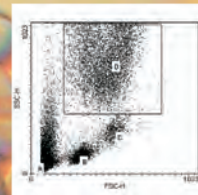
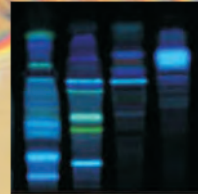
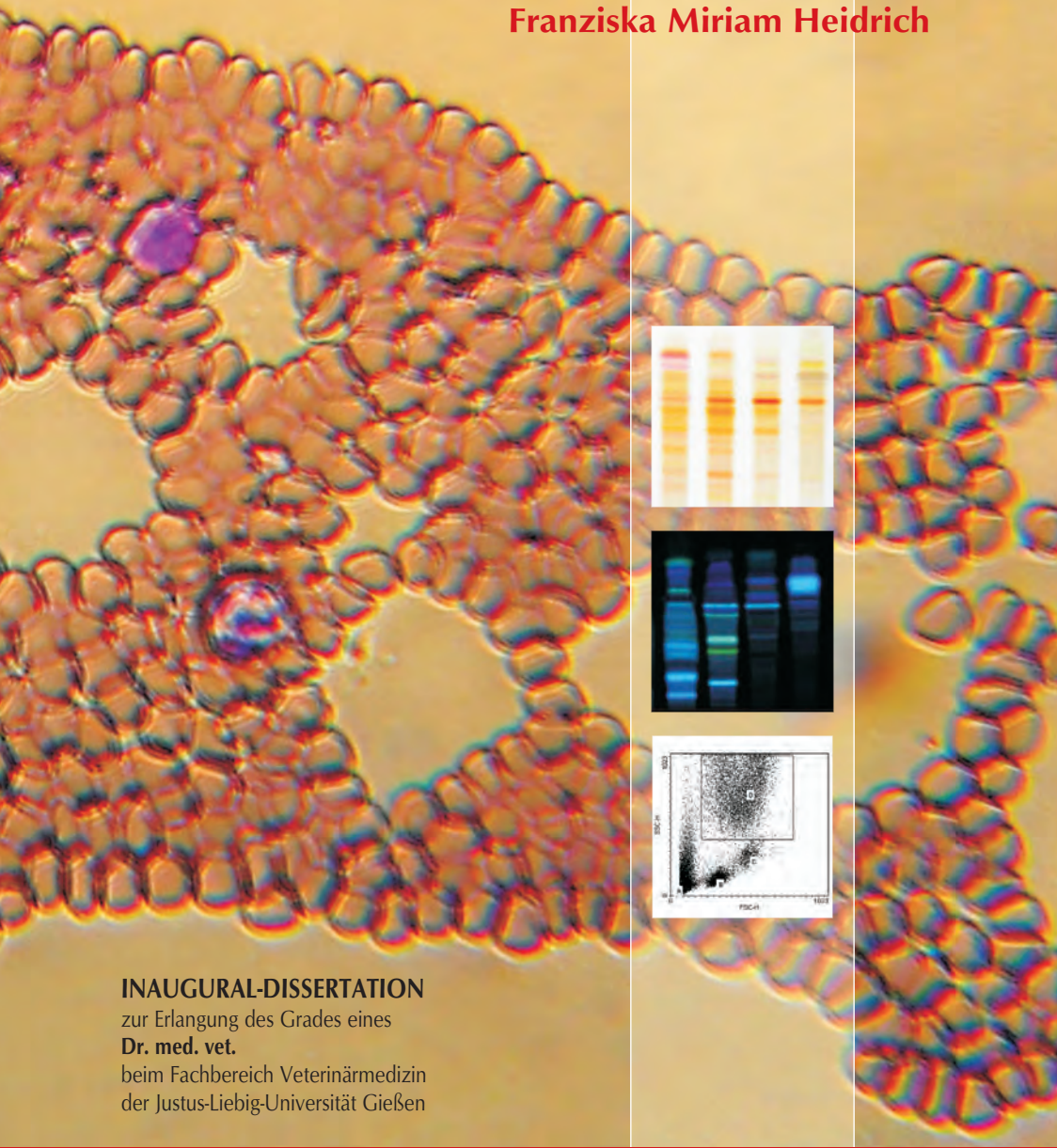


Pigmentsynthese bei *Exophiala dermatitidis*: Einfluss auf Phagozytose und Oxidative Burst

Franziska Miriam Heidrich



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
und der
Klinik für Dermatologie und Andrologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. P. Mayser

**Pigmentsynthese bei *Exophiala dermatitidis*:
Einfluss auf Phagozytose und Oxidative Burst**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Franziska Miriam Heidrich

Tierärztin aus Gießen

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus- Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
Prof. Dr. Dr. habil. P. Mayser

Tag der Disputation: 12.05.2010

Für meine Familie

Erklärung

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

Bad Arolsen, den 09.02.2010

Franziska Miriam Heidrich

Abkürzungsverzeichnis

A23187	Calcimycin
ATCC	American Type Culture Collection
BCECF-AM	Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceinacetoxymethylester
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, the Netherlands)
CD	cluster of differentiation
CF	Cystic Fibrosis (Mukoviszidose)
DHN	Dihydroxynaphtalen
DMSO	Dimethylsulfoxid
FL-1	Fluoreszenz-1, Emissionsmaximum 525 nm
FL-2	Fluoreszenz-2, Emissionsmaximum 578 nm
FL-3	Fluoreszenz-3, Emissionsmaximum 680 nm
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Vorwärtsstreulicht
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	high liquid performance chromatography
IL-3	Interleukin-3
Mel	Mutationen im Melaninsyntheseweg
MHC	major histocompatibility complex
MOPS	N-Morpholino-Propansulfonsäure
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
P	Abkürzung für Stamm aus der Stammsammlung Prof. Haase

	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Aachen
PE	Phycoerythrin
PKS	Polyketid-Synthase
Rf-Wert	Verhältnis von Substanzlaufstrecke zur Laufstrecke des Fließmittels
ROS	reactive oxygen species
SSC	Seitwärtsstreulicht
UV	Ultraviolettes Licht
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Exophiala dermatitidis.....	1
1.1.1	Taxonomie.....	1
1.1.2	Vorkommen.....	2
1.2	Pigmente.....	5
1.2.1	Definition und Funktion.....	5
1.2.2	Tryptophanpigmente und Melanin.....	6
1.3	Immunologie.....	7
1.3.1	Das Immunsystem.....	7
1.3.2	Angeborene oder unspezifische Abwehr.....	7
1.3.3	Adaptive oder spezifische Abwehr.....	9
1.3.4	Ablauf einer Immunreaktion und Rolle des Oxidative Burst.....	10
2	Hintergrund und Fragestellung	12
3	Material und Methoden	15
3.1	Pigmentgewinnung.....	15
3.1.1	Verwendete Isolate von <i>Exophiala dermatitidis</i>	15
3.1.2	Kulturmedien.....	17
3.1.3	Gewinnung des Rohextraktes.....	18
3.1.4	Säulenchromatographie.....	19
3.1.5	Dünnschichtchromatographie.....	20
3.1.6	High Performance Liquid Chromatographie (HPLC).....	24
3.2	Oxidative Burst und Phagozytose.....	26
3.2.1	Verwendete Isolate.....	26
3.2.2	Anzucht und Kultur.....	26
3.2.3	Verwendete monoklonale Antikörper zur Identifizierung der neutrophilen Granulozyten im Durchflußzytometer.....	27
3.2.4	Gewinnung der Tryptophanpigmente zur Untersuchung der Auswirkung auf die Phagozytose und den Oxidative Burst.....	27
3.3	Oxidative Burst.....	29
3.3.1	Dihydrorhodamine 123.....	29

3.3.2	Versuchsaufbau Oxidative Burst.....	29
3.4	Phagozytose.....	30
3.4.1	Verwendetes Fluorochrom als Marker der Hefezellen für die Phagozytose- Messung.....	30
3.4.2	Versuchsaufbau Phagozytose.....	31
3.5	Durchflusszytometer	31
3.5.1	Physikalische Grundlagen.....	31
3.5.2	Prinzip des Durchflusszytometers.....	32
3.5.3	Messung im Durchflusszytometer.....	34
3.5.4	Auswertung	35
3.6	Statistische Auswertung	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Pigmentisolierung bei <i>Exophiala dermatitidis</i>	38
4.1.1	<i>Exophiala dermatitidis</i> Wildtyp (ATCC No.34100).....	38
4.1.2	<i>Exophiala dermatitidis</i> Mel-1 (ATCC No. 44502)	40
4.1.3	<i>Exophiala dermatitidis</i> Mel-3 (ATCC No. 44504)	41
4.2	Phagozytose.....	42
4.3	Vorversuche	43
4.4	Oxidative Burst	47
4.4.1	Einfluß der Melaninsynthese auf den Oxidative Burst	49
4.4.2	Einfluß von DMSO auf den Oxidative Burst.....	49
4.4.3	Einfluß der Tryptophan-abgeleiteten Pigmente von <i>E. dermatitidis</i> Mel-3 auf den Oxidative Burst.....	50
5	Diskussion.....	63
6	Zusammenfassung	73
7	Summary	75
8	Literaturverzeichnis.....	77
9	Danksagung.....	84

1 Einleitung

1.1 *Exophiala dermatitidis*

1.1.1 Taxonomie

Pilze werden als Eukaryonten definiert, die im Gegensatz zu Pflanzen und Algen kein Chlorophyll bilden. Man unterscheidet die niedrigen Pilze, wie die zellulosehaltigen Oomyzeten und die Myxomyzeten (Schleimpilze), von den höheren Pilzen (Mykologie für Mediziner 2003). Die Einteilung der chitinhaltigen höheren Pilze (Eumyzyten) erfolgt vor Allem anhand der Morphologie ihrer Sporenbildung. Diese erfolgt einerseits außen auf einem Basidium (Ständer) durch Abschnürung, andererseits innerhalb eines Schlauches (Ascus). Dementsprechend wird von Ascomyzyten (Schlauchpilzen) und Basidiomyzyten (Ständerpilzen) gesprochen.

Die Gattung *Exophiala* gehört innerhalb der Ascomyzyten zur Klasse der Euascomyzyten und ist hier der Ordnung der Chaetothyriales der Familie der Herpotrichiellaceae zugeordnet (Atlas of clinical fungi 2000). Ihre Vermehrung erfolgt entweder sexuell durch Sporenbildung oder asexuell durch die Ausbildung von Konidien.

Angehörige der Gattung *Exophiala* lassen sich außerdem aufgrund ihrer Melanin-einlagerungen in die Zellwand des Myzels und die Konidien, sowie ihrer molekularen Phylogenese den Schwärzepilzen zuordnen. Neben *Exophiala* gehören viele weitere potentiell pathogene Pilze, die den Ascomyzyten sowie den Basidiomyzyten zugeordnet werden, zu den Schwärzepilzen. Schwärzepilze sind dimorph wachsende Pilze mit der Fähigkeit zur Melaninsynthese. Sie können sowohl als Hefen wachsen, als auch Myzel ausbilden. Häufig sind in einer Kultur beide Wachstumsformen nebeneinander zu beobachten (Szaniszlo et al. 1993).

Des Weiteren gehören Schwärzepilze, von denen keine sexuellen Hauptfruchtformen, aber unterschiedliche sexuelle Nebenfruchtformen bekannt sind, zur Unterabteilung der Deuteromyzyten (Fungi imperfecti). Bei diesen sind lediglich vegetative Sporen (Konidien) zur Vermehrung beschrieben. Deuteromyzyten können anhand ihrer Konidiogenese in Coelomyzyten und Hyphomyzyten unterteilt werden. Während in Coelomyzyten die Konidien von koniogenen Zellen jeweils an einer bestimmten Stelle im Myzel gebildet werden, weist

die Konidienbildung bei Hyphomyzeten stets eine zufällige Verteilung auf. *Exophiala dermatitidis* gehört zu den Hyphomyzeten.

1.1.2 Vorkommen

Exophiala dermatitidis ist ein für Mensch und Tier potentiell pathogener Pilz, der entweder Infektionen der Haut verursachen kann, oder nach systemischer Ausbreitung einen ausgeprägten Neurotropismus aufweist. Meist kommt er allerdings als Saprophyt auf Holz, in der Erde und auf organischem Material vor.

Untersuchungen zur weltweiten Ausbreitung des Schwärzepilzes sind bislang nicht vorhanden, allerdings gibt es zahlreiche Fallberichte aus verschiedenen Ländern und Erdteilen zu Infektionen bei Mensch und Tier sowie zum Vorkommen des Pilzes in der Natur.

1.1.2.1 Umweltisolate

Dixon et al. (1980) konnte erstmals in einer Studie das Vorkommen von *E. dermatitidis* auf Hölzern und Pflanzen sowie in Bodenproben aus Virginia zeigen. Ziel war der Nachweis von Schwärzepilzen in der Natur. Die hohe Anzahl der positiven Proben belegt ein ubiquitäres Vorkommen des Pilzes in Virginia.

Der Boden im brasilianischen Regenwald bildet ein optimales Habitat für pathogene Pilze. Mok et al. (1984) untersuchten insgesamt 1949 Bodenproben aus dem gesamten Amazonasgebiet mittels Maus- Inokulationstechnik. Von diesen Bodenproben erwiesen sich 12% (n=243) als positiv. Bei 7 Isolaten handelte es sich um *Exophiala dermatitidis*.

In einer epidemiologischen Studie in einer Futter- und Samenhandlung in Nordamerika wurden Luft- und Bodenproben positiv auf *Exophiala dermatitidis* getestet (Espinel-Ingroff et al. 1982)

Weiterhin wurden in den USA aus Taiwan importierte, zum Verzehr bestimmte Pilze (*Auricularia polytrichia*) positiv auf *Exophiala dermatitidis* getestet. Somit gelang der erste Nachweis dieses Schwärzepilzes auf Lebensmitteln (Kazanas 1986).

Von Nishimura and Miyaji (1982) wurde der Pilz in Proben von Luftbefeuchtern und Bade- und Abwässern in Japan entdeckt, was die Erdteil-übergreifende Verbreitung von *E. dermatitidis* unterstreicht.

1.1.2.2 Isolate bei Tieren

In einer umfassenden Feldstudie im Amazonasgebiet wurden die Organe von 450 Fröschen und Kröten mykologisch untersucht. Obwohl die Organe weder makroskopische, noch histopathologische Veränderungen aufwiesen, konnten bei 54 der untersuchten Tiere insgesamt 105 verschiedene Pilzstämme nachgewiesen werden, darunter auch *Exophiala dermatitidis* (Mok and Morato de 1985).

Bei klinisch gesunden Fledermäusen aus dem Amazonasgebiet in Brasilien konnte bei der mykologischen Untersuchung der inneren Organe *E. dermatitidis* isoliert werden (Reis und Mok 1979). In einer weiteren Studie wurde *E. dermatitidis* in der Leber von Fledermäusen gefunden. Das Isolat erwies sich nach subkutaner, intravenöser und intraperitonealer Injektion als pathogen für Labormäuse, nach intravenöser Injektion zeigte sich ein ausgeprägter Neurotropismus des Stammes (Muotoe-Okafor and Gugnani 1993).

Schließlich stammt aus Japan die erstmalige Beschreibung einer Sekundärinfektion mit *E. dermatitidis* bei einem an malignem Lymphom erkrankten Hund. Das Krankheitsbild war durch subkutane, schwarze Noduli im Bereich des Halses charakterisiert (Kano et al. 2000).

In einer Studie aus Texas konnten Wolf et al. (1992) *Exophiala* erstmals als Erreger von Nasennebenhöhleninfektionen bei Kleintieren nachweisen.

1.1.2.3 Infektionen beim Menschen

Beim Menschen verursacht *Exophiala dermatitidis* die kutane Chromoblastomykose, die subkutane Phaeohyphomykose und das tiefe eumykotische Myzetom. Alle drei Formen können zu einer generalisierten Infektion führen, wobei der Erreger einen ausgeprägten Neurotropismus aufweist. Klinische Erkrankungen treten meist in Regionen auf, wo die Menschen barfuß laufen und sich den saprophytär vorkommenden Erreger durch Traumata inokulieren. Des Weiteren sind im asiatischen Raum, vornehmlich in Japan und Taiwan, Erkrankungen durch *E. dermatitidis* häufiger anzutreffen. Da es sich hierbei oftmals um generalisierte Infektionen bei immunkompetenten Patienten handelt, wird eine genetische Disposition vermutet.

Bei der Chromoblastomykose (Dermatitis verrucosa) handelt es sich um eine kutane, nach Trauma erworbene Infektion. Charakteristisch sind ulzerierende, papillomatöse oder granulomatöse Hautveränderungen. Die betroffenen Hautareale weisen derbe Knoten auf und bilden sich im Verlauf der Erkrankung zu flächenhaft verhornenden Warzen aus, die

blumenkohlartig wuchern oder geschwürartig zerfallen. In Folge der lokalen Infektion kann eine lymphogene Metastasierung auftreten. Ursache für die Chromoblastomykose sind neben *Exophiala*-Spezies auch *Fonsecaea compacta*, *F. pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa* und *Rhinoctadiella aquaspersa* (Atlas of clinical fungi 2000).

Die Phaeohyphomykose betrifft tiefere Hautregionen und gehört zu den subkutanen Mykosen. Ursache ist ebenfalls die traumatische Inokulation der Erreger. Kennzeichen der Phaeohyphomykose ist eine leukozytäre und eosinophile Immunantwort. Dies hat die Entstehung charakteristischer infektiöser Granulome zur Folge. In der Histologie sind neben diesen Granulomen die melanisierten Filamente, die der Pilz im Gewebe ausbildet, zu erkennen (de Hoog 1997). Neben Haut und Unterhaut kann auch die Kornea als Primärorgan betroffen sein. So berichtet Gerard et al. 1998 von einem Fall eines Korneaukulus bedingt durch *Exophiala dermatitidis*. Eine weitere Infektion der Kornea nach Korneatransplantation in Frankreich beschreiben Benaoudia et al. (1999). Wie bei der Chromoblastomykose kann die Phaeohyphomykose Ausgangspunkt einer systemischen Ausbreitung der Erreger sein (Fothergill 1996). Als Erreger der Phaeohyphomykose gelten neben *Exophiala*-Spezies auch *Phialophora*-, *Aureobasidium*-, *Cladosporium*-, und *Alternaria*-Spezies (Braun-Falco O. et al. 1997).

Das eumykotische Myzetom (Madurafuß, Maduramykose) gehört ebenfalls zu den subkutanen Mykosen. Es handelt sich um ein langsam wachsendes, meist schmerzloses Granulationsgeschwulst. Die zunächst lokale Primärinfektion der Haut durchsetzt zunehmend tiefere Schichten bis auf den Knochen. Es erscheinen tumorartig deformierende Schwellungen, die zur Fistelbildung mit purulentem, teilweise drusenhaltigem Sekret führen. Die Therapie ist schwierig und es bleibt oftmals nur die Amputation (Hof 2003). Zu den Erregern derartiger Myzetome zählen die Pilzgattungen *Madurella*, *Allescheria*, *Candida*, *Streptomyces* und *Exophiala*. Das eumykotische Myzetom tritt überwiegend in sehr warmen Regionen auf. Prädilektionsstellen sind die Extremitäten, wobei die Granulationsgeschwulste auch an allen anderen Körperteilen auftreten können (Beketi et al. 2005),

Myzetome sind immer wieder Gegenstand von Fallberichten aus verschiedenen Ländern gewesen. So berichten Correale et al. (2005) über ein Myzetom bei einem neugeborenen Kind in Italien nach Legen eines Zentralen Venenkatheters und Gutierrez et al. (2005) über ein Myzetom der Lunge eines Mannes in Spanien. Von Brownell et al. (2005) liegt ein Bericht

über ein Myzetom im Fußbereich eines Mannes aus Trinidad vor und eine retrospektive Studie über 28 Jahre enthält 5 Fälle von Myzetomen in Tunesien (Daoud et al).

Tritt eine generalisierte Infektion mit *Exophiala dermatitidis* auf, so weist der Pilz stets einen ausgeprägten Neurotropismus auf. Es handelt sich meist um immunkompetente Patienten asiatischer Herkunft (Chang et al. 2000). Eine genetische Komponente wird dementsprechend vermutet. Ein früherer Fallbericht aus Asien zur systemischen Ausbreitung von *Exophiala* beschreibt zunächst einen Befall des Lymphsystems mit anschließender Ausdehnung auf das ZNS (Hiruma et al. 1993). Auch sind Fälle von invasiver Sinusitis, allergischer Sinusitis und zerebraler Infektion bekannt (Brandt and Warnock 2003).

Aus Deutschland wird ein Befall der Lunge mit *Exophiala dermatitidis* bei Patienten mit Cystischer Fibrose, ebenso die systemische Ausbreitung bei einem Kind mit akuter lymphatischer Leukämie beschrieben (Blaschke-Hellmessen et al. 1994).

Schließlich sind es Nachman et al. (1996), die den Fall einer Katheter-assoziierte Fungämie durch *Exophiala dermatitidis* bei einem immunsupprimierten Kind zum Gegenstand ihres Berichtes machten.

1.2 Pigmente

1.2.1 Definition und Funktion

Pigmente sind anorganische oder organische Stoffe mit Eigenfarbe, die im Gegensatz zu den Farbstoffen im Anwendungsmedium praktisch unlöslich sind (Brockhaus 2007). Der Farbeindruck entsteht durch Absorption und Reflexion bestimmter Frequenzanteile des sichtbaren Lichts.

In der Medizin werden endogene und exogene Pigmente unterschieden. Zu den endogenen Pigmenten zählen alle Neben- oder Endprodukte des Stoffwechsels, wie die Abbauprodukte des Sauerstoffträgers Hämoglobin, nämlich Hämosiderin, Hämatoidin und Bilirubin. Auch die sogenannten autogenen Pigmente wie Lipofuszin und Melanin gehören zu den endogenen Pigmenten, genauso wie die Lipochrome in den Fettzellen. Unter exogenen Pigmenten versteht man alle Pigmente, die von außen in den Körper gelangen und nicht von ihm gebildet werden. Hierzu gehören Kohle und Tusche, die sich als Anthrakosen in allen Organen ablagern können. Ebenso zählen farbige Pflanzenstoffe wie Chlorophyll, Carotinoide, Flavine, Xantophyll und Polyphenole dazu (Pschyrembel 2002)

Einige der Pigmente sind in bedeutende metabolische oder physiologische Prozesse eingebunden. Wichtige Beispiele hierzu sind das Chlorophyll in der Photosynthese, das Hämoglobin als Sauerstoffträger oder das Melanin als antioxidatives Pigment in der humoralen Abwehr und im UV-Strahlenschutz (Britton, 1983).

1.2.2 Tryptophanpigmente und Melanin

Pilze synthetisieren in Abhängigkeit von ihren Umwelteinflüssen ein breites Spektrum an verschiedensten Pigmenten mit unterschiedlichen Funktionen.

Einige Spezies synthetisieren zum Schutz vor UV-Licht Melanin, beispielsweise *Cryptococcus neoformans*, *Exophiala dermatitidis* und *Aspergillus fumigatus* (Jacobson et al. 1995; Brakhage et al. 1999; Schnitzler et al. 1999; Jacobson et al. 2000; Hamilton and Gomez 2002; Langfelder et al. 2003). Über die Schutzwirkung vor schädlicher UV-Strahlung hinaus wurden zahlreiche weitere Funktionen von Melanin erforscht, so der Schutz vor dem Abtöten als Folge des Oxidative Burst in der Immunologie (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003).

Weiterhin sind bestimmte Pilz-Spezies in der Lage, auf Tryptophan-Mangelmedium pigmentierte Indolalkaloide zu bilden. So wird bei der durch *Malassezia* hervorgerufenen Erkrankung Pityriasis versicolor alba ein enger Zusammenhang dieser Pigmente mit dem klinischen Bild vermutet (Mayser et al. 1998). Das klinische Bild dieser Erkrankung ist durch depigmentierte, konfluierende Flecken im Bereich der Schweißrinne gekennzeichnet. Die betroffenen Areale zeichnen sich durch eine Hyposensibilität gegenüber UV-Strahlung und durch eine grüne Fluoreszenz unter der Wood'schen Lampe aus.

In einem in-vitro-Bestrahlungsversuch an *Candida albicans* und *Staphylokokken* erwies sich das von *Malassezia furfur* synthetisierte Pityriacitrin als potenter Schutz vor dem Zelltod dieser beiden Mikroorganismen durch UVB-Bestrahlung (Machowinski et al. 2006). Es bietet somit eine Erklärung für die Unempfindlichkeit der unpigmentierten Stellen gegenüber UV-Licht bei Pityriasis versicolor.

Ein weiteres von *Malassezia furfur* synthetisiertes Indolalkaloid, das Malassezin, führt in menschlichen Melanozyten zur Apoptose und kann in Zusammenhang mit den depigmentierten Arealen bei Pityriasis versicolor gebracht werden (Kramer et al. 2005).

Die gelb-grüne Fluoreszenz der betroffenen Stellen könnte mit der Bildung von Pityrialakton durch *Malassezia furfur* in Zusammenhang stehen (Mayser et al. 2003). Weitere pigmentierte Stoffwechselprodukte aus Tryptophan sind die Pityriarubine A, B und C, welche eine

strukturelle Ähnlichkeit mit dem Proteinkinase-C-Hemmer Arcyriarubin aufweisen und den Oxidative Burst signifikant hemmen (Kramer et al. 2005).

Andere bekannte Tryptophanderivate sind die Ergotalkaloide von Pilzen, wie das Mykotoxin Ergotamin von *Claviceps purpurea* (Tudzynski et al. 1999). Auch das Phytohormon Indole-3 acetic acid (Vogler and Kuhlemeier 2003) gehört zu den Tryptophanderivaten, ebenso wie das Ommochrom, welches die Augenfarbe bei Insekten bestimmt (Oxford and Gillespie 1998), sowie industriell relevante Pigmente wie beispielsweise Indigo .

1.3 Immunologie

(Klinische Veterinärimmunologie 2000)

1.3.1 Das Immunsystem

Als **Immunsystem** (lat: *immunis*=frei, unberührt) wird das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen bezeichnet, das Gewebeschädigungen durch Krankheitserreger verhindert. Es entfernt in den Körper eingedrungene Mikroorganismen oder fremde Substanzen und ist außerdem in der Lage, fehlerhaft gewordene körpereigene Zellen zu zerstören.

Bestandteile des Abwehrsystems sind die Organe des lymphatischen Systems, im gesamten Organismus verteilte Zellen (v.a. Leukozyten, Zellen des MPS) und Moleküle (Immunglobuline, Lymphokine).

Es erfolgt eine Unterteilung in die unspezifische, angeborene Abwehr und die erworbene, spezifische Abwehr.

1.3.2 Angeborene oder unspezifische Abwehr

Bei der unspezifischen Abwehr handelt es sich um stammesgeschichtlich sehr früh entstandene Mechanismen. Sie beinhalten Barrieren, zu denen die Epithelien, der Säureschutzmantel der Haut und die Magensäure gehören. Auch allgemein entzündliche Reaktionen und humorale Faktoren wie das Komplementsystem gehören zur unspezifischen Abwehr, genauso wie das Lysozym und die Akute-Phase-Proteine. Zu den zellulären Faktoren zählen die Natürlichen Killerzellen, die polymorphkernigen Granulozyten und die Zellen des MPS.

Das Komplementsystem besteht aus über 30 Proteinen, die im Blutplasma gelöst oder zellgebunden vorkommen. Sie werden in einer Kaskade nacheinander aktiviert und führen zur Lyse fremder Zellen, zur Aktivierung immunkompetenter Zellen und zur Opsonierung von Antigen-Antikörperkomplexen. Die Aktivierung des Komplementsystems kann über zwei Wege erfolgen. Der klassische Weg wird durch die Bindung von Komplementfaktor 1 (C1) an die Fc-Region IgG- oder IgM-haltiger Immunkomplexe aktiviert. Der alternative Weg kann durch IgA- oder IgE-Antikörper, durch Polysaccharide von Bakterien und Pilzen oder durch Zellwandbestandteile von Protozoen ausgelöst werden.

Lysozym ist ein Enzym, das auf Schleimhäuten des Magen- Darmtraktes, im Blutplasma, in Speichel, Tränen, Cerumen und im Schweiß vorkommt. Hochkonzentriert kommt es in polymorphkernigen Leukozyten vor. Es spaltet das dimere Murein, welches die innerste Schicht der Zellwand von Bakterien bildet und hat somit eine starke bakterizide Wirkung.

Bei den Akute-Phase-Proteinen handelt es sich um in der Leber synthetisierte Plasmaproteine, deren Serumkonzentration bei akuten entzündlichen Reaktionen erhöht ist und die wahrscheinlich für die Infektionsabwehr wichtig sind.

Natürliche Killerzellen haben eine gemeinsame Vorläuferzelle mit den Lymphozyten im Knochenmark, besitzen jedoch keine antigenspezifischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Sie erkennen und zerstören körperfremde oder entartete körpereigene Zellen anhand ihres MHC I- Komplexes auf der Zelloberfläche.

Die polymorphkernigen Granulozyten entstehen ebenfalls aus der myeloischen Reihe im Knochenmark und machen 60-70% der Blutleukozyten aus. Eine Unterteilung erfolgt entsprechend ihrer histologischen Anfärbbarkeit (Methylenblau-Eosin-Färbung, Giemsa-Färbung) in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Sie besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose, zur Adhärenz an das Gefäßendothel und zur durch Chemotaxis verursachten Migration. Potente chemotaktische Faktoren für Granulozyten sind aktivierte Komplementkomponenten, Leukotriene, der Plättchenaktivierende Faktor, das bakterielle Tripeptid FMLP sowie einige Zytokine. Ein Vordringen im Gewebe zu den eingedrungenen Erregern ermöglichen die in den Granula enthaltenen Substanzen (saure Hydrolasen, Defensine, Myeloperoxidasen und Proteasen).

Neutrophile Granulozyten stellen den größten Anteil aller im Blut zirkulierenden Granulozyten dar. Sie phagozytieren opsonierte Mikroorganismen, virusinfizierte Zellen, Tumorzellen und andere körperfremde Antigene. Neben der Phagozytose sind sie zur

Abtötung von Mikroorganismen durch die Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite (ROS-Synthese, Oxidative Burst) befähigt.

Eosinophile Granulozyten sind an der Abwehr von Infektionen durch Parasiten und an IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen beteiligt.

Basophile Granulozyten sind an IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp beteiligt, da sie bei Degranulation wirksame Mediatoren wie Histamin freisetzen.

Unter MPS versteht man alle phagozytoseaktiven, von Monozyten abstammenden Zellen, die Makrophagen der verschiedenen Körperhöhlen und Gewebe. Monozyten gehören zu den Leukozyten und sind die größten mononukleären Zellen im Blut. Sie sind zur Migration und zur Phagozytose befähigt und besitzen auf ihrer Membranoberfläche u.a. Rezeptoren für Komplementproteine und Fc-Rezeptoren für IgG zur Phagozytose von Mikroorganismen. Monozyten entstehen im Knochenmark aus der myeloischen Reihe der pluripotenten Stammzelle und gelangen von dort aus in die Blutbahn. Die im Blut für 1-2 Tage zirkulierenden Monozyten differenzieren sich nach Auswanderung in verschiedene Organe zu ortsständigen, gewebetypischen Makrophagen. Zusätzlich können Makrophagen zu Antigen-präsentierenden Zellen werden, indem sie Epitope von Antigenen durch MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren und somit das spezifische Abwehrsystem über T-Helferzellen aktivieren.

1.3.3 Adaptive oder spezifische Abwehr

Die Zellen der adaptiven Immunabwehr besitzen antigenspezifische Rezeptoren und können somit gezielt Antigene erkennen und Antikörper gegen sie bilden. Zu diesen spezifischen Abwehrzellen gehören die Antigen-präsentierenden Zellen, die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten.

T-Lymphozyten entwickeln sich aus der lymphatischen Reihe der pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Ihre Reifung und immunologische Differenzierung erfolgt während der Perinatalperiode und der Kindheit unter dem Einfluß des Thymus (sogenannte Thymuspassage). Alle Zellen, die mit körpereigenen Antigenen reagieren, werden eliminiert (Negativselektion). Alle anderen T-Lymphozyten werden positiv selektioniert und reifen zur funktionsfähigen T-Zelle. Nach ihrer Ausdifferenzierung halten sich die T-Lymphozyten als Träger der zellvermittelten Immunität größtenteils in den sekundären Organen des lymphatischen Systems auf (Milz und Lymphknoten).

Es werden verschiedene T-Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenproteine unterschieden, sie erfüllen jeweils unterschiedliche Funktionen. Außerdem tragen sie auf ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor, der jedem T-Lymphozyten das Erkennen eines spezifischen Antigens ermöglicht (Schlüssel-Schloß-Prinzip).

T-Helferzellen tragen ein CD4-Protein auf ihrer Oberfläche. Sie erkennen Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten) auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Durch die Erkennung der Antigene beginnen sich die T-Helferzellen zu teilen und zahlreiche Botenstoffe freizusetzen. Es werden zwei Subtypen unterschieden, TH₁-Zellen führen zu einer Verstärkung der zellulären Antwort, während TH₂-Zellen die Bildung von Antikörpern und somit die humorale Antwort stimulieren

Zytotoxische T-Zellen (T-Killerzellen) erkennen Antigene, die ihnen von allen kernhaltigen Zellen auf MHC-I-Molekülen dargeboten werden. Daher spielen sie vor allem in der Erkennung und Beseitigung von viral infizierten Zellen eine Rolle. Sie heften sich mit ihrem T-Zellrezeptor an diese krankhaft veränderten Zellen und setzen Substanzen frei, die zum programmierten Zelltod führen (Apoptose). T-Suppressorzellen und T-Regulatorzellen vermitteln die Toleranz verschiedener Antigene und vermeiden so eine überschießende Immunantwort.

Die B-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche antigenspezifische Rezeptoren, die aus membrangebundenen Antikörpern bestehen. Jede B-Zelle kann nur einen bestimmten Antigenrezeptor exprimieren. Der Erwerb dieser antigenspezifischen Rezeptoren erfolgt in den B-Zell-Reifungsorganen. Bei Vögeln ist dies die Bursa fabricii, beim Menschen das Knochenmark, bei Kaninchen der Blinddarm und bei Wiederkäuern die Peyerschen Platten des Ileums. Nach dem Zusammentreffen von B-Zelle und passendem Antigen kommt es infolge der Lymphokinausschüttung durch T-Helferzellen zur Bindung und Ausdifferenzierung der B-Zelle zur Antikörper-bildenden Plasmazelle.

Antikörper erkennen bestimmte Bestandteile von Antigenen (Protein und Kohlenhydratmoleküle) und binden sich an diese. Sie erfüllen drei Funktionen: die Opsonierung der Antigene, die Aktivierung des Komplementsystems und die Inaktivierung der Fremdstoffe durch Bildung von Komplexen.

1.3.4 Ablauf einer Immunreaktion und Rolle des Oxidative Burst

Nach Überwindung der mechanischen und physikalischen Barrieren durch einen körperfremden Stoff hängt die Reaktion des Immunsystems in erster Linie davon ab, ob es

sich um einen Erstkontakt handelt, oder ob die körpereigene Abwehr sich bereits mit dem Antigen auseinandergesetzt hat.

Bei Erstkontakt reagieren zunächst die Zellen und humoralen Faktoren der angeborenen oder unspezifischen Abwehr. Granulozyten werden chemotaktisch an den Ort des Geschehens angelockt. Neutrophile Granulozyten eliminieren die Antigene durch Phagozytose oder durch das Ausschütten toxischer Substanzen. Sie sind zur schnellen Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Oxidative Burst) befähigt, die zur Zerstörung eingedrungener Erreger führen. Die Entstehung der Sauerstoffradikale in den Granulozyten erfolgt über die Aktivierung der NADPH-Oxidase. Dieser Enzymkomplex besteht aus membrangebundenen Komponenten, die Cytochrom b558 und ein 45-kD Flavoprotein enthalten, und aus cytosolischen Bausteinen, welche als p47(phox), p67(phox) und GTP-bindendes Protein charakterisiert sind (Clancy et al. 1992). Es wird vermutet, daß der Aktivierung der NADPH-Oxidase eine Aktivierung der PKC vorangeht (Inoguchi et al. 2003). Die NADPH-Oxidase katalysiert die Umwandlung von Sauerstoffmolekülen in Superoxidanionen (Abbildung 1). Diese Superoxidanionen rekombinieren sich spontan mit anderen Molekülen und dienen als Ausgangssubstanz für die Entstehung weiterer Sauerstoffradikale. Es werden hoch reaktive Substanzen wie Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff gebildet. Sie zerstören sowohl extrazellulär gelegene, als auch intrazellulär in Phagosomen aufgenommene Erreger.

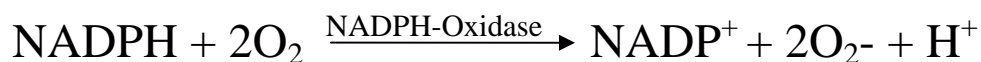


Abbildung 1: Entstehung des Superoxidanions aus NADPH und Sauerstoff nach Aktivierung der NADPH-Oxidase

Makrophagen beginnen im Zuge der Erstreaktion, die Antigene zu phagozytieren und anschließend Epitope über MHC-II- Moleküle zu präsentieren. Sie sind ebenfalls zur Bildung von Sauerstoffradikalen befähigt. Durch die Präsentation erfolgt die Aktivierung der B- und T-Lymphozyten als Elemente der spezifischen Abwehr. Nach einer Erstinfektion bleiben Antikörper und Gedächtniszellen zurück, die bei einem erneuten Kontakt mit dem Erreger eine wesentlich schnellere und effizientere Reaktion der körpereigenen Abwehr ermöglichen.

2 Hintergrund und Fragestellung

Die Synthese von Pigmenten und Fluorochromen auf Minimalagar mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Mayser erstmals 1998 bei *Malassezia furfur* entdeckt. Makroskopisch zeigte sich eine braune Verfärbung des Nährbodens, die im UV-Licht bei 254 und 366 nm Wellenlänge eine gelb-grünliche Fluoreszenz aufwies (Mayser et al. 1998).

Im Jahr 2002 erfolgte die erste Veröffentlichung der physikalischen und spektroskopischen Eigenschaften einer bislang unbekannt Substanz. Ihr wurde aufgrund der gelben Eigenfarbe im Tageslicht und der vermuteten Beteiligung am Krankheitsbild der Pityriasis versicolor der Name Pityriacitrin gegeben. Es wurde angenommen, daß das Indolderivat aufgrund seiner komplizierten Ringstruktur einen komplexen UV-Filter darstellt (Mayser et al. 2002). Diese Vermutung konnte in der Arbeit von Juncu im Jahr 2007 bestätigt werden. Die potente Schutzwirkung der Substanz vor UV-Strahlung ließ einen engen Zusammenhang zwischen der Pigmentsynthese von *Malassezia furfur* und dem klinischen Bild der Pityriasis versicolor alba vermuten. Bei der Pityriasis versicolor alba handelt es sich um eine Infektion der Haut, die aufgrund der Lipophilie des Erregers *Malassezia furfur* oftmals erst nach der Pubertät auftritt. Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch helle, konfluierende Flecken in schweißhaltigen Arealen. Bemerkenswerterweise zeichnen sich diese Flecken trotz Depigmentierung durch völlige Hyposensibilität gegenüber UV-Strahlung aus und fluoreszieren gelb-grün unter der Wood-Lampe. Die Synthese von Pityriacitrin durch *Malassezia furfur* wird als Grund für diese Unempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung vermutet. Das von *Malassezia furfur* gebildete Pigment Malassezin führte im Modell zu Apoptose in humanen Melanozyten (Kramer et al. 2005). Es wird ein Zusammenhang zwischen Malassezin und der Depigmentierung erkrankter Hautareale vermutet. Die gelb-grüne Fluoreszenz der Läsionen wird möglicherweise durch das ebenfalls von *Malassezia* synthetisierte Pityrialakton verursacht (Mayser et al. 2003).

Der von Mayser et al. (1998) erstmals entdeckte Tryptophanstoffwechsel erwies sich somit sowohl aus biochemischer, als auch aus klinischer Sicht als hochinteressant. In Folge dessen wurden 2004 zahlreiche weitere Stämme von *Malassezia sp.* hinsichtlich einer möglichen Pigmentsynthese auf Minimalagar mit Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle untersucht. Interessanterweise zeigte neben *M. furfur* lediglich *M. pachydermatis* die Fähigkeit zur

Synthese der Indolderivate (Mayser et al. 2004). Neben der Untersuchung der *Malassezia* Stämme gelang im Jahr 2006 der Nachweis des Tryptophanstoffwechselweges bei Stämmen von *Candida glabrata* (Mayser et al. 2007). Es konnte bewiesen werden, daß der komplexe Stoffwechselweg nicht nur in den hochentwickelten Basidiomyzeten vorkommt, sondern auch bei den Ascomyzeten. Da die Entwicklung der beiden Formen vor rund 600 Millionen Jahren auseinanderging, scheint die Fähigkeit zur Indolderivatsynthese somit fundamental bei Pilzen zu sein.

Im Jahr 2006 gelang Nies der Nachweis des Tryptophanstoffwechsels bei einer weiteren Familie der Ascomyzeten. Neben der Isolierung der bereits bekannten Substanz Pityriacitrin konnte sie mit dem Exophialin eine völlig neue Substanz aus dem Pigmentspektrum von *Exophiala dermatitidis* aufreinigen. Diese Ergebnisse gaben Anlaß dazu, die Pigmentspektren verschiedener Stämme von *Exophiala dermatitidis* strukturell weiter aufzuklären. Der Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* besitzt neben der Fähigkeit zur Pigmentsynthese aus Tryptophan die Fähigkeit zur Melaninsynthese. Mutanten dieser Spezies weisen Defekte im Melaninsyntheseweg auf und können somit nur Vorstufen des Melanins synthetisieren. Für die vorliegende Arbeit bot sich daher ein Untersuchungsansatz über einen möglichen Einfluß der Melaninsynthese auf die Synthese von Pigmenten aus Tryptophan an.

Die Pathogenität von *Exophiala dermatitidis* ist bis heute weitestgehend ungeklärt. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf die Funktion des Melanins, das eine wichtige Rolle bei Infektionen mit *Exophiala* spielt. So infizierten Dixon et al. (1987) Albinomäuse intravenös mit Zellen von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und der Mutante Mel-3 und konnten Melanin erstmals als Virulenzfaktor von *Exophiala* beschreiben. Die Mortalität lag nach Infektion mit dem Wildtyp bei 100%, nach Infektion mit *Exophiala dermatitidis* Mel-3 betrug sie nach 21 Tagen 0% (Dixon et al. 1987). Ähnliche Ergebnisse hatten bereits Kwon-Chung et al. (1982) bei der Untersuchung der Virulenz einer Melaninmangelmutante von *Cryptococcus neoformans* an Mäusen erlangt (Kwon-Chung et al. 1982). Wang et al (1995) konnten erstmals eine Schutzwirkung des Melanins von *Cryptococcus neoformans* vor der Antikörpervermittelten Phagozytose zeigen. Schnitzler et al. (1999) führten eine wesentlich höhere Abtötungs-Rate der Mutante Mel-3 im Vergleich zum Melanin-haltigen Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* auf Unterschiede im Oxidative Burst zurück. Grund für die höhere Virulenz der Melanin-bildenden Stämme von *Exophiala dermatitidis* und *Cryptococcus neoformans* könnte eine Neutralisation der körpereigenen Oxidantien wie Hypochlorid und Permanganat durch das Melanin sein.

Die Rolle der Indolderivate in Bezug auf die Pathogenität von *Exophiala dermatitidis* ist bisher völlig ungeklärt. Für Pityriarubin konnte im Modell bereits eine suppressive Wirkung auf den Oxidative Burst nachgewiesen werden (Kramer et al. 2005). Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit der Einfluß der Indolderivate von *Exophiala dermatitidis* auf den Oxidative Burst und die Phagozytose im Vollblutansatz untersucht werden. Darüber hinaus war die Frage nach dem Einfluß der Melaninsynthese auf Phagozytose und Oxidative Burst durch Vergleich eines Wildtyp-Stammes mit seiner Melaninmangel-Mutante Gegenstand dieser Untersuchung.

Zusammenfassend ergaben sich für diese Studie somit folgende Fragen:

1. Welche pigmentierten Tryptophanabbauprodukte synthetisiert der Melaninbildner *Exophiala dermatitidis* Wildtyp- Stamm?
2. Unterscheiden sich die Pigmentspektren der *Exophiala dermatitidis* Melaninmangel-Mutanten vom Wildtyp?
3. Schützt sich der Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* durch die Synthese von Melanin vor der Phagozytose und/ oder dem Oxidative Burst?
4. Haben die Tryptophanpigmente von *Exophiala dermatitidis* einen Einfluß auf den Oxidative Burst?

3 Material und Methoden

3.1 Pigmentgewinnung

3.1.1 Verwendete Isolate von *Exophiala dermatitidis*

Die in dieser Arbeit verwendeten Referenzstämme der Spezies *Exophiala dermatitidis* waren von Prof. Dr. G. Haase aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Aachen bereits für vorangegangene Projekte zur Verfügung gestellt worden (Tabelle 1). Es handelte sich um den Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* und drei seiner Melaninmangelmутanten. Sie weisen Defekte an unterschiedlichen Stellen des Melaninsyntheseweges auf (Abbildung 2). Bei der Mutante Mel-3 handelt es sich um eine spontane Mutation des Wildtyps. Ihr Synthesedefekt liegt auf einer sehr frühen Stufe des Melaninsyntheseweges und sie ist aus diesem Grund zu keinerlei Melaninsynthese mehr befähigt. Der Synthesedefekt der Mutante Mel-1 liegt auf einer späteren Stufe, sie ist zur Synthese von Scytalon und den Carotinoiden befähigt. Der genaue Defekt in der Melaninsynthese von Mel-4 ist bislang ungeklärt, sie produziert kein Melanin, jedoch Carotinoide.

Tabelle 1: Herkunft der Stämme von *Exophiala dermatitidis*

Name	Genotyp	Herkunft	Referenz	Stamm
<i>Exophiala dermatitidis</i>	A	Prof. Dr. G. Haase Aachen	Wildtyp ATCC No. 34100	P 202
<i>Exophiala dermatitidis</i>	A	Prof. Dr. G. Haase Aachen	Mel 3 ATCC No. 44504	P 201
<i>Exophiala dermatitidis</i>	A	Prof. Dr. G. Haase Aachen	Mel 1 ATCC No. 44502	P 1108
<i>Exophiala dermatitidis</i>	A	Prof. Dr. G. Haase Aachen	Mel-4 ATCC No. 58058	P 914

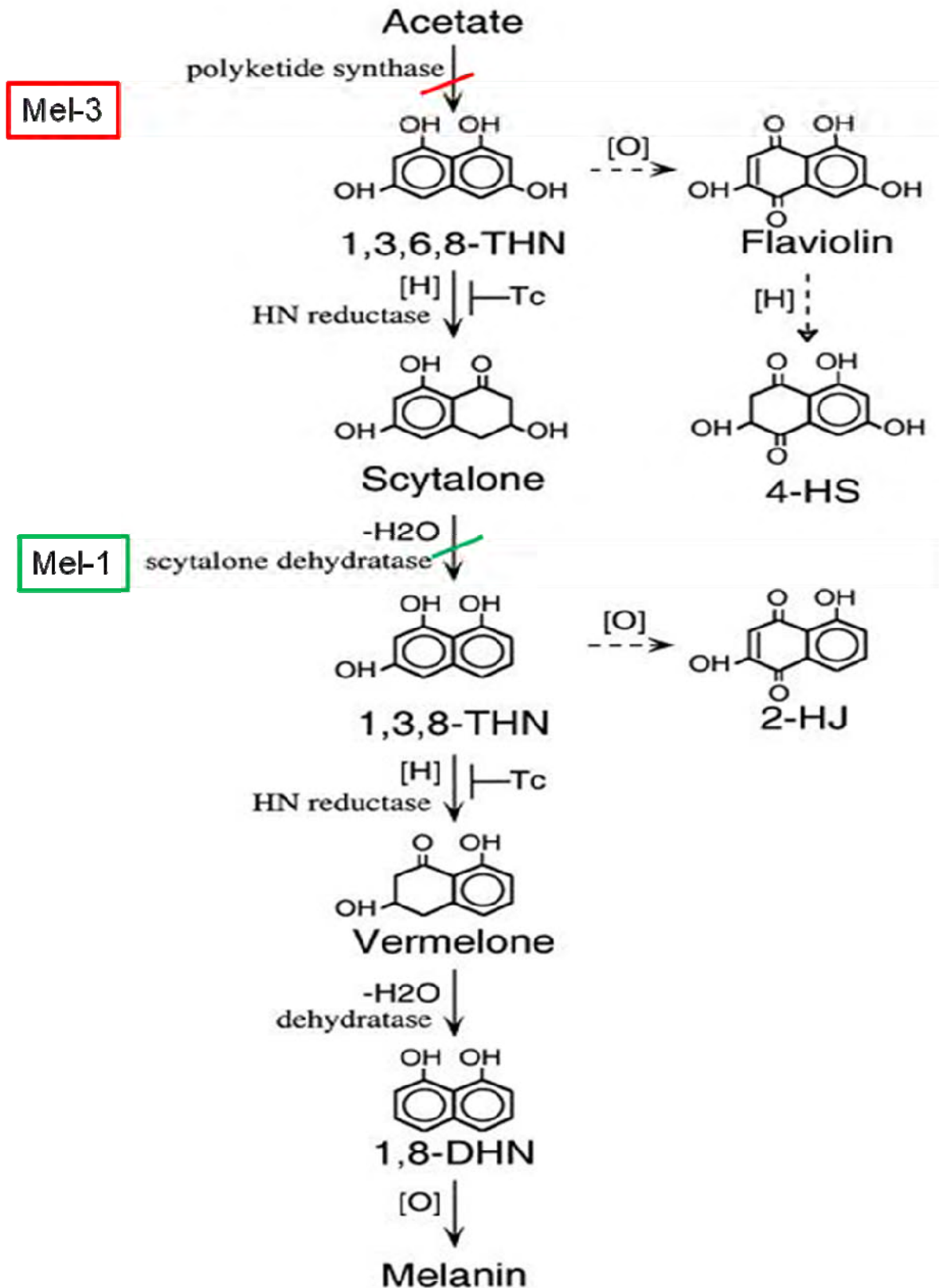


Abbildung 2: Enzymdefekte der verschiedenen Mutanten von *E. dermatitidis* im Melaninsyntheseweg (Juncu 2007)

3.1.2 Kulturmedien

3.1.2.1 *Exophiala dermatitidis*

Die verwendeten Stämme waren in sterilen Kunststoffröhrchen (Cryo Tube Vials, Nunc, Roskilde, Dänemark) bei -196°C in Behältern mit flüssigem Stickstoff (HC 35, Taylor-Wharton, Königsstein) tiefgefroren.

Nach dem Auftauen erfolgte die Anzucht auf einem Selektivnährmedium für pathogene Pilze (SPF, Merck, Darmstadt), der alle notwendigen Nährstoffe bei gleichzeitigem Schutz vor Schimmelpilzen aus der Anflugflora (Cycloheximid) und Bakterien (Chloramphenicol) bietet. Seine Zusammensetzung kann der Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung Selektivnährmedium für pathogene Pilze:

Zutat	Menge (g/l)
Pepton aus Sojamehl	10,0
D (+) Glukose	10,0
Cycloheximid	0,4
Chloramphenicol	0,05
Agar- Agar	12,5

Tabelle 3: Zusammensetzung von 300 ml 1b- Agar:

Zutat	Menge/ 300 ml Aqua dest.	Hersteller
Agar- Agar	6 g	Merck, Darmstadt
D (+) Glucose	3 g	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	3 g	Merck, Darmstadt
MgSO_4	1,5 g	Merck, Darmstadt
Tween 80	9 ml	Sigma- Aldrich
L- Tryptophan	0,9 g	Fluka Biochemika

Nach 6 Tagen Wachstum bei 32°C im Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) wurden die Kolonien mittels eines sterilen Wattetupfers (Cotton buds, Karl Beese, Barsbüttel) auf einen transparenten Minimalagar (1b-Agar) zur Induktion der Pigmentsynthese verbracht. Er

ist bezüglich der Inhaltsstoffe stark reduziert und besteht im Wesentlichen aus nur einer Lipidquelle, Tryptophan als Stickstoffquelle und Glucose.

Die Herstellung erfolgte im Labor, die Zusammensetzung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Hierzu wurden zunächst Glukose, Agar-Agar und die Salze in einen 500 ml- Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 300 ml Aqua dest. aufgefüllt. Danach erfolgte das Autoklavieren bei 1 bar über einen Zeitraum von 30 Minuten (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin). Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurden Tween 80 und Tryptophan eingerührt.

Das Einfüllen von je 15 ml des hergestellten Nährmediums in Kunststoffpetrischalen (Durchmesser 10 cm, Nunc, Roskilde, DK) erfolgte unter einer Uniflow Biohazard Laminar Flow Sicherheitsbank (Gerätetyp UVUB 1200, Uniequip Laborgeräte, Martinsried).

3.1.3 Gewinnung des Rohextraktes

Die Inkubation des beimpften 1b-Minimalagars erfolgte bei einer Temperatur von 32 °C über einen Zeitraum von vier Wochen im Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau). Aufgrund der Bildung von Tryptophan-Metaboliten verfärbte sich der transparente Nährboden bereits nach 3-4 Tagen Wachstum der Stämme braun. Diese Braunfärbung intensivierte sich weiter bis zum Ende der vierwöchigen Wachstumsphase. Im UV-Licht zeigte sich bei 254 und 366 nm eine deutliche Fluoreszenz des Nährbodens im gelb-grünen Bereich.

Zur Pigmentgewinnung wurde der Agar mit Hilfe eines Holzspatels aus den Petrischalen gelöst, wobei immer insgesamt je 40 Platten in ein 5l-Becherglas überführt wurden. Nach anschließender Zerkleinerung mittels eines Pürierstabes wurde das gewonnene Material mit 3l Ethylacetat (Merck, Darmstadt) aufgegossen. Zur Extraktion der Pigmente blieb das Gemisch 12 Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur stehen.

Anschließend erfolgte eine Filtration der Suspension über Glaswolle, um feste Bestandteile von dem in Ethylacetat gelösten Pigment zu trennen. Das Filtrat wurde in einem Scheidetrichter mit Aqua dest. aufgegossen und gut durchmischt. Innerhalb von 10 Minuten trennten sich im Scheidetrichter drei Phasen, die untere Wasserphase, die mittlere schaumige Phase mit Tween und Agarresten und die obere Ethylacetatphase mit Pigment.

Nach Trennung der drei Phasen wurden aus der Ethylacetatphase durch Zugabe von Natriumsulfat (Merck, Darmstadt) letzte Wasserreste gebunden. Die Trocknung dieses gewonnenen Ethylacetat- Pigmentgemisches erfolgte in einem Rotationsverdampfer (Typ VVI, Heidolph- Elektro KG, Kehlheim). Der Extrakt wurde für die Pigmentgewinnung in 96% Methanol (Merck) aufgenommen und in Autosampler-Gewindeflaschen (Volumen 1,8

ml) zur anschließenden lichtgeschützten Lagerung bei -18 °C überführt. Um die Auswirkung der Pigmente auf den Oxidative Burst zu untersuchen, wurde der Extrakt in DMSO (Sigma) aufgenommen und ebenfalls in Autosampler- Gewindeflaschen gefüllt.

3.1.4 Säulenchromatographie

Zu einer ersten Auftrennung des gewonnenen Rohextrakts wurde eine Säulenchromatographie (Niederdruckchromatographie) durchgeführt. Diesem Verfahren liegt das Prinzip der Gelpermeations- oder Ausschlußchromatographie zugrunde. Die aufzutrennenden Moleküle werden in einer mobilen Phase (96% Methanol) durch die stationäre Phase (Sephadex LH 20, Sigma) geführt. Die stationäre Phase weist relativ kleine Poren auf, das Prinzip der Trennung ist eine Siebwirkung. Niedermolekulare Bestandteile, deren größtes Molekül kleiner ist als der Durchmesser der Poren haben ein größeres Verteilungsvolumen. Sie verteilen sich sowohl auf die stationäre, als auch auf die mobile Phase und durchlaufen die Säule entsprechend langsam. Die Verteilung der höhermolekulare Substanzen beschränkt sich auf die mobile Phase, sie durchlaufen die Säule demnach schneller. Die verwendete Säule hat eine Länge von 525 mm (NS29 mit Fritte, Fa. Pfeuffer).

Tabelle 4: Fraktionen der verschiedenen Stämme von *E.dermatitidis* nach Säulenchromatographie

<i>Exophiala dermatitidis</i> Mel-1 (ATCC No. 44502): 7 Fraktionen			
	366nm	Tageslicht Säule	Tageslicht Auffang
F1	leuchtend grünlich	caramell-beige	orange
F2	bräunlich-lila	caramell-beige	braun-orange
F3	grünlich-leuchtend	caramell-beige	rot-orange
F4	lila-grünlich	weinrot	rot
F5	lila-dunkel	weinrot	dunkelrot
F6	leuchtend hellgrün-	rot-braun	weinrot
F7	bräunlich-lila	braun	rostrot

<i>Exophiala dermatitidis</i> Wildtyp (ATCC No. 34100): 5 Fraktionen			
	366 nm	Tageslicht Säule	Tageslicht Auffang
F1	lila- braun	dunkelbraun	braun
F2	leuchtend grün	braun	orange
F3	olivgrün	braun	orange
F4	lila leuchtend	braun	orange
F5	olivgrün	braun	hellorange

<i>Exophiala dermatitidis</i> Mel-3 (ATTC No.44504): 8 Fraktionen			
	366 nm	Tageslicht Säule	Tageslicht Auffang
F1	hell-ockergelb	caramell	rot
F2	lila	caramell-braun	orange
F3	neongelb	caramell-braun	orange
F4	lila	caramell-braun	rotbraun
F5	hellgrün-leuchtend	caramell-braun	rotbraun
F6	aubergine	dunkel-caramell	orange
F7	hellblau-leuchtend	dunkel-caramell	goldgelb
F8	lila+hellgrün	rot-braun	hellgelb

Der gleichmäßige Fluß der mobilen Phase wurde durch Druckaufbau mit einem Gummiball erzielt, die Fließgeschwindigkeit betrug 19 ml/ min. Die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte bei Tageslicht und mit Hilfe einer UV-Lampe (Desaga GmbH, Heidelberg) bei einer Wellenlänge von 366 nm. Die so gewonnenen Fraktionen wurden mittels Rotationsverdampfer getrocknet, erneut in Methanol oder DMSO aufgenommen und zur Lagerung bei -18°C in Autosampler-Gewindeflaschen überführt.

Tabelle 4 zeigt die Anzahl der Fraktionen je nach *Exophiala*-Stamm und deren farbliche Ausprägungen im 366 nm- UV- Licht und bei Tageslicht

3.1.5 Dünnschichtchromatographie

Das der Dünnschichtchromatographie zugrunde liegende Trennverfahren beruht ebenfalls auf der Verteilung eines Stoffgemisches zwischen einer mobilen und einer festen Phase. Die feste

Phase besteht aus einem sehr feinkörnigen Kieselgel, welches auf einer Glasplatte aufgetragen ist (Kieselgel 60-Platten, Merck). Bei der mobilen Phase handelt es sich um ein polares Laufmittelgemisch, bestehend aus Toluol- Ethylformiat- Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3. Die zuvor mittels Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen (gelöst in Methanol) wurden am Linomaten (Camag, Muttenz, Schweiz) in einzelnen Banden auf die Kieselgelplatten aufgetragen (Beispiel-Einstellungen für 8 Banden je Platte siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Einstellungen Linomat IV

Plattenbreite	200 mm
Startposition	18 mm
Bandenbreite	15 mm
Abstand zwischen den Banden	6 mm
Geschwindigkeit	6 sec/ μ l
Volumen	20 μ l
Druck Hauptventil	> 100 bar
Druck Reduzierventil	4- 5 bar

Anschließend wurden die Kieselgelplatten für 45 Minuten in eine mit Laufmittelgemisch gesättigte, geschlossene Laufkammer gestellt. Das Laufmittel saugte sich mittels der Kapillarkräfte an der DC-Platte nach oben. Sobald die aufgetragenen Banden erreicht wurden, lösten sich die darin enthaltenen Moleküle. Sie waren nun sowohl den Kräften der stationären Phase, als auch den Kräften der mobilen Phase ausgesetzt. Je nach Kräfteverhältnis entfernten sich die Moleküle unterschiedlich weit von den Ausgangsbanden. Nach Markierung der Laufmittelgrenze wurden die Kieselgelplatten unter einem Abzug getrocknet. Zur Detektion der entstandenen Banden wurden die Kieselgelplatten zunächst unter verschiedenen Bedingungen fotografiert (Camag Reprostar 3, Camag, Muttenz, Schweiz, Tabelle 6). Die Berechnung der Rf-Werte der einzelnen Banden im Tageslicht und im UV-Licht erfolgte mit dem Computerprogramm Win Cats (Camag, Muttenz, Schweiz). Durch Bedampfen der DC-Platten mit NH₃ (Ammoniaklösung reinst, 33%, Merck) und Salzsäure (Salzsäure rauchend, 37%, Merck) wurde das Verhalten und die Stabilität der Substanzen in Abhängigkeit vom pH-Wert überprüft.

Die so entstandenen Bandenmuster wurden hinsichtlich der jeweiligen Rf-Werte und ihres Verhaltens im sauren, basischen und neutralen Bereich, sowie auf Basis ihrer Darstellung bei Tageslicht und unter UV-Licht bei 366 nm und 254 nm beurteilt. Somit konnten einige Substanzen bereits aufgrund dieser optischen Merkmale durch Vergleich mit bereits bekannten Reinsubstanzen identifiziert werden.

Um eine Identifizierung der unbekanntenen Banden zu ermöglichen, erfolgte die präparative Dünnschichtchromatographie. Die Banden wurden mit Einmalskalpellen ausgekratzt, anschließend mit Mörser und Pistill fein zerkleinert und mit Ethylacetat und Aqua dest. aufgegossen. Es bildeten sich zwei Phasen: die obere ethylacetathaltige Phase enthielt das gelöste Pigment, die untere wasserhaltige Phase beinhaltete das ausgefallene Kieselgel. Die obere Phase wurde mittels Einmalpipette abpipettiert und zur Bindung des Restwassers mit Natriumsulfat (Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz) versetzt. Die Flüssigkeit wurde nun mittels Rotationsverdampfer bis kurz vor der kompletten Trocknung abrotiert. Die nun erhaltene visköse Lösung wurde in Autosampler überführt und unter einem Stickstoffstrom in einem Techne DRI-Block DB (Thermo Dux, Heidelberg) bei 40° C getrocknet.

Tabelle 6: Bedingungen Camag Reprostar 3

Bild 1	Aufnahme bei Tageslicht
Bild 2	Aufnahme bei 366 nm
Bild 3	Aufnahme bei 254 nm
Bild 4	Aufnahme bei Tageslicht nach Bedampfen mit HCl (rauchend, 37%, Merck)
Bild 5	Aufnahme bei 366 nm nach Bedampfen mit HCl
Bild 6	Aufnahme bei Tageslicht nach Bedampfen mit Ammoniak (reinst, Merck)
Bild 7	Aufnahme bei 366 nm nach Bedampfen mit Ammoniak

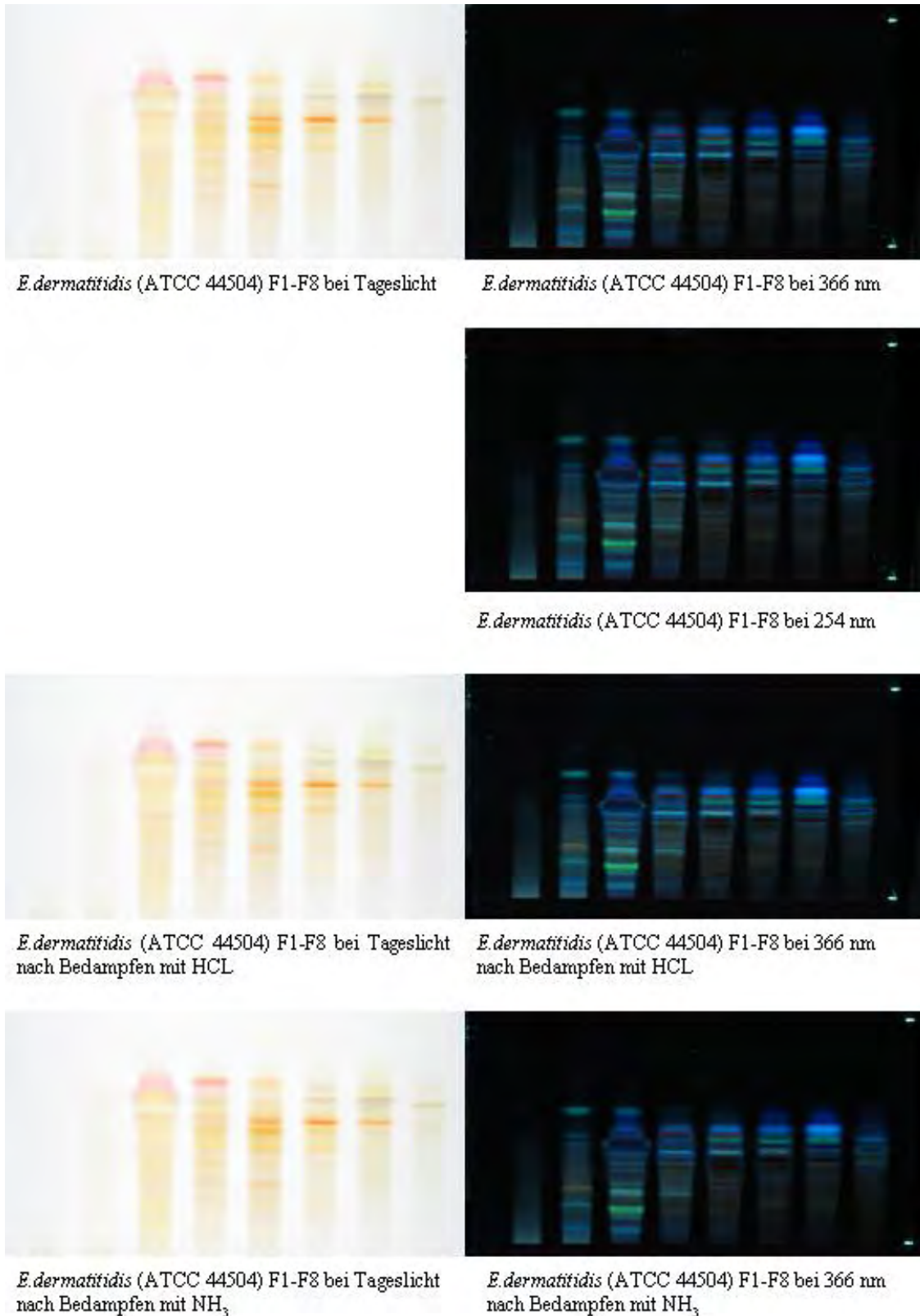


Abbildung 3: Kieselgelplatten von *Exophiala dermatitidis* Mutante Mel-3, Fraktionen F1-F8 bei Tageslicht (links) und unter UV- Licht (rechts) im neutralen, sauren und basischen Bereich (von oben nach unten)

3.1.6 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Die HPLC, auch als Hochleistungs- Flüssigchromatographie bezeichnet, diente der weiteren Auftrennung der zuvor gewonnenen Banden der DC-Fractionen. Sie sollte die Identifizierung und Quantifizierung unbekannter Substanzen durch den Vergleich mit bereits bekannten Reinsubstanzen (Standardisierung) ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Arten von HPLC durchgeführt, die präparative und die analytische HPLC. Zielsetzung der präparativen HPLC war zunächst die Isolierung der Pigmente in definierter Reinheit bei maximaler Menge und minimaler Zeit. Bei der analytischen HPLC wurde anschließend mit geringen Probenmengen gearbeitet mit dem Ziel der möglichst vollständigen Auftrennung der Einzelkomponenten der Fractionen und ihrer anschließenden Identifikation.

3.1.6.1 Präparative HPLC

Bei der präparativen HPLC handelt es sich um eine reversed-Phase-HPLC. Sie diente der Trennung der mittels Säulenchromatographie gewonnenen, noch recht komplexen DC-Banden, die durchschnittlich 5-10 Komponenten enthielten.

Die stationäre Phase bestand aus einer unpolaren LiChrospher- RP8- Säule (Merck, Darmstadt, 30x250mm). Demzufolge traten unpolare lipophile Probesubstanzen eher in Wechselwirkung mit der Säulenfüllung als polare hydrophile Substanzen. Die flüssige Phase bestand aus einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril (Lösungsmittel Gradient Grade, Merck, Darmstadt), die Flussrate betrug 5 ml/min. Im zeitlichen Verlauf der reversed-Phase-HPLC nahm der Wassergehalt des Gemisches ab (linearer Gradient von 100 – 0% Wasser bzw. 0 – 100% Acetonitril über 180 Minuten). Lipophile Substanzen verblieben länger auf der Säule als die hydrophilen Substanzen. Zur Erzeugung des Gradienten diente eine Gilson Masterpumpe M305, die mit einer weiteren Pumpe gekoppelt war (Gilson Modell 302). Beide Pumpen waren mit einem präparativen Pumpenkopf mit einer Leistung von 50ml/min versehen. Die Steuerung erfolgte über ein Gilson 802-Modul.

Am Ende der Säule erfolgte die Detektion der einzelnen Fractionen bei 220 nm mittels eines UV-Detektors (Holochrome, Gilson). Die HPLC-Fractionen von je 5 ml wurden in einem Fractionensammler (Super Frac, Pharmacia Biotech) aufgefangen. Es folgte eine Zusammenführung der Komponenten auf Basis der Retentionszeiten, der Farbe und der

Fluoreszenz. Die Entfernung der Lösungsmittel wurde durch eine anschließende Gefrierdrying erzielt.

Eine weitere Auftrennung erfolgte durch einen erneuten HPLC-Durchlauf, wobei der Konzentrationsgradient flacher und entsprechend breiter gewählt wurde. Auch nach diesem zweiten Durchlauf wurden einige Proben wieder vereinigt und erneut gefriergetrocknet. Im nächsten Schritt wurde eine Teilprobe der so gewonnenen Fraktionen zur analytischen HPLC verwendet.

3.1.6.2 Analytische HPLC

In der analytischen HPLC wurden Bruchteile der zuvor in der präparativen HPLC gewonnenen Fraktionen auf ihre Reinheit untersucht.

Die stationäre Phase bestand ebenfalls aus einer unpolaren reversed-Phase-Säule (RP-18, 4 × 250 mm, stationäre Phase Shandon ODS Hypersil 3 µm, Life Science International LTD, Cheshire, England). Als mobile Phase wurde erneut ein Acetonitril-Wasser-Gemisch verwendet, wobei die Flußrate 1 ml/min betrug. Im zeitlichen Verlauf der reversed-Phase-HPLC nahm der Wassergehalt des Gemisches ab (linearer Gradient von 100 – 0% Wasser bzw. 0 – 100% Acetonitril über 100 min). Die Retentionszeiten der Bestandteile konnten somit über den Wasseranteil des Eluenten gesteuert werden. Da dieser zu Beginn der HPLC bei 100% lag, verblieben die lipophilen Substanzen länger auf der Säule als die hydrophilen Substanzen.

Der Aufbau des Gradienten erfolgte mittels Hochdruck (Gynkotec Gradientenpumpe 480, Gynkotec, Germering).

Um einen optimalen Probenauftrag zu gewährleisten, wurden Autosampler (Alcott Modell 738, Bischoff Analystechnik, Leonberg) mit einem Volumen von 100 µl verwendet. Am Ende der Säule erfolgte die Detektion der Fraktionen bei 220 nm (UV-Detektor 785, bai, Bensheim).

Bei ausreichender Reinheit der gewonnenen Pigmente wurden die Proben zur weiteren Strukturaufklärung unter Stickstoffatmosphäre auf Trockeneis an das Institut für Organische Chemie der TU München geschickt.

3.2 Oxidative Burst und Phagozytose

3.2.1 Verwendete Isolate

Für alle Versuche bezüglich Phagozytose und Oxidative Burst wurden ausschließlich der Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* (ATCC No.34100) und seine Melaninmangel- Mutante Mel-3 (ATCC No. 44504) verwendet (siehe Tabelle 1). Die Mutante Mel-3 synthetisiert kein Melanin, ihr fehlt somit eine wichtige Schutzfunktion vor der Immunabwehr des Wirtes. Sie diene aus diesem Grund in allen durchgeführten Messungen als Kontrollgruppe. Der Vergleich dieser Kontrolle mit dem Wildtyp ermöglichte die Untersuchung eines möglichen Einflusses der Melaninsynthese auf Phagozytose und Oxidative Burst. Die Zugabe der pigmentierten Tryptophanabbauprodukte ermöglichte die Untersuchung eines möglichen Einflusses dieser Pigmente auf Phagozytose und Oxidative Burst.

3.2.2 Anzucht und Kultur

Die *Exophiala*-Stämme wurden mittels einer sterilen Öse dünn auf SPF-Medium (Merck, Darmstadt) ausgestrichen und für 6 Tage bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Die weitere Kultur erfolgte in dem bereits von Schnitzler et al. verwendeten Flüssigmedium für Hefen (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003d). Dieses Flüssigmedium enthält einen großen Anteil an Yeast Extract, der nachweislich das Wachstum des dimorphen Pilzes in der Hefeform begünstigt. Dieses einheitliche Wachstum ist Voraussetzung für eine optimale Messung im Durchflußzytometer. Yeast Nitrogen Base enthält zahlreiche Stickstoffquellen, unter anderem auch Tryptophan. Untersuchungen von Mayser et al. haben jedoch gezeigt, daß die Aminosäure Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle vorkommen muß, um die Synthese der Indolderivate anzuregen (Mayser et al. 1998b). MOPS acid und MOPS-Salz dienen als Puffer des Mediums, Glucose als Energielieferant.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Flüssigmediums für den Phagozytoseversuch (Schnitzler et al.)

Inhaltsstoff	Menge.	Hersteller
Yeast Extract	50 g	DIFCO, Michigan
D (+) Glucose	10 g	Merck, Darmstadt
MOPS- Salz	17, 26 g	Sigma- Aldrich

Yeast Nitrogen Base	6, 7 g	Sigma- Aldrich
MOPS- Acid	1, 91 g	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	ad 1l	Merck

Die Wells einer 6-Well-Platte (Tissue Culture Plate, 6 Well, Flat Bottom, Falcon) wurden unter sterilen Bedingungen mit 5 ml des Flüssigmediums für Hefen pro Well gefüllt. Jeweils eine Einzelkolonie von *Exophiala dermatitidis* wurde mit einer sterilen Öse hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 32°C im Wasserschüttelbad (GFL 1092).

Um lediglich Einzelzellen ohne Akkumulationen zu gewinnen, wurden die Pilzzellen anschließend über ein Sieb (Cell Strainer 40 µm, BD- Falcon) filtriert. Das Filtrat wurde in 50 ml-PP-Röhrchen (Greiner, Labortechnik) verbracht und zweimal bei Raumtemperatur zentrifugiert (3000Upm, 5 min). Zwischen den Zentrifugationsschritten wurden die Zellen mit jeweils 5 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung (Fresenius Kabi) gewaschen.

3.2.3 Verwendete monoklonale Antikörper zur Identifizierung der neutrophilen Granulozyten im Durchflußzytometer

Zur genauen Identifizierung der neutrophilen Granulozyten im Durchflußzytometer wurden diese in einem Kontrollansatz mit PE-gefärbten, monoklonalen CD 16-Antikörpern (BD) markiert. Es wurden 10µl der monoklonalen Antikörper (Konzentration 0,02 mg/ ml) zu 100 µl Vollblut (in 990 µl PBS) gegeben. Nach 45 min. Inkubation im Wasserschüttelbad bei 37°C wurde der Ansatz ebenfalls zweimal zentrifugiert (1300 Upm, 10 min) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die gefärbten Zellen in 500 µl PBS zur Messung im Durchflußzytometer aufgenommen.

3.2.4 Gewinnung der Tryptophanpigmente zur Untersuchung der Auswirkung auf die Phagozytose und den Oxidative Burst

Die zur Pigmentgewinnung verwendeten Referenzstämme von *Exophiala dermatitidis* sind Tabelle 1 zu entnehmen. Sie wurden wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben zunächst auf Selektivnährmedium angezchtet und anschließend für 4 Wochen auf 1b-Agar verbracht.

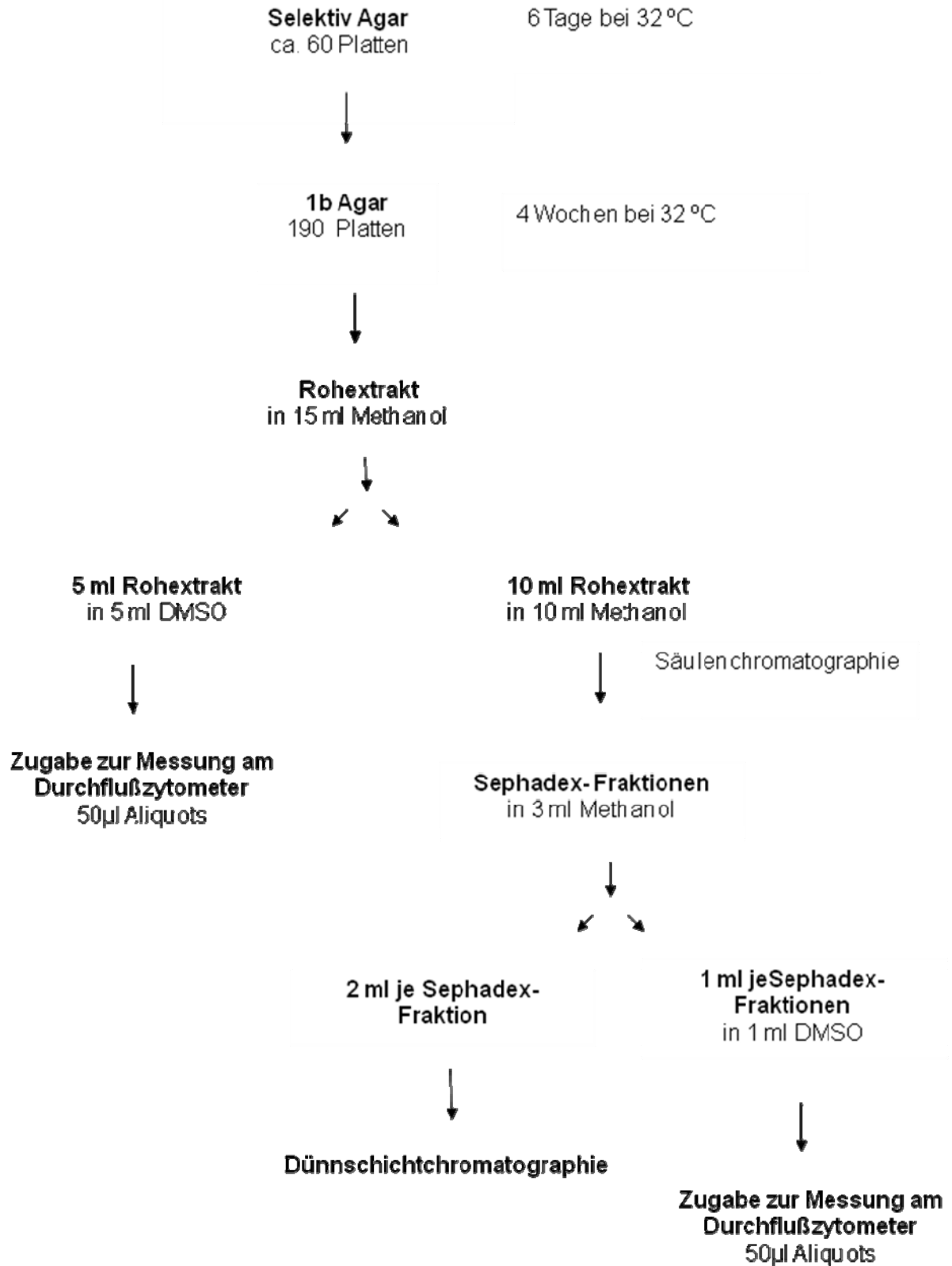


Abbildung 4: Pigmentgewinnung zur Messung ihrer Auswirkung auf den Oxidative Burst am FACS

Um eine Quantifizierung des synthetisierten Pigments zu erzielen, wurden 190 1b-Agarplatten der jeweiligen Stämme von *Exophiala* zur Gewinnung von Rohextrakten verwendet (Abbildung 4). Jeder dieser Rohextrakte wurde in insgesamt 15 ml Methanol gelöst. 5 ml des Gemisches wurden im Rotationsverdampfer abrotiert und in 5 ml DMSO aufgenommen, um anschließend in 50 µl-Aliquots den Ansätzen zur durchflußzytometrischen Messung beigelegt zu werden. Die restlichen 10 ml Rohextrakt wurden säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Einzelfraktionen wurden in 3 ml Methanol gelöst, wovon 2 ml der Aliquots zur weiteren Aufreinigung mittels Dünnschichtchromatographie verwendet wurden. Der verbleibende Rest von 1 ml wurde mittels Rotationsverdampfer abrotiert und in 1 ml DMSO gelöst und in Form von 50µl Aliquots für die Versuche im Durchflußzytometer verwendet.

Zur Zugabe einzelner Banden der säulenchromatographischen Fraktionen wurden 400 µl der Einzelfraktionen mittels Linomat auf jeweils 6 Kieselgelplatten aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Trocknung über 48h, um Reste des Laufmittels zu entfernen. Es erfolgte eine Unterteilung der Fraktionen in acht Banden mit einer Breite von 1 cm. Diese Banden der 6 Platten wurden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie aufgereinigt und in 300µl DMSO gelöst. Die Zugabe zu den Versuchen erfolgte in Aliquots von 50µl.

Reinsubstanzen wurden in einer Konzentration von 100µg/ 50µl DMSO hinzugegeben.

3.3 Oxidative Burst

3.3.1 Dihydrorhodamine 123

Als Indikator für den Oxidative Burst der neutrophilen Granulozyten wurde wie in der Arbeit von Schnitzler et al. Dihydrorhodamine 123 gewählt (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003). Dihydrorhodamine fluoresziert in seiner Ausgangsform nicht. Bei Inkubation mit Vollblut diffundiert es in die Mitochondrien der neutrophilen Granulozyten. Dort wird es während des Oxidative Burst durch die Bildung der Sauerstoffradikale zu Rhodamine oxidiert. Dieses fluoresziert grün bei einem Absorptionsmaximum von 488 nm. Die Zunahme der Fluoreszenz in den Granulozyten ist somit ein Maß für den Oxidative Burst.

3.3.2 Versuchsaufbau Oxidative Burst

Zunächst wurden von den gemäß 3.2.2. angezüchteten Stämmen von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und Mel-3 je 5×10^6 Zellen in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Sie wurden in je 1ml PBS aufgenommen und mit 1ml heparinisiertem Vollblut durch vorsichtiges Schwenken der PP-Röhrchen vermischt. Die Zugabe von Dihydrorhodamine 123 (Sigma-Aldrich) erfolgte in einer Konzentration von 10 mg/l. Die Pigmente wurden in Form von Rohextrakten, einzelnen Sephadex-Fraktionen, Banden der DC-Platten und als Reinsubstanzen zugegeben. Sie waren hierfür stets in DMSO gelöst. In jeder Versuchsreihe diente ein Ansatz ohne Pigmente als Kontrolle. Die PP-Röhrchen wurden bei 37°C im Wasserschüttelbad inkubiert.

Das Verhältnis der neutrophilen Granulozyten zu den Hefezellen war nach Auszählen in der Neubauer-Zählkammer etwa bei 1:1. Somit konnte gewährleistet werden, daß bei maximaler Phagozytoseleistung jeder Granulozyt mindestens eine Pilzzelle phagozytieren konnte. Das Vollblut stammte aus der jeweiligen Tagesspende der Blutbank des Instituts für Immunologie und Transplantationsmedizin in Gießen von gesunden Spendern im Alter zwischen 20- 40 Jahren.

Nach 0-10-30-60 Minuten wurden jeweils 100µl entnommen und nach Zugabe von 2 ml kaltem Lysepuffer (Lysisbuffer, 10x concentrate, BD) in PP-Conical-Tubes (15 ml, Falcon) auf Eis gestellt. Der Lysepuffer bewirkt eine Lyse der Erythrozyten und stoppt die Granulozytenaktivität durch das im Puffer enthaltene Formaldehyd ab. Auch die Kühlung der Proben auf Eis verhinderte ein weiteres Ablaufen physiologischer Reaktionen. Im Anschluss an das Abstoppen wurden die Proben zweimal mit je 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (10 min, 1300Upm).

Zur Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen.

3.4 Phagozytose

3.4.1 Verwendetes Fluorochrom als Marker der Hefezellen für die Phagozytose-Messung

Für die Messung der Phagozytose wurden ebenfalls jeweils 5×10^6 Zellen von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und seiner Mutante Mel-3 in einer modifizierten Neubauer- Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Sie wurden mit 10 ml isotoner Natriumchloridlösung in ein 50 ml

PP-Röhrchen überführt. Es erfolgte eine Behandlung mittels Ultraschallsonde (VibraCell 75022) über zwei Minuten. Ziel dieser Behandlung ist die verbesserte Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes zur Messung am Durchflußzytometer (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003).

Im Anschluss an die Ultraschallbehandlung wurden die Zellen erneut zentrifugiert (3000 Upm, 10 min) und in 1 ml PBS aufgenommen. Das Anfärben erfolgte mit BCECF-AM (Sigma-Aldrich). Dieser Farbstoff fluoresziert in seiner Ausgangsform nicht. Nach intrazellulärer Aufnahme in die Hefezellen wird BCECF-AM durch eine Esterase zu BCECF hydrolysiert. BCECF fluoresziert grün bei einem Absorptionsmaximum von 505 nm und einem Emissionsmaximum von 530-540 nm. Um eine optimale Aufnahme des Farbstoffes zu gewährleisten, wurde BCECF-AM in einer Konzentration von 1 mol/l zu den Zellen gegeben und für 45 Minuten bei 37°C im Wasserschüttelbad inkubiert.

Nach dem Färben wurden die Pilzzellen erneut zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und zentrifugiert.

3.4.2 Versuchsaufbau Phagozytose

Es wurden 5×10^6 der mit BCECF-AM gefärbten Zellen von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp bzw. Mel-3 in 1ml PBS aufgenommen und mit 1ml heparinisiertem Vollblut bei 37°C im Wasserschüttelbad inkubiert. Die Zugabe der Pigmente erfolgte wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. In jeder Versuchsreihe diente ein Ansatz ohne Pigmente als Kontrolle.

Das Abstoppen der Phagozytose und die Lyse der Erythrozyten erfolgte ebenfalls wie in Kapitel 3.3.2.

Zur Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen.

3.5 Durchflusszytometer

3.5.1 Physikalische Grundlagen

3.5.1.1 Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die meist rasch abklingende Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie. Die Anregung erfolgt photometrisch durch Licht einer spezifischen Wellenlänge. Dadurch werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Zurückfallen in das Grundniveau

emittieren sie Energie in Form von Photonen. Ein Teil der Energie geht stets in Form von Wärme verloren. Deshalb ist das emittierte Licht immer von niedrigerer Energie und somit langwelliger als das absorbierte Licht.

3.5.1.2 Streuung

Unter Streuung versteht man eine Richtungsänderung eines Teils der Primärstrahlung durch Wechselwirkungsprozesse beim Durchgang durch Materie. Beispiele sind die Streuung von Licht an Atomen oder Feinstaub, von Elektronen an anderen Elektronen oder von Neutronen an Atomkernen.

Man unterscheidet zwischen elastischer und unelastischer Streuung. Bei der elastischen Streuung ist die Summe der kinetischen Energie nach dem Stoß genauso groß wie vor dem Stoß. Bei der unelastischen Streuung geht ein Teil der Energie in Form von Wärme verloren. Im realen Versuchsaufbau handelt es sich immer um unelastische Streuung.

3.5.2 Prinzip des Durchflusszytometers

(Quelle: Thomas Nebe, Institut für Klinische Chemie, Klinikum Mannheim)

3.5.2.1 Lichtquelle

Als Lichtquelle am Durchflußzytometer dient ein luftgekühlter Argonlaser. Dieser sendet monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm aus. Der Lichtstrahl zeichnet sich durch eine hohe Energiedichte aus und erzeugt demnach ausreichende Signale zur Messung. Im Querschnitt weist er eine Gaus'sche Energieverteilung mit dem Energiemaximum in der Mitte auf. Mittels Linsensystemen wird er in eine elliptische Form gebracht. Sein kleinster Durchmesser ist größer als die zu messenden Partikel, um eine optimale Streuung zu erreichen.

3.5.2.2 Messküvette

Die Probensuspension wird in eine Messküvette angesaugt. Hierbei teilt sich der Flüssigkeitsstrom in einen Hüll- und einen Probenstrom auf. Durch den höheren Druck des Hüllstroms zieht sich der Probenstrom in der Mitte fadenförmig auf. Die darin enthaltenen Partikel werden dadurch perlschnurartig aufgereiht am Argonlaser vorbeigeführt. Die Strömungsverhältnisse und die Oberflächenbeschaffenheit in der Meßküvette führen bei assymetrischen Partikeln zu einer Orientierung in Richtung Längsachse.

3.5.2.3 Streuung des Argonlaserstrahls

Der emittierte Argonlaserstrahl wird von den gemessenen Partikeln in unterschiedlicher Weise gestreut. Mit Detektoren wird einerseits das Streulicht im engen Winkel (Vorwärtsstreulicht) und andererseits das Streulicht im rechten Winkel (Seitwärtsstreulicht) gemessen.

Beim Vorwärtsstreulicht handelt es sich um eine Ablenkung des Laserstrahls von seiner Geradlinigkeit um $\pm 3^\circ$. Je größer der gemessene Partikel, umso größer der Streuwinkel. Es wird somit als Parameter für die Partikelgröße genutzt. Unter Seitwärtsstreuung versteht man die Ablenkung des Laserstrahls um 90° zur Seite. Diese Streuung ist von der Granularität und der Oberflächenbeschaffenheit der Partikel abhängig.

3.5.2.4 Fluoreszenz der Partikel

Partikel mit schwacher Primärfluoreszenz können zur besseren Detektion und Abgrenzung von anderen Zellpopulationen mit fluoreszierenden Farbstoffen angefärbt werden. Im Durchflußzytometer kann eine grüne Fluoreszenz, eine gelbe Fluoreszenz und eine rote Fluoreszenz der Partikel detektiert werden. Beim Einsatz zweier Fluoreszenzfarbstoffe, deren Spektren sich teilweise überschneiden, müssen die entsprechenden Anteile herausgefiltert werden.

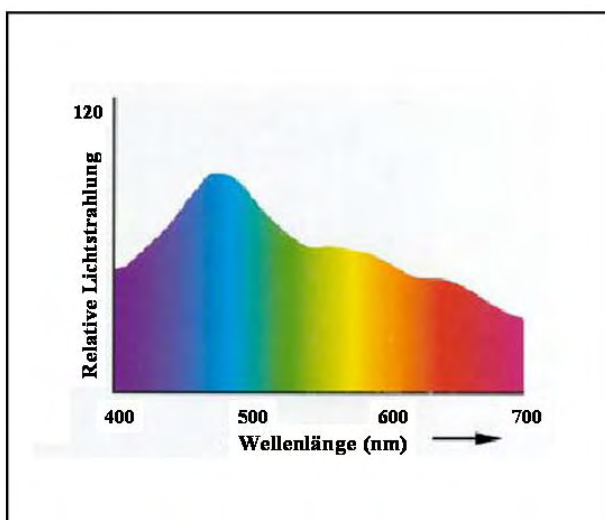


Abbildung 5: Wellenlänge des sichtbaren Lichts (Quelle: FH Köln)

In dieser Arbeit wurden die Zellen von *Exophiala dermatitidis* mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM zur Phagozytosemessung angefärbt. Als Indikator für die Aktivität der Granulozyten wurde der grüne Farbstoff Dihydrorhodamine 123 eingesetzt.

3.5.2.5 Detektion des Streulichts und der Fluoreszenz

Im engen Winkel von +/- 3° werden große Lichtmengen gestreut. Zur Detektion werden entsprechend einfache Photodioden benutzt. Zur Detektion der Seitwärtsstreuung und der Fluoreszenz im 90° Winkel müssen Blenden und Photomultiplier-Röhren eingesetzt werden.

3.5.2.6 Signalverarbeitung

Jede Störung des gradlinig verlaufenden Laserlichts wird als „event“ bezeichnet. Die Stärke eines events wird in Volt gemessen, wobei die Spannung zwischen 0,00 und 10,24 Volt liegt. Die Unterteilung der Messskala erfolgt in 0,01- Schritten, somit werden 1025 Intensitätsstufen unterschieden.

Die Photonen werden in Ströme und anschließend in Spannungsimpulse verwandelt. Die analogen Signale werden verstärkt und schließlich in digitale Signale umgewandelt.

3.5.3 Messung im Durchflusszytometer

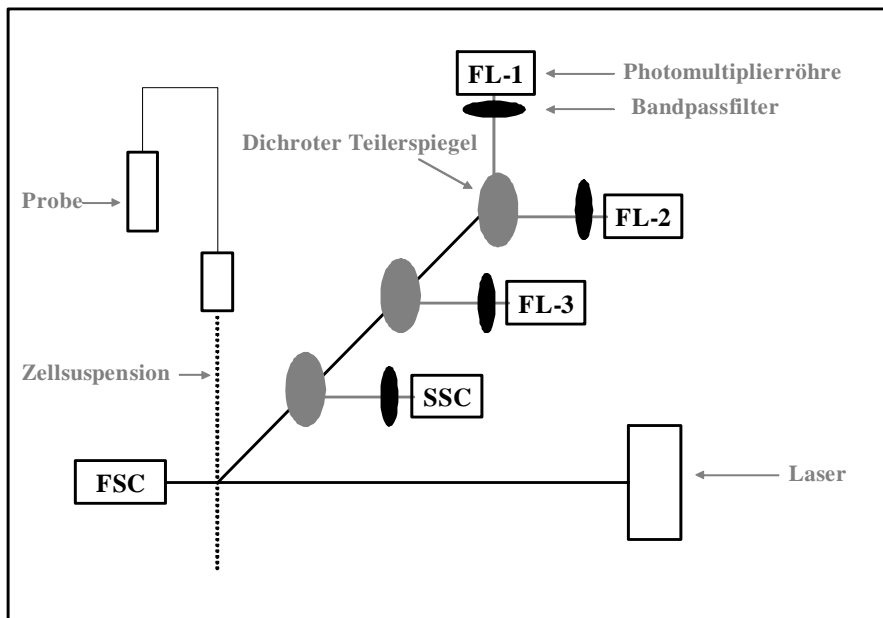


Abbildung 6: Schema Durchflusszytometer - Streuung des Argonlaserlichtes (Laser) durch die perlschnurartig aufgereichte Zellsuspension und Messung der Vorwärtsstreuung (FSC), der Seitwärtsstreuung (SSC) und verschiedener Fluoreszenzen (FL-1 bis FL-3).

Die Messung erfolgte spätestens zwei Stunden nach Ende der Inkubationszeit der Pilzzellen mit BCECF bzw. mit Dihydrorhodamine im Durchflusszytometer (Becton Dickinson) des Instituts für Immunologie und Transplantationsmedizin in Gießen. Die in 500µl PBS gelösten Granulozyten und Pilzzellen wurden hierzu in 5 ml-FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt

3.5.4 Auswertung

3.5.4.1 Phagozytose-Ansatz

Um die Menge der phagozytierten Pilzzellen durch die neutrophilen Granulozyten zu messen, wurde zunächst ein Gate um die Granulozyten festgelegt (siehe Abbildung 7). Nach Aufnahme der angefärbten Pilzzellen in die Granulozyten sollte laut Protokoll der RWTH Aachen (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003k) eine Zunahme der Fluoreszenz FL-1 im Granulozytengate meßbar sein.

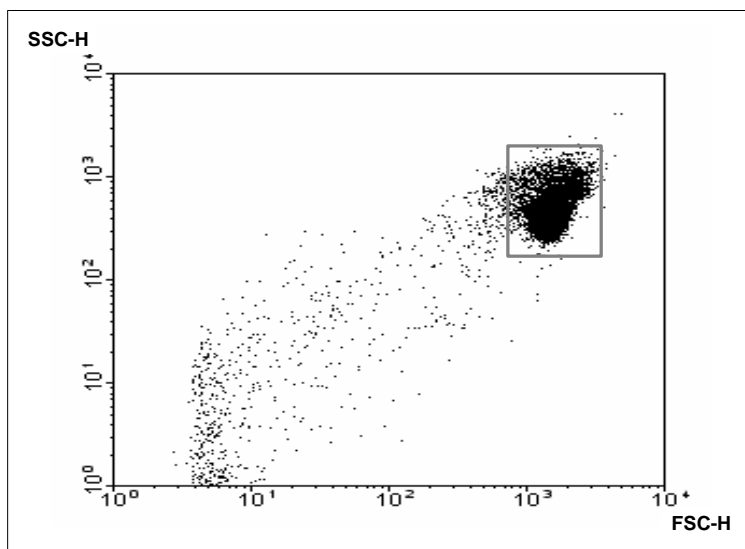


Abbildung 7: Dotplot-Darstellung isolierter neutrophiler humaner Granulozyten mit Gate, Vorwärtsstreulicht (X- Achse) wurde gegen Seitwärtsstreulicht (Y- Achse) aufgetragen.

3.5.4.2 Oxidative Burst

In einer Dotplot-Darstellung wurde die Vorwärtsstreuung als Parameter für die Größe der gemessenen Partikel gegen die Seitwärtsstreuung als Granularitätsparameter aufgetragen. Um die Zunahme der FL-1 durch die Bildung von Rhodamine im Bereich der neutrophilen

Granulozyten zu messen, wurde ein entsprechendes Gate festgelegt. Eine Größenzunahme der Granulozyten nach Phagozytose der Hefezellen erforderte ein großzügig gewähltes Gate.

Alle sogenannten „events“, welche in das Gate fielen, wurden in einer zweiten Darstellung aufgetragen, wobei die Abszisse mit der FL-1 und die Ordinate mit der FSC-H belegt wurden. Das Anlegen von vier Quadranten erfolgte so, daß im oberen linken Quadranten alle neutrophilen Granulozyten zu liegen kamen, die noch keine Sauerstoffradikale gebildet hatten. Dementsprechend fielen in den oberen rechten Quadranten alle Granulozyten, die bereits Radikale gebildet hatten (Abbildung 9). Mit Hilfe des Cellquest-Programms am Durchflusszytometer wurde der geometrische Mittelwert des oberen rechten Quadranten berechnet.

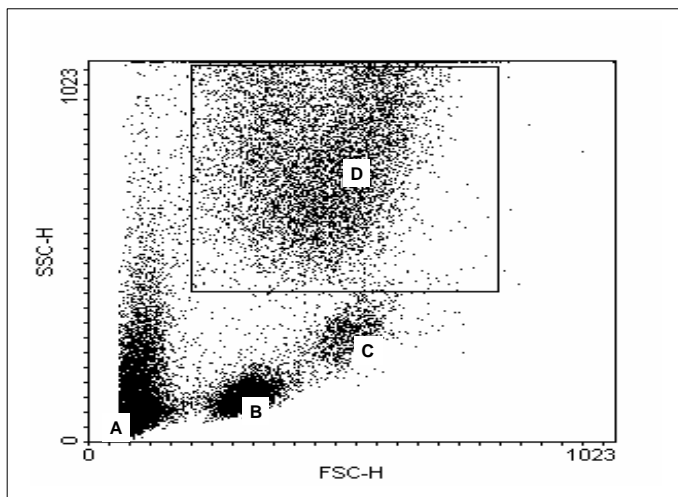


Abbildung 8: Dotplot- Darstellung von lysiertem Vollblut mit Granulozytengate: A=Zelltrümmer, B=Monozyten, C=Lymphozyten, D=Granulozyten

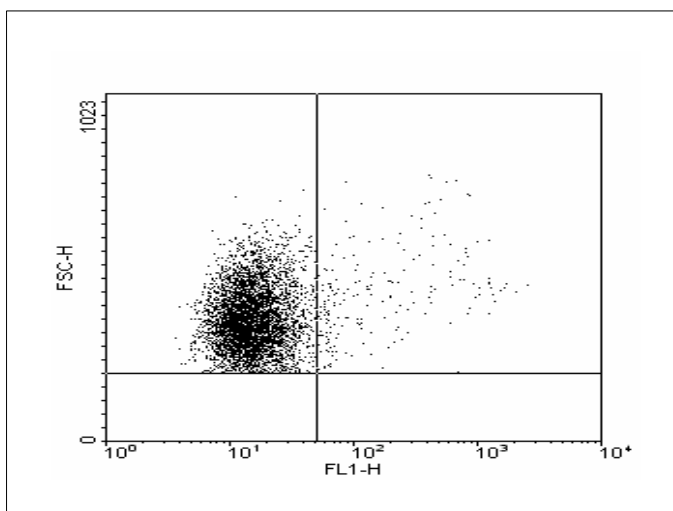


Abbildung 9: Neutrophile Granulozyten aus lysiertem Vollblut

3.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Median \pm Standardabweichung vom Median aus n verschiedenen Messungen dargestellt. Eine Normalverteilung wurde vorausgesetzt und die Daten wurden durch einen zweiseitigen Student-t-Test analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant, und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$ wurde als statistisch hochsignifikant angesehen. Die Erfassung der Daten sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte mit Microsoft Excel 2000.

4 Ergebnisse

4.1 Pigmentisolierung bei *Exophiala dermatitidis*

Zur Pigmentisolierung standen der Wildtyp von *E. dermatitidis* und seine Melaninmangelmutanten Mel-1 und Mel-3 zur Verfügung (Tabelle 1). Bereits nach 3-4 Tagen der vierwöchigen Inkubationszeit zeigte sich eine Braunfärbung des 1b-Minimalagars. Diese Braunfärbung verstärkte sich noch weiter bis zum Ende der Inkubationszeit und sprach für eine intensive Indolalkaloid-Synthese bei *Exophiala dermatitidis*. Desweiteren sprach die vergleichsweise große Menge an 15 ml gewonnenem Rohextrakt aus 190 Agarplatten für eine hohe Syntheseleistung. Bei allen Nährbodenschalen der Spezies konnte eine deutliche gelbgrüne Fluoreszenz im UV-Licht (366 nm) beobachtet werden.

Der melaninbildende Wildtyp, seine zur Synthese von Scytalone und Carotenoiden befähigte Mutante Mel-1, sowie die zur Melaninbildung nicht mehr befähigte Mutante Mel-3 unterschieden sich weder in der Menge an gebildetem Rohextrakt, noch in der Intensität der Braunfärbung.

4.1.1 *Exophiala dermatitidis* Wildtyp (ATCC No.34100)

Nach Auftrennung des Rohextraktes durch Säulenchromatographie konnten fünf verschiedene Fraktionen gewonnen werden. Sie wiesen auf den Kieselgelplatten nach Dünnschichtchromatographie sowohl bei Tageslicht als auch im UV-Licht (254 nm und 366 nm) ein breites Spektrum an unterschiedlichen Banden auf (Abbildung 10 und Abbildung 11). In der vorangegangenen Arbeit von Nies (2006) konnte das bei Tageslicht gelbe Indolderivat Pityriacitrin bei 13 Isolaten von *Exophiala dermatitidis* mittels vergleichender Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. Ein Nachweis im Wildtyp gelang bisher noch nicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gelben Banden mit einem Rf-Wert von 0,19 in den Fraktionen 2,3,4 mittels präparativer Dünnschichtchromatographie weiter aufgereinigt. Die Elutionszeit in der anschließenden HPLC betrug 63-64 Minuten. Wie bereits aus vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Mayser bekannt, ist dies ein Charakteristikum von Pityriacitrin. Somit gelang erstmals der Nachweis dieses Indolderivates im Wildtyp von *E. dermatitidis*.

Eine rote Bande in Fraktion 4 ließ aufgrund ihres errechneten R_f - Wertes von 0,38 und der farblichen Intensität das bereits aus anderen Pilzen bekannte Pityriarubin C vermuten. Sie wurde ebenfalls dünn-schichtchromatographisch weiter aufgereinigt. Bei der anschließenden HPLC betrug die Elutionszeit 85 Minuten, ein Charakteristikum der vermuteten Substanz. Die strukturelle Analyse mittels Spektroskopie in der TU München führte zur erstmaligen Identifizierung von Pityriarubin C bei *Exophiala dermatitidis*.

Die violetten Banden in den Fraktionen 3 und 4 mit einem R_f - Wert von 0,54 wurden ebenfalls mittels präparativer DC und HPLC weiter aufgereinigt und zur Spektroskopie nach München geschickt. Es handelt sich um ein Gemisch aus Exophialin und Desoxyexophialin.

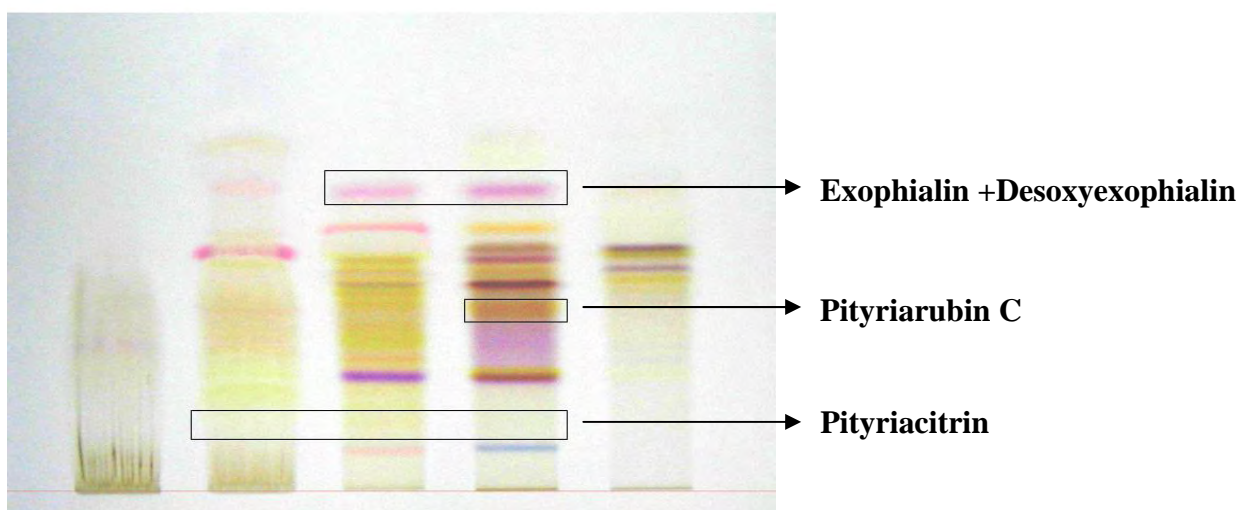


Abbildung 10: DC-Platte Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* (ATCC No.34100) bei Tageslicht

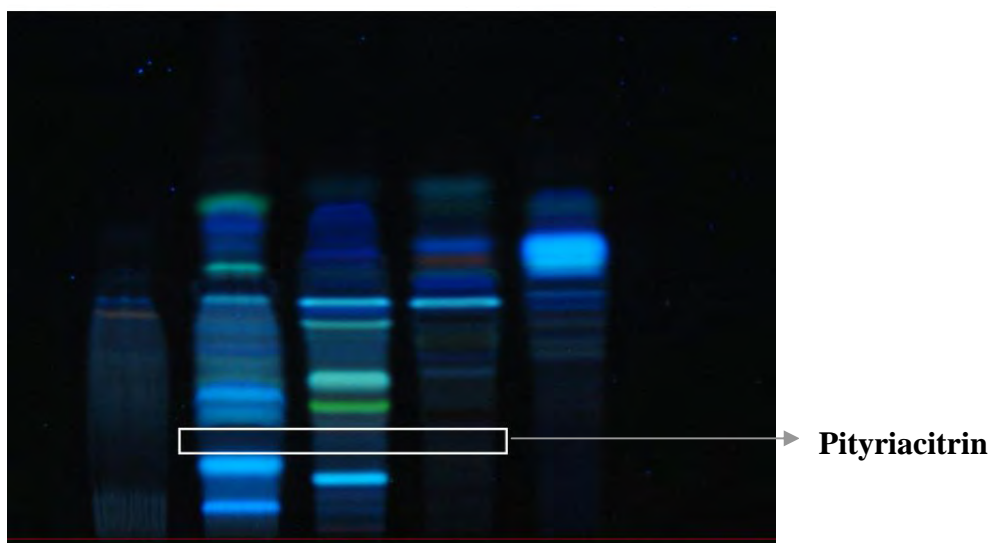


Abbildung 11: DC-Platte Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* (ATCC No.34100) im UV-Licht (366 nm)

4.1.2 *Exophiala dermatitidis* Mel-1 (ATCC No. 44502)

Nach Auftrennung des Rohextraktes durch Säulenchromatographie konnten sieben verschiedene Fraktionen gewonnen werden (Abbildung 12 und Abbildung 13). Sie wiesen auf der DC-Platte bei Tageslicht ein deutlich geringeres Spektrum an Banden im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Banden dieser Mutante sind vorrangig von violetter bzw. gelber Farbe. Das rote Indolderivat Pityriarubin ist auf den DC-Platten nicht zu erkennen.

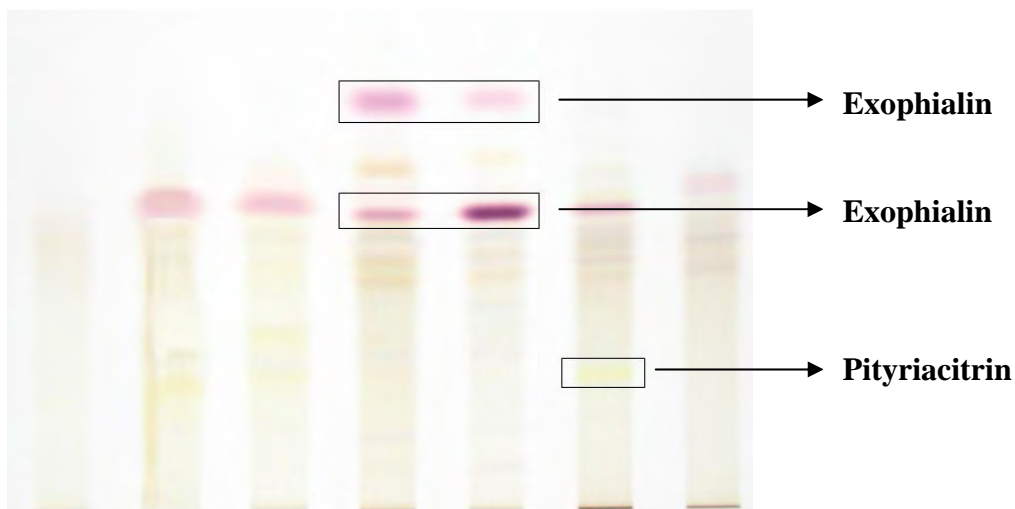


Abbildung 12: DC-Platte von *Exophiala dermatitidis* Mel-1 (ATCC No. 44502) bei Tageslicht

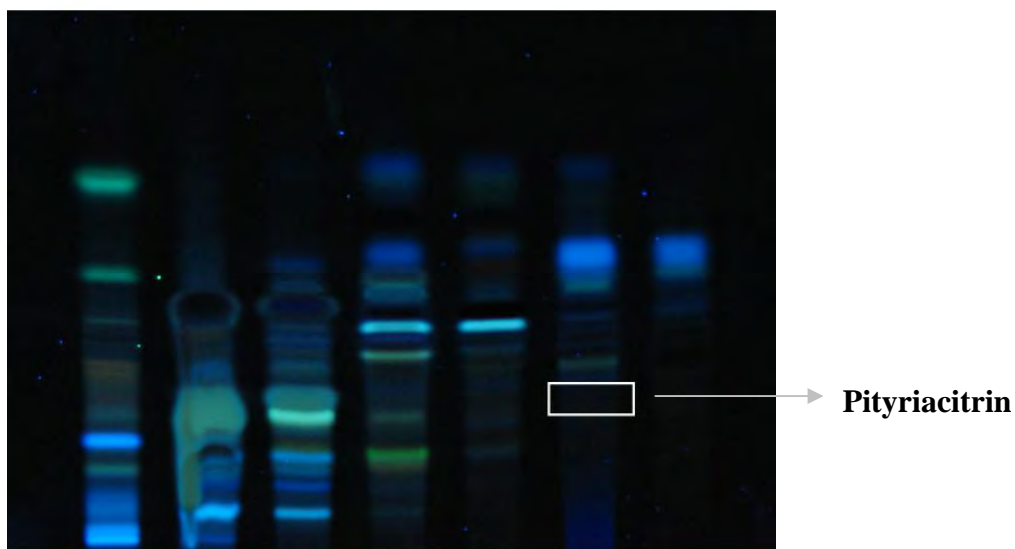


Abbildung 13: DC-Platte von *Exophiala dermatitidis* Mel-1 (ATCC No. 44502) im UV-Licht bei 366 nm

Nies (2006) gelang erstmals der Nachweis von Pityriacitrin bei dieser Mutante mittels vergleichender Dünnschichtchromatographie. Die bei Tageslicht gelbe Substanz mit einem Rf-Wert von 0,23 konnte auch im Rahmen dieser Arbeit aus der Fraktion 6 mittels präparativer Dünnschichtchromatographie aufgereinigt werden. Aufgrund der Elutionszeit von 63-64 Minuten in der HPLC konnte die Synthese der Substanz durch Mel-1 bestätigt werden.

Auch das von Nies (2006) erstmals isolierte violette Exophialin mit einem Rf-Wert von 0,37 aus den Fraktionen 4,5 konnte erneut bestätigt werden. Desweiteren wurden zwei violette Banden aus denselben Fraktionen mit einem Rf-Wert von 0,56 als Exophialin identifiziert.

4.1.3 *Exophiala dermatitidis* Mel-3 (ATCC No. 44504)

Die säulenchromatographische Auftrennung des Rohextraktes der Melanin-freien Mutante führte zur Gewinnung von acht verschiedenen Fraktionen (Abbildung 14 und Abbildung 15). Sie weisen im Vergleich zur Mutante Mel-1 ein vielfältigeres Spektrum an Banden im Tageslicht und im UV-Licht (254 und 366 nm) auf.

Auch hier konnte die von Nies (2006) mittels vergleichender DC bereits identifizierte Substanz Pityriacitrin (Rf= 0,16) in den Fraktionen 3,5 mittels präparativer DC und HPLC bestätigt werden.

Eine auffällig violette Bande in Fraktion 4 mit einem Rf- Wert von 0,56 wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie aufgereinigt. Die Elutionszeit in der HPLC betrug 92 Minuten. Aus diesem Grund konnte Exophialin erstmals in der Mutante Mel-3 von *Exophiala dermatitidis* vermutet werden. Die nachfolgenden Untersuchung mittels Spektroskopie in der TU München bestätigten diesen Verdacht. Exophialin wurde erstmals von Nies (2006) in der Mutante Mel-1 nachgewiesen.

In den Fraktionen 5,6,7 wurden die deutlich roten Banden mit einem Rf-Wert von 0,39 mit den üblichen Verfahren aufbereitet. Aufgrund der Elutionszeit in der HPLC von 85 Minuten konnte das Indolderivat Pityriarubin C erstmals auch in einer Mutante von *Exophiala dermatitidis* nachgewiesen werden.

Zwei weitere rote Banden in den Fraktionen 5,6 mit einem Rf-Wert von 0,19 bzw. 0,29 ließen Pityriarubin A bzw. B vermuten. Der Nachweis in der HPLC war jedoch aufgrund zu geringer Mengen nicht möglich.

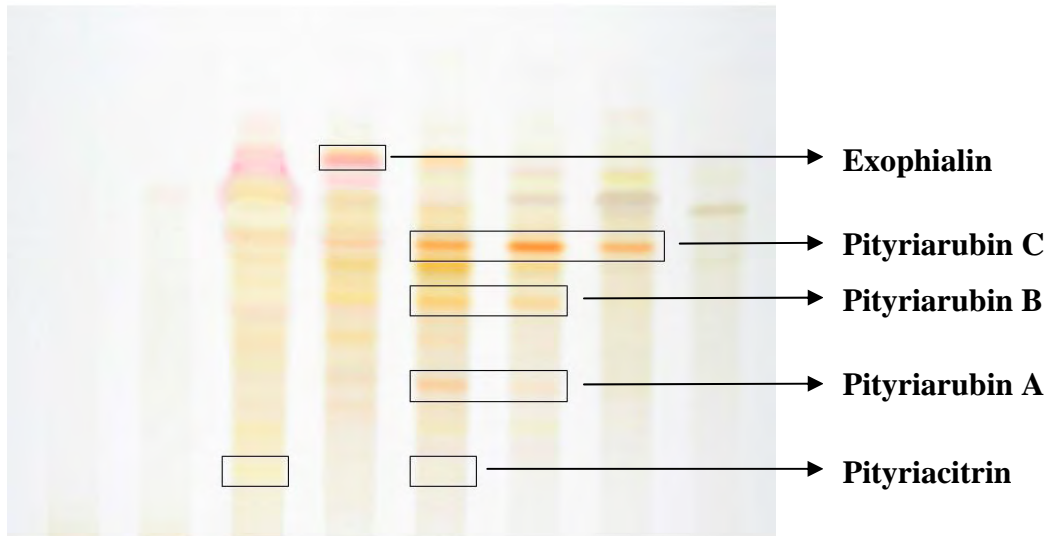


Abbildung 14: DC-Platte von *Exophiala dermatitidis* Mel-3 (ATCC No.44504) bei Tageslicht

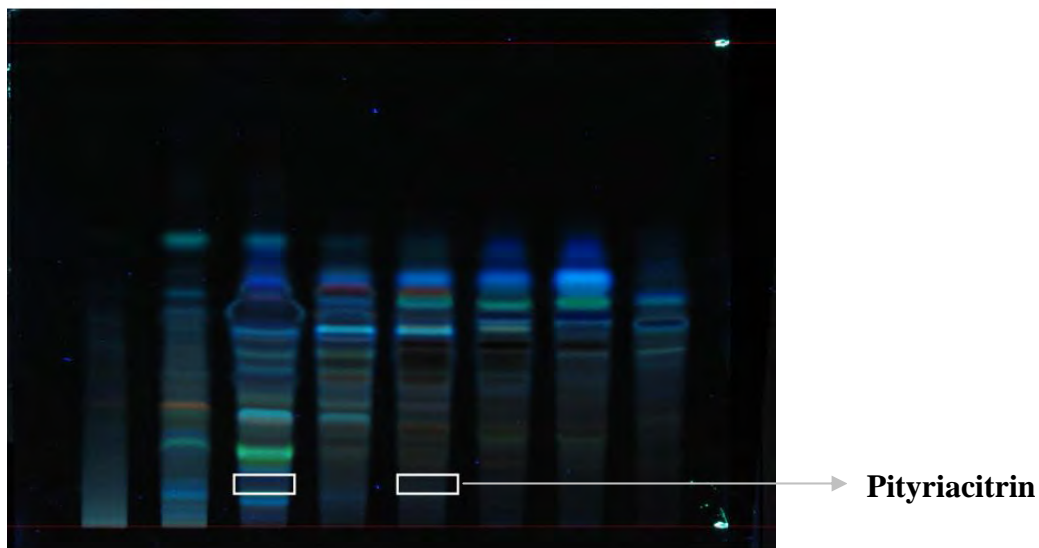


Abbildung 15: DC-Platte von *Exophiala dermatitidis* Mel-3 (ATCC No.44504) im UV-Licht bei 366 nm

4.2 Phagozytose

Zur Phagozytosemessung wurden die Hefezellen von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und Mel-3 mit BCECF-AM angefärbt. Damit eine optimale Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen gewährleistet war, erfolgte zunächst eine Behandlung der Zellen mittels

Ultraschallsonde (Kapitel 3.4.1). Nach intrazellulärer Aufnahme wird BCECF-AM durch eine Esterase zu BCECF hydrolysiert, welches eine grüne Fluoreszenz aufweist. Mit einem Emissionsmaximum von 530-540 nm kann diese grüne Fluoreszenz im FL-1-Kanal des Durchflusszytometers gemessen werden.

4.3 Vorversuche

Es wurde zunächst untersucht, ob sich die Pilzzellen von *Exophiala dermatitidis* gleichmäßig mit BCECF-AM anfärben. Eine gleichmäßige Fluoreszenz der Zellen in ausreichender Intensität ist die Grundvoraussetzung für die Messung der Phagozytose im Durchflusszytometer.

Abbildung 16 zeigt die Histogramme der Pilzzellen vom Wildtyp nach Messung im Durchflusszytometer. Auf der Abszisse ist die FL-1 aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl der gezählten Ereignisse. Im linken Bild ist die Messung von ungefärbten Pilzzellen zu sehen, sie weisen lediglich eine schwache Primärfluoreszenz im FL-1-Kanal auf. Nach Anfärbung der Zellen mit BCECF-AM ist im rechten Bild eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurve zu sehen.

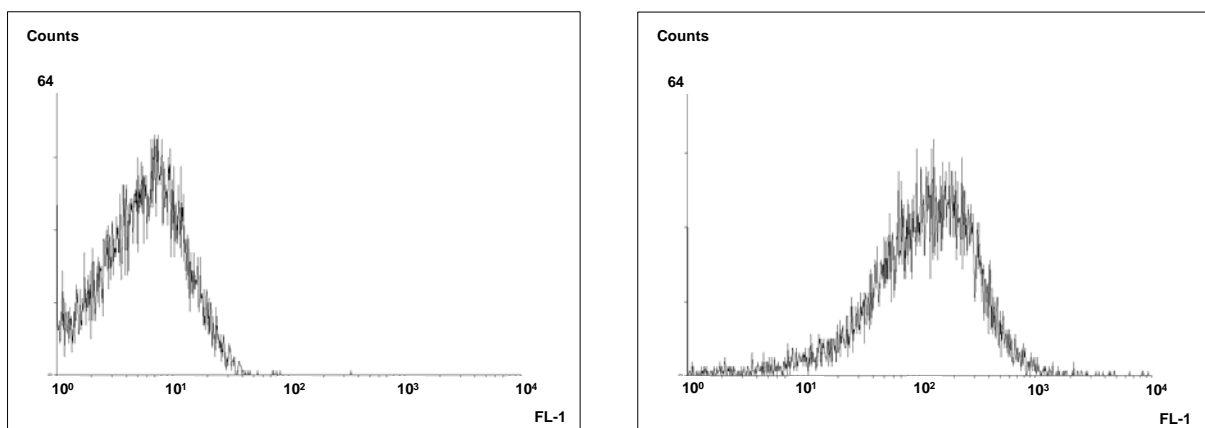


Abbildung 16: Histogramm *E. dermatitidis* Wildtyp ungefärbt (links), nach Anfärben mit BCECF-AM (rechts)

Abbildung 17 zeigt das Histogramm der Zellen der Melaninmangel-Mutante Mel-3. Die Rechtsverschiebung der Kurve nach Anfärben mit BCECF-AM ist noch deutlicher zu erkennen als beim Wildtyp. Hierfür konnte das beim Wildtyp in den Zellmembranen

eingelagerte Melanin verantwortlich gemacht werden, welches die Emission des grünen Farbstoffes beim Wildtyp verringerte.

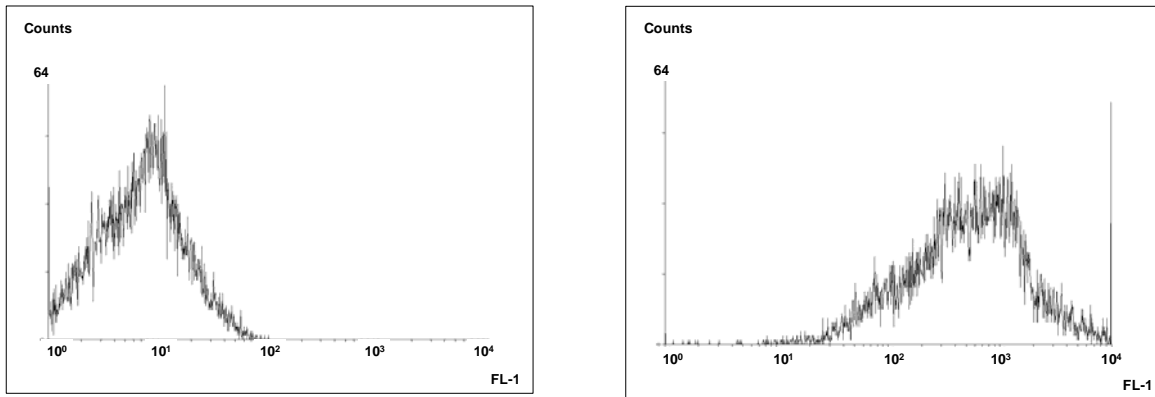


Abbildung 17: Histogramm *E. dermatitidis* Mel-3 ungefärbt (links), nach Anfärben mit BCECF-AM (rechts)

Neben der durchflusszytometrischen Beurteilung der Pilzzellen wurden desweiteren die neutrophilen Granulozyten beurteilt. Sie stammten aus Vollblut-EDTA-Proben aus der Tagesspende des Instituts für Transfusionsmedizin des Uniklinikums Gießen. Die Spender waren stets gesund und in einem Alter zwischen 20-40 Jahren. Eine Einverständniserklärung der Spender zur Verwendung ihres Blutes für Forschungszwecke wurde im Rahmen des Aufnahmebogens zur Blutspende unterschrieben und liegt dem Institut vor.

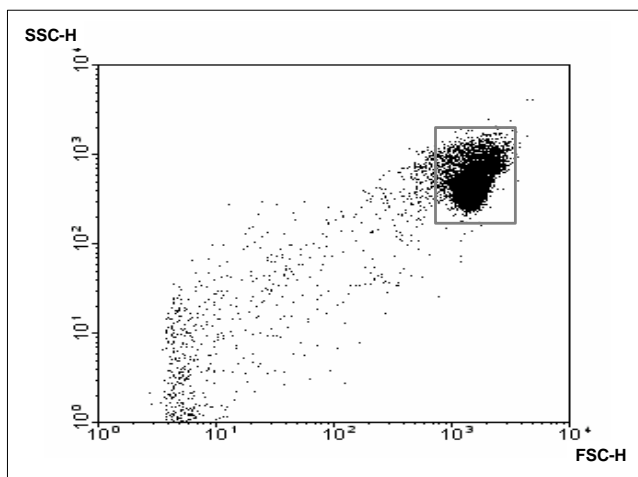


Abbildung 18: Dotplot-Darstellung neutrophiler Granulozyten mit Gate, Vorwärtsstreuung (Abszisse) wurde gegen die Seitwärtsstreuung (Ordinate) aufgetragen

Abbildung 18 zeigt die Dotplot-Darstellung der neutrophilen Granulozyten nach Erythrozytenlyse. Auf der Abszisse ist die Vorwärtstreuung als Maß für die Größe aufgetragen und auf der Ordinate die Seitwärtsstreuung als Maß für die Granularität. Beide Parameter der Zellen sind physiologisch. Alle Zellen außerhalb der kompakten Dotplot-Wolke sind Zelltrümmer. Ihre geringe Anzahl spricht für eine hohe Vitalität der Granulozyten.

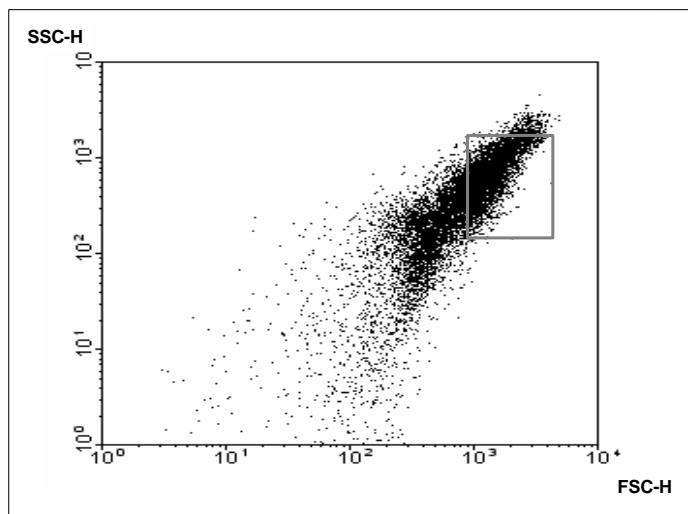


Abbildung 19: Dotplot-Darstellung *E. dermatitidis* Wildtyp mit Granulozyten-Gate (aus Abbildung 18)

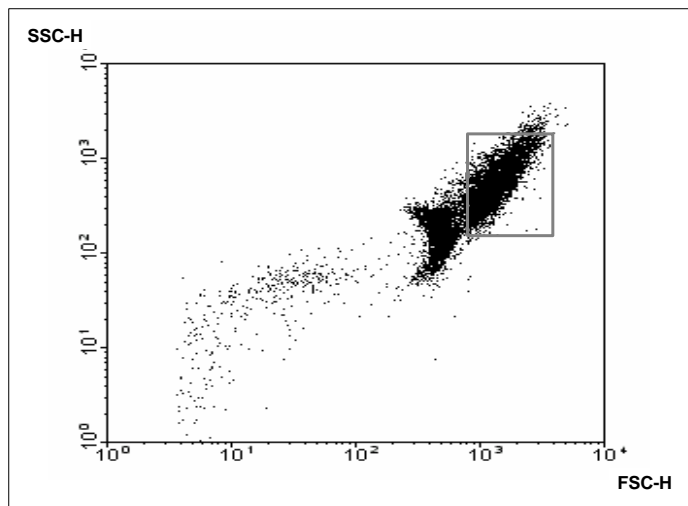


Abbildung 20: Dotplot-Darstellung *E. dermatitidis* Mel-3 mit Granulozyten-Gate (aus Abbildung 18)

Abbildung 19 zeigt die Dotplot-Darstellung der Pilzzellen des Wildtyps mit dem Granulozyten-Gate. Auch hier sind die FSC auf der Abszisse und die SSC auf der Ordinate aufgetragen. Ein Großteil der Population ist von gleicher Größe und Granularität wie die neutrophilen Granulozyten. Auch die Hefezellen der Mutante Mel-3 unterscheiden sich in einer solchen Dotplot-Darstellung nicht von den Zellen des Wildtyps (Abbildung 19 und Abbildung 20). Eine Unterscheidung der Pilzpopulationen von der Population der Granulozyten war somit nicht möglich. Dementsprechend ist die Fluoreszenzzunahme im Granulozytengate kein sinnvoller Parameter für die Phagozytose. Selbst Zellen, die noch nicht phagozytiert wurden, kommen im Granulozytengate zu liegen.

Abbildung 21 zeigt die Dotplotdarstellung neutrophiler Granulozyten nach Erythrozytenlyse. Hierbei wurde die Fluoreszenz gegen die Granularität aufgetragen. Die gefärbten Pilzzellen von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und seiner Mutante Mel-3 stellen sich im selben Bereich dar (Abbildung 22) Eine Unterscheidung der Populationen war demnach auch in dieser Darstellung nicht möglich.

Die Menge der durch die Granulozyten phagozytierten gefärbten Pilzzellen kann nur festgestellt werden, wenn sich die beiden Zellpopulationen anhand der Größe oder der Granularität im Durchflusszytometer unterscheiden lassen. Dies ist bei den Zellen von *Exophiala dermatitidis* und den neutrophilen humanen Granulozyten nicht gegeben. Sie gleichen sich sowohl in der Granularität, als auch in der Größe.

Die grüne Fluoreszenz FL-1 kann demnach sowohl von den gefärbten, noch nicht phagozytierten Pilzzellen stammen, als auch von bereits phagozytierten Pilzzellen nach intrazellulärer Aufnahme in die Granulozyten.

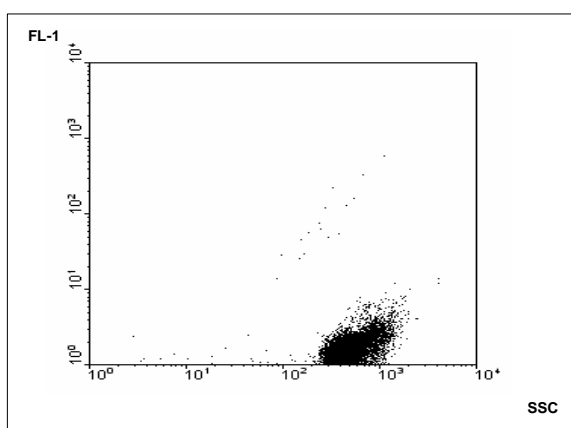


Abbildung 21: Dotplot-Darstellung neutrophile Granulozyten

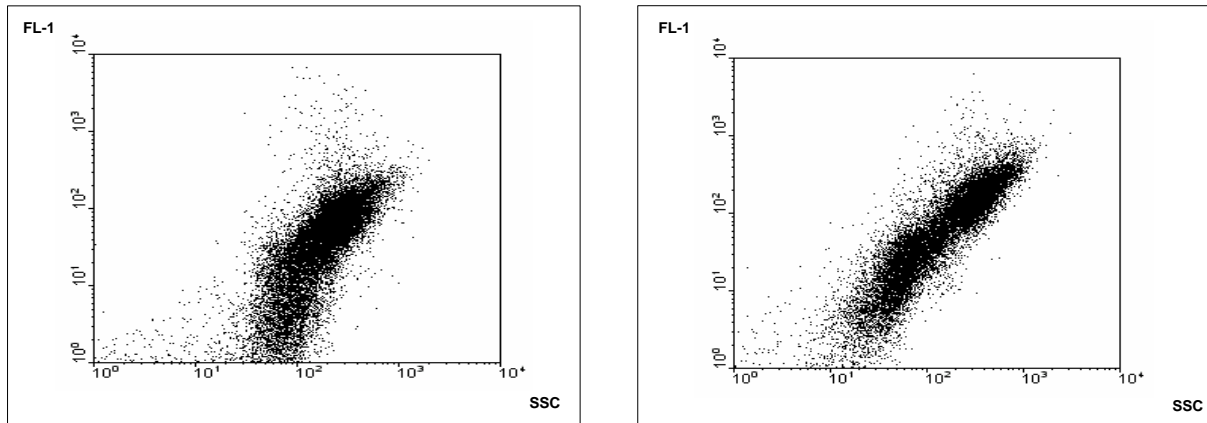


Abbildung 22: Dotplot-Darstellung gefärbter Pilzzellen von *E. dermatitidis* Wildtyp (links) und Mel-3 (rechts)

4.4 Oxidative Burst

Um die Anregung der Sauerstoffradikalbildung durch *Exophiala dermatitidis* in den neutrophilen Granulozyten zu messen, wurden die Hefezellen der Mutante Mel-3 mit humanem Vollblut inkubiert. Als Indikator für den Burst diente Dihydrorhodamine 123, welches durch die gebildeten Sauerstoffradikale zu Rhodamine oxidiert wird. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. In einer Dotplot-Darstellung wurde die Vorwärtstreuung als Parameter für die Größe der gemessenen Partikel gegen die Seitwärtsstreuung als Granularitätsparameter aufgetragen. Nach Erythrozytenlyse des Vollbluts können im Durchflußzytometer drei verschiedenen Zellpopulationen und die Zelltrümmer unterschieden werden (Abbildung 23). Die Granulozyten stellen sich als großflächige Wolke mit hoher Granularität dar, wobei ein Teil der Zellen von *Exophiala dermatitidis* ebenfalls in diese Wolke fallen. Die Monozyten und die Lymphozyten haben eine geringere Granularität als die Granulozyten. Die Zelltrümmer stellen sich als kleine Partikel mit geringer Granularität da.

Um die Zunahme der grünen Fluoreszenz durch die Bildung von Rhodamine im Bereich der neutrophilen Granulozyten zu messen, wurde ein entsprechendes Gate festgelegt. Eine Größenzunahme der Granulozyten nach Phagozytose der Hefezellen erforderte ein großzügig gewähltes Gate.

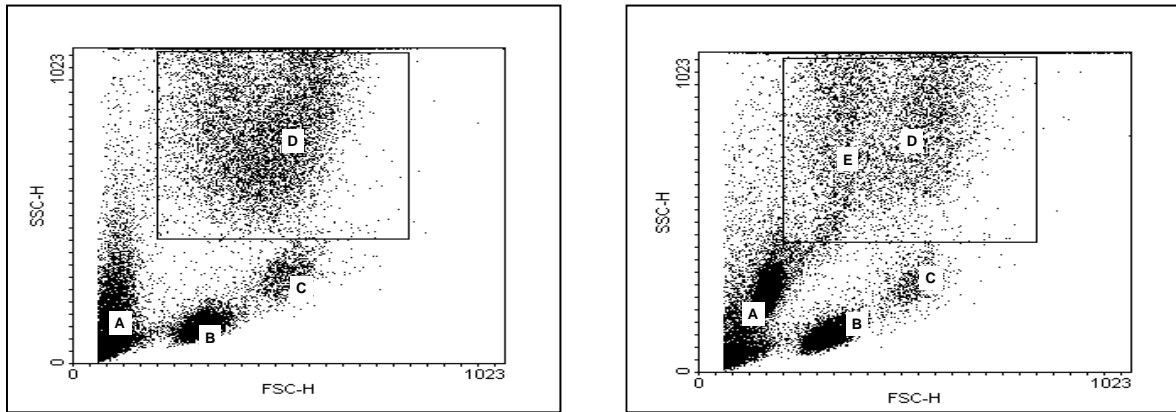


Abbildung 23: Dotplot-Darstellung von lysiertem Vollblut (links) und nach Inkubation mit *E. dermatitidis* Mel-3 (rechts); A=Zelltrümmer, B=Monozyten, C=Lymphozyten, D=Granulozyten, E=*E. dermatitidis* Mel-3

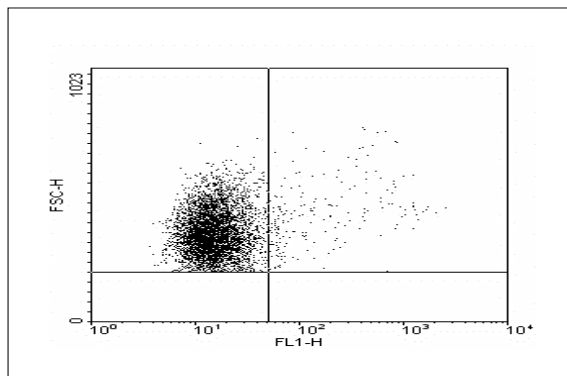


Abbildung 24: Neutrophile Granulozyten aus lysiertem Vollblut

Alle „events“, welche in das Gate fielen, wurden in einer zweiten Darstellung aufgetragen, wobei die Abszisse mit der grünen Fluoreszenz und die Ordinate mit der Vorwärtsstreuung belegt wurden. Wie in

Abbildung 24 zu sehen, fallen die neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt 0 Minuten in den oberen linken Quadranten. Je mehr Sauerstoffradikale gebildet werden, umso weiter verschiebt sich die Population in den oberen rechten Quadranten. Dementsprechend konnte der geometrische Mittelwert des oberen rechten Quadranten als Maß für den Oxidative Burst berechnet werden.

4.4.1 Einfluß der Melaninsynthese auf den Oxidative Burst

In Abbildung 25 ist der geometrische Mittelwert der FL-1 nach 0-10-30-60 Minuten Inkubationszeit dargestellt. Es wurde der Wildtyp mit der Mutante Mel-3 verglichen. Bei beiden Stämmen nahm die FL-1 im Verlauf der Inkubationszeit von 60 Minuten gleichmäßig zu. Das Mittel der Fluoreszenz lag beim Wildtyp in allen Zeitstufen deutlich unter dem Mittel bei der Mutante Mel-3. Der Unterschied zwischen den beiden Stämmen war bereits zum Zeitpunkt 0 Minuten signifikant. Zum Zeitpunkt 10-30-60 Minuten war die Fluoreszenzentwicklung beim Wildtyp hochsignifikant niedriger als bei der Mutante Mel-3. In den Ansätzen mit dem Wildtyp wurden demnach deutlich weniger Sauerstoffradikale gebildet.

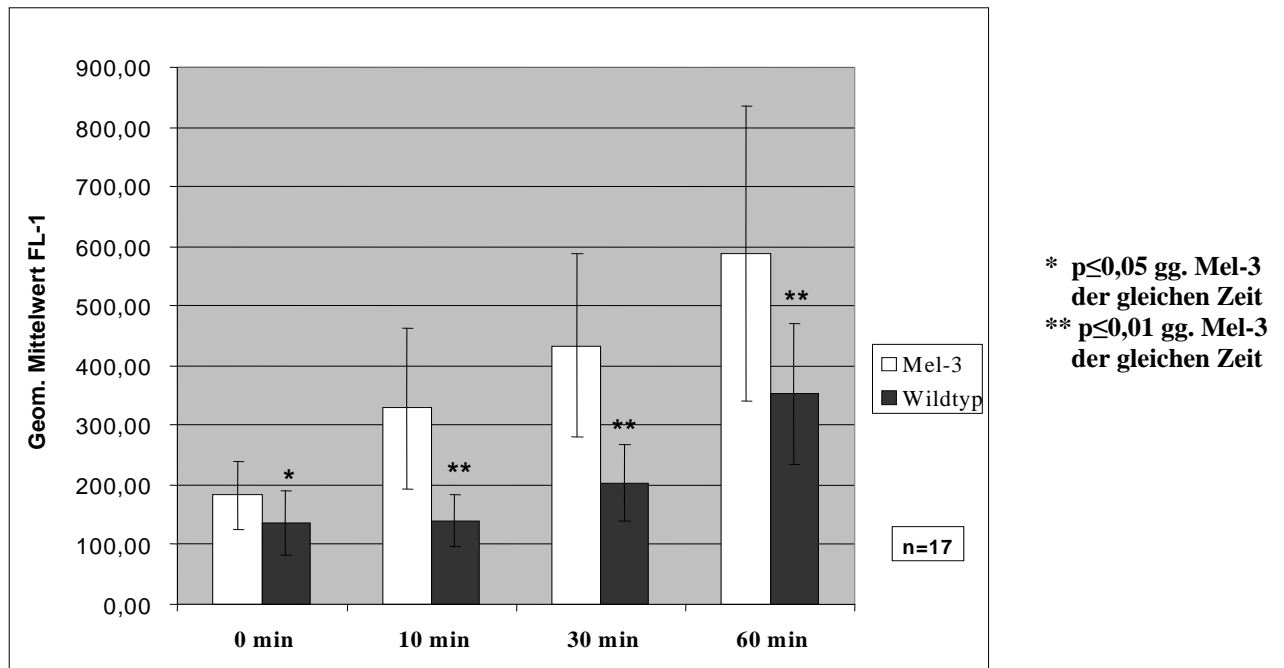


Abbildung 25: Vergleich Oxidative Burst von *E. dermatitidis* Wildtyp und Mel-3

4.4.2 Einfluß von DMSO auf den Oxidative Burst

Alle Pigmente waren für die Versuche zum Oxidative Burst in DMSO gelöst. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von DMSO auf die ROS-Synthese untersucht. Abbildung 26 zeigt den geometrischen Mittelwert der FL-1 im Verlauf der Inkubationszeit von 60 Minuten. Zur Kontrolle wurden allein Zellen der Mutante Mel-3 mit Vollblut inkubiert. Sie wurde dem

gleichen Ansatz unter Zugabe von 50µl DMSO gegenübergestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Proben mit DMSO.

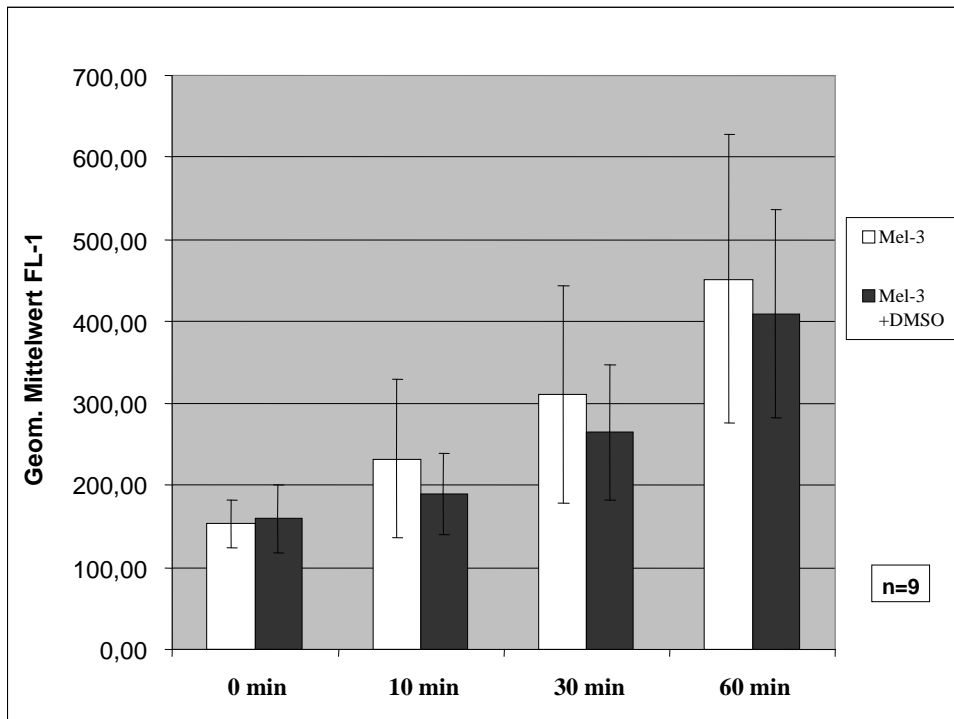


Abbildung 26: Einfluß von DMSO auf den Oxidative Burst

4.4.3 Einfluß der Tryptophan-abgeleiteten Pigmente von *E. dermatitidis* Mel-3 auf den Oxidative Burst

Für alle Versuche zum Einfluß der Tryptophanpigmente auf den Oxidative Burst wurde zur Aktivierung der Granulozyten die Mutante Mel-3 verwendet. Sie synthetisiert im Flüssigmedium für Hefen keine Indolderivate. Desweiteren ist sie nicht zur Melaninsynthese befähigt und kann sich im Vergleich zum Wildtyp schlechter vor dem Burst schützen. Aus diesem Grund diente die Burstaktivität in den neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit diesem Stamm stets als Kontrolle. Die Tryptophanpigmente wurden in Form von Rohextrakten, als Sephadex-Fractionen, Banden der DC-Platten und in Reinform hinzugegeben.

4.4.3.1 Einfluß der Rohextrakte auf den Oxidative Burst

Die Rohextrakte von jeweils 190 Agarplatten von *E. dermatitidis* Wildtyp, Mel-1, Mel-3 und Mel-4 wurden in DMSO gelöst. In den einzelnen Untersuchungen wurden jeweils 50µl dieser Pigmentgemische hinzu gegeben.

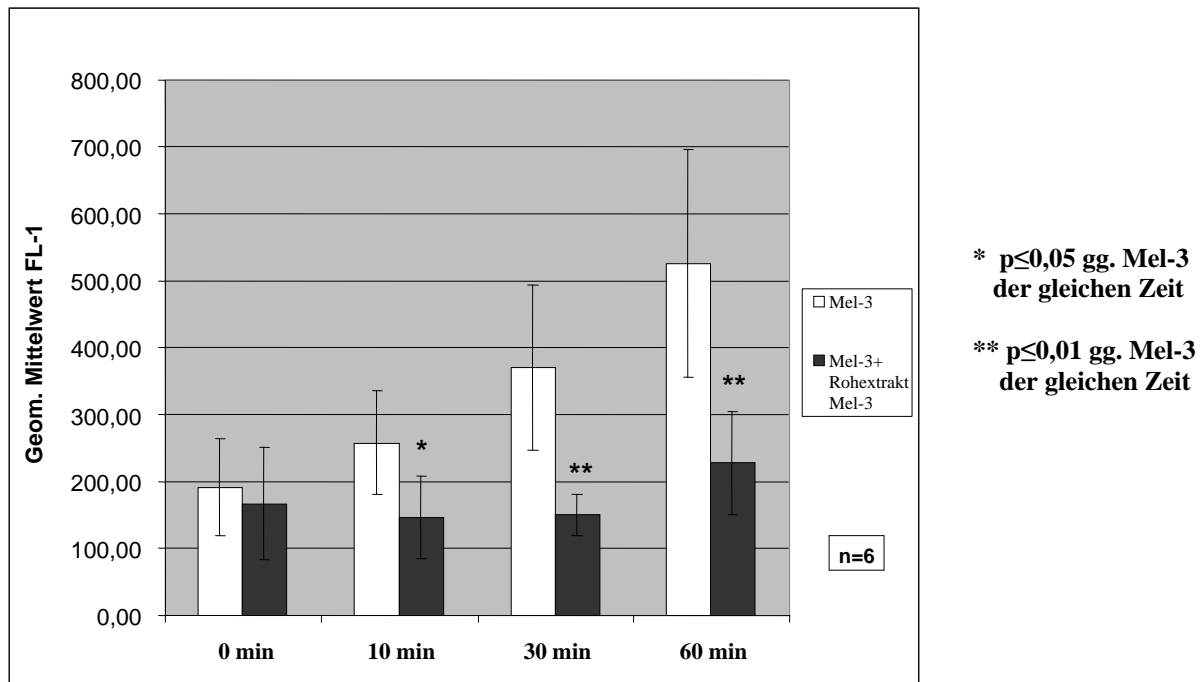


Abbildung 27: Einfluss von *Exophiala dermatitidis* Rohextrakt Mel-3 auf den Oxidative Burst

Abbildung 27 zeigt den geometrischen Mittelwert der grünen Fluoreszenz im Verlauf von 60 Minuten Inkubationszeit. Es wurde der Einfluss des Rohextraktes von Mel-3 mit der Kontrolle verglichen. Sowohl bei der Kontrolle, als auch in den Ansätzen mit 50µl Rohextrakt der Mutante Mel-3 war eine Zunahme der Fluoreszenz FL-1 im Verlaufe der Inkubationszeit zu beobachten. Während der ersten Sekunden der Inkubationszeit zeigte die Fluoreszenz in den neutrophilen Granulozyten in beiden Ansätzen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 27). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bereits nach 10 Minuten Inkubationszeit. Die Bildung von Rhodamine in den Proben mit Rohextrakt war im Vergleich zur Kontrolle wesentlich geringer. Dies spricht für eine schnell wirksame Schutzfunktion der im Rohextrakt enthaltenen Tryptophanpigmente vor der ROS-Synthese.

In den nächsten Zeitstufen nach 30 und 60 Minuten Inkubationszeit nahm der geometrische Mittelwert der FL-1 in den Proben mit Rohextrakt nur noch geringfügig zu. Im Gegensatz

dazu stieg die Fluoreszenz in den Referenzmessungen proportional zur verstreichenden Zeit. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsansätzen war nach 30 und 60 Minuten Inkubationszeit hochsignifikant.

Abbildung 28 zeigt exemplarisch die Dotplot-Darstellungen von Mel-3 ohne und mit Rohextrakt im zeitlichen Verlauf. Es wurde die Fluoreszenz gegen die Größe der gemessenen Partikel aufgetragen. Bereits zum Zeitpunkt 0 Minuten war in beiden Proben eine Rechtsverschiebung der Zellpopulation zu sehen. Die Bildung der Sauerstoffradikale lief demnach schon innerhalb weniger Sekunden ab und führte zur Bildung von Rhodamine. Bereits nach 10 Minuten Inkubationszeit wurde der Unterschied zwischen den beiden Proben deutlich. In der Probe ohne Rohextrakt fluoreszierten nahezu alle Granulozyten, während in der Probe mit Rohextrakt deutlich weniger Rhodamine gebildet wurde. Dieser Unterschied verstärkte sich im weiteren zeitlichen Verlauf noch.

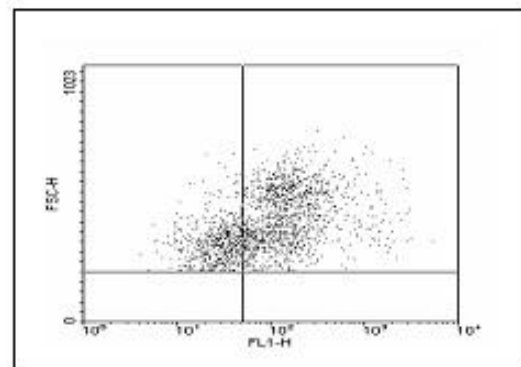
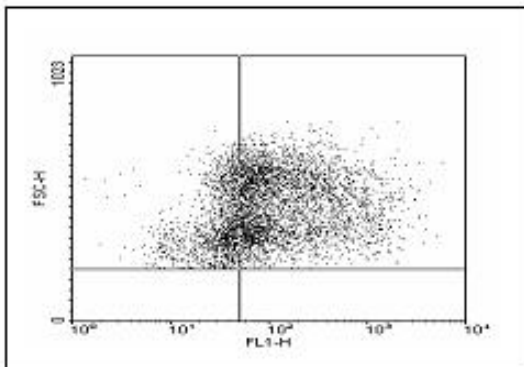
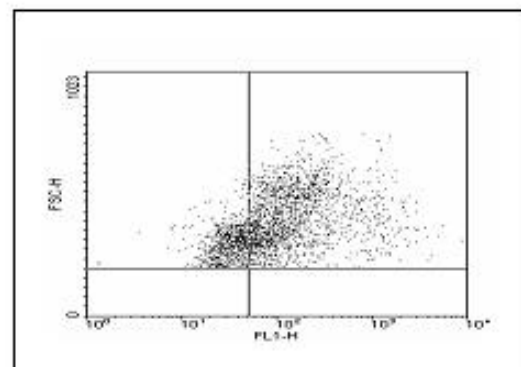
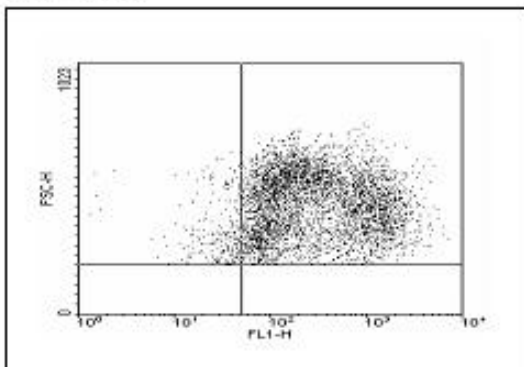
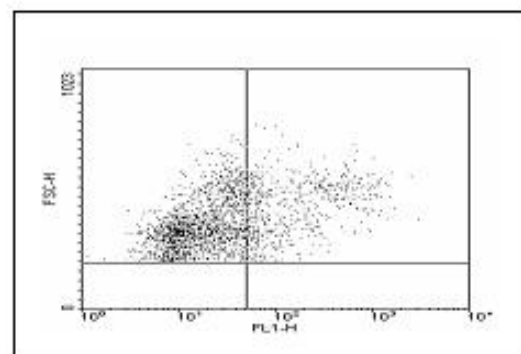
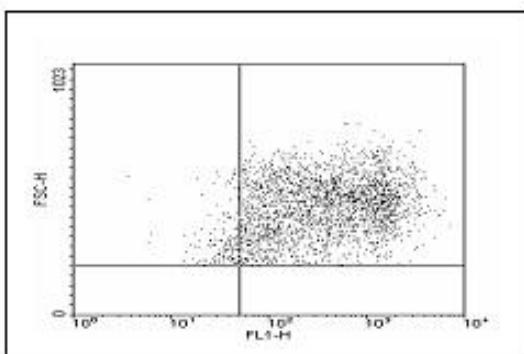
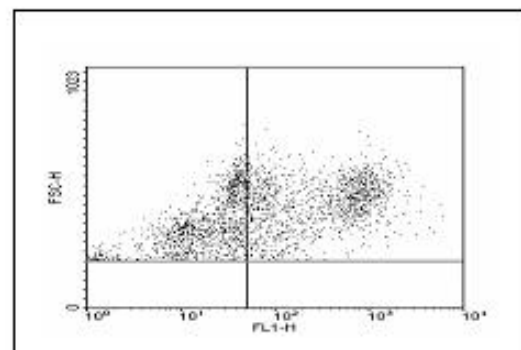
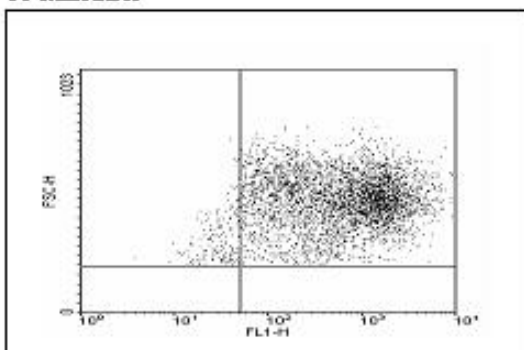
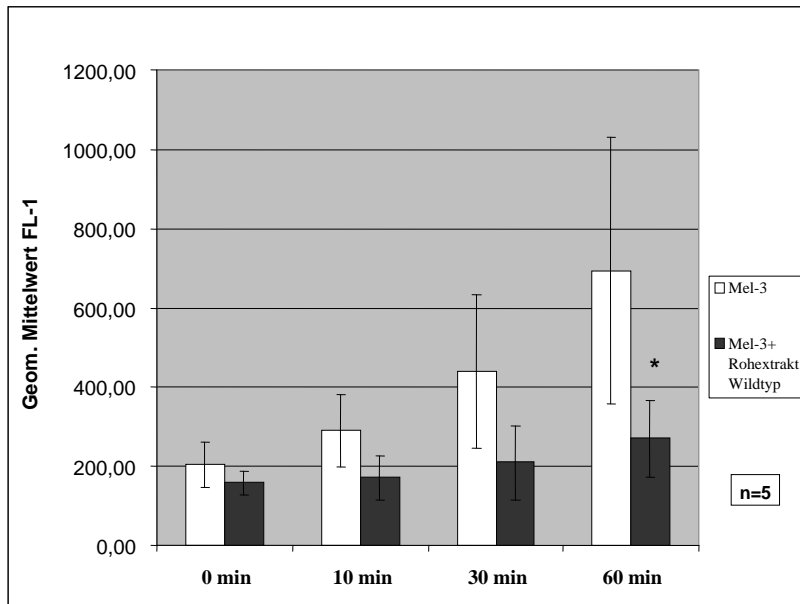
0 Minuten**10 Minuten****30 Minuten****60 Minuten**

Abbildung 28: Ablauf des Oxidative Burst nach Aktivierung durch Zellen der Mutante Mel-3 ohne Schutz durch den Rohextrakt Mel-3 (links) und mit Schutz durch den Rohextrakt Mel-3 (rechts) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-10-30-60 Minuten)



* $p \leq 0,05$ gg. Mel-3 der gleichen Zeit

** $p \leq 0,01$ gg. Mel-3 der gleichen Zeit

Abbildung 29: Ablauf des Oxidative Burst nach Aktivierung durch Zellen der Mutante Mel-3 ohne Schutz durch den Rohextrakt des Wildtyps (Balken hell) und mit Schutz durch den Rohextrakt des Wildtyps (Balken dunkel) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-10-30-60 Minuten)

Der Rohextrakt des Wildtyps hemmte die Bildung von Rhodamine wie in Abbildung 29 zu sehen, ebenfalls in allen Zeitstufen. Allerdings konnte nur nach 60 Minuten Inkubationszeit ein signifikanter Unterschied zum Referenzansatz festgestellt werden.

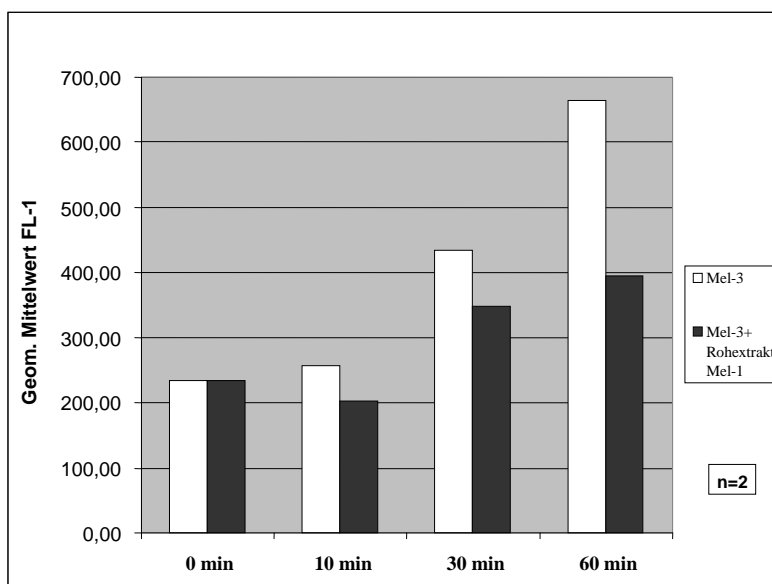


Abbildung 30: Ablauf des Oxidative Burst nach Aktivierung durch Zellen der Mutante Mel-3 ohne Schutz durch den Rohextrakt Mel-1 (Balken hell) und mit Schutz durch den Rohextrakt Mel-1 (Balken dunkel) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-10-30-60 Minuten)

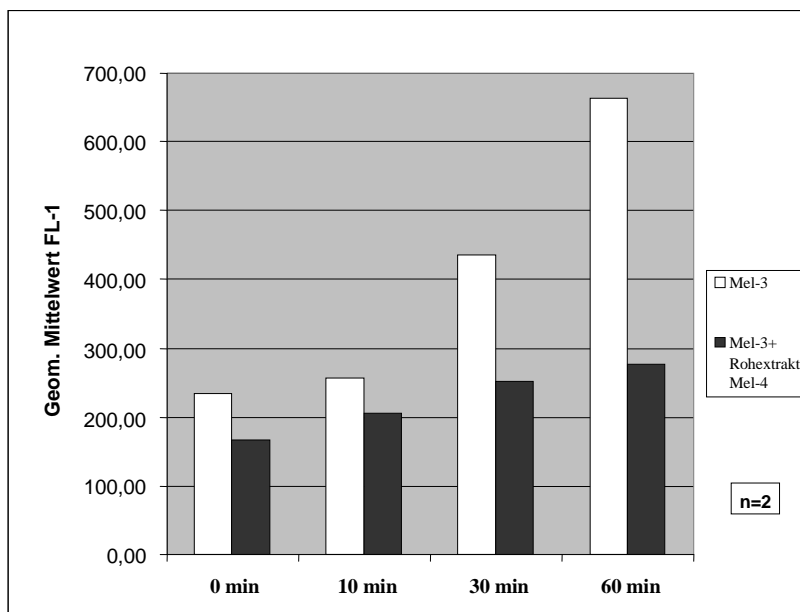


Abbildung 31: Ablauf des Oxidative Burst nach Aktivierung durch Zellen der Mutante Mel-3 ohne Schutz durch den Rohextrakt Mel-4 (Balken hell) und mit Schutz durch den Rohextrakt Mel-4 (Balken dunkel) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-10-30-60 Minuten)

In zwei Versuchsreihen mit den Rohextrakten der Mutanten Mel-1 und Mel-4 von *Exophiala dermatitidis* zeigte sich eine Tendenz in allen Zeitstufen, die Sauerstoffradikalbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu unterdrücken (Abbildung 30 und Abbildung 31).

4.4.3.2 Einfluß der Sephadex-Fractionen auf den Oxidative Burst

Die aus dem hoch wirksamen Rohextrakt von *E. dermatitidis* Mel-3 mittels Säulenchromatographie weiter aufgereinigten und so gewonnenen Einzelfractionen wurden in DMSO gelöst. Es wurden jeweils 50µl dieser Einzelfractionen zum Gesamtansatz mit Mel-3 hinzugefügt, um ihre Auswirkung auf die ROS- Synthese zu untersuchen.

Abbildung 32 zeigt den geometrischen Mittelwert der grünen Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0-60 Minuten. Insgesamt wurde der Einfluß der Pigmentgemische der Fractionen 1-8 auf die Bildung von Rhodamine untersucht und mit der üblichen Kontrolle verglichen. Die Bildung von Rhodamine war in den Proben mit den Fractionen 2,6,7 bereits nach 0 Minuten deutlich niedriger als bei der Kontrolle. Dieser Unterschied war in den Proben mit Pigmentgemisch der Fraction 2 hochsignifikant.

Nach 10 Minuten Inkubationszeit unterschieden sich die Fractionen eins und sechs signifikant, die Fraction zwei hochsignifikant von der Kontrolle. Nach 30 Minuten wurde die

Bildung von Rhodamine durch die Fraktionen zwei und sechs hochsignifikant unterdrückt. Der Unterschied zwischen den Referenzmessungen und den Fraktionen eins und sieben war in dieser Zeitstufe signifikant.

Nach 60 Minuten unterdrückten die Sephadex- Fraktionen 1,2,4,5,6,7 den Oxidative Burst hochsignifikant. Die Fraktionen drei und acht zeigten in keiner Zeitstufe eine signifikante Hemmung der Rhodaminbildung.

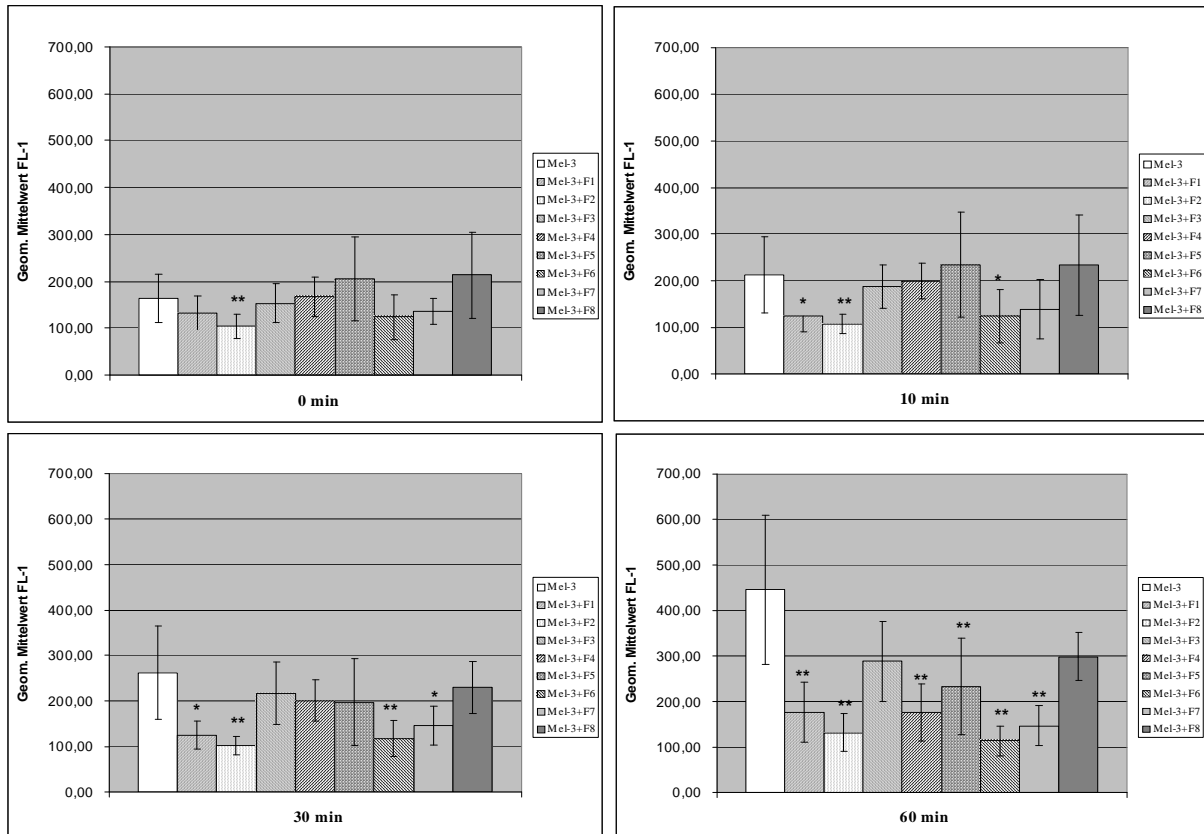


Abbildung 32: Ablauf des Oxidative Burst nach Aktivierung durch *E.dermatitidis*-Zellen der Mutante Mel-3 ohne Schutz durch die Fraktionen F1-F8 Mel-3 (Balken1 hell) und mit Schutz durch F1-F8 (Balken 2-9) nach 0 – 60 Minuten Inkubationszeit. (n=8; *=p<0,05; **=p<0,01)

Die Fraktionen zwei und sechs von *E. dermatitidis* Mel-3 zeigten in allen Zeitstufen die stärkste Unterdrückung der Bildung von Rhodamine im Vergleich zur Kontrolle. Die Inhaltsstoffe dieser Fraktionen erwiesen sich als die potentesten Hemmstoffe der ROS-Synthese in den neutrophilen Granulozyten. Die Unterdrückung durch die darin enthaltenen Substanzen fand bereits nach wenigen Sekunden der Inkubation statt. Eine toxische Wirkung

der Fraktionen konnte ausgeschlossen werden, da die Zellen sowohl mikroskopisch, als auch in der Dot-Plot- Darstellung unverändert waren.

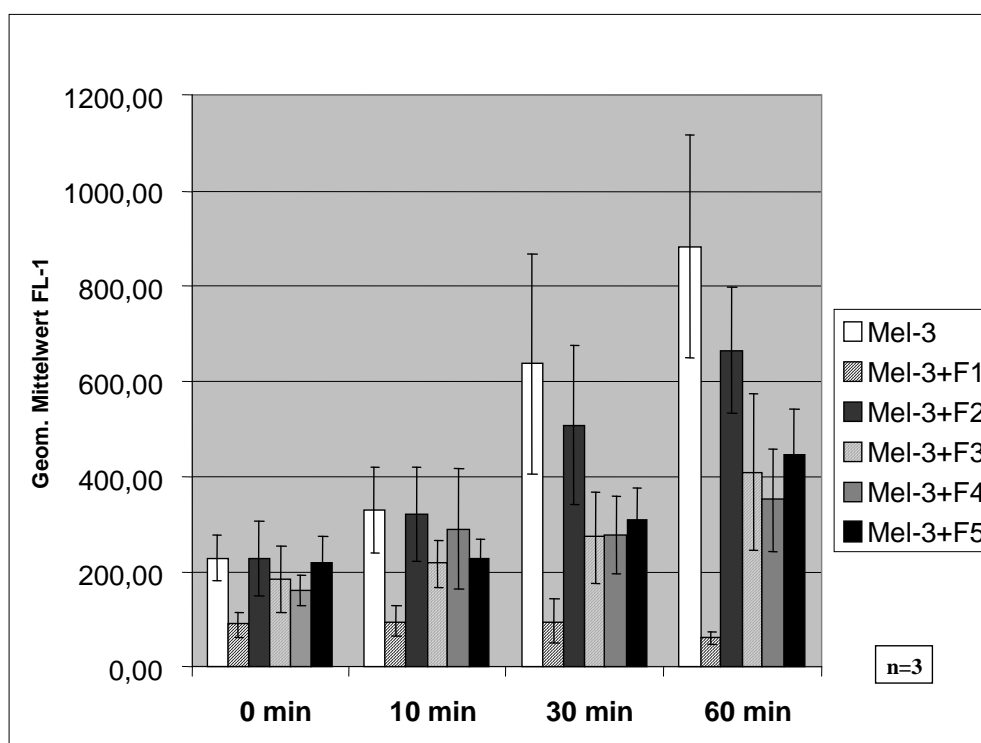


Abbildung 33: Ablauf des Oxidative Burst nach Aktivierung durch *E.dermatitidis*-Zellen der Mutante Mel-3 ohne Schutz durch die Fraktionen F1-F5 Wildtyp (Balken 1 hell) und mit Schutz durch F1-F5 (Balken 2-6) nach 0,10,30,60 Minuten Inkubationszeit

Da sich das Pigmentgemisch des *E. dermatitidis* Wildtyps im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als potenter Hemmstoff des Oxidative Burst erwiesen hat, wurden die fünf Einzelfraktionen wie oben beschrieben, getestet (Abbildung 33). Die Zugabe der Fraktion eins verhinderte nahezu vollständig die Synthese von Sauerstoffradikalen. Die Fraktionen drei bis fünf führten ebenfalls zu einer starken Hemmung des Oxidative Burst, Fraktion zwei hatte nur einen mäßigen Einfluss.

4.4.3.3 Einfluß der DC-Banden von Mel-3 auf den Oxidative Burst

Die Fraktion 6 (Mel-3) wurde, wie in Abbildung 34 zu sehen, in Banden von 1 cm Länge aufgeteilt. Diese Banden wurden nach Aufbereitung hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Bildung von Rhodamine im Vollblutansatz untersucht. Dieses Verfahren diente zur Annäherung an die potenten Hemmstoffe des Oxidative Burst.



Abbildung 34: Unterteilung der Sephadex- Fraktion F6 der Mutante Mel-3 in einzelne Banden B1-B8

Abbildung 35 zeigt den geometrischen Mittelwert der FL-1 im zeitlichen Verlauf von 60 Minuten Inkubationszeit. Die Inhaltsstoffe der Banden 5-8 hemmten deutlich die Zunahme der grünen Fluoreszenz in allen Zeitstufen. Die einzige bekannte Substanz im Bereich dieser Banden ist das Pityriarubin C in Bande 6. In Bande 7 fiel neben zahlreichen Fluorochromen eine unbekannt prominente Bande von grauer Farbe (Anthrazit) im Tageslicht mit einem errechneten Rf- Wert von 0,50 auf. Bereits in verschwindend geringen Mengen erwies sich die in dieser Bande enthaltene Substanz als potenter Inhibitor des Oxidative Burst. Eine toxische Wirkung konnte nach mikroskopischer Kontrolle der Morphologie der Leukozyten ausgeschlossen werden. Zur erwünschten Identifikation dieses neuen Pigments und für weitere Messungen seiner Wirkung wurden 800 Tryptophanagar-Platten der Mutante Mel-3 angezüchtet und die graue Substanz wurde mittels präparativer DC aufgereinigt. In der HPLC konnte die Substanz weiter aufgetrennt werden. Die anschließende Zugabe der aufgereinigten Substanz zum Vollblutansatz führte zu einer deutlichen Unterdrückung der Bildung von Rhodamine im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 36) Eine weitere Analyse des hoch wirksamen Stoffes in der TU München und weitere Messungen am Durchflusszytometer waren jedoch aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

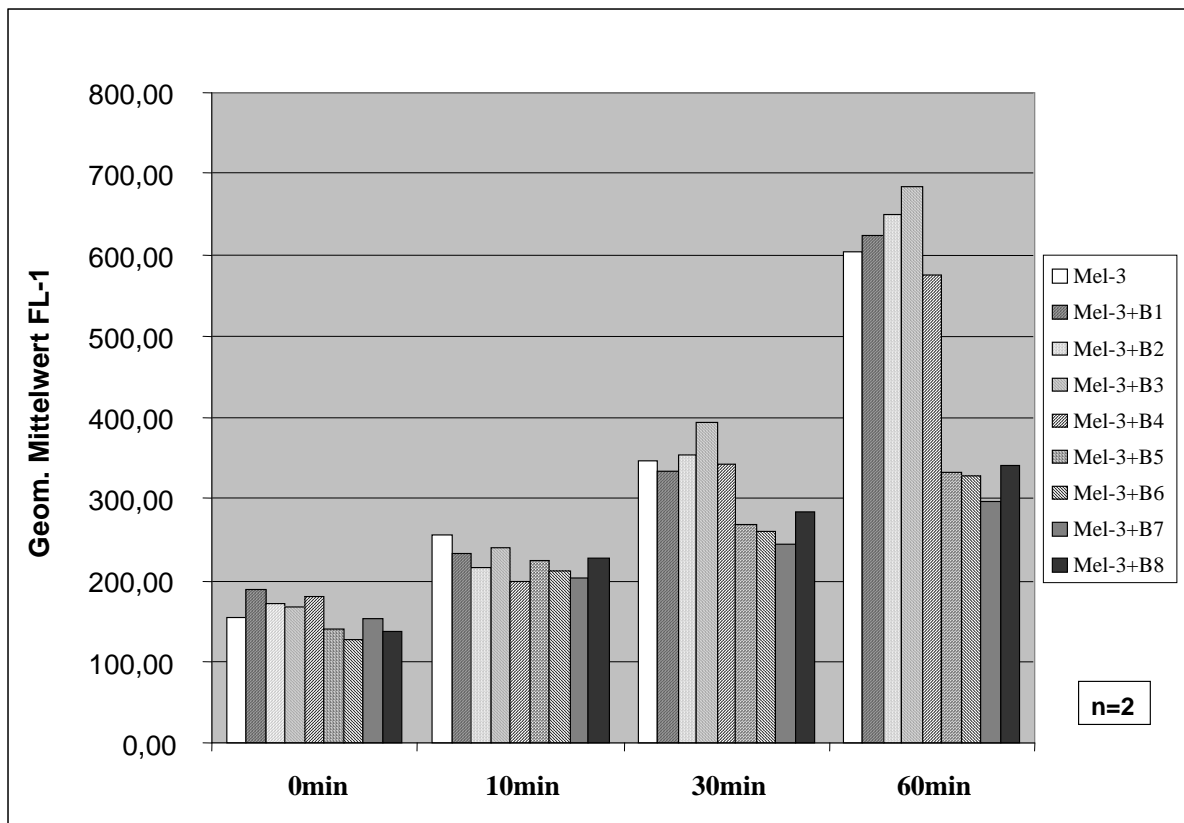


Abbildung 35: Ablauf des Oxidative Burst nach Aktivierung durch *E.dermatitidis*-Zellen der Mutante Mel-3 ohne Schutz durch die Banden B1-B8 der F6 Mel-3 (Balken 1 hell) und mit Schutz durch B1-B8 (Balken 2-9) nach unterschiedlicher Inkubationszeit (0-10-30-60 Minuten)

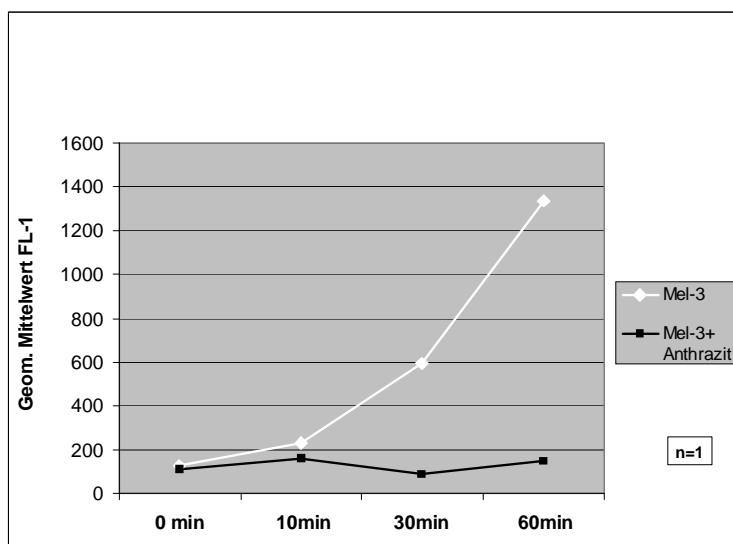


Abbildung 36: Einfluß der aus Fraktion F6 der *E.dermatitidis*-Mutante Mel-3 gewonnenen grauen Substanz (Rf 0 0,50) auf den Oxidative Burst

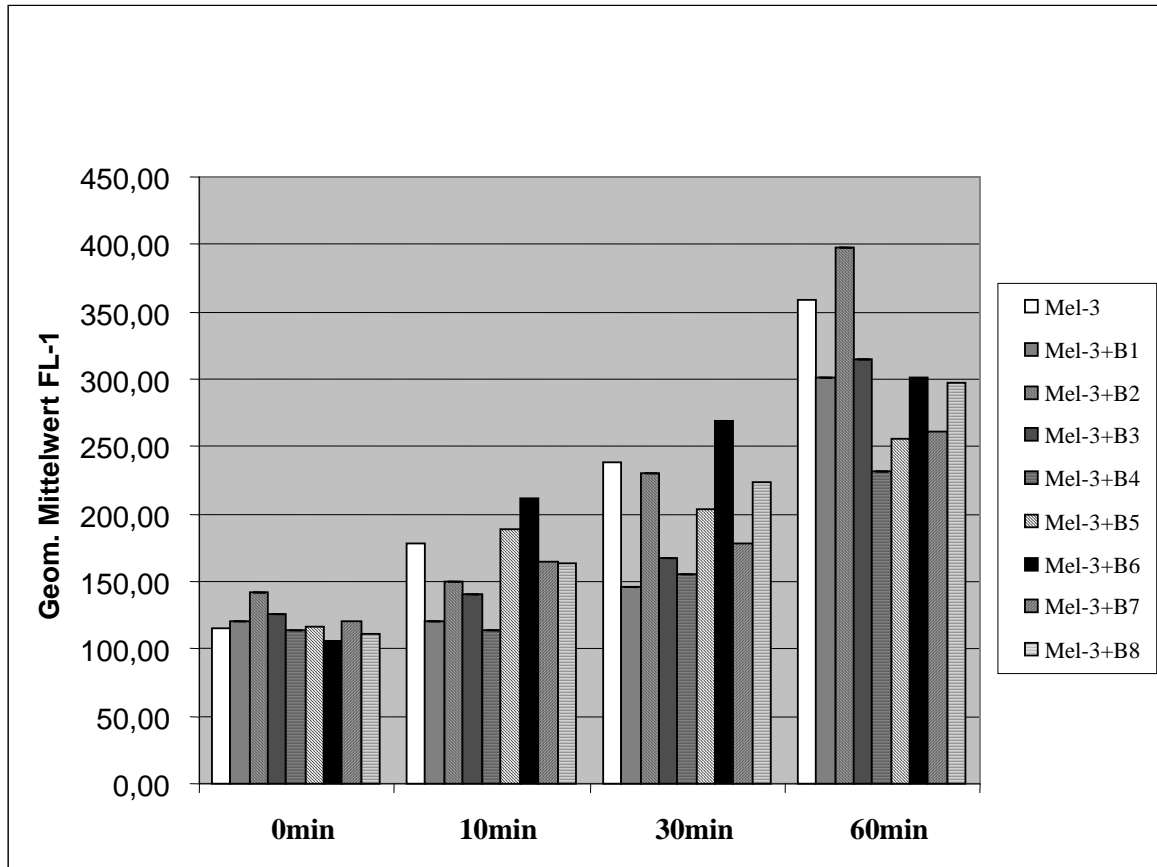


Abbildung 37: Ablauf des Oxidative Burst nach Aktivierung durch *E.dermatitidis*-Zellen der Mutante Mel-3 ohne Schutz durch die Banden B1-B8 der F2 Mel-3 (Balken1 hell) und mit Schutz durch B1-B8 (Balken 2-9) nach unterschiedlicher Inkubationszeit (0-10-30-60 Minuten)

Neben dem Einfluß der Banden B1-B8 der Fraktion F6 (Mel-3) wurden die Banden der Fraktion F2 (Mel-3) in einem einmaligen Versuch untersucht. Abbildung 37 zeigt den geometrischen Mittelwert der FL-1 im zeitlichen Verlauf von 60 Minuten Inkubationszeit. Die Inhaltsstoffe der Banden 1,4,5 hemmten die Zunahme der grünen Fluoreszenz in allen Zeitstufen.

4.4.3.4 Einfluß der Reinsubstanzen auf den Oxidative Burst

Von weiterem Interesse hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Burst waren die bereits bekannten Substanzen Pityriarubin C, Exophialin und Malassezin.

Für Pityriarubin C war bereits in einer vorangegangenen Arbeit im Modell ein Einfluß auf die ROS- Synthese gezeigt worden (Kramer et al. 2005). Eine mögliche Hemmung der ROS- Synthese des Indolderivats im Vollblutansatz wurde bisher noch nicht untersucht. Die Wirkung des in großen Mengen von *Exophiala dermatitidis* synthetisierten Exophialins ist

bislang noch völlig ungeklärt. Das erstmals in *Malassezia* entdeckte Pigment Malassezin führte zu Apoptose in humanen Melanozyten (Kramer et al. 2005).

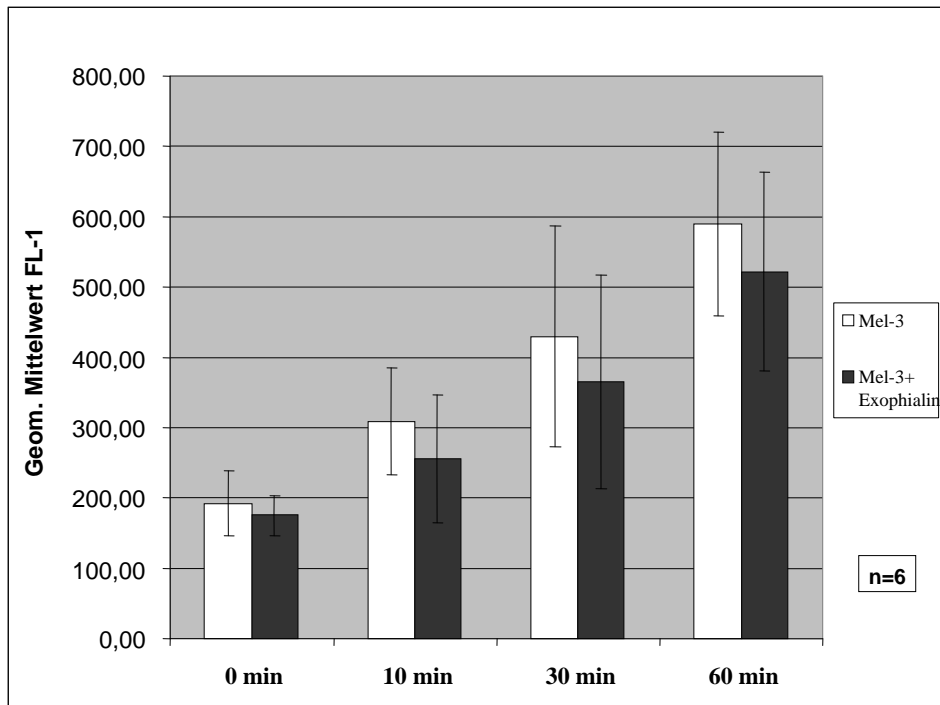


Abbildung 38: Einfluß von Exophialin auf den Oxidative Burst

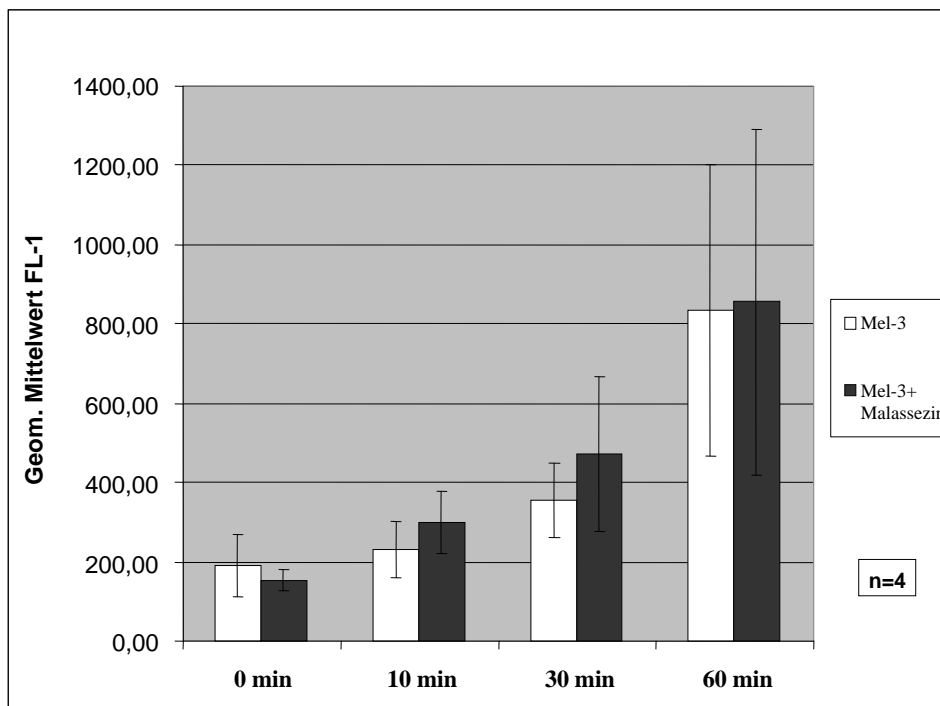


Abbildung 39: Einfluß von Malassezin auf den Oxidative Burst

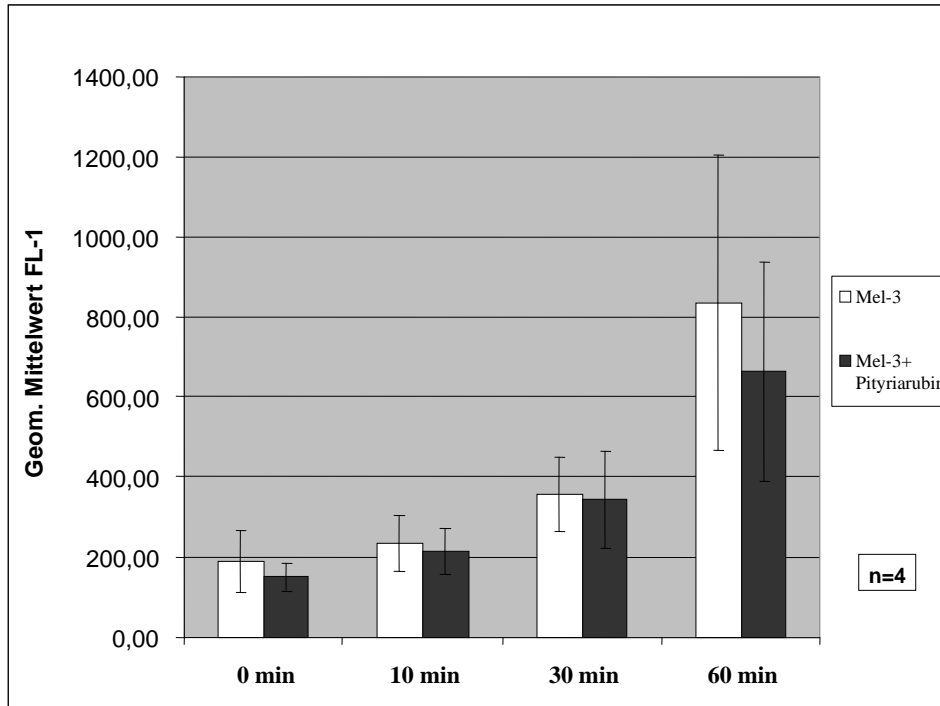


Abbildung 40: Einfluß von Pityriarubin C auf den Oxidative Burst

Die Zugabe der Pigmente erfolgte in einer Konzentration von 100µg Reinsubstanz pro 50µl DMSO je Ansatz. Trotz dieser großen Menge an Pigmenten war zwischen Kontrolle ohne und Test-Ansätzen mit Pigmenten kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildung 38-40). Für Exophialin lag der geometrische Mittelwert der FL-1 zwar in allen Zeitstufen deutlich unter dem Mittelwert der Kontrolle, signifikant war die Hemmung der ROS-Synthese jedoch in keinem Fall. Eine ähnliche Tendenz war nach Zugabe von Pityriarubin C zu erkennen (Abbildung 40). Hier war der Unterschied lediglich nach 60 Minuten deutlich zu sehen. Die Zugabe von Malassezin führte zu keiner sichtbaren Hemmung der ROS-Synthese, der geometrische Mittelwert der FL-1 lag nach 10, 30 und 60 Minuten sogar eher über dem der Kontrolle (Abbildung 39).

5 Diskussion

Die Synthese von Pigmenten und Fluorochromen durch Kultivierung von Pilzen auf einem Minimalagar mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle wurde erstmals bei *Malassezia furfur* beschrieben (Mayser et al. 1998).

Im Jahr 2004 wurden im Rahmen einer Dissertation zahlreiche weitere Stämme von *Malassezia* hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu einer solchen Pigmentbildung untersucht, wobei nur *Malassezia furfur* und *Malassezia pachydermatis* zur Bildung von pigmentierten Tryptophanabbauprodukten befähigt waren. Die Lipidquelle des Nährbodens hatte keinen Einfluß auf diesen völlig neuen Stoffwechselweg und erwies sich somit als austauschbar. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß strukturell ähnliche Stickstoffquellen (Tryptamin, Serotonin, Gramin) die Hefen nicht zur Pigmentproduktion anregen konnten (Mayser et al. 2004).

In vivo könnte der Zustand, bei dem lediglich Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle auf der Haut zur Verfügung steht, das Ergebnis exzessiven Schwitzens sein (Liappis et al. 1979).

Die Verstoffwechslung des Tryptophans zur Pigmentsynthese erfolgt auf zwei verschiedene Arten. Entweder wird der Pyrrolring des Indols (2,3-Benzopyrrol) geöffnet und es werden Ommochrome mittels Polyketidsynthasen gebildet (Phenoxazin-Ommochrom-Stoffwechselweg), oder der Indolring bleibt erhalten und es werden die sogenannten Indolderivate synthetisiert. Als Indolderivate konnten bis heute u.a. Malassezin, Pityriacitrin, Pityrialakton, Pityriaanhydrid, Pityriarubine A-C, Exophialin, sowie *Malassezia*-Indol A beschrieben werden (Mayser et al. 2002, Mayser et al. 2003, Irlinger et al. 2004, Kramer et al. 2005, Nies 2006, Mayser et al. 2007).

Zusätzlich zur strukturellen Analyse dieser völlig neuen Pigmente liegen für einige bereits Daten über ihre möglichen Funktionen vor. Pityriacitrin stellt durch seine komplexe Ringstruktur einen potenten UV-Filter dar. Es wurde erstmals aus *Malassezia furfur* isoliert (Mayser et al. 2002). Für das ebenfalls erstmals in *Malassezia* entdeckte Pigment Malassezin wurde eine apoptotische Wirkung in humanen Melanozyten nachgewiesen (Kramer et al. 2005). Pityriarubin, welches in Pilzen wie *Candida glabrata* (Mayser et al. 2007) und *Malassezia furfur* (Irlinger et al. 2004) nachgewiesen wurde, weist eine Schutzwirkung vor der ROS- Synthese auf (Kramer et al. 2005). Pityrialakton konnte für die gelb-grüne

Fluoreszenz unter der Wood'schen Lampe der betroffenen Hautareale bei Pityriasis versicolor verantwortlich gemacht werden (Mayser et al. 2003).

Weitere Untersuchungen sollten klären, ob es sich bei dem durch Tryptophan angeregten Stoffwechselweg um einen bei Pilzen weit verbreiteten Stoffwechselweg handelt. Mayer (2008) wies die Synthese der Indolderivate Pityriacitrin und Pityriarubin erstmals im pflanzenpathogenen Pilz *Ustilago* nach. Bei 17 von 27 untersuchten Stämmen konnte eine Pigmentsynthese nachgewiesen werden. Nies (2006) beschrieb Pityriacitrin erstmalig bei 13 Isolaten von *Exophiala*.

Einige Stämme von *Exophiala dermatitidis* sind neben der Synthese der Indolderivate auch zur Melaninsynthese befähigt. Melanin erwies sich als potenter Schutz vor dem Killing als Folge von Phagozytose und Oxidative Burst neutrophiler Granulozyten (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003).

Erkenntnisse von Zuther et al. (2008) haben gezeigt, daß das von *Ustilago maydis* synthetisierte Pigmentspektrum die Tryptophanmetabolite enthält, welche vermutlich im Zusammenhang mit der Ätiologie der Pityriasis versicolor stehen. Aus diesem Grund kann der vollständig sequenzierte Maisbrandpilz fortan als Modell zur Untersuchung der Biosynthese der Tryptophanpigmente fungieren. Es konnte gezeigt werden, daß in der Pigmentsynthese von *Ustilago maydis* lediglich der erste Schritt von Tryptophan zu Indolpyruvat enzymatisch durch eine Aminotransferase (TAM-1) katalysiert ist.

Für drei der bereits bekannten Pigmente konnte eine spontane Entstehung aus Indolpyruvat und Tryptophan bewiesen werden. Pityriacitrin entstand in sterilen Lösungen, die lediglich aus Tryptophan und Indolpyruvat bestanden. Es wird eine Kondensation der beiden Stoffe vermutet, die über weitere Zwischenschritte zur Entstehung von Pityriacitrin führt. Auch Pityriarubin C entstand in Spuren aus Indolpyruvat und Tryptophan. Pityriaanhydrid formierte sich sowohl in diesen Lösungen, als auch in Lösungen, die lediglich Indolpyruvat enthielten.

Die vorliegende Arbeit sollte zunächst die Arbeit von Nies fortführen und somit stand die weitere strukturelle Aufklärung der Pigmente von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und seinen Mutanten im Fokus. Die Ergebnisse von Zuther et al. (2008) zur spontanen Entstehung der Tryptophanderivate aus Indolpyruvat und Tryptophan wurden erst nach Abschluß der Pigmentisolierung im Rahmen dieser Dissertation veröffentlicht. Die Isolierung von Pityriacitrin aus allen von Nies und in dieser Arbeit untersuchten Stämmen von *Exophiala* bestätigte die Ergebnisse von Zuther et al. zur spontanen Entstehung dieses Pigments. Auch

Mayer (2008) konnte Pityriacitrin aus allen zur Tryptophanpigmentsynthese befähigten *Ustilago*-Stämmen isolieren.

Pityriarubin C konnte nur aus *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und seiner Mutante Mel-3 isoliert werden. Auf den DC-Platten von Mel-1 konnte keine rote Bande mit einem Rf-Wert von 0,38 nachgewiesen werden. Auch bei den Untersuchungen von *Ustilago* wurde Pityriarubin nicht in allen zur Synthese befähigten Stämmen gefunden. Eine spontane Entstehung der Pityriarubine ist demnach unwahrscheinlich.

Die von Nies erstmals in Mel-1 isolierte, bislang noch völlig unbekannt Substanz Exophialin wurde im Zuge dieser Arbeit nun auch im Wildtyp und der Mutante Mel-3 nachgewiesen. Darüber hinaus konnte aus derselben Bande mit einem Rf-Wert von 0,54 auf der DC-Platte des Wildtyps neben Exophialin auch Desoxyexophialin isoliert werden. Exophialin entsteht durch Kondensation von Flaviolin aus dem Melaninstoffwechselweg und Indol-3-Essigsäure zu einem instabilen Zwischenprodukt, aus dem nach Ringschluß Exophialin und seine Abkömmlinge Desoxyexophialin und Exophialapyruvat hervorgehen. Eine Kondensation der beiden Substanzen ohne enzymatische Katalysierung ist nicht möglich und eine spontane Entstehung von Exophialin kann somit ausgeschlossen werden. Auch die Tatsache, daß die Substanz bislang nur in *Exophiala dermatitidis* nachgewiesen wurde, spricht gegen eine spontane Entstehung.

Insgesamt unterschieden sich die Pigmentspektren der drei untersuchten Stämme von *Exophiala dermatitidis* deutlich. Die DC-Platte des Wildtyps zeigte neben den bereits identifizierten Substanzen ein breites Spektrum an Banden mit unterschiedlichen farblichen Ausprägungen und unterschiedlichen Rf-Werten. Betrachtet man die dünnschichtchromatographischen Platten der beiden Mutanten Mel-3 und Mel-1, so fällt eine wesentlich geringere Vielfalt an bei Tageslicht sichtbaren Substanzen im Vergleich zum Wildtyp auf. Auch in der Anzahl der Fraktionen nach säulenchromatographischer Auftrennung unterschieden sich die untersuchten Mutanten vom Wildtyp. Alleine im Zuge dieser Arbeit, in deren Verlauf die DC-Platten immer wieder in neuen Ansätzen nachproduziert wurden, war das optische Ergebnis immer wieder reproduzierbar.

Ähnlich waren die Ergebnisse der Untersuchungen des Tryptophan-Pigmentspektrums von 17 *Ustilago*-Stämmen durch Mayer (2008). Jeder Stamm wies ein individuelles, reproduzierbares Bild auf den DC-Platten auf.

Bisher konnte eine spontane Entstehung der Tryptophanpigmente nur für Pityriacitrin und Pityrialakton bewiesen werden. Das unterschiedliche Bild der Dünnschicht-

chromatographieplatten und die Reproduzierbarkeit dieser Unterschiede stellt eine Entstehung aller Tryptophanpigmente auf spontanem Weg in Frage. Dementsprechend erwies sich die Untersuchung der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* auch nach den neuen Erkenntnissen von Zuther et al. (2008) zur Biosynthese der Tryptophanpigmente als sinnvoll.

Neben der strukturellen Analyse des Pigmentspektrums von *Exophiala dermatitidis* sollte die Auswirkung der Indolderivate auf die Phagozytose und den Oxidative Burst mittels Durchflusszytometer untersucht werden.

Infektionen mit dem Schwärzepilz beschränken sich meist in Form von Phaeohyphomykosen oder Chromoblastomykosen auf die Haut. Einige Fallberichte beschreiben jedoch eine systemische Ausbreitung des Pilzes mit ausgeprägtem Neurotropismus. Oftmals wird die Infektion erst in sehr fortgeschrittenen systemischen Stadien diagnostiziert, da die Patienten zunächst nahezu beschwerdefrei sind. Dies spricht für Mechanismen des Pilzes, das Immunsystem seines Wirtes zu unterdrücken. Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenität von *Exophiala dermatitidis* zu leisten.

Bisherige Untersuchungen zur Pathogenität beschränken sich auf die Funktion des Melanins, das eine wichtige Rolle bei Infektionen mit *Exophiala dermatitidis* spielt. 1987 infizierten Dixon et al. Albinomäuse intravenös mit Zellen von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und Mel-3 und konnten Melanin erstmals als Virulenzfaktor von *Exophiala* beschreiben. Die Mortalität lag nach Infektion mit dem Wildtyp bei 100%, nach Infektion mit Mel-3 betrug sie nach 21 Tagen 0% (Dixon et al. 1987). Ähnliche Ergebnisse erlangten Kwon-Chung et al. bereits 1982 bei der Untersuchung der Virulenz einer Melaninmangelmutante von *Cryptococcus neoformans* (Kwon-Chung et al. 1982). Wang et al konnten 1995 erstmals eine Schutzwirkung des Melanins vor der Antikörper-vermittelten Phagozytose zeigen (Wang et al. 1995). 2004 konnten Schnitzler et al. eine wesentlich höhere Killing-Rate der Mutante Mel-3 im Vergleich zum melaninhaltigen Wildtyp als Folge des Oxidative Burst nachweisen (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003). Grund für die höhere Pathogenität der melaninhaltigen Stämme von *Exophiala dermatitidis* und *Cryptococcus neoformans* ist die Neutralisation von Oxidantien der körpereigenen Abwehrzellen (Hypochlorid, Permanganate).

Die Rolle der Indolderivate in der Pathogenität von *Exophiala dermatitidis* ist bisher weitgehend ungeklärt. Für Pityriarubin konnte bereits eine suppressive Wirkung auf den Oxidative Burst nachgewiesen werden (Kramer et al. 2005). In dieser Arbeit wurde das

komplette Tryptophan-Pigmentspektrum von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und seinen Mutanten Mel-1, Mel-3 und Mel-4 hinsichtlich einer Wirkung auf den Oxidative Burst untersucht.

Zunächst sollte die bereits im Institut für Mikrobiologie der RWTH Aachen angewandte Methode zur Messung von Phagozytose und Oxidative Burst am Durchflußzytometer etabliert werden (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003). Das Protokoll wurde so modifiziert, daß eine Messung des Einflusses der Tryptophanpigmente von *Exophiala dermatitidis* auf die ROS-Synthese in den neutrophilen Granulozyten möglich wurde.

Zur Phagozytosemessung wurden die Zellen von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und Mel-3 in einem Spezialflüssignährmedium angezüchtet. Ziel war die Gewinnung der Zellen des dimorphen Pilzes in der Hefeform, um eine gleichmäßige Anfärbung zu ermöglichen. Nach 3-4 Tagen Inkubationszeit konnte diese Hefeform mikroskopisch bestätigt werden. Die Anfärbung der Pilzzellen erfolgte mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff BCECF-AM, der bereits mit Erfolg von verschiedenen Autoren zur Messung der Wechselwirkung zwischen Mikroorganismen und Granulozyten verwendet wurde (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003). Der Farbstoff eignet sich deshalb gut für derartige Studien, da er in die Hefezellen hineindiffundiert und somit zu keiner Veränderung der Oberflächenmerkmale führt. Die Wechselwirkung zwischen den Pilzzellen und den Granulozyten bleibt demnach unverändert. Des Weiteren bleibt die Vitalität der Zellen erhalten (Podbielski et al. 1996, Schnitzler et al. 1995). Die Zellen des Wildtyps und der Mutante Mel-3 färbten sich nach Behandlung mittels Ultraschallsonde sehr gleichmäßig an, allerdings fluoreszierten die Zellen des melanisierten Wildtyps deutlich schwächer nach intrazellulärer Aufnahme von BCECF-AM als die Zellen der Mutante Mel-3. Hierfür konnte von Schnitzler et al. (1999) das in den Zellmembranen eingelagerte Melanin verantwortlich gemacht werden, welches die Absorption des Argonlasers und die Emission des grünen Farbstoffes verringerte.

In dieser Arbeit wurde heparinisiertes Vollblut verwendet, da eine Isolierung der Granulozyten mittels Dextran-Sedimentation nachweislich zu einer Aktivierung der Granulozyten führt (Podbielski et al. 1996, Schnitzler et al. 1999). Die bei hohen Heparinkonzentrationen bekannte Hemmung der Phagozytose konnte durch eine Konzentration von 10 I.E pro ml ausgeschlossen werden (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003).

Um die Anzahl der phagozytierten Zellen am Durchflußzytometer nach der Methode der RWTH Aachen zu messen, muß eine Unterscheidung der Pilzzellen von den neutrophilen

Granulozyten anhand der Größe (FSC) oder der Granularität (SSC) möglich sein. Ausgehend von zwei unterschiedlichen Zellpopulationen zum Zeitpunkt 0 Minuten wäre demnach eine Abnahme der freien gefärbten Hefezellen bei gleichzeitiger Zunahme der fluoreszierenden Granulozyten nach 10-30-60 Minuten zu messen.

Weder die Zellpopulation des Wildtyps von *Exophiala dermatitidis*, noch die der Mutante Mel-3 ließen sich jedoch mit Hilfe der Größe oder Granularität hinreichend am Durchflusszytometer von den neutrophilen Granulozyten unterscheiden. Beide Stämme wurden unserem Labor bereits für die Arbeit von Nies vom Uniklinikum RWTH Aachen freundlicherweise zur Verfügung gestellt und schon im Vorfeld sequenziert. Eine mögliche Kontamination konnte durch mikroskopische Untersuchung ausgeschlossen werden, des Weiteren wiesen Wildtyp und Mel-3 ein morphologisch nahezu identisches Bild bezogen auf Größe und Granularität im Durchflusszytometer auf. Die Zellen waren während des gesamten Versuches in isotoner Kochsalzlösung beziehungsweise PBS gelöst, wodurch eine Veränderung der Morphologie durch osmotische Schwankungen ausgeschlossen werden konnte.

Bei den gegebenen Eigenschaften der Zellpopulationen war lediglich die Messung der Abnahme der nicht fluoreszierenden neutrophilen Granulozyten möglich. Allerdings ist diese Aussage ohne eine Messung der Zunahme der fluoreszierenden Granulozyten nach Assoziation mit den Pilzzellen wertlos.

Eine Messung der Phagozytose nach dem Protokoll der RWTH Aachen war demnach durch alleiniges Anfärben der Hefezellen mit BCECF-AM unmöglich. Um die beiden Populationen effektiv zu unterscheiden, müßten die Granulozyten ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden, der allerdings nicht im FL-1-Kanal gemessen wird. Pattanapanyasat et al beschreiben 2007 eine durchflusszytometrische Messung der Phagozytoseaktivität nach Inkubation von *Candida albicans* mit Vollblut pädiatrischer Patienten. Die Granulozyten wurden mit PE-konjugierten monoklonalen anti-CD-13 Antikörpern markiert, die Pilzzellen wurden ebenfalls mit BCECF-AM gefärbt. In einem zwei-Farben-Diagramm konnten somit die rot-fluoreszierenden Granulozyten von den grün-fluoreszierenden Pilzzellen unterschieden werden. Erste Messungen der Phagozytose nach dem Protokoll von Pattanapanyasat et al wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits durchgeführt. In einer Dotplot-Darstellung wurde die grüne Fluoreszenz auf der Abszisse aufgetragen, die rote Fluoreszenz auf der Ordinate. Die Unterteilung der Darstellung in vier Quadranten erlaubte die Unterscheidung der Pilzzellen von den Granulozyten und eine Abgrenzung der beiden

Populationen von Pilzzellen, die bereits phagozytiert wurden. Die Methode wird derzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Mayser etabliert.

Zur Messung der ROS-Synthese der Granulozyten am Durchflusszytometer wurden die Zellen des Wildtyps von *Exophiala dermatitidis* und die seiner Mutante Mel-3 ebenfalls nach dem Protokoll der RWTH Aachen in einem Spezialflüssignährmedium angezchtet. Eine Synthese der Tryptophanmetabolite konnte ausgeschlossen werden, da in einer vorausgegangenen Arbeit festgestellt wurde, dass Tryptophan hierzu als alleinige Stickstoffquelle vorhanden sein muß (Mayser et al. 1998).

Die Synthese der Sauerstoffradikale in den Granulozyten erfolgt über die Aktivierung der NADPH-Oxidase. Sie kann sowohl intrazellulär in Phagosomen erfolgen, als auch extrazellulär. Dihydrorhodamine 123 wird durch die gebildeten Radikale zu Rhodamine oxidiert, welches grün fluoresziert und als Indikator für den Oxidative Burst dient.

Es wurde zunächst die Burst-Aktivität in den Granulozyten nach Inkubation mit Zellen des melanisierten Wildtyps von *Exophiala dermatitidis* mit der Burst-Aktivität nach Inkubation mit Zellen der Mutante Mel-3 verglichen. Bereits Peltroche-Llacsahuanga et al. (2003) konnten eine schützende Wirkung des Melanins vor den Auswirkungen des Burst zeigen, da sich die beiden Stämme signifikant im Killing unterschieden. In dieser Arbeit gelang es erstmals, eine Schutzwirkung des Melanins vor dem Oxidative Burst direkt im Vollblutansatz zu zeigen. Die Burst-Aktivität der Granulozyten nach Inkubation mit Zellen des Wildtyps lag bereits zum Zeitpunkt 0 Minuten, also nach wenigen Sekunden der Inkubation, signifikant unter der Aktivität nach Inkubation mit den Zellen der Mutante Mel-3. In allen anderen Zeitstufen war dieser Unterschied hochsignifikant.

Granulozyten sind die am Häufigsten anzutreffenden Zellen des Immunsystems in mit Schwärzepilzen infizierten Arealen. Aus diesem Grund spielen sie eine entscheidende Rolle für die weitere Ausbreitung der Pilze im Körper. Die Unterdrückung dieser Abwehrmechanismen innerhalb weniger Sekunden durch Melanin stellt somit einen entscheidenden Beitrag zum Grad der Virulenz des Pilzes dar. Bereits 2001 konnte eine höhere Virulenz des Wildtyp-Stammes im Vergleich zur weißen Mutante in einem Maus-Infektionsmodell nachgewiesen werden (Feng et al. 2001). Auch die beschriebenen klinischen Fälle von generalisierter Ausbreitung des Wildtyps von *Exophiala dermatitidis* bestätigen die hohe Invasivität des Stammes. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene hochpotente Unterdrückung des Oxidative Burst innerhalb weniger Sekunden durch Melanin stellt eine logische Erklärung für diese klinischen Beobachtungen dar.

Der Rohextrakt von *Exophiala dermatitidis* Mel-3 stellt ein Gemisch aller Tryptophanderivate des Pilzes gelöst in DMSO dar. Dieses Pigmentgemisch inhibierte die ROS-Synthese nach 10 Minuten signifikant, nach 30 und 60 Minuten hochsignifikant, was für eine potente Wirkung einzelner Bestandteile oder der Kombination dieser spricht. Eine signifikante Hemmung der Sauerstoffradikalsynthese durch DMSO konnte ausgeschlossen werden.

Auch der Rohextrakt des Wildtyps unterdrückte den Burst signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, allerdings war dieser Unterschied erst nach 60 Minuten zu verzeichnen.

Für die Gewinnung der Rohextrakte der beiden Stämme wurde die gleiche Anzahl an Tryptophanagarplatten und die gleiche Verdünnung in DMSO verwendet. Eine geringere Pigmentsynthese des Wildtyps muss dennoch als eine mögliche Erklärung für die weniger intensive Wirkung des Rohextraktes auf die Sauerstoffradikalsynthese in Betracht gezogen werden. Andererseits könnte die Mutante Mel-3 ein wirksameres Pigmentspektrum synthetisieren, was den Melaninmangel und die damit verbundene geringere Virulenz ausgleicht.

Alle vier untersuchten Rohextrakte hatten Einfluß auf die Intensität des Oxidative Burst, wobei das Pigmentgemisch der Melanin-freien Mutante Mel-3 die stärkste Wirkung hatte. Ihr fehlt gänzlich die Fähigkeit zur Melaninsynthese, wohingegen die anderen Mutanten zur Synthese von Vorstufen des Melanins befähigt sind. Möglicherweise kompensiert sie diesen Defekt durch die Synthese höher wirksamer Substanzen.

Die Rohextrakte von Mel-1 und Mel-4 zeigten ebenfalls eine Tendenz zur Hemmung der ROS-Synthese. Eine Untersuchung dieser Pigmentspektren hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Sauerstoffradikalsynthese wäre deshalb in einer nachfolgenden Arbeit von Interesse.

Um die besonders potenten Hemmstoffe aus dem Gemisch herauszufinden, wurden die Pigmente nach Auftrennung durch Säulenchromatographie hinsichtlich ihrer Wirkung auf die ROS-Synthese untersucht. Die Fraktionen zwei und sechs der insgesamt acht Fraktionen von *E. dermatitidis* Mel-3 erwiesen sich als die stärksten Hemmstoffe. Keinerlei Auswirkung auf den Oxidative Burst hatten die Fraktionen drei und acht.

Es konnte demnach gezeigt werden, daß bestimmte Stoffe aus einzelnen Fraktionen von Mel-3 offenbar für die potente Schutzwirkung vor der Immunantwort des Wirtes verantwortlich sind. Die deutlichen Unterschiede zwischen den Fraktionen waren stets reproduzierbar. Es erfolgte eine weitere Annäherung an die wirksamen Substanzen und anschließend die Zugabe von Reinsubstanzen.

Krämer et al. (2005) konnte erstmals eine Unterdrückung des Oxidative Burst durch die von *Malassezia furfur* synthetisierten Pityriarubine im Modell nachweisen. Die ROS-Synthese in den neutrophilen Granulozyten wurde jeweils mit Calciumionophor A23187, IL-3, FMLF und PE stimuliert. Eine Hemmung der ROS-Synthese auf Ebene der Proteinkinase C durch Arcyriarubin A war bereits bekannt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Pityriarubine mit Arcyriarubin C konnte eine Hemmung der Sauerstoffradikalesynthese durch die Pityriarubine vermutet werden. Die Pityriarubine hemmten die ROS-Synthese nach Stimulation mit IL-3, A23 und FMLF, wobei Pityriarubin C die stärkste Hemmung verursachte. Keine Hemmung erfolgte nach Stimulation mit PE oder partikulären Stimulantien wie Zymosan. Die Schlußfolgerung der vorliegenden Arbeit war, daß die Pityriarubine an einer Stelle im Reaktionsweg von IL-3 oder FMLF angreifen, da es sich bei A23 um einen unspezifischen Ca-Aktivator handelt. Mit dem Hintergrund dieser neuen Erkenntnisse sollte im Zuge dieser Dissertation eine mögliche Wirksamkeit der Pityriarubine auf die ROS-Synthese im Vollblutansatz überprüft werden. Selbst in hohen Konzentrationen zeigte Pityriarubin C jedoch keinen signifikanten Einfluß. Somit kann eine signifikante Wirkung dieser Stoffgruppe auf den Oxidative Burst im Vollblutansatz ausgeschlossen werden. Vermutlich handelt es sich bei den Pilzzellen um partikuläre Stimulantien des Oxidative Burst.

Nies et al. (2006) konnten erstmals die Synthese des völlig neuartigen Stoffes Exophialin in *Exophiala dermatitidis* Mel-1 nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnten Exophialin und Derivate von Exophialin auch aus dem Wildtyp und der Mutante Mel-3 isoliert werden. Die Funktion dieser Substanzen ist bisher völlig unbekannt und aus diesem Grund wurde die Auswirkung von Exophialin auf die ROS-Synthese untersucht. Es zeigte sich allerdings selbst in hohen Konzentrationen keine signifikante Hemmung der Sauerstoffradikalsynthese in den Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Malassezin führt zur Apoptose in Melanozyten und konnte somit für die unpigmentierten Hautareale bei der Pityriasis versicolor verantwortlich gemacht werden (Kramer et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Substanz erstmals hinsichtlich einer möglichen Auswirkung auf den Oxidative Burst untersucht. Es konnte jedoch selbst in hohen Konzentrationen keine signifikante Hemmung des Burst festgestellt werden.

Eine bisher völlig unbekannt graue Substanz aus *E. dermatitidis* Mel-3 mit einem Rf-Wert von 0,50 hemmte hingegen die ROS-Synthese deutlich. Diese Substanz könnte für die potente Wirkung der Tryptophanpigment-Gemische in Frage kommen. Eine strukturelle Analyse war

leider nicht möglich, da das Grau nur in verschwindend geringen Mengen synthetisiert wurde. Diese Tatsache spricht ebenfalls dafür, dass es sich um einen hochpotenten Hemmstoff der Sauerstoffradikalsynthese handeln könnte. Eine weitere Aufarbeitung dieses Stoffes in einer nachfolgenden Arbeit wäre demzufolge von besonderem Interesse.

6 Zusammenfassung

Indolderivate wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Mayser 1998 erstmals bei der Hefe *Malassezia furfur* beschrieben, bei der sie vermutlich in einem klinischen Zusammenhang mit der Hautkrankheit Pityriasis versicolor stehen. Im Jahr 2006 konnten Nies et al. solche Indolderivate erstmals bei *Exophiala dermatitidis* nachweisen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Untersuchung der Pigmentspektren verschiedener Stämme von *Exophiala dermatitidis* und ihre Überprüfung auf eine mögliche Rolle in der Pathogenese von *Exophiala-dermatitidis*-Infektionen.

Hierfür wurden der Wildtyp und seine Mutanten Mel-1, Mel-3 und Mel-4 zur Pigmentsynthese auf 1b-Minimalagar angezüchtet. Nach vierwöchiger Wachstumsphase wurde das dabei entstandene Pigment als Rohextrakt gewonnen, durch chromatographische Methoden vorgereinigt, sowie einzelne farbige Bestandteile weiter aufgereinigt. Die Stukturaufklärung isolierter Reinsubstanzen erfolgte an der TU München. Grundlage zur Untersuchung des Oxidative Burst stellte der von Schnitzler et al. (1999) etablierte Vollblutansatz mit Dihydrorhodamine 123 als Indikator für die Sauerstoffradikalsynthese von neutrophilen Granulozyten dar. Die anschließende Messung erfolgte am Durchflußzytometer. Im Rahmen der Untersuchung der Pigmentspektren konnte beim Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* erstmals die Synthese von Pityriacitrin, Pityriarubin C, Exophialin und Desoxyexophialin nachgewiesen werden.

Für die Mutante Mel-1 konnte erstmals das bislang nur durch vergleichende DC nachgewiesene Pityriacitrin in der HPLC, sowie durch Analyse der TU München bestätigt werden. Desweiteren konnte Exophialin aus zwei violetten Banden mit einem Rf-Wert von 0,38 und 0,56 isoliert werden.

Unter den Syntheseprodukten der Mutante Mel-3 wurde erstmals Exophialin, Pityriarubin C und Pityriacitrin nachgewiesen.

Beim Vergleich des Wildtyps von *Exophiala dermatitidis* mit seiner Melaninmangel-Mutante Mel-3 hinsichtlich ihrer Auswirkung auf den Oxidative Burst in Vollblutproben konnte eine deutliche Hemmung des Oxidative Burst durch den Wildtyp gegenüber Mel-3 aufgezeigt werden. Dies läßt den Rückschluß auf eine deutliche Schutzwirkung des vom Wildtyp synthetisierten Melanins vor der ROS-Synthese zu.

Auch die untersuchten Pigment-Rohextrakte von Wildtyp, Mel-1, Mel-3 und Mel-4 hatten alle eine hemmende Wirkung auf die ROS-Synthese, wobei der Rohextrakt von Mel-3 den stärksten Einfluß hatte.

Bei den Sephadex-Fractionen der Mutante Mel-3 ergaben unterschiedliche Einflüsse auf die ROS-Synthese. Die Fraktionen zwei und sechs zeigten in allen Zeitstufen zwischen 0 und 60 Minuten die stärkste Unterdrückung, wohingegen bei den Fraktionen drei und acht zu keinem Zeitpunkt Auswirkungen auf die ROS-Synthese beobachtet wurden.

Nach weiterer Unterteilung der hemmenden Fraktion sechs der Mutante Mel-3 mittels präparativer Dünnschichtchromatographie in acht Banden konnte eine deutliche Hemmung des Oxidative Burst durch die Banden 5-8 verzeichnet werden. In diesem Bereich kam neben zahlreichen Fluorochromen und Pityriarubin C eine prominente Bande von grauer Farbe vor. Diese Substanz hemmte die ROS-Synthese deutlich, wohingegen Pityriarubin C keinen Einfluß darauf hatte. Auch die acht Banden der Fraktion zwei der Mutante Mel-3 unterschieden sich in ihrer Auswirkung auf den Oxidative Burst. Hier wirkten sich nur die Fraktionen 1,4,5 hemmend auf die ROS-Synthese aus.

Die weiterhin untersuchten Reinsubstanzen Exophialin und Malassezin hatten selbst in hohen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluß auf die ROS-Synthese.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und seine Mutanten unter den eingesetzten Anzuchtbedingungen ein sehr unterschiedliches Spektrum an pigmentierten Indolderivaten bilden, das sich stets reproduzieren ließ. Es wurde eine Hemmung der ROS-Synthese durch diese Pigmente in Form von Rohextrakten einzelner Stämme, in Form weiter aufgereinigten Säulenchromatographie-Fractionen, sowie in Form von Einzelbanden beobachtet. Die läßt Rückschlüsse auf deren wichtige Rolle in der Pathogenese von *Exophiala dermatitidis*-Infektionen bei Mensch und Tier zu. Die aus diesen Resultaten hervorgehenden neuen Fragestellungen sind weiteren Untersuchungen vorbehalten.

7 Summary

In 1998, the working group of Prof. Mayser first described some particular indole derivatives in the yeast *Malassezia furfur*, which might be clinically related to the skin disease pityriasis versicolor. In 2006, Nies et al. were the first ones able to show the production of these indole derivatives in *Exophiala dermatitidis*. The aim of this study was to compare the pigment spectrum of different species of *Exophiala dermatitidis* and to clarify whether they are part of the pathogenesis of infections with *Exophiala dermatitidis*.

The wildtype and its mutants Mel-1, Mel-3 and Mel-4 were cultivated on minimal agar as a base for pigment production. The pigment was extracted after a period of growth of 4 weeks and chromatographically purified to obtain pure substances. Structural analyses of the isolated substances were performed at Munich Technological University. Following the studies of Schnitzler et al. (1999), unlabeled yeast cells were incubated in heparinized whole blood and dihydrorhodamine 123 was added as an indicator for the ROS-synthesis in the granulocytes. Flow cytometric analysis was performed in a FACScan flow cytometer.

By investigating the pigment spectrum of *Exophiala dermatitidis*, the synthesis of Pityriacitrin, Pityriarubin C, Exophialin and Desoxyexophialin in the wildtype could be shown.

In former studies, the pigments of the mutant Mel-1 were already investigated by comparative DC and the indole pyruvate Pityriacitrin was found to be produced by this yeast. In the present study, this achievement could be approved by HPLC and the analysis of Munich Technological University. Exophialin, an almost unknown indole derivative which was isolated from Mel-3 for the first time by Nies et al. (2006) was found in two violet DC-bands of Mel-1 ($R_f=0,38$; $R_f=0,56$).

The indole derivatives Exophialin, Pityriarubin C and Pityriacitrin were detected in the mutant Mel-3 in this present study.

The degree of the oxidative burst evoked by *Exophiala dermatitidis* wildtype was found to be lower when it was compared with its mutant Mel-3. The wildtype is probably protected from the oxidative burst by its synthesised Melanin.

When the raw extracts of the wildtype, Mel-1, Mel-3 and Mel-4 were added in the experimental series of oxidative burst, evoked oxidative burst levels were also found to be lower compared with the control without any indole derivatives. The raw extract of Mel-3

inhibited the oxidative burst most. The sephadex-fractions of the mutant Mel-3 had different influences on the synthesis of ROS. Fractions two and six suppressed the oxidative burst in all time levels between 0 and 60 minutes strongly, while fractions three and eight had no influence on the synthesis of ROS at any time.

Fraction six was subdivided by preparative thin layer chromatography into eight bands and the bands 5-8 were able to inhibit evoked oxidative burst levels. Beside the already known Pityriarubin C and other fluorochromes these three bands 5-8 include an unknown grey-coloured pigment. This grey pigment was able to inhibit the synthesis of ROS strongly, while Pityriarubin C had no influence on the evoked oxidative burst. The eight bands of fraction two of the mutant Mel-3 differed in the way they influenced the oxidative burst. Only fractions 1,4,5 led to a decreased oxidative burst level. Although added in high concentrations, the pure substances Exophialin and Malassezin did not have any influence on the synthesis of ROS.

In summary can be said that the wildtype of *Exophiala dermatitidis* and its mutants are able to produce a very bright and different spectrum of pigmented indole derivatives when cultivated on minimal agar. This pigment spectrum is reproducible at any time. An inhibition of the ROS synthesis was shown by these indole derivatives when they were added as raw extracts, fractions of thin layer chromatography and as single bunches. The indole derivatives seem to play an important role in the pathogenesis of infections in human beings and animals caused by *Exophiala dermatitidis*.

8 Literaturverzeichnis

Beketi AK, Ba MC, Sy MH, Bah L, Ndao AK, Tagny RM, Diallo A, Sakho Y and Badiane SB, (2005) [Cranial and cervical vertebral mycetoma. Report of three cases]. *Neurochirurgie* 51(5) 471-475.

Benaoudia F, Assouline M, Pouliquen Y, Bouvet A and Gueho E, (1999) *Exophiala* (Wangiella) dermatitidis keratitis after keratoplasty. *Med.Mycol.* 37(1) 53-56.

Blaschke-Hellmessen R, Lauterbach I, Paul KD, Tintelnot K and Weissbach G, (1994) [Detection of *Exophiala dermatitidis* (Kano) De Hoog 1977 in septicemia of a child with acute lymphatic leukemia and in patients with cystic fibrosis]. *Mycoses* 37 Suppl 1 89-96.

Brakhage AA, Langfelder K, Wanner G, Schmidt A and Jahn B, (1999) Pigment biosynthesis and virulence. *Contrib.Microbiol.* 2 205-215.

Brandt ME and Warnock DW, (2003) Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J.Chemother.* 15 Suppl 2 36-47.

Braun-Falco O., Plewig G. and Wolff H.H., (1997) *Dermatologie und Venerologie* Springer Verlag, 4. Auflage

Brockhaus 2007

Brownell I, Pomeranz M and Ma L, (2005) Eumycetoma. *Dermatol.Online.J.* 11(4) 10.

Chang CL, Kim DS, Park DJ, Kim HJ, Lee CH and Shin JH, (2000) Acute cerebral phaeohyphomycosis due to *Wangiella dermatitidis* accompanied by cerebrospinal fluid eosinophilia. *J.Clin.Microbiol.* 38(5) 1965-1966.

Correale M, Ieva R, Rinaldi M, Rinaldi G and Di BM, (2005) Voluminous mycetoma in a newborn with down syndrome: Role of echocardiography. *Eur.J.Echocardiogr.*

Daoud M, Ezzine Sebai N, Badri T, Mokhtar I, Fazaa B, Kamoun MR Mycetoma-retrospective study of 13 cases in Tunisia

de Hoog GS, (1997) Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. *Mycoses* 40(Suppl.2):5-8

Dixon DM, Polak A and Szaniszlo PJ, (1987) Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin-deficient *Wangiella dermatitidis*. *J.Med.Vet.Mycol.* 25(2) 97-106.

Enke (2000) Verlag Klinische Veterinärimmunologie

Espinel-Ingroff A, Kerkering TM and Shadomy HJ, (1982) Isolation of dematiaceous pathogenic fungi from a feed and seed warehouse. *J.Clin.Microbiol.* 15(4) 714-719.

Feng B, Wang X, Hauser M, Kaufmann S, Jentsch S, Haase G, Becker JM and Szaniszlo PJ, (2001) Molecular cloning and characterization of *WdPKS1*, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. *Infect.Immun.* 69(3) 1781-1794.

Gerard C, Duchesne B, Hayette MP, Layalaye B, Marechal-Courtoise C, (1998) A case of *Exophiala dermatitidis* ulceration, *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 268, 103-8

Fothergill AW, (1996) Identification of dematiaceous fungi and their role in human disease. *Clin.Infect.Dis.* 22 Suppl 2 S179-S184.

Gutierrez F, Masia M, Ramos J, Elia M, Mellado E and Cuenca-Estrella M, (2005) Pulmonary mycetoma caused by an atypical isolate of *Paecilomyces* species in an immunocompetent individual: case report and literature review of *Paecilomyces* lung infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 24(9) 607-611.

Hamilton AJ and Gomez BL, (2002) Melanins in fungal pathogens. *J.Med.Microbiol.* 51(3) 189-191.

Hiruma M, Kawada A, Ohata H, Ohnishi Y, Takahashi H, Yamazaki M, Ishibashi A, Hatsuse K, Kakihara M and Yoshida M, (1993) Systemic phaeohyphomycosis caused by *Exophiala dermatitidis*. *Mycoses* 36(1-2) 1-7.

Hof H, (2003) [Candida, aspergillus and company. Pathogenic fungi]. *Pharm.Unserer Zeit* 32(2) 96-103.

Hoog de, (2000) Atlas of clinical fungi 2nd edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, the Netherlands 17

Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H and Nawata H, (2003) Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J.Am.Soc.Nephrol.* 14(8 Suppl 3) S227-S232.

Irlinger B, Kramer HJ, Mayser P and Steglich W, (2004) Pityriarubins, biologically active bis(indolyl)spirans from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 43(9) 1098-1100.

Jacobson ES, (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin.Microbiol.Rev.* 13(4) 708-717.

Jacobson ES, Hove E and Emery HS, (1995) Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect.Immun.* 63(12) 4944-4945.

Juncu C (2007) Synthese von Melanin und Pityriacitrin bei *Exophiala dermatitidis*: Ein Vergleich zweier UV-protektiver Substanzen, VVB Laufersweiler Verlag

Kano R, Kusuda M, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H and Hasegawa A, (2000) First isolation of *Exophiala dermatitidis* from a dog: identification by molecular analysis. *Vet.Microbiol.* 76(2) 201-205.

Kazanas N, (1986) Pathogenicity of a fungus resembling *Wangiella dermatitidis* isolated from edible mushrooms. *Appl.Environ.Microbiol.* 51(2) 261-267.

Kramer HJ, Kessler D, Hipler UC, Irlinger B, Hort W, Bodeker RH, Steglich W and 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) 2290-2297.

Kramer HJ, Podobinska M, Bartsch A, Battmann A, Thoma W, Bernd A, Kummer W, Irlinger B, Steglich W and Mayser P, (2005) Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem*. 6(5) 860-865.

Kwon-Chung KJ, Polacheck I and Popkin TJ, (1982) Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J.Bacteriol*. 150(3) 1414-1421.

Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G and Brakhage AA, (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal.Genet.Biol*. 38(2) 143-158.

Liappis N, Kelderbacher SD, Kessler K and Bantzer P, (1979) Quantitative study of free amino acids in human eccrine sweat excreted from the forearms of healthy trained and untrained men during exercise. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 42(4) 227-234.

Machowinski A, Kramer HJ, Hort W and Mayser P, (2006) Pityriacitrin - a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses* 49(5) 388-392.

Mayer P (2008) Tryptophan-abhängige Pigmentsynthese bei Brandpilzen, Gießener Elektronische Bibliothek (GEB)

Mayser P, Schafer U, Kramer HJ, Irlinger B and Steglich W, (2002) Pityriacitrin - an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch.Dermatol.Res*. 294(3) 131-134.

Mayser P, Stapelkamp H, Kramer HJ, Podobinska M, Wallbott W, Irlinger B and Steglich W, (2003) Pityrialactone - a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84(3) 185-191.

Mayser P, Tows A, Kramer HJ and Weiss R, (2004) Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains. *Mycoses* 47(1-2) 34-39.

Mayser P, Wenzel M, Kramer HJ, Kindler BL, Spiteller P and Haase G, (2007) Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Med.Mycol.* 45(6) 519-524.

Mayser P, Wille G, Imkampe A, Thoma W, Arnold N and Monsees T, (1998) Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* 41(7-8) 265-271.

Mok WY, Luizao RC, do Socorro Barreto da Silva, Teixeira MF and Muniz EG, (1984) Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. *Appl.Environ.Microbiol.* 47(2) 390-394.

Mok WY and Morato de CC, (1985) Association of anurans with pathogenic fungi. *Mycopathologia* 92(1) 37-43.

Muotoe-Okafor FA and Gugnani HC, (1993) Isolation of *Lecythophora mutabilis* and *Wangiella dermatitidis* from the fruit eating bat, *Eidolon helvum*. *Mycopathologia* 122(2) 95-100.

Nachman S, Alpan O, Malowitz R and Spitzer ED, (1996) Catheter-associated fungemia due to *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. *J.Clin.Microbiol.* 34(4) 1011-1013.

Nies S (2006) Tryptophanabhängige Synthese von indolhaltigen Pigmenten bei verschiedenen humanpathogenen Asco- und Basidiomyzeten, VVB Laufersweiler Verlag

Nishimura K and Miyaji M, (1982) Studies on a saprophyte of *Exophiala dermatitidis* isolated from a humidifier. *Mycopathologia* 77(3) 173-181.

Oxford GS and Gillespie RG, (1998) Evolution and ecology of spider coloration. *Annu.Rev.Entomol.* 43 619-643.

Pattanapanyasat K, Sukapirom K, Tachavanich K and Kaewmoon S, (2007) Flow cytometric quantitation of opsonophagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* using a whole blood microassay. *Cytometry A* 71(12) 1027-1033.

Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Jentsch S, Platz A, De HS, Schweizer KG and Haase G, (2003) Analyses of phagocytosis, evoked oxidative burst, and killing of black yeasts by human neutrophils: a tool for estimating their pathogenicity? *Med.Mycol.* 41(1) 7-14.

Platz A, (2004) Flowzytometrische Erfassung der Phagozytose schwarzer Hefen durch humane Granulozyten. *GENERIC Ref Type: Generic*

Podbielski A, Schnitzler N, Beyhs P and Boyle MD, (1996) M-related protein (Mrp) contributes to group A streptococcal resistance to phagocytosis by human granulocytes. *Mol.Microbiol.* 19(3) 429-441.

Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch* (259. Auflage 2002) 556/ 1305

Reis, NR and Mok WY. (1979) *Wangiella dermatitidis* isolated from bats in Manaus, Brazil. *Sabouraudia* 17 213-218.

Schnitzler N, Haase G, Bussing A, Kaufhold A, Beyhs P and Podbielski A, (1995) Measuring resistance to phagocytosis of group A and G streptococci: comparison of direct bactericidal assay and flow cytometry. *Med.Microbiol.Immunol.* 184(1) 17-22.

Schnitzler N, Peltroche-Llacsahuanga H, Bestier N, Zundorf J, Lutticken R and Haase G, (1999) Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect.Immun.* 67(1) 94-101.

Szaniszlo PJ, Karuppayil SM, Mendoza L and Rennard RJ, (1993) Cell cycle regulation of polymorphism in *Wangiella dermatitidis*. *Arch.Med.Res.* 24(3) 251-261.

Thieme Verlag Mykologie für Mediziner (2003) 5-8

Tudzynski P, Holter K, Correia T, Arntz C, Grammel N and Keller U, (1999) Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol.Gen.Genet.* 261(1) 133-141.

Vogler H and Kuhlemeier C, (2003) Simple hormones but complex signalling. *Curr.Opin.Plant Biol.* 6(1) 51-56.

Wang Y, Aisen P and Casadevall A, (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect.Immun.* 63(8) 3131-3136.

Wolf AM, (1992) Fungal diseases of the nasal cavity of the dog and cat. *Vet.Clin.North Am.Small Anim Pract.* 22(5) 1119-1132.

Zuther K, Mayser P, Hettwer U, Wu W, Spiteller P, Kindler B, Karlovsky P, Basse C, Schirawski J (2008) The Tryptophan Aminotransferase Tam1 Catalyses the Single Biosynthetic Step for Tryptophan Dependent Pigment Synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 68, 152–172

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Mayser für die Bereitstellung des Themas, für die tolle Betreuung, sowie für die nicht selbstverständliche finanzielle Unterstützung danken. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Zentrums für Dermatologie und Andrologie des Universitätsklinikums Gießen-Marburg, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen. Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Ursula Förste und bei Frau Anne Gries für die tolle Einarbeitung im Labor bedanken.

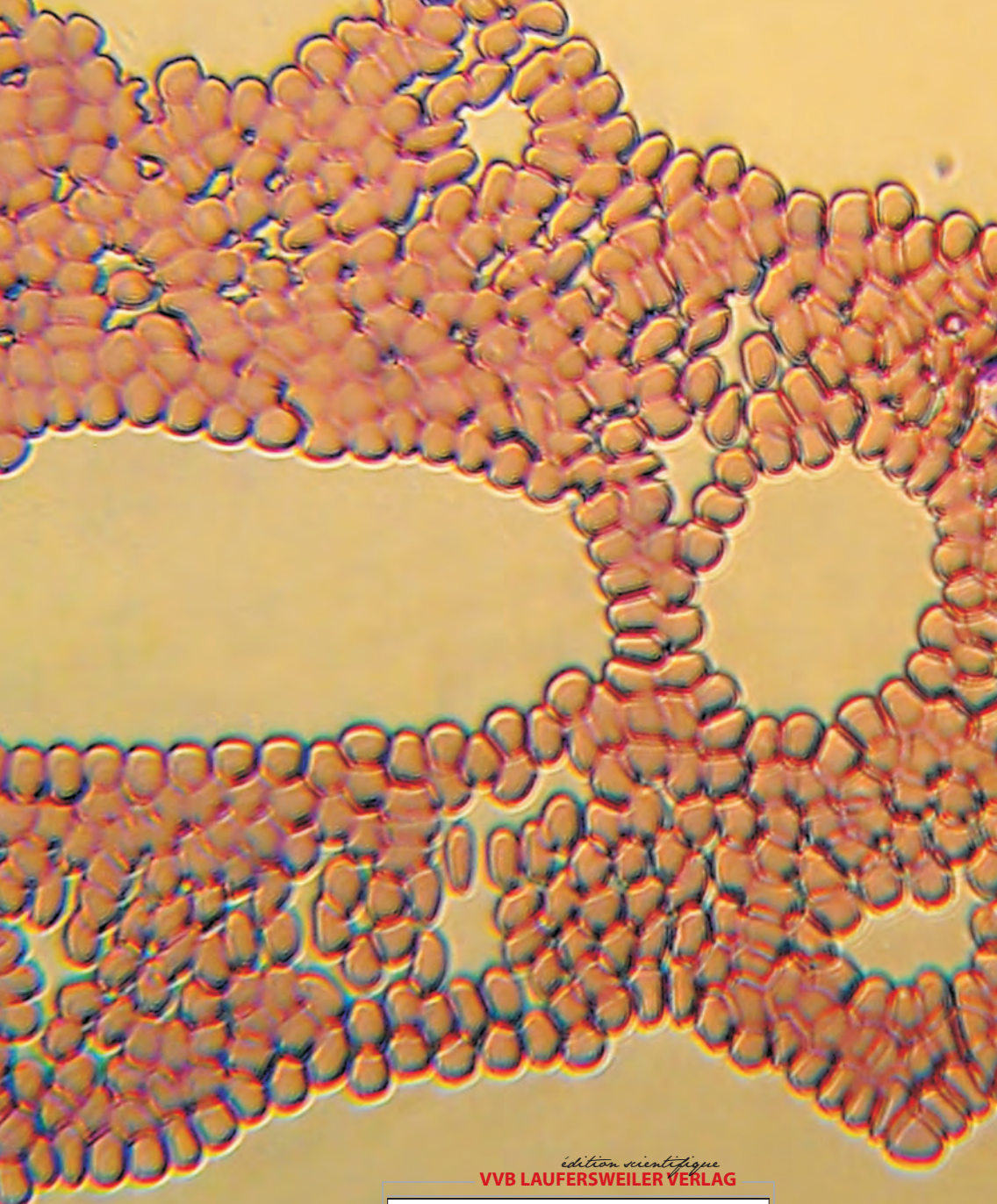
Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Dipl.-Chem. H.-J. Krämer aus der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin in Gießen, der mich unermüdlich unterstützt hat und mit vielen kreativen Ideen außerordentlich viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Des weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Baljer und Herrn Dr. R. Weiss aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere in Gießen für die freundliche Betreuung und die schnelle Korrektur dieser Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich auch Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Sachs, sowie allen Mitarbeitern des Zentrums für Transfusionsmedizin und Hämotherapie in Gießen danken, da sie die Messungen an ihrem Durchflusszytometer ermöglichten und mich stets unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. M. Diener aus dem Institut für Veterinär-Physiologie in Gießen für die schnelle Korrektur der Arbeit.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben. Ich möchte meinem geliebten Mann Stefan danken, der mir so einmalig zur Seite stand.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599880 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5530-1



9 783835 955301