumberg, J. B. (2005), Flovols, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence, J. Med. Food 8, 281–290

Gründer, S., Mayser, P., Redmann, T., Kaleta, E. F. (2005), Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb, Mycoses. 48(2): 114-9

Gudmundsdottir, K., Ashworth, A. (2004), BRCA2 in meiosis: turning over a new leaf, Trends Cell Biol.14(8): 401-4

Guého, E., Boekhout, T., Ashbee, H. R., Guillot, J., van Belkum, A., Faergemann, J. (1998), The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens, Med. Mycol. 36 Suppl 1: 220-9

Guého, E., Guillot, J (1995), The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons, Antonie Van Leeuwenhoek 67(3): 297-314

Guého, E., Midgley, G., Guillot, J (1996), The genus *Malassezia* with description of four new species, Antonie Van Leeuwenhoek 69(4): 337-55

Gupta, A. K., Batra, R., Bluhm, R., Faergemann, J. (2003), Pityriasis versicolor, Dermatol. Clin. 21(3):413-29

Hadorn, B., Hanimann, F., Anders, P., Curtius, H.-Ch., Halverson, R. (1967), Free amino acids in human sweat from different parts of the body, Nature 215: 416-417

Heitefuss, R., König, K., Obst, A., Reschke, M.: Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, DLG-Verlag, Frankfurt am Main (2000)

Hodgins, D. S. (1971), Yeast phenylalanine ammonia-lyase. Purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine, J. Biol. Chem. 246(9): 2977-85

Hoffmann, G., Schmutterer, H.: Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen, 2. erweiterte und ergänzte Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1999)

Hughes, K. A., Lawley, B. (1997), A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts, Environ. Microbiol. 5(7): 555-65

Ingham, E., Cunningham, A. C. (1993), *Malassezia furfur*, J. Vet. Med. Mycol. 31: 265-288

Irlinger, B., Krämer, H.-J., Mayser, P., Steglich, W. (2004) Pityriarubine, biologisch aktive Bis(indolyl)spirane aus Kultuten der lipophilen Hefe *Malassezia furfur*, Angew. Chem. Int. Ed. 43: 1098-1100

Jung, E.G., Bohnert, E. (1976), Mechanism of depigmentation on pityriasis versicolor alba (Pva.), Derm. Res. 256: 333-334

Juvvadi, P. R., Seshime, Y., Kitamoto, K. (2005), Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid-flavonoid metabolic pathway in the f ilamentous fungus *Aspergillus oryzae*, J Microbiol. 43(6): 475-86

Kahmann, R., Romeis, T., Bölker, M., Kämper, J. (1995) Control of mating and Development in *Ustilago maydis*, Curr. Opin. Genet. Dev. 559-64

Kämper, J. (2003) Regulation der pathogenen Entwicklung bei dem Maisbrandpilz *Ustilago maydis*, Jahrbuch Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie

Kim, S. H., Kronstad, J. W.,Ellis, B. E. (2001) Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*, Phytochemistry 58: 849-857

Kistiakovsky, E. V. (1927), Pityriasis versicolor and ultraviolet rays, Arch. Derm. Syph. 15: 685-689

Kojic, M., Kostrub, C.F., Buchmann, A.R.,. Holloman, W. K. (2002), BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*, Mol. Cell. 10(3): 683-91.

Kojic, M., Yang, H., Kostrub, C.F., Pavletich, N. P.,. Holloman, W. K. (2003), The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*, Mol. Cell. 12(4): 1043-9.

Kojic, M., Zhou, Q., Lisby, M,. Holloman, W. K. (2005), Brh2-Dss1 interplay enables properly controlled recombination in *Ustilago maydis*, Mol. Cell. Biol. 25(7): 2547-57

Krämer, H.-J., Kessler, D., Hipler, U. C., Irlinger, B., Hort, W., Bödeker, R. H., Steglich, W., Mayser, P. (2005), Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bisindolylmaleimide arcyriarubin A, Chembiochem. 6(12): 2290-7

Kwon-Chung, K. J., Bennett, J. E. (1992), Med. Mycol., Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 170-182

Lacaz, Cda. S., Heins-Vaccari, E. M., De Melo, N. T., Hernandez-Arriagada, G. L. (1996), Basidiomycosis: a review of the literature, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 38(5): 379-90

Lewis, G. M., Hopper, M.E. (1936), Pseudo-Achromia of Tinea versicolor, Arch. Derm. Syph. 34: 850-861

Lutz, A. (1892), Korrespondenz, Honolulu, September 1891, MH. Prakt. Dermatol. 14: 152-155

Maresca, V., Flori, E., Briganti, S., Camera, E., Cario-Andre, M., Taieb, A., Picardo, M. (2006), UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype, J. Invest. Dermatol.126(1): 182-90

Masuhr, K. F., Neumann, M.: Neurologie, 5. Auflage, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (2005)

Mayser, P., Imkampe,A., Winkeler M., Papavassilis, C. (1998) Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*, Arch Dermatol Res. 290(5): 277-82

Mayser, P., Pape, B. (1998) Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophane derivatives. Antonie van Leeuwenhoek 73, 315-319

Mayser, P., Schäfer, U., Krämer, H.-J., Irlinger, B, Steglich, W. (2002) Pityriacitrin - a ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. Arch. Dermatol. Res. 294, 131-134

Mayser, P., Scheurer, C., Papavassilis, C., Gründer, K. (1996), Hydrolase activity of 150 *Malassezia furfur* isolates of different clinical origin, Mycoses 39(5-6): 225-31

Mayser, P., Stapelkamp, H., Krämer, H. J., Podobinska, M., Wallbott, W., Irlinger, B., Steglich, W. (2003), Pityrialactone- a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*, Antonie Van Leeuwenhoek 84(3):185-91

Minimikawa, T., Uritani, I. (1965), Phenylalanine ammonia-lyase in sweet potato roots: inhibition by phenylpropanoids, J. Biochem. (Tokyo) 58(1): 53-9

Pape, B. (2001), Abnehmende UV-Licht Sensibilität des *Malassezia furfur* bei Synthese von Pigmenten aus Tryptophan, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen

Nakagi, K., Hata, K., Iwata, E., Takeo, K. (2000), *Malassezia pachydermatis* isolated from a South American sea lion (Otaria byronia) with dermatitis, J. Vet Med Sci. 2000 62(8): 901-3

Nardoni, S., Mancianti, F., Corazza, M., Rum, A. (2004), Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs, Mycopathologia 157(4): 383-8

Nardoni, S., Mancianti, F., Rum, A., Corazza, M. (2005), Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis, J. Feline Med. Surg. 7(3): 141-5

Olson, S.: Herkunft und Geschichte des Menschen – Was die Gene über unsere Vergangenheit verraten, Deutsche Ausgabe, Berlin Verlag, Berlin (2003)

Patel, R., Roberts, G. D., Kelly, D. G., Walker, R. C. (1995) Central venous catheter infection due to *Ustilago* species, Clin. Infect. Dis. 21: 1043-1044

Pflug, H. D.: Umweltgeschichte der Erde – Die Zukunft im Spiegel der Vergangenheit, Shaker Verlag, Aachen (2004)

Prell, H.: Interaktion von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen, Gustav Fischer Verlag, Jena (1996)

Rao, P. V., Moore, K., Towers, G. H. (1967), Degradation of aromatic amino acids by fungi. II. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago hordei*, Can. J. Biochem. 45(12): 1863-72

Rassner, G.: Dermatologie Lehrbuch und Atlas, 7. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Jena (2002)

Reichmann, M.(2002) Isolierung und Analyse haploider *Ustilago maydis* Stämme, die ein *b*-abhängiges Expressionsmuster zeigen, Dissertation, Ludwig-Maximilans-Universität München

Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N, Schmid, J. (1997), Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity, Plant. Physiol. 113(1): 175-9

Roth, S., Kristo,P., Auranen, A., Shayehgi, M., Seal, S., Collins, N., Barfoot, R., Rahman, N., Klemi, P. J., Grenman, S., Sarantaus, L., Nevanlinna, H., Butzow, R., Ashworth, A., Stratton,

M. R., Aaltonen, L. A. (1998), A missense mutation in the BRCA2 gene in three siblings with ovarian cancer, Br. J. Cancer. 77(8): 1199-202

Ruete, A. E. (1933), Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor, Derm. Wochenschrift 96: 333-336

Sies, H., Stahl, W. (2004), Carotenoids and UV protection, Photochem. Photobiol. Sci. 3(8): 749-52

Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H., Tronnier, H (2000), Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans, Am. J. Clin. Nutr. 71(3): 795-8

Stahl, W., Heinrich, U., Wiseman, S., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H. (2001), Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans, J. Nutr. 131(5): 1449-51

Stahl, W., Krutmann, J. (2006), Systemic photoprotection through carotenoids, Hautarzt 2006 Feb 4

Stahl, W., Sies, H. (2002), Carotenoids and protection against solar UV radiation, Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol15(5): 291-6

Stapelkamp, H. (2003) Fluoreszierende Metaboliten im Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur*, Dissertation Justus-Liebig-Universität Giessen

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

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

Taylor, B. E., Wheeler, M. H., Szaniszlo, P. J. (1987), Evidence for a pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi, Mycologia 79: 320-322

Thody, A. J., Higgins, E. M., Wakamatsu, K, Ito, S., Burchill, S. A., Marks, J. M. (1991), Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis, J. Invest. Dermatol. 97(2): 340-4

Torres, A., Hochberg, M., Pergament, I., Smoum, R., Niddam, V., Dembitsky, V. M., Temina, M., Dor, I., Lev, O., Srebnik, M., Enk, C. D. (2004), A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*, Eur. J. Biochem. 271(4): 780-4

Wang, Y., Casadevall, A.: Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV-light, Appl. Environ. Microbiol. 60: 3864-3866

Wille, G., Mayser, P., Thoma, W., Monsees, T., Baumgart, A., Schmitz, H. J., Schrenk, D, Polborn, K., Steglich, W. (2001), Malassezin--A novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, Bioorg. Med. Chem. 9(4): 955-60

Wood, J. M., Schallreuter, K. U. (2006), UVA-irradiated pheomelanin alters the structure of catalase and decreases its activity in human skin, J.Invest. Dermatol.126(1):13-4

Wroblewski, N., Bar, S., Mayser, P. (2005), Missing granulocytic infiltrate in pityriasis versicolor--indication of specific anti-inflammatory activity of the pathogen?, Mycoses. 48 Suppl 1:66-71

Zitzler, J. (2004), Oxidativer Stress- assoziierter neuronaler Zelltod und die Identifikation neuroprotektiver Gene durch ein neuartiges Screening-System**,** Dissertation, Ludwig-Maximilans-Universität München

9 ANHANG

9.1 Dünnschichtchromatographie *U. maydis* Fraktionen 2-6

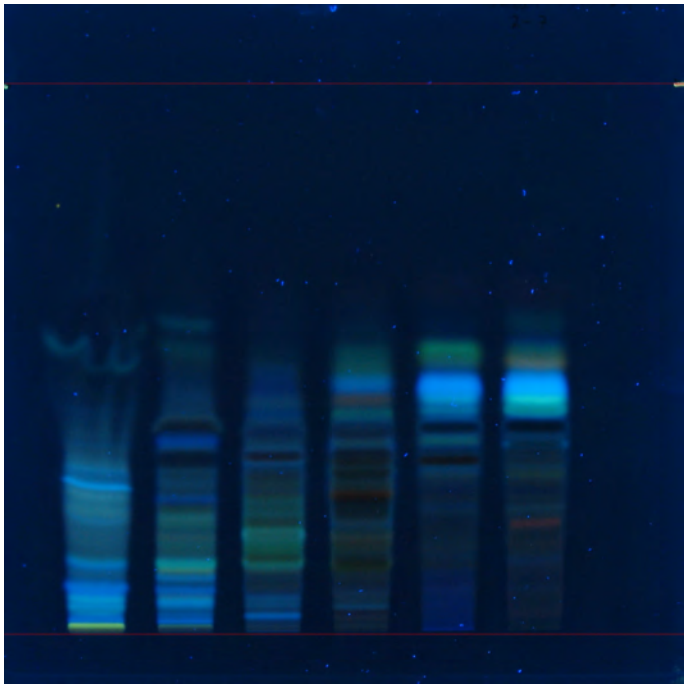


Abb. 32: *U. maydis Fraktionen 2-6 im UV-Licht (366 nm)*

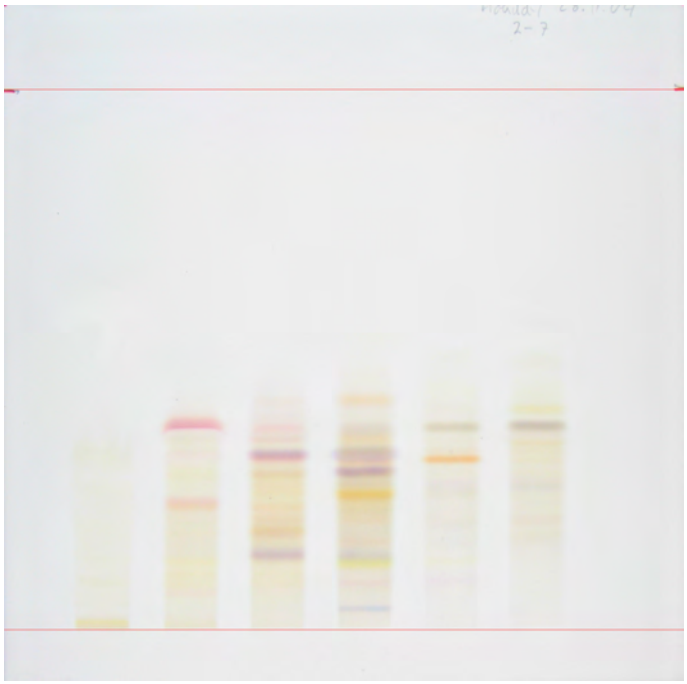


Abb. 33: *U. maydis Fraktionen 2-6 nach Ansäuerung im sichtbaren Licht*

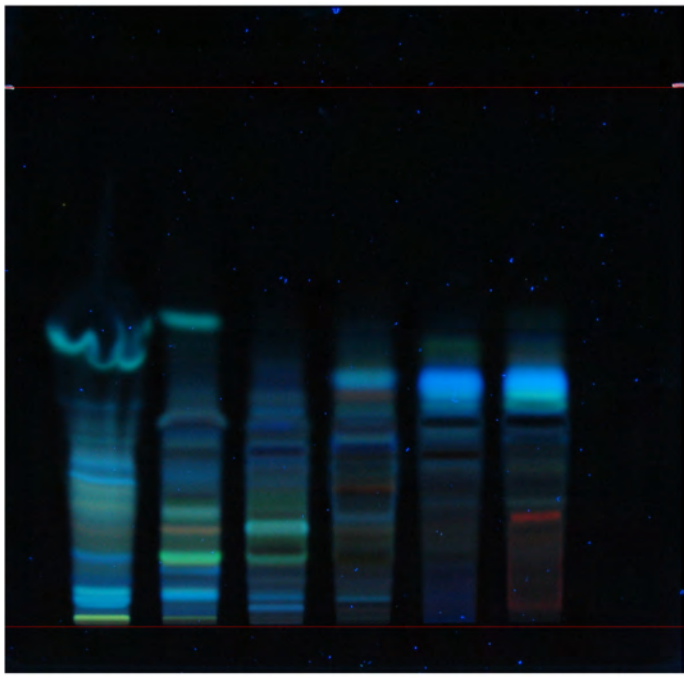


Abb. 34: *U. maydis Fraktionen 2-6 nach Ansäuerung im UV-Licht (254 nm)*

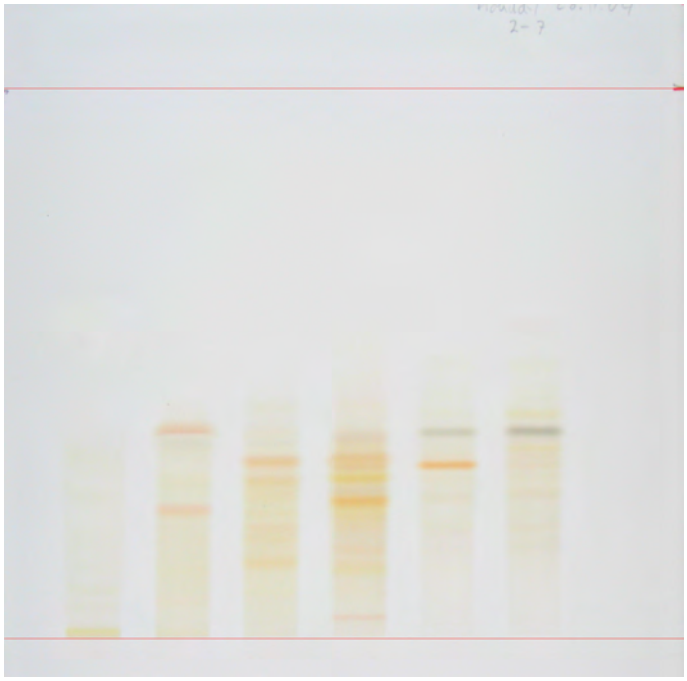


Abb. 35: *U. maydis Fraktionen 2-6 nach Alkalisierung im sichtbaren Licht*

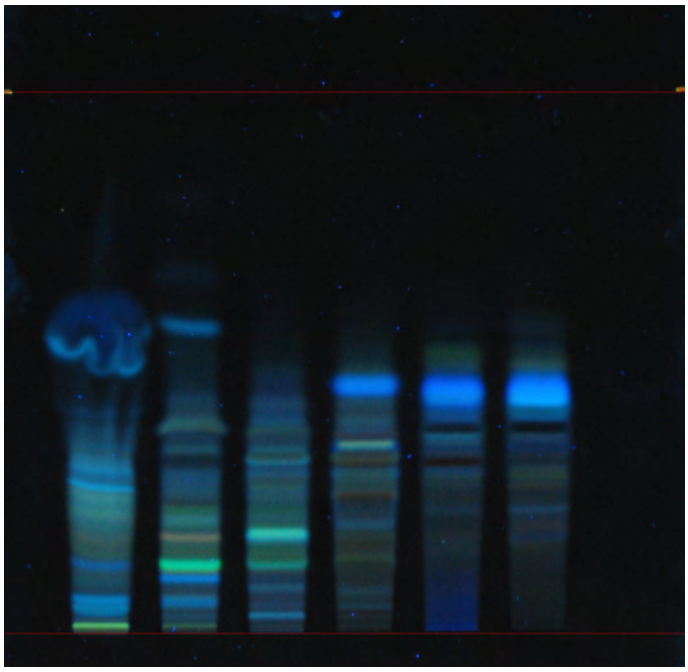


Abb. 36: *U. maydis Fraktionen 2-6 nach Alkalisierung im UV-Licht (254 nm)*

9.2 Dünnschichtchromatographie *UV31* Fraktionen 1-2

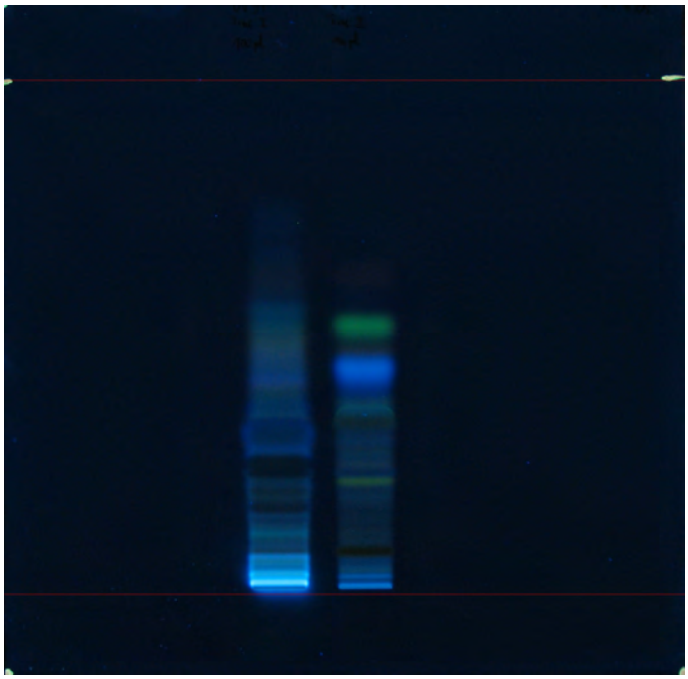


Abb. 37: *UV31 Fraktionen 1 und 2 im UV-Licht (366 nm)*

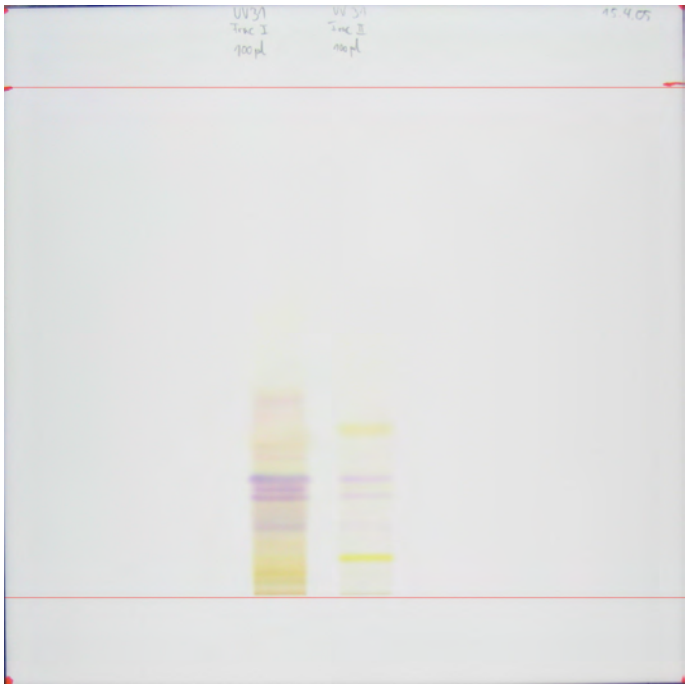


Abb. 38: *UV31 Fraktionen 1-2 nach Ansäuerung im sichtbaren Licht*

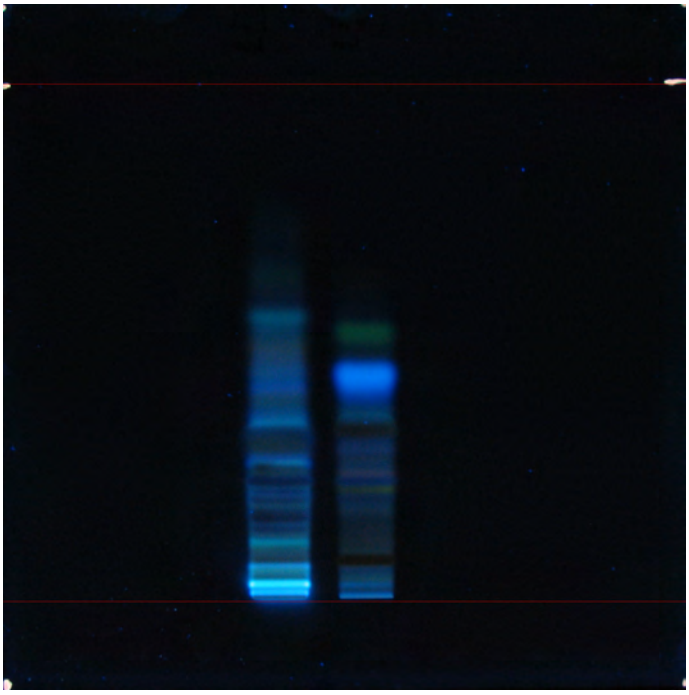


Abb. 39: *UV31 Fraktionen 1-2 nach Ansäuerung im UV-Licht (254 nm)*

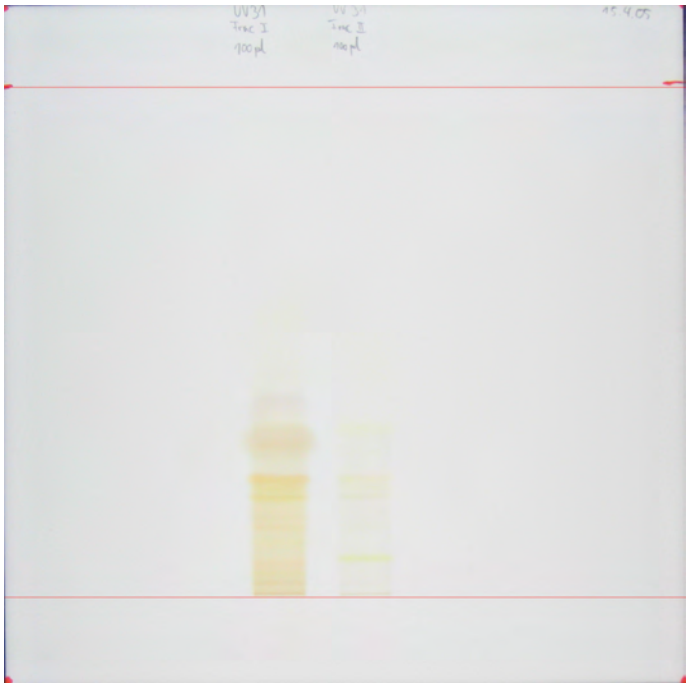


Abb. 40: *UV31 Fraktionen 1-2 nach Alkalisierung im sichtbaren Licht*

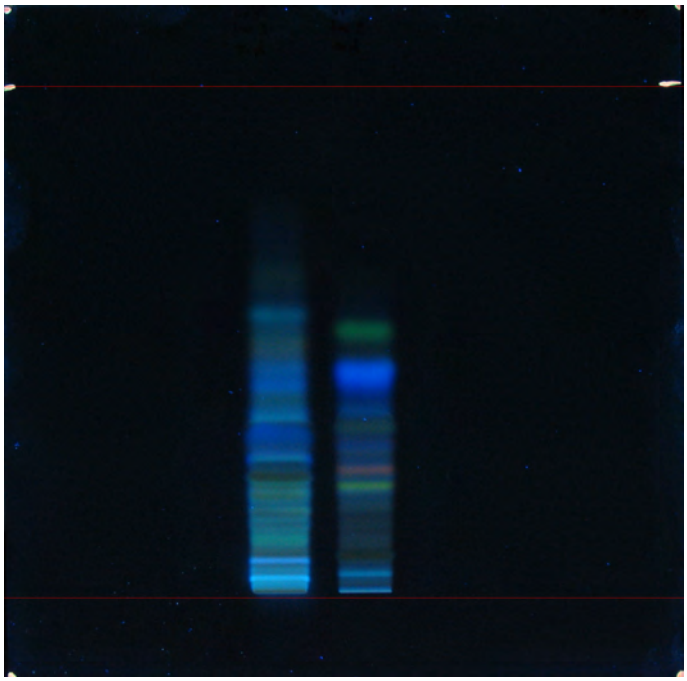


Abb. 41: *UV31 Fraktionen 1-2 nach Alkalisierung im UV-Licht (254 nm)*

9.3 Dünnschichtchromatographie *UV31* Fraktionen 1-2 vs. *U. maydis* Fraktionen 1-3

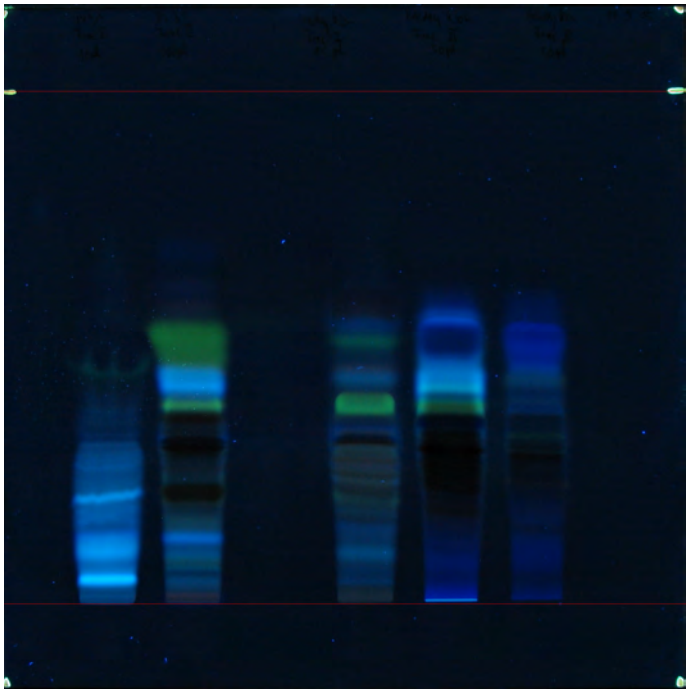


Abb. 42: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Ustilago maydis Klon Fraktionen 1-3 im UV-Licht (366 nm)*

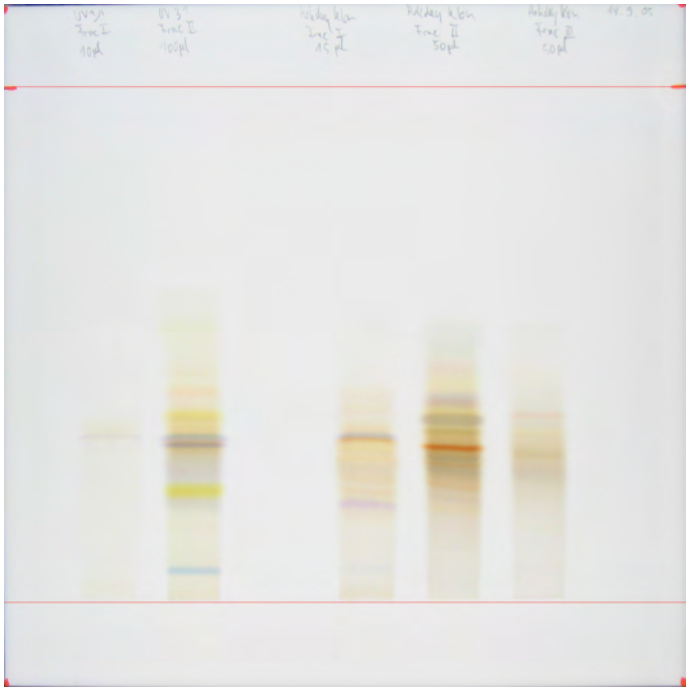


Abb. 43: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Ustilago maydis Klon Fraktionen 1-3 nach Ansäuerung im sichtbaren Licht*

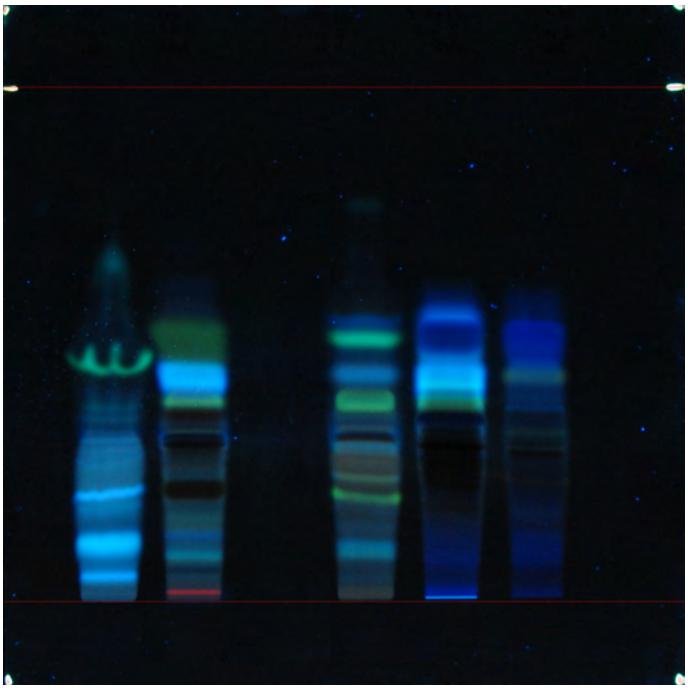


Abb. 44: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Ustilago maydis Klon Fraktionen 1-3 nach Ansäuerung im UV-Licht (254 nm)*

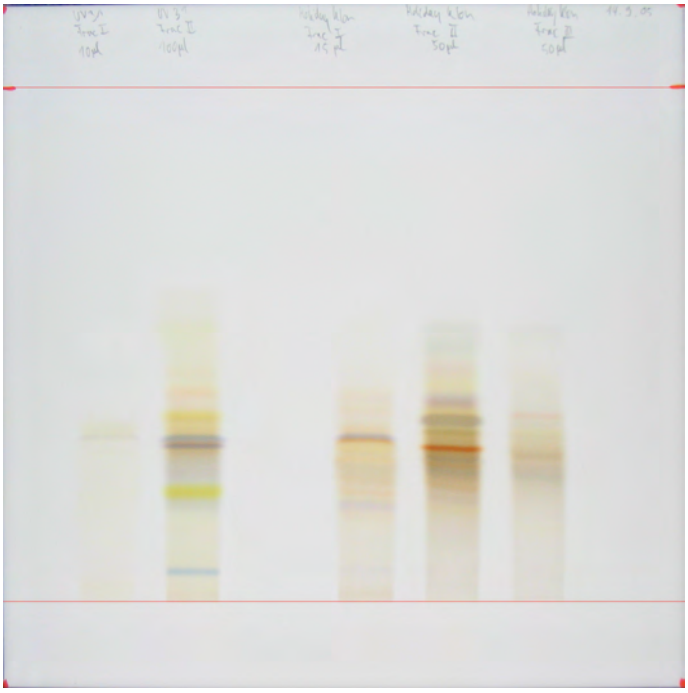


Abb. 45: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Ustilago maydis Klon Fraktionen 1-3 nach Alkalisierung im sichtbaren Licht*

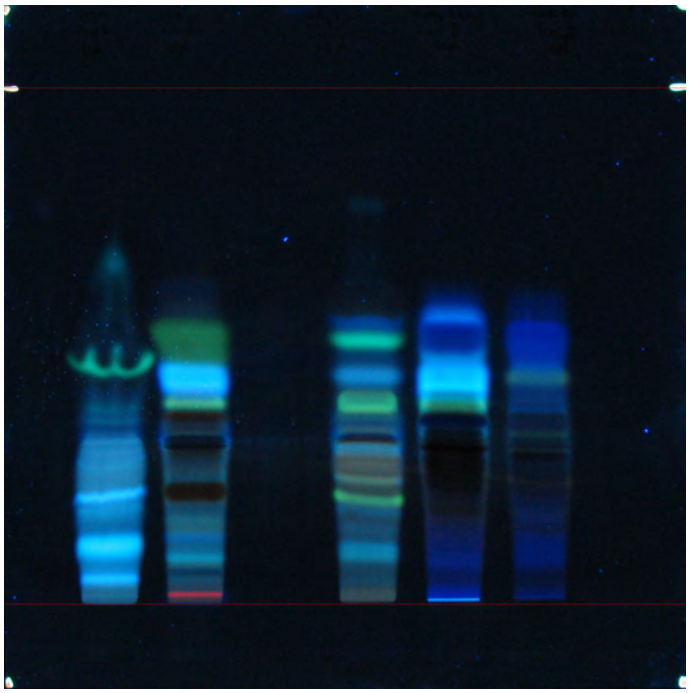


Abb. 46: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Ustilago maydis Klon 1-3 nach Alkalisierung im UV-Licht (254 nm)*

9.4 Dünnschichtchromatographie *UV31* Fraktionen 1-2 vs. Standards

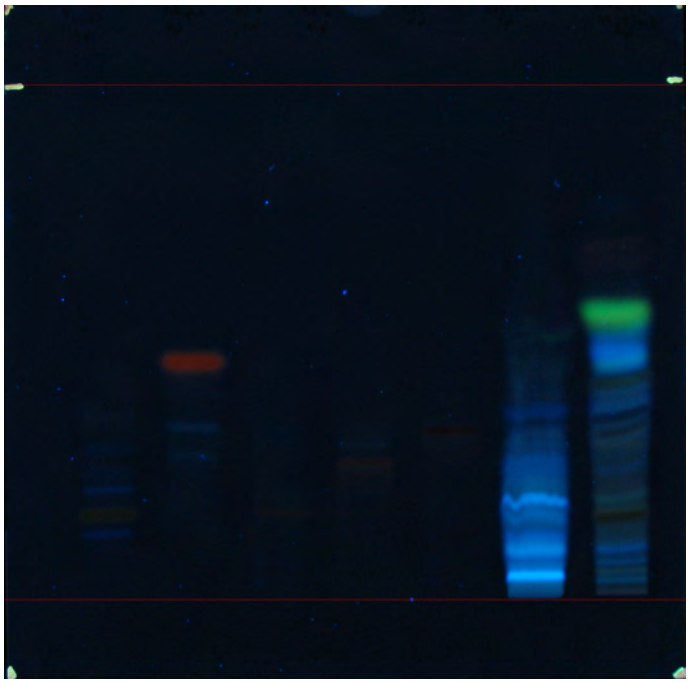


Abb. 47: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Standards im UV-Licht (366 nm)*

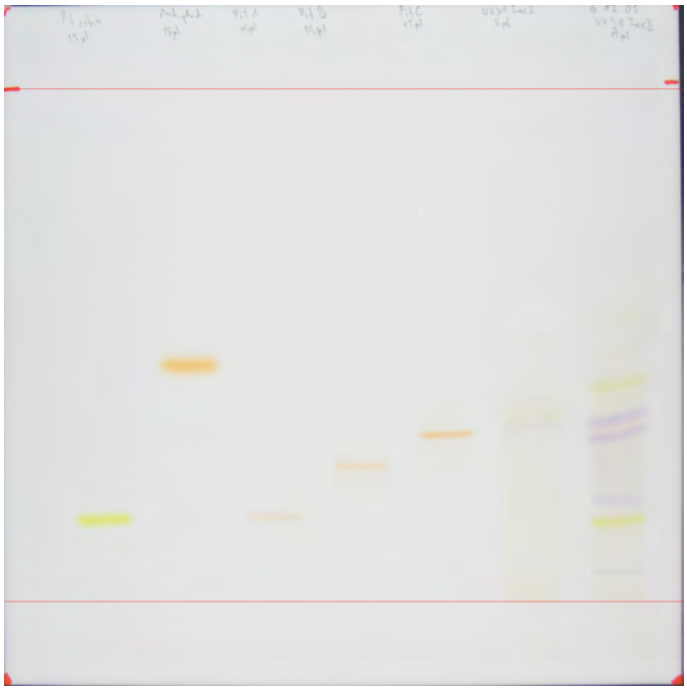


Abb. 48: *UV31Fraktionen 1-2 vs. Standards nach Ansäuerung im sichtbaren Licht*

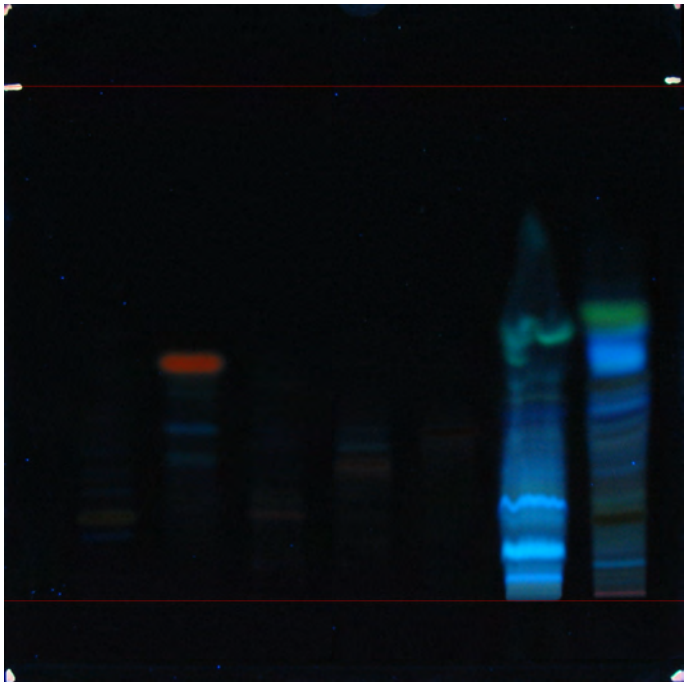


Abb. 49: *UV31Fraktionen 1-2 vs. Standards nach Ansäuerung im UV-Licht (254 nm)*

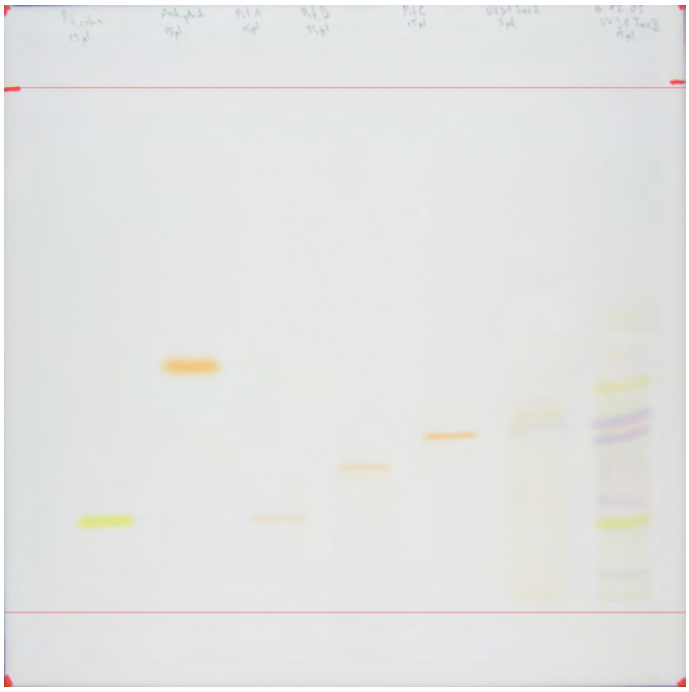


Abb. 50: *UV31Fraktionen 1-2 vs. Standards nach Alkalisierung im sichtbaren Licht*

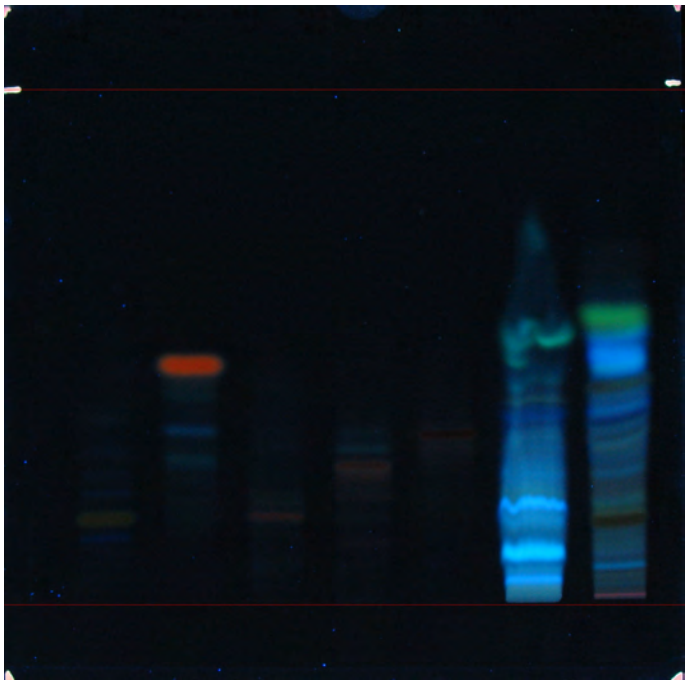


Abb. 51: *UV31 Fraktionen 1-2 vs. Standards nach Alkalisierung im sichtbaren Licht*

9.5 Tabellen Bestrahlungsversuche

	keine Bestrahlung	UVA (J/cm²)		UVB (mJ/cm²)		
		100	200	500	1000	2000
ARG 1 (mg)	6,09	1,53	0	1,74	0	0
ARG 2 (mg)	5,63	1,61	0	1,27	0	0
ARG 3 (mg)	5,14	1,21	0	1,42	0	0
Mittelwert ARG (mg)	5,62	1,45	0	1,48	0	0
Mittelwert ARG (10^6 Zellen)	464,46	119,83	0	122,04	0	0
TRP 1 (mg)	5,78	5,33	0	4,74	0,97	0
TRP 2 (mg)	6,54	5,72	0	4,40	0,59	0
TRP 3 (mg)	6,79	4,79	0	3,54	0,31	0
Mittelwert TRP (mg)	6,37	5,28	0	4,23	0,62	0
Mittelwert TRP (10^6 Zellen)	522,13	432,79	0	346,45	51,09	0
ARG 1 (%)	100	25,1	0	28,6	0	0
ARG 2 (%)	100	28,6	0	22,6	0	0
ARG 3 (%)	100	23,5	0	27,6	0	0
Mittelwert ARG (%)	100	25,8	0	26,3	0	0
TRP 1 (%)	100	92,2	0	82,0	16,8	0
TRP 2 (%)	100	87,5	0	67,3	9,0	0
TRP 3 (%)	100	70,5	0	52,1	4,6	0
Mittelwert TRP (%)	100	83,4	0	67,1	10,1	0

Tab. 16: *Bestrahlungsversuch 1*

	keine Bestrahlung	UVA (J/cm²)		UVB (mJ/cm²)		
		100	200	500	1000	2000
ARG 1 (mg)	3,81	1,26	0	1,15	0	0
ARG 2 (mg)	4,01	1,06	0	0,94	0	0
ARG 3 (mg)	3,80	1,89	0	0,81	0	0
Mittelwert ARG (mg)	3,87	1,40	0	0,97	0	0
Mittelwert ARG (10^6 Zellen)	320,11	115,98	0	79,89	0	0
TRP 1 (mg)	5,10	5,38	0	4,39	1,27	0
TRP 2 (mg)	5,06	5,31	0	4,53	0,82	0
TRP 3 (mg)	5,55	4,60	0	4,36	0	0
Mittelwert TRP (mg)	5,24	5,10	0	4,43	0,70	0
Mittelwert TRP (10^6 Zellen)	429,23	417,76	0	362,84	57,10	0
ARG 1 (%)	100	33,1	0	30,2	0	0
ARG 2 (%)	100	26,4	0	23,4	0	0
ARG 3 (%)	100	49,7	0	21,3	0	0
Mittelwert ARG (%)	100	36,4	0	25,0	0	0
TRP 1 (%)	100	105,5	0	86,1	24,9	0
TRP 2 (%)	100	104,9	0	89,5	16,2	0
TRP 3 (%)	100	82,9	0	78,6	0	0
Mittelwert TRP (%)	100	97,8	0	84,7	13,7	0

Tab. 17: *Bestrahlungsversuch 2*

	keine Bestrahlung	UVA (J/cm²)		UVB (mJ/cm²)		
		100	200	500	1000	2000
ARG 1 (mg)	4,19	2,57	0	1,24	0	0
ARG 2 (mg)	4,43	2,17	0	1,51	0	0
ARG 3 (mg)	3,98	1,77	0	1,43	0	0
Mittelwert ARG (mg)	4,20	2,17	0	1,39	0	0
Mittelwert ARG (10^6 Zellen)	347,11	179,34	0	115,15	0	0
TRP 1 (mg)	4,22	5,67	1,47	3,86	0,90	0
TRP 2 (mg)	4,70	5,91	0,75	3,81	0,90	0
TRP 3 (mg)	4,21	5,40	0,51	3,41	1,23	0
Mittelwert TRP (mg)	4,38	5,66	0,91	3,69	1,01	0
Mittelwert TRP (10^6 Zellen)	358,74	463,93	74,59	302,73	82,79	0
ARG 1 (%)	100	61,3	0	29,6	0	0
ARG 2 (%)	100	49,0	0	34,1	0	0
ARG 3 (%)	100	44,5	0	35,9	0	0
Mittelwert ARG (%)	100	51,6	0	33,2	0	0
TRP 1 (%)	100	134,4	34,8	91,5	21,3	0
TRP 2 (%)	100	125,7	16,0	81,1	19,1	0
TRP 3 (%)	100	128,3	12,1	81,0	29,2	0
Mittelwert TRP (%)	100	129,5	21,0	84,5	23,2	0

Tab. 18: *Bestrahlungsversuch 3*

	keine Bestrahlung	UVA (J/cm²)		UVB (mJ/cm²)		
		100	200	500	1000	2000
ARG 1 (mg)	2,95	1,48	0	0,54	0	0
ARG 2 (mg)	2,63	1,70	0	0,77	0	0
ARG 3 (mg)	2,69	1,52	0	0,70	0	0
Mittelwert ARG (mg)	2,76	1,57	0	0,67	0	0
Mittelwert ARG (10^6 Zellen)	227,82	129,48	0	55,37	0	0
TRP 1 (mg)	3,62	2,40	0	2	0,24	0
TRP 2 (mg)	3,91	2,22	0	1,89	0,20	0
TRP 3 (mg)	3,62	2,02	0	1,95	0,10	0
Mittelwert TRP (mg)	3,72	2,21	0	1,95	0,18	0
Mittelwert TRP (10^6 Zellen)	304,64	181,42	0	159,56	14,75	0
ARG 1 (%)	100	50,2	0	18,3	0	0
ARG 2 (%)	100	64,6	0	29,3	0	0
ARG 3 (%)	100	56,5	0	26,0	0	0
Mittelwert ARG (%)	100	57,1	0	24,5	0	0
TRP 1 (%)	100	66,3	0	55,2	6,6	0
TRP 2 (%)	100	56,8	0	48,3	5,1	0
TRP 3 (%)	100	55,8	0	53,9	2,8	0
Mittelwert TRP (%)	100	59,6	0	52,5	4,8	0

Tab. 19: *Bestrahlungsversuch 4*

	keine Bestrahlung	UVA (J/cm²)		UVB (mJ/cm²)		
		100	200	500	1000	2000
ARG 1 (mg)	3,78	2,65	0	1,61	0	0
ARG 2 (mg)	4,64	2,74	0	1,48	0	0
ARG 3 (mg)	4,58	2,68	0	1,35	0	0
Mittelwert ARG (mg)	4,3	2,69	0	1,48	0	0
Mittelwert ARG (10^6 Zellen)	358,13	222,31	0	122,31	0	0
TRP 1 (mg)	4,84	2,99	0,07	2,66	0,72	0
TRP 2 (mg)	4,46	3,13	0	2,91	0,60	0
TRP 3 (mg)	4,49	2,76	0	2,65	0	0
Mittelwert TRP (mg)	4,60	2,96	0,02	2,74	0,44	0
Mittelwert TRP (10^6 Zellen)	376,78	242,62	1,91	224,59	36,07	0
ARG 1 (%)	100	70,1	0	42,6	0	0
ARG 2 (%)	100	59,1	0	31,9	0	0
ARG 3 (%)	100	58,5	0	29,5	0	0
Mittelwert ARG (%)	100	62,6	0	34,7	0	0
TRP 1 (%)	100	61,8	1,4	55,0	14,9	0
TRP 2 (%)	100	70,2	0	65,2	13,5	0
TRP 3 (%)	100	61,5	0	59,0	0	0
Mittelwert TRP (%)	100	64,5	0	59,7	9,4	0

Tab. 20: *Bestrahlungsversuch 5*

	keine Bestrahlung	UVA (J/cm²)		UVB (mJ/cm²)		
		100	200	500	1000	2000
ARG 1 (mg)	3,87	2,41	0	1,58	0	0
ARG 2 (mg)	3,96	2,88	0	1,31	0	0
ARG 3 (mg)	4,14	3,29	0	1,74	0	0
Mittelwert ARG (mg)	3,99	2,86	0	1,54	0	0
Mittelwert ARG (10^6 Zellen)	329,75	236,36	0	127,55	0	0
TRP 1 (mg)	3,98	2,92	0	2,83	1,02	0
TRP 2 (mg)	4,96	3,20	0	2,70	0,66	0
TRP 3 (mg)	4,61	2,94	0	2,79	1	0
Mittelwert TRP (mg)	4,52	3,02	0	2,77	0,89	0
Mittelwert TRP (10^6 Zellen)	370,22	247,54	0	227,32	73,22	0
ARG 1 (%)	100	62,3	0	40,8	0	0
ARG 2 (%)	100	72,7	0	33,1	0	0
ARG 3 (%)	100	79,5	0	42,0	0	0
Mittelwert ARG (%)	100	71,5	0	38,6	0	0
TRP 1 (%)	100	73,4	0	71,1	25,6	0
TRP 2 (%)	100	64,5	0	54,4	13,3	0
TRP 3 (%)	100	63,8	0	60,5	21,7	0
Mittelwert TRP (%)	100	67,2	0	62,0	20,2	0

Tab. 21: *Bestrahlungsversuch 6*

10 ERKLÄRUNG

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 unveröffentlichten 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, eingehalten.

Philipp Ernst Schering, Gießen 2007

11 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. med. Peter Mayser, der mir die Durchführung dieser Arbeit im Zentrum für Dermatologie und Andrologie ermöglichte. Dabei stand er einem jederzeit hilfreich mit Rat und Tat zur Seite. Auch hatte er stets ein offenes Ohr für neue Anregungen oder Probleme sowie aufmunternde Worte oder einen guten Spruch für jeden Doktorranden übrig und trug so in wesentlichen Maße zum guten Klima im Labor bei.

Auch Dr. med. Hans-Joachim Krämer, der sich ebenfalls immer sehr hilfsbereit und aufmunternd zeigte, gilt ein großer Dank. Auch er war jederzeit als Ansprechpartner zu erreichen und war durch sein Engagement, speziell bei der Durchführung der HPLC, bei der Erstellung dieser Arbeit eine große Hilfe.

Desweiteren möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern in München (Ludwig-Maximilians-Universität) und Marburg (Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie) bedanken. Zum einen bei der Arbeitsgruppe von Dr. Spiteller (München) für die Strukturaufklärung der gewonnenen Substanzen, zum anderen bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kahmann (Marburg) für die Bereitstellung der Mutanten *UV 31, UV 33, UV 36, UV 310, UV 312* und *UV 333*.

Ein besonderer Dank geht an meine Freundin April, ohne deren Unterstützung ich diese Arbeit nicht hätte erstellen können. Sie gab mir immer wieder den nötigen Antrieb und zeigte mir auch, wann es mal wieder Zeit für eine Pause war. Auch hätte ich ohne ihre Hilfe wohl nie die ganzen Funktionen von Microsoft Word und Excel verstanden. Thank you very much for your help April, it is highly appreciated.

Auch allen anderen Doktoranden sei hiermit gedankt. Mit ihnen war es nie langweilig im Labor, es herrschte stets eine angenehme Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Hilfe machte vieles leichter. Speziell bei Peter und Maja, mit denen ich die meiste Zeit im Labor verbracht habe, möchte ich mich nochmals bedanken. Ich möchte die Zeit mit euch nicht missen und bin froh solche Freunde zu haben.

Für die gute und freundliche Unterstützung sei auch Frau Ursula Förste gedankt. Sie brachte einem nicht nur vielerlei Handgriffe bei, sondern konnte einem mit guten Tipps oft weiterhelfen.

Ein weiterer Dank ist an Frau Dr. med. Heike Voss gerichtet, die mir die Durchführung der Bestrahlungsversuche näherbrachte.

Last but not least sei auch meinen Eltern für die mentale und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums gedankt.

12 LEBENSLAUF

Persönliche Information

Name: Philipp Ernst Schering
Geburtsdatum: 30.06.1979
Geburtsort: Buchholz in der Nordheide
Nationalität: Deutsch
Sprachen: Deutsch, Englisch, Französisch

Schulausbildung

1986 – 1990 Grundschule Am Burgfeld, Bad Berleburg
1990 – 1992 Johannes-Althusius-Gymnasium, Bad Berleburg
1992 – 1999 Gymnasium-Schloss-Wittgenstein, Bad Laasphe
01. Juni 1999 Abitur

Ersatzdienst

1999 – 2000 Herz-Kreislauf-Klinik, Bad Berleburg

Studium

2000 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Giessen:

- Ärztliche Vorprüfung: 02.09.2002
- Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 28.08.2003
- Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 06.09.2005
- Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 21.11.2006

10/2005 – 09/2006 Praktisches Jahr:

- 1. Tertial: Pädiatrie an der Universitätskinderklinik der JLU Giessen
- 2. Tertial: Innere Medizin am Klinikum Wetzlar
- 3. Tertial: Chirurgie: Unfallchirurgie am Klinikum Wetzlar und Allgemeinchirurgie am Changi General Hospital, Singapur

Beruflicher Werdegang

Seit dem 01.03.2007 DRK Klinikum Westerwald, Krankenhaus Kirchen, Pädiatrie

Promotion

04/2004 – 04/2006 Experimenteller Teil im mykologischen Labor des Zentrums für Dermatologie und Andrologie (Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. P. Mayser) des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Giessen