

**Pityriacitrin - ein von *Malassezia furfur* synthetisierter UV-Filter
und seine Wirkungen auf die kutane Mikroflora**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Angelika Machowinski
aus Wissen

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Peter Mayser

Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Mayser
Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Caroline Herr

Tag der Disputation: 05.02.08

„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.“

Publikationen und bisherige Veröffentlichungen

- Präsentation der Ergebnisse anhand eines Posters auf der 37. Wissenschaftlichen Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft 04.- 06. September 2003 in Heidelberg:

Pityriacitrin: UV-Filter auch bei *Candida albicans* und *Staphylokokken*? Von A.

Machowinski¹, H.-J. Krämer², P. Mayser¹

¹Zentrum für Dermatologie und Andrologie, Justus Liebig University Gießen, Gaffkystr. 14, D-35385 Gießen

²Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Klinische Pharmakologie, Justus Liebig University Gießen, Gaffkystr. 11C, D-35385 Giessen

- Publikation in *Mycoses*:

Machowinski, A.¹, Krämer, H.-J.², Hort, W.¹, Mayser, P.¹: Pityriacitrin – a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses*, 49: 388-392, 2006

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CBS | Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn, The Netherlands) |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| HPLC | High pressure/ performance liquid chromatography |
| ROS | Reactive oxygen species |
| S | <i>Staphylococcus</i> |
| TEF | Toluol–Ethylformiat–Ameisensäure |
| TLC | Thin layer chromatography |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung und Fragestellung | 7 |
| 1.1. Einleitung | 7 |
| 1.2. Die Pityriasis versicolor als eine der häufigsten <i>Malassezia</i> -assoziierten Dermatosen | 7 |
| 1.3. Mikrobiologie von <i>Malassezia furfur</i> | 11 |
| 1.3.1. Pityriacitrin | 13 |
| 1.4. Pathogenitätsfaktoren | 15 |
| 1.5. Mikrobiologie der Haut und Einfluß von UV-Licht | 17 |
| 1.6. Ziel der Arbeit und Fragestellung | 22 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 24 |
| 2.1. Auswahl der Mikroorganismen | 24 |
| 2.2. Nährmedien und Kulturverfahren | 24 |
| 2.3. Eich- und Wachstumskurven | 27 |
| 2.4. Gewinnung von Pityriacitrin | 31 |
| 2.5. Tryptophanabhängige Lichtschutzfähigkeit | 34 |
| 2.6. Konzentrationsabhängigkeit des Lichtschutzeffektes | 35 |
| 2.7. Wirkung von Pityriacitrin auf <i>Candida albicans</i> | 36 |
| 2.8. Wirkung von Pityriacitrin auf <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i> | 37 |
| 2.9. Statistische Methoden | 38 |
| | |
| 3. Ergebnisse | 39 |
| 3.1. Einfluß des Tryptophangehaltes auf die Lichtschutzfähigkeit von <i>M. furfur</i> | 39 |
| 3.2. Einfluß der Konzentration auf die Lichtschutzfähigkeit von <i>Pityriacitrin</i> | 43 |
| 3.3. Einfluß von Pityriacitrin auf <i>Candida albicans</i> | 47 |
| 3.4. Einfluß von Pityriacitrin auf <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i> | 50 |
| | |
| 4. Diskussion | 57 |
| 5. Zusammenfassung | 68 |
| 6. Literaturverzeichnis | 71 |
| 7. Abbildungsverzeichnis | 85 |
| 8. Rohdaten | 86 |
| 9. Herstellerverzeichnis | 93 |

1. Einleitung und Ziel der Arbeit

1.1. Einleitung

Malassezia furfur gehört zu der residenten Mikroflora der Haut (Roberts 1969). Das Vorhandensein dieses obligat-lipophilen Pilzes ist aber auch mit der Erkrankung Pityriasis versicolor assoziiert (Gupta 2002). Die Pityriasis versicolor alba geht mit Depigmentierungen der Haut einher. Trotz Hemmung der Melanozytenfunktion weisen diese Läsionen keine erhöhte UV-Sensibilität auf (Thoma 2005).

Obwohl der Erreger und die Erkrankung Pityriasis versicolor schon seit langem bekannt sind, liegt noch kein umfassendes Modell zur Pathogenese vor. Dass UV-Licht und die nutritive Versorgung für den Pilz bei der Erkrankung eine Rolle spielen, ist bekannt (Wertheim 1923, Ruete 1933, Nazzaro Porro 1976, Faergemann 1987).

Mayser konnte 1998 ein Minimalmedium präsentieren, das allein aus Agar, einer Lipidquelle (Tween 80[®]) und einer Stickstoffquelle bestehen muß, um bei *Malassezia furfur* Wachstum zu induzieren. Nahm man als Stickstoffquelle nur Tryptophan, so bildeten die *Malassezia furfur* Kulturen Pigmente und Fluorochrome (Mayser 1998 d). Dieser Syntheseweg kann eine Erklärung für die Pathogenese der Pityriasis versicolor liefern. Nach chromatographischen Untersuchungen wurde aus dem Pigment ein Indolderivat isoliert, welches als Filter des ultravioletten Spektrums über einen breiten Wellenlängenbereich wirken kann: Pityriacitrin (Mayser 2002).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, welche Bedeutung der Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolismus von *Malassezia furfur* und die damit verbundene Produktion des Pityriacitrins für die Hefe selbst und auch für andere Mikroorganismen auf der Haut haben könnte.

1.2. Die Pityriasis versicolor als eine der häufigsten *Malassezia*-assoziierten Dermatose

Die Namensgebung und somit Erstbeschreibung der Pityriasis versicolor wurde zuerst von Willan 1801 vorgenommen (Willan 1801). 1846 veröffentlichte Carl Ferdinand Eichstedt Studien über den Befall der mit Pityriasis versicolor erkrankten Haut mit Pilzen (Eichstedt

1846). Malassez hat 1874 hefe-ähnliche, vorwiegend ovale Zellen in Kopfschuppen beschrieben und bezeichnete sie als Sporen (Malassez 1874). Sabouraud erkannte die von Malassez beschriebenen Sporen 1904 als Ursache der Kopfschuppen und schuf die neue Gattung *Pityrosporum* ("Spore der Schuppe") (zitiert nach Keddie 1974). Gordon fand 1951 einen weiteren Pilz auf der Haut, den er sowohl von gesunder als auch von mit Pityriasis versicolor erkrankten Arealen anzüchten konnte. Er bezeichnete ihn als *Pityrosporum orbiculare* (Gordon 1951). In den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts gab es vier bekannte Spezies: *Malassezia furfur* Robin 1853, *Pityrosporum ovale* Castellani und Chalmers 1913, *P. orbiculare* Gordon 1951 und *Pityrosporum pachydermatis* Weidman 1925. Lange war nicht klar, ob es sich bei *Pityrosporum ovale* und *Pityrosporum orbiculare* um verschiedene Spezies handelt, oder ob es nur verschiedene Ausprägungen der gleichen Art sind (Sternberg 1961, Faergemann 1982, Midgley 1985, Cunningham 1990). Guého *et al.* grenzten die Spezies *Malassezia furfur*, *Malassezia pachydermatis* und *Malassezia sympodialis* ab (Guého 1989, 1990). Genomanalysen zeigten, dass noch weitere 4 Spezies abgegrenzt werden können (Boekhout 1994, Guillot 1995, Guého 1996). Es handelt sich dabei um *Malassezia globosa*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia restricta* und *Malassezia slooffiae*. Weitere Spezies sind *M. dermatis* (Sugita 2002), *M. japonica* (Sugita 2003), *M. yamatoensis* (Sugita 2004) und bei Tieren *M. nana* (Hirai 2004).

Die Pityriasis versicolor ist eine oberflächliche Mykose mit keinem hohen Krankheitswert, dafür geht sie mit einer kosmetischen Beeinträchtigung einher (Jeliffé 1954, Gründer 1987). Bei der Pityriasis versicolor zeigen sich Farbvarianzen ("versicolor") auf der Haut, deren Beschreibung von "gelb", "dunkelbraun", "rot", "café-au-lait" bis "ins schwärzliche gehend" reicht (El-Hefnawi 1971, Borelli 1991). Die Haut läßt sich durch seitlichen Druck oder Abkratzen als Hobelspanphänomen/ Schuppen abheben.

Die Krankheit findet weltweite Verbreitung (Grigoriu 1984). Die Häufigkeit der Pityriasis versicolor ist aber vor allen in Ländern mit tropischen und subtropischen Klima sehr hoch und kann dort bis zu 40% betragen (Borelli 1991, Hay 1992). In europäischen Ländern tritt sie in den warmen Sommer- und Herbstmonaten vermehrt auf (Parisis 1977).

Das Alter der betroffenen Patienten liegt im Mittel zwischen 20 und 39 (Parisis 1977, Chetty 1979, Seeliger 1981). Es sind aber auch Fälle von Kleinkindern sogar Neugeborenen beschrieben (Jeliffé 1954, Smith 1966, Wyre 1981, Ahtonen 1990). Der vorrangige

Symptombereich der Pityriasis versicolor ist die Brust und der Rücken (El-Hefnawi 1971, Faergemann 1983). Sie findet sich aber auch auf den Armen und im Gesicht, dort vor allem an der Stirn (Terragni 1991). Hände, Füße und Ohren sind sehr selten befallen (Ruete 1928, Roberts 1969, Chetty 1979). Ein Fall der Tinea versicolor des Penis wird von Blumenthal beschrieben (Blumenthal 1971).



Abbildung 1: Pityriasis versicolor

Die Diagnose einer Pityriasis versicolor wird mit Hilfe des klinischen Bildes und der Wood-Licht-Untersuchung gestellt (UV-Licht mit der Wellenlänge 366nm), wobei letzteres eine typisch gelb-orange Fluoreszenz der Läsionen hervorruft. (Borelli 1991).

Eine besondere Form der Erkrankung ist die Pityriasis versicolor alba. Bei dieser Ausprägung liegen keine Farbvarianzen in den befallenen Bereichen vor. Hypo- und Depigmentierung führen zu einer Abgrenzung gegenüber der Pityriasis versicolor und im Gegensatz zu der hyperchromen Form der Mykose sind klinische Daten bei der Alba-Variante recht selten, besonders hinsichtlich einer erfolgreichen Therapie der depigmentierten Areale. Die vorhandene Literatur liefert ein kontroverses Bild bezüglich der verantwortlichen Pathogenitätsfaktoren, auf die im weiteren Verlauf der Arbeit eingegangen wird.

Klinisch folgt die Depigmentierung häufig im Anschluß an die hyperpigmentierte Phase der Pityriasis versicolor (Fox 1927). Es werden aber auch beide Formen nebeneinander beobachtet. Kinder sind seltener von der Mykose betroffen, weisen dann aber eher die Alba-Form auf (Thoma 2005).

Die hypochromen Areale sind gegenüber einer Repigmentierung sehr therapieresistent, auch unter artifizieller Bestrahlung. Andererseits weisen gerade diese Bereiche keine erhöhte UV-Sensibilität auf (Lewis 1936, De Almeida 2006), selbst bei verstärkter UV-Bestrahlung (Kistiakovsky 1927, Wertheim 1928, Ruete 1933).

Als Differentialdiagnosen der Pityriasis versicolor kommen die postinflammatorische Hyperpigmentierung, das Erythrasma, das seborrhoische Ekzem und Dermatophytosen in Betracht (Mayser 1999). Die Alba-Form ist abzugrenzen gegenüber der Vitiligo und verschiedenen Leukoderma-Varianten (Wertheim 1928, Bechet 1935, Lewis 1936).



Abbildung 2: Pityriasis versicolor alba

Die Therapie besteht aus den topisch wirksamen Substanzen aus der Gruppe der Azole, wie zum Beispiel Ketoconazol (Terzolin[®] oder Nizoral[®]) oder Econazol (Epipevaryl[®]). Auch andere Antimykotika zeigen Wirkung, wie das Selendisulfid (Ellsurex[®]-Paste), Ciclopiroxolamin, Terbinafin, Propylenglykol oder Salicylspiritus (Lange 1998, Nenoff 2001, Mayser 2003 b). Wenn die lokale Therapie nicht anschlägt, die Herde zu groß werden oder die Krankheit sehr häufig rezidiert, wird eine systemische Therapie angewendet, z. B. mit Ketoconazol 400mg 1x pro Monat, Itraconazol 200mg/ d über 5-7 Tage oder Fluconazol 400mg Einmalig (Mayser 2003 b, Gupta 2003, Thoma 2005). Die allgemeine Prognose bei der Pityriasis versicolor ist günstig. Doch die dermatologische Symptomatik/ Beeinträchtigung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit trotz korrekter Behandlung rezidivieren (Hay 1992).

1.3. Mikrobiologie von *Malassezia furfur*

Malassezia furfur gehört zu der Gattung der *Malassezia* Hefen. Ein perfektes Stadium ist bisher nicht bekannt, so dass dieser Sproßpilz einerseits zu den "fungi imperfecti" gezählt wird (Seeliger 1981, Horner 1995). Andererseits liegen bei ihm ein lamellenartiger Aufbau der Zellhülle und eine positive Diazoniumblau-B-Färbereaktion vor, so dass er zu den Basidiomyceten (Ständerpilze) gerechnet werden kann. (Hagler 1981, Simmons 1987, Nenoff 2001).

Mikromorphologisch finden sich bei *Malassezia furfur* unter dem Lichtmikroskop runde, flaschenförmige, ovale und/ oder zylindrische Formen, die unterschiedliche Länge und Durchmesser aufweisen (Ruete 1928). Die Zellgröße reicht von 1,5-4,5 x 2,0-6,5µm, stellenweise bis zu 8µm im Durchmesser (Yarrow & Ahearn 1984).

Die etwa 120nm dicke Zellwand mit spiraligem Aufbau (Mittag 1994, 1995) besteht aus der Außenlamelle, der mehrschichtigen, multilamellös untergliederten Zwischenwand und der Plasmamembran. Es wird vermutet, dass der Lipidgehalt der Außenlamelle Adhärenzprozesse von *Malassezia furfur* begünstigt (Mittag 1994, 1995).

Die Vermehrung von *Malassezia furfur* erfolgt durch Abschnürung der hervorsproßenden Tochterzellen von der Elternzelle unter Hinterlassung einer halskrausenartigen Narbe ("Collarette") (Barnes 1973, Yarrow & Ahearn 1984).

Von erkrankten Arealen entnommenes Schuppenmaterial wird in 10-30%iger Kali-Lauge inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Hier zeigen sich runde Sproßzellen, die sich zu Haufen / "Nestern" zusammen lagern, umgeben von Hyphen (Gordon 1951, Nazzaro Porro 1977, Bojanovsky 1979, Faergemann 1989).

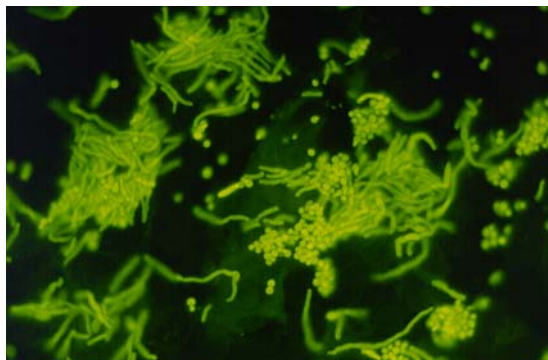


Abbildung 3: *Malassezia furfur* unter dem Fluoreszenzmikroskop

Aus entnommenem Schuppenmaterial lässt sich *Malassezia furfur* anzüchten. Nach 7tägiger Kultur bei 32°C finden sich stumpf-glänzende, leicht genabelte, creme-gelbe Kulturen. Der Geruch wird als fruchtig beschrieben (Seeliger 1981). Das Temperaturoptimum liegt bei ca. 35°C (Yarrow & Ahearn 1984). Die pH-Wert-Optima liegen bei 5,5-6,5. Da *Malassezia* Hefen resistent gegenüber Cycloheximid (400ppm) sind (Yarrow & Ahearn 1984), bietet es sich an, es als Zusatz zum Nährboden hinzu zu geben, um das Risiko einer Kontamination zu verringern.

Nachdem Benham 1939 Studien über den Lipidbedarf von *Malassezia furfur* veröffentlicht hatte, war die obligate Lipidabhängigkeit bekannt. Weary beschrieb 1966 Wachstum auf einem Medium, welches kein Öl, dafür aber Tween, einen Polyoxysorbitanfettsäureester enthält (wie auch bei Dixonagar). Eine Differenzierungsmöglichkeit der *Malassezia* Hefen lieferte Mayser 1997 durch eine Studie über die Verstoffwechslung verschiedener Emulgatoren. Mit Cremophor EL konnte nur bei *Malassezia furfur* ein Wachstumshof nachgewiesen werden. Möglich ist auch eine Differenzierung durch die unterschiedliche Empfindlichkeit auf Polidocanol (Mayser 1997) und andere Azole (Gupta 2000). 1998 veröffentlichte Mayser Studien über ein neues Minimalmedium für *Malassezia furfur*, welches nur aus einer Aminostickstoffquelle und einer Lipidquelle, dem Tween besteht. Die Fähigkeit auf diesem Medium Pigment zu bilden bietet eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung von *Malassezia*-Stämmen. *Malassezia pachydermatis* zeigt ebenso die Fähigkeit zur Bildung von Pigment, wenn auch unter leicht veränderten Wachstumsvoraussetzungen. Dies lässt eine enge molekulargenetische Verwandtschaft vermuten (Mayser 2004).

Die Fermentation von Kohlenhydraten ist bisher nicht bekannt (Yarrow & Ahearn 1984) Nazzaro Porro zufolge unterstützt Glucose das Wachstum (Nazzaro Porro 1976). Für das Wachstum sind Kohlenhydrate jedoch nicht essentiell (Mayser 1998).

Vitamine sind für das Wachstum nicht von Bedeutung (Weary 1968, Nazzaro Porro 1976).

Der Verstoffwechslung von Stickstoff kommt im Zusammenhang mit *Malassezia furfur* und der vorliegenden Arbeit eine besondere Bedeutung zu. *Malassezia furfur* kann mit unterschiedlicher Effektivität 21 getestete Aminosäuren metabolisieren (Weary 1968, Mayser 1998), außer Tyrosin (El-Gothamy 1981). Auf der Haut stellen freie Aminosäuren einen hohen Anteil der wasserlöslichen Bestandteile (Spier 1956). Der Gehalt an freien

Aminosäuren auf der Haut zeigt auf mit *Tinea versicolor* erkrankten Arealen quantitative Unterschiede (Burke 1962), so dass ein Zusammenhang zwischen Aminosäurenstoffwechsel und mit *Malassezia furfur* assoziierten Krankheiten zu vermuten sein könnte. Die Aminosäurenverluste im menschlichen ekkrinen Schweiß könnten auch eine Rolle in der Pathogenese spielen (Rothmann 1949a&b, Liappis 1975, 1980), da das Schwitzen als Manifestationsfaktor der Erkrankung gilt (Borelli 1991).

Zusätzlich kann die Hefe Ammoniumsalze wie NH_4Cl , NH_4HSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Harnstoff, Kreatin, Kreatinin, Harnsäure und Allantoin verstoffwechseln (Mayser 1998).

1.3.1. Pityriacitrin

Ausführlich soll die Verstoffwechslung der Aminosäure Tryptophan beschrieben werden. Bereits bei der Beschreibung des Lipidbedarfs von *Malassezia furfur* wurde dargestellt, dass Mayser 1998 ein Minimalmedium präsentieren konnte, das allein aus Agar, einer Lipidquelle (Tween 80) und einer Stickstoffquelle bestehen muß, um bei *Malassezia furfur* Wachstum zu induzieren. Nahm man nun als Stickstoffquelle nur L-Tryptophan, so bildeten die *Malassezia furfur* Kulturen rotbräunliches Pigment, welches in den Agar diffundierte (Mayser & Wille 1998). Ob es sich um L- oder D-Tryptophan handelte, spielte keine Rolle. Die natürlichen Aminosäuren gehören –bis auf wenige Ausnahmen- der L-Reihe an. Tryptophan gehört zu den heterozyklischen Aminosäuren und ist polar. Es ist eine essentielle Aminosäure und in den meisten Proteinen zu 1-2% enthalten, fehlt jedoch zum Beispiel in Kollagen und Insulin. Der Hauptabbauweg von Tryptophan führt unter Abspaltung des Alanins zum Acetoacetyl-CoA (Buddecke 1989).

Es lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem gebildeten Pigment um Derivate des Tryptophans handelt. Bereits für andere Basidiomyceten ist eine Pigmentbildung nach Zugabe von Tryptophan zum Nährboden beschrieben (Hagler 1981). Aus dem Stoffwechsel des Tryptophans lassen sich zwei grundsätzliche Synthesewege ableiten: a) Öffnung des Pyrolringes des Indols und Bildung von Ommochromen (Butenandt 1956), b) Erhalt des Indolringes und Bildung von Indolderivaten. Indole und Indolderivate wurden dünnschichtchromatographisch nach Gill und Steglich (1987) nachgewiesen (Mayser 1999, Wille 2001, Mayser 2003 a).

Setzt man das Pigment UV-Licht der Wellenlänge 254 bzw. 366nm aus, so zeigt sich eine Fluoreszenz.

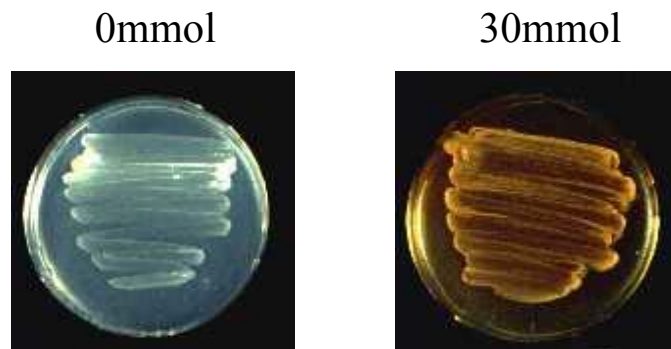


Abbildung 4: *Malassezia furfur* auf Agar mit verschiedenem Gehalt an Tryptophan nach 7 Tagen Inkubation

Bisherige Untersuchungen ergaben, dass die Synthese von Tryptophan-Derivaten (Pigmenten und Fluorochromen) für *Malassezia furfur* einen Lichtschutz im UVA- und UVB-Bereich bewirken kann (Mayser 1998, 1999, 2002). Da der Pilz auf der Hautoberfläche lokalisiert ist, könnte dies von Bedeutung sein. Den Verbindungen können außerdem vorläufig eine Tyrosinaseinhibition und antibiotische Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* im Plattendiffusionstest zugesprochen werden. Aufgrund ihrer vielfältigen Farben könnten die gebildeten Pigmente eine Erklärung für die verschiedenen Farbausprägungen einer Pityriasis versicolor liefern. Die angesprochenen Fluorochrome könnten die bei Diagnosestellung unter Wood-Licht charakteristische Fluoreszenz erklären. Eine dabei besonders hervorstechende Verbindung, Pityriacitrin (Mayser 2002), ist zum größten Teil Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit:

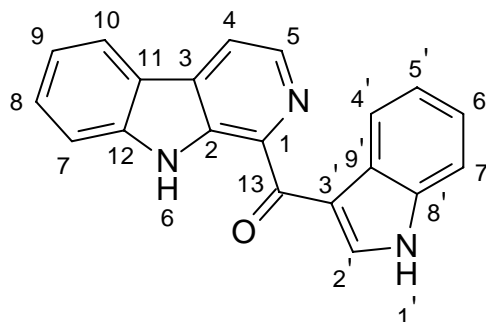


Abbildung 5: Pityriacitrin

Hier handelt es sich um ein Indolderivat (9*H*-Pyrido[3,4-*b*]indol-1-yl)(1'*H*-indol-3'-yl) methanon: C₂₀H₁₃N₃O, welches auch in marinen Bakterien der Gattung *Paracoccus* (Stamm

F-1547) gefunden und als UV-Schutz patentiert wurde (Nagao 1999). Es ist eine gelbfarbene Festsubstanz mit dem Molgewicht von 311,1033. Bei der Messung des UV-Spektrums zeigen sich Absorptionsmaxima bei 389, 315, 289 und 212nm (Abbildung 6).

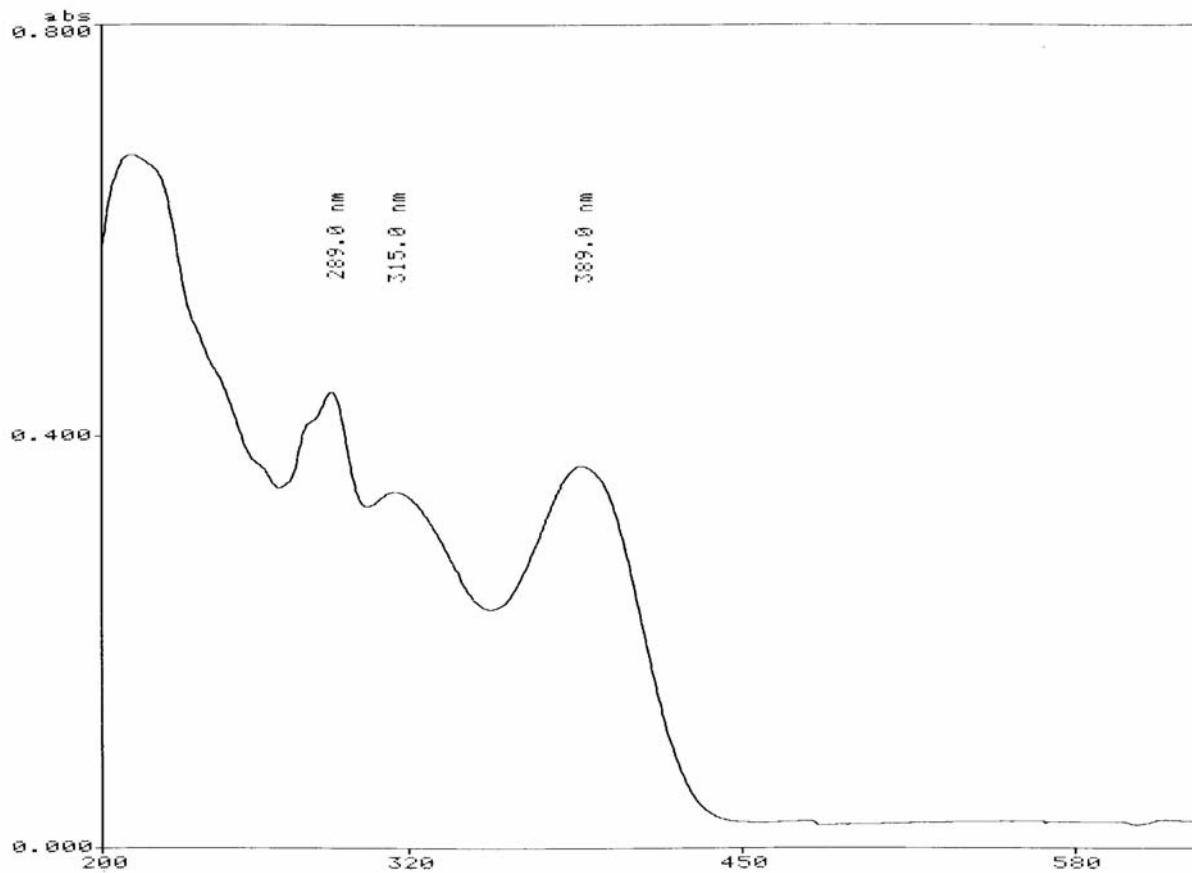


Abbildung 6: Absorptionsspektrum von Pityriacitrin (gelöst in 64% Acetonitril)

Zusammenfassend ist *Malassezia furfur* aufgrund seiner Nährstoffbedürfnisse und vermutlich auch wegen seiner Fähigkeit zur Pigmentbildung optimal an seinen Lebensraum, die menschliche Haut angepaßt (Mayser 1998, 1999).

1.4. Pathogenitätsfaktoren

Neben der Assoziierung der *Malassezia*-Spezies mit der Pityriasis versicolor (Faergemann 1981), werden ihnen eine Bedeutung in der Pathogenese des seborrhoischem Ekzems (Bergbrant 1991, Nakabayashi 2000), der *Malassezia*-Follikulitis (Bojanovsky 1979, Bäck 1985), der atopischen Dermatitis (Guého 1998, Sugita 2004) und akneiformer Dermatosen (Bojanovsky 1977) zugesprochen.

Faergemann und Fredriksson beschreiben die höchste Inzidenz der Besiedelung mit *Malassezia furfur* zu Beginn der Pubertät, wenn die Talgdrüsen aktiv werden (Faergemann 1980). Das ausgeprägteste Vorkommen von *Malassezia furfur* findet sich auf der Brust und auf dem Rücken (Roberts 1969, El-Hefnawi 1971, Parisi 1977, Faergemann 1983). Dies entspricht dem vorrangigen Symptombereich der Pityriasis versicolor. Sie findet sich meist an talgdrüsenreichen Arealen (Faergemann 1983), da die dortigen Lipidvorkommen gute Wachstumsbedingungen für den Pilz darstellen. Dies könnte auch die geringere Inzidenz der Erkrankung im höheren Alter erklären, da dann der Lipidgehalt der Haut abnimmt. Die Besiedlung mit *Malassezia furfur* kann in erkrankten Arealen bis zu 450 000 Keime/ cm² betragen (Mc Ginley 1970).

Dieser Hypothese gegenüber stehen Untersuchungen, die *Malassezia globosa* als ursächlichen Faktor der Erkrankung bezeichnen, da damit das Überwiegen von runden Zellformen in den erkrankten Gebieten zu erklären wäre (Crespo Erchiga 2000, Aspiroz 2002). Des Weiteren ist diese Art am häufigsten in solchen Hautarealen zu entnehmen. Sie ist aber auch die häufigste, die auf gesunder Haut gefunden werden kann (Nakabayashi 2000).

Pityriasis versicolor gilt als nicht ansteckend (Borelli 1991). Studien über eine mögliche Vererbung der Pityriasis versicolor oder anderen mit *Malassezia furfur* assoziierten Hauterkrankungen liegen vor (Burke 1961, Lynfield 1974).

Als Hauptpathogenitätsfaktor gilt die Hyperhidrosis und danach die Immunsuppression (Borelli 1991, Hay 1992). Außerdem wird an einen hormonellen Einfluß (Canizares 1959, Burke 1961, Boardman 1962, Roberts 1969, Borelli 1991) oder Malnutrition (Burke 1961) gedacht. Art und Weise der Körperhygiene wird als untergeordnet vermutet (Burke 1961, Parisi 1977, Chetty 1979). Ein Zusammenhang wird zwischen Pityriasis versicolor und lipidhaltigen Körperlotionen/ Sonnenölen gesehen (Roed-Petersen 1980, Mayser 1999). Eine Interaktion von *Malassezia furfur* mit dem menschlichen Immunsystem ist bekannt, wie zum Beispiel die Fähigkeit, das Komplementsystem oder die humorale Abwehr zu aktivieren (Sohnle 1980, Sohnle 1983, Faergemann 1983, Scheynius 1984, Dotz 1985, Cunningham 1992). Neue Untersuchungen zeigen, dass trotz hoher Pilzbesiedelung die Immunantwort mit neutrophilen Granulozyten ausbleibt. Es wird vermutet, dass dies an dem hohen Lipidgehalt der Zellmembran liegen kann oder dass tryptophanabhängig synthetisierte Pityriarubine die Immunantwort unterdrücken (Wroblewski 2005).

Histologisch findet man den Pilz im *stratum corneum* und im Infundibulum der Haarfollikel (Ruete 1928, Wolff 1976, Hay 1992). Die Adhärenz von *Malassezia furfur* an das *stratum corneum* ist *in vitro* von zahlreichen Faktoren abhängig (Faergemann 1983, Bergbrant 1994, Bond 1996), wie zum Beispiel Temperatur, Inkubationszeit und Inokulationsmenge. In den von der Haut entnommenen Schuppen einer Pityriasis versicolor findet man Hefephase und Myzelphase nebeneinander (Gordon 1951, Nazzaro Porro 1977, Bojanovsky 1979, Faergemann 1989). Die Umwandlung in die Myzelphase und Ausbildung von Hyphen wird von vielen Autoren für die Pathogenese der mit *Malassezia furfur* assoziierten Erkrankungen verantwortlich gemacht (Dorn 1977, Mc Ginley 1975, Gupta 2002) und kann im lipidabhängigen Metabolismus zum Beispiel durch Cholesterin und Cholesterolester induziert werden (Nazzaro Porro 1977).

Die hypochromen Areale der Pityriasis versicolor alba sind recht therapieresistent trotz UV-Bestrahlung (Versuch der Repigmentierung) (El-Gothamy 1975). Gerade diese Bereiche weisen keine erhöhte UV-Sensibilität auf (Lewis 1936, De Almeida 2006). Im Gegenteil, hier fehlt die typische Erythembildung während der Strahlentherapie (Kistiakovsky 1927, Wertheim 1928, Ruete 1933). Untersuchungen zur Folge könnten Pigmentgemische isoliert von *Malassezia*-Spezies als UV-Filter dienen und somit dieses Phänomen erklären. Der 1998 entdeckte Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolismus von *Malassezia furfur* liefert weitere Aufschlüsse zur Pathogenese der Depigmentierung und kann auch klinische Symptome wie die Fluoreszenz der erkrankten Areale erklären (Mayser 1998 d).

Anderen Autoren zu Folge liegt möglicherweise eine Schädigung der Melanozytenfunktion vor, die durch toxischen Einfluß von Pilz-Metaboliten zustande kommen könnte (Nazzaro Porro 1986, De Luca 1996, Krämer 2005 b, Solano 2006).

1.5. Mikrobiologie der Haut und Einfluß von UV-Licht

Die Haut besteht aus **1.** Epidermis (syn. Oberhaut, bestehend aus *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, an Hohlhand und Fußsohle zusätzlich aus *stratum lucidum*, und dem *stratum corneum*). Diese bildet zusammen mit dem **2.** Korium (syn. Dermis oder Lederhaut, bestehend aus *stratum papillare* und *stratum reticulare*) die Cutis. In der untersten Schicht, der **3.** Subcutis (syn. Unterhaut) befinden sich ekkrine Schweißdrüsen, der Haarfollikel mit Haar, Talgdrüsen, die *mm. arrector pili* und apokrine Schweißdrüsen

(Duftdrüsen). Die Haut bietet Raum für einen breit gefächerten Mikrokosmos. Vorrangiger Besiedlungsort der residenten und transienten Mikroflora der Haut, wie z. B. *Malassezia spp.*, *Staphylokokken* oder auch *Candida albicans* ist das *stratum corneum* und das Infundibulum des Haarfollikels. Das *stratum corneum* entsteht durch mitotische Teilung von *stratum basale* Zellen, die dann scheinbar säulenartig (wie "auf einer Rolltreppe“) nach oben wandern, während sie sich differenzieren und schließlich später absterben. Der Zellturnover beträgt ca. 12-14 Tage (Noble 1992).

Dieser Prozeß, Keratinisation, bedeutet weiterhin auch, dass die Hautoberfläche vorrangig aus Keratin besteht, welches auf den ersten Blick keine optimalen Nahrungsbedingungen für Mikroorganismen bieten kann.

Das *stratum corneum* bildet mit seinen fest verbackenen Schuppencellen eine wirksame Barriere, die erst von den Kleinlebewesen durchdrungen werden muß (Noble 1992).

Den Mikroorganismen, die diese Beschränkungen überwunden haben, bietet die Haut dann ein stabiles Mikroklima. Potentielle nährstoffreiche Substanzen kommen zum größten Teil aus dem Schweiß und den Talgdrüsen. Diese Absonderungen bilden eine Art Oberflächenemulsion, die z. B. Mineralien, Proteine oder Hormone enthält und deren Zusammensetzung eine aktive Rolle im Gleichgewicht der Mikroflora spielt (Noble 1992).

Die Temperatur der Haut ändert sich sowohl durch Umgebungseinflüsse als auch durch physiologische Veränderungen, meist durch Gefäßaktivität. Trotzdem liegt sie im Allgemeinen zwischen 30 und 40°C.

Der pH-Wert der Haut kann variieren, ist aber hauptsächlich leicht sauer. Maßgeblich für den pH-Wert der Haut ist die Summe der wasserlöslichen Bestandteile (Spier 1956). Bei Körperregionen mit starker apokriner Schweißbildung kann er sogar deutlich im alkalischen Bereich liegen, bis zu pH-Wert 8,5 (Spier 1956). Schwitzen und hohe Luftfeuchtigkeit führen zu einer verstärkten Hydratation des *stratum corneum*. Durch die daraus resultierende verschlechterte Barrierefunktion haben es Mikroorganismen einfacher, in die Haut einzudringen. Der basisch reagierende pH-Wert stellt für *Staphylokokken* keine Wachstumshemmung dar. *Staphylococcus aureus* gilt als einer der widerstandsfähigsten humanpathogenen Bakterien überhaupt und entwickelt gerade in solchen Bereichen wie zum Beispiel der *regio axillares* bevorzugt Pyodermien (Hahn 2005). Hier und in talgdrüsenreichen Arealen sind vermehrt freie Fettsäuren zu finden. Dies lässt den

Rückschluß auf vermehrte bakterielle Lipolyse zu. Diese freien Fettsäuren dienen zum Beispiel auch als Nahrung für lipophile *Malassezia spp.* (Nenoff 2001).

Die Hautflora besteht zum größten Teil aus Koagulase-negativen *Staphylokokkenspezies*, aeroben grampositiven *Coryneformen*, anaeroben *Propionibakterien* und *Malassezia-Spezies* (Somerville 1969, McGinley 1975, Leyden 1991, Hahn 2005).

Staphylokokken sind grampositive Kugelbakterien. Ihre Bezeichnung kommt von dem griechischen Wort Staphyle (=Traube) und bezieht sich auf die traubenförmige Lagerung in der mikroskopischen Ansicht (Hahn 2005).

Staphylococcus epidermidis ist ein Plasmakoagulase-negativer Saprophyt der Haut und Schleimhäute, der zur residenten Mikroflora der Haut gezählt wird (Noble 1992). Diese Staphylokokkenart hat eine mehrschichtige Mureinschicht. Zusammen mit oberflächlichem Polysaccharid, Proteinen und Hämagglutininen vermittelt sie die Adhärenz (Hahn 2005).

Dem gegenüber besitzt *Staphylococcus epidermidis* auch fakultativ pathogenes Potential. So verursacht er z. B. bis zu 40% der Endokarditiden durch künstliche Herzklappen. Er gilt als zweithäufigster Verursacher der Sepsis (>30% aller Fälle) (Hahn 2005).

Staphylococcus aureus wird im Gegensatz zu *Staphylococcus epidermidis* zur transienten Hautflora (Anflugflora) gerechnet (Hahn 2005). Diese Bakterienart ist grampositiv, fakultativ anaerob, produziert Koagulase und hat einen Durchmesser von 0,8-1µm (Dahl 1983). Da sie sich auch im Haarfollikel aufhält, wird ihr zusammen mit *Malassezia furfur* und *Streptococcus pyogenes* die Auslösung von Follikulitiden zugesprochen. Die Fähigkeit von *Staphylococcus aureus*, Infektionen zu verursachen, scheint an seiner Möglichkeit zu liegen, einen Cocktail von Enzymen und Toxinen (wie z. B. $\alpha\beta\gamma\delta$ -Hämolysine) zu bilden, die letztendlich zum Erscheinungsbild der Krankheit beitragen (Noble 1992). Zu den Erkrankungen zählen oberflächliche aber auch tief-invasive eitrige Infektionen (70-80% aller Wundinfektionen), Sepsis und Endokarditis. Die angesprochenen Toxine sind zum Beispiel für Brechdurchfall, das Toxic-Shock-Syndrom (TSS) oder das Staphylococcal-Scaled-Scin-Syndrome (SSSS) verantwortlich (Hahn 2005). *Staphylococcus aureus* ist fast immer bei atopischer Dermatitis nachzuweisen (Walsh 1981, Dahl 1983, Leyden 1991) und findet sich auch bei der Psoriasis (Marples 1973).

Die klassische Wachstumskinetik von Bakterien ist abhängig von der Temperatur im Zusammenhang mit dem pH-Wert, der limitierenden Nahrungskonzentration und der Präsenz und Konzentration von Inhibitoren (Noble 1992).

Candida albicans gilt als fakultativ pathogener Sproßpilz, der in kleinen Mengen als Saprophyt auf der Haut lebt, oberflächliche Infektionen der Haut und Schleimhäute hervorruft und zu tiefen Organmykosen führen kann (Fegeler 1978, Ollert 1988). Hauptreservoir von *Candida albicans* sind die Schleimhäute des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes (Hahn 2005). Da er eher dort als auf gesunder Haut gefunden wird, wird er zur transienten Flora gerechnet (Leyden 1991). Er ist der häufigste Mykoseerreger beim Menschen und ein Leiterreger bei AIDS (Hahn 2005). Als Pathomechanismus steht die Adhärenz des Pilzes an der Haut oder Schleimhaut zusammen mit lokaler oder systemischer Immunsuppression im Vordergrund (Ray 1984, Ghannoum 1986 & 1987, Ollert, 1988, Hof 1995). Einer Infektion mit *Candida albicans* stehen vier Barrieren entgegen: Die Haut und Schleimhaut als mechanische Barriere, die Kolonisationsresistenz durch die bakterielle Schleimhautflora, die zelluläre Immunität sowie humorale Abwehrmechanismen (Hahn 2005).

Die Hautflora ist somit ein fein abgestimmtes System, in dem sich die Bakterien und Pilze, zusätzlich zu physikalischen und chemischen Faktoren, dem Kampf um Nahrung und dem direkten Einfluß (z. B. durch Toxine) der anderen Konkurrenten stellen müssen. Ist das Gleichgewicht der Mikroflora gestört, kommt es zu den oben beschriebenen Erkrankungen (Singh 1971, Leyden 1978).

Der Einfluß von UV-Licht auf diese Mikroflora ist bekannt. Licht als Spektralbereich elektromagnetischer Wellen wird in folgende Bereiche eingeteilt:

| | Wellenlänge in nm |
|-----------|--------------------------|
| Infrarot | 700-2500 |
| Sichtbar | 400-700 |
| UVA | 315-400 |
| UVB | 280-315 |
| UVC | 200-280 |
| Vakuum-UV | < 200nm |

Tabelle 1: Zusammensetzung der Sonnenstrahlung der Erde (nach Cockell 1999 und Dummer 2001)

Das UVA-Licht wird als Bräunungsstrahlung bezeichnet. Sie erreicht die Erdoberfläche wenig abgeschwächt und ist auch weniger energiereich im Vergleich zur UVB-Strahlung. UVB-Licht oder die sogenannte Dorno-Strahlung ist erythemerzeugend wie auch die UVC-Strahlung (Dummer 2001). Letztere wird jedoch weitestgehend in der Atmosphäre absorbiert (Rünger 1997, Cockell 2002), genauso wie Vakuum-UV, das Strahlung unterhalb einer Wellenlänge von 200nm bezeichnet. (Rettberg 2002). UV-Licht unterliegt während der Passage durch die Erdatmosphäre der Absorption und der Streuung. CO₂ schwächt vor allen Dingen Strahlung um ein Maximum von 190nm, also die Strahlung unter 200nm. Ozon formt eine Schicht in der Stratosphäre, die rund um den Äquator ihre dünnste Schichtstärke hat und Richtung Nord- und Südpol immer dichter wird. Die Menge an Ozon über einem definiertem Erdpunkt wird als Dobson units (DU) gemessen. Ozon entsteht bei der Durchdringung der UV-Strahlung durch die Erdatmosphäre, in der sich aufgesplittete Sauerstoffatome mit dem molekularen Sauerstoff zu O₃ zusammenlagern (Rettberg 2002). Ozon absorbiert vor allen Dingen UVB-Strahlungswellen in der Hartley Region (200-300nm) und in der Huggins Bande (300-360nm) (Cockell 1999).

Durch geändertes Freizeitverhalten und Verdünnung der Ozonschicht rückt die Bedeutung der UV-Strahlung immer mehr in den Vordergrund (Hölzle 1997). Selbst geringe UV-Dosen bewirken Effekte auf der menschlichen Haut (van der Vleuten 1996, Kindl 2000). Der Zusammenhang UV-Licht und Kanzerogenese beruht zum einem auf die durch UV-Licht verursachten DNA-Schäden und zum anderen auf dessen immunsuppressiver Wirkung, so dass die Selektion prämaligner und maligner Zellen gestört ist (Rünger 1997). UVB-Licht wird direkt durch die DNA-Moleküle absorbiert und führt so zu Strahlenschäden. Im Gegensatz führt UVA hauptsächlich zu einer Aktivierung von photosensitiven Molekülen in der Zelle, die entweder direkt mit der DNA reagieren oder in Reaktion mit O₂ zu reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS: reactive oxygen species) werden, die ihrerseits DNA-Schäden hervorrufen (Rettberg 2002). Bei Mikroorganismen kann übermäßige UV-Strahlung zusätzlich eine Hemmung der photosynthetischen Aktivität hervorrufen oder die Reduktion der mikrobiellen Motilität (Cockell 1999).

Der Hemmeffekt von UV-Licht auf das Wachstum von *Malassezia furfur* der Haut wurde *in vitro* untersucht: UVB-Licht stört hier das Wachstum mehr als UVA-Licht und *Malassezia furfur* reagiert darauf empfindlicher als die anderen Hautkeime wie *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* oder *Candida albicans* (Faergemann 1987). Wikler bestätigte eine Wachstumshemmung durch UV-Licht und fügte ultrastrukturelle Ergebnisse hinzu: Verklumpte Ribosomen und Zellkernlysis bei intakter Zellwand (Wikler 1990).

Therapeutischer Nutzen solcher Wachstumsreduktion zum Beispiel von *Staphylococcus aureus* durch UV-Strahlung ist in der Behandlung der atopischen Dermatitis beschrieben worden (Yoshimura 1996).

1.6. Ziel der Arbeit und Fragestellung

Die Fähigkeit von *Malassezia furfur* zur Bildung von Pigmenten nach Gabe von Tryptophan zum Nährmedium und daraus resultierender Produktion von Pityriacitrin als Breit-Spektrum UV-Filter ist von Mayser beschrieben (Mayser 2002). Folgende Fragen ergeben sich aus dieser Beobachtung:

1. Bedeutet mehr Tryptophan im Nährmedium besseren Lichtschutz für *Malassezia furfur*?

Über die Rolle von Tryptophan im Stoffwechsel der Epidermis ist noch wenig bekannt. Bisher sind eher geringe Konzentrationen nachgewiesen worden (Burke 1962/63), die aber für die Pigmentsynthese ausreichend sind.

Im ersten Versuch soll untersucht werden, inwiefern sich ein geänderter Tryptophangehalt im Nährmedium von *Malassezia furfur* auswirken kann.

Ist *Malassezia furfur* in der Lage, durch steigenden Tryptophangehalt im Nährmedium einen potenteren UV-Filter zu bilden, welcher ihn vor steigenden UVB-Dosen schützt? Nimmt der Pilz ein gesteigertes Angebot an Tryptophan als Signal wahr, vermehrt Pityriacitrin oder weitere Lichtschutzfaktoren zu bilden?

2. Bedeutet mehr Pityriacitrin vermehrte UV-Toleranz?

Die Lichtschutzfähigkeit des Pityriacitrins wurde mit einer Konzentration von 2,8µg/ µl ~ 9mmol untersucht (Mayser 2002). Im zweiten Versuch soll eine Dosis-/ Wirkungskurve erstellt werden, von der ablesbar ist, bei welcher Konzentration von exogen zugeführtem Pityriacitrin der gewünschte Lichtschutz noch zu verzeichnen ist.

3. Welche Effekte des Pityriacitrins auf *Candida albicans* lassen sich feststellen?

Bei einem Vorversuch hat sich gezeigt, dass Pityriacitrin bei *Candida albicans* auch einen Lichtschutz ausüben kann. Es ist zu untersuchen, welchen Einfluß Pityriacitrin auf andere Pilze, die Bestandteile der humanen Mikroflora sein können, haben könnte. Ruft es eine Wachstumshemmung hervor oder wirkt es auch hier als UV Filter?

4. Wie wirkt Pityriacitrin bei *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus*?

In Vorversuchen konnte den gefundenen Pigmentbestandteilen eine antibiotische Wirkung zu gesprochen werden (Mayser 1999). Diese könnte *Malassezia furfur* Vorteile gegenüber Bakterien oder anderen Mikroorganismen bringen. *Malassezia furfur* wird zusammen mit anderen Mikroorganismen zur residenten Flora der Haut gezählt. Es stellt sich die Frage, inwiefern die Produktion von Pityriacitrin auf das Gleichgewicht der Mikroflora wirkt. Es soll *in vitro* die Frage untersucht werden, ob Pityriacitrin möglicherweise antimikrobiell wirkt und sich *Malassezia furfur* somit einen Vorteil in der gemeinsamen ökologischen Nische erarbeiten könnte oder ob es auch für Bakterien als UV-Filter wirken könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Auswahl der Organismen:

Sowohl für die Gewinnung von Pityriacitrin als auch für die weiteren Versuche wurde der *Malassezia furfur* Referenzstamm CBS 1878 verwendet.

Bei den Stämmen in Versuchsaufbau III handelt es sich um einen Wildstamm von *Candida albicans* (845/ 03), in Versuch IV um Stämme von *Staphylococcus aureus* (VA 313, VA 218, VA 288) und *Staphylococcus epidermidis* (VA 245, VA 262, SP 943), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. A. Sziegoleit, Institut für medizinische Mikrobiologie der JLU Giessen. VA und SP sind interne Bezeichnungen. Sie besagen, dass einige Keime auf dem Varia-Platz isoliert wurden, andere im Sputum-Labor. Es sind allesamt "Wildstämme", isoliert aus Materialien von Patienten des Universitätsklinikums Gießen.

2.2. Nährmedien und Kulturverfahren:

A) *Malassezia furfur*

Die Dauerkultur von *Malassezia furfur* erfolgte bei 30°C auf modifiziertem Dixonagar. Die Kulturen wurden in wöchentlichen Abständen mit einem sterilen Wattetupfer auf frisch zubereiteten Agar weiterverimpft. Bei allen Versuchen mit *Malassezia furfur* wurde darauf geachtet, mit höchstens 7 Tage alten Kulturen zu arbeiten. Ein Optimum im Wachstum liegt etwa bei 4-5 Tagen. Der für die Stammhaltung verwendete mDixonagar enthält statt Glycerol und Ölsäure Olivenöl. Zusätzlich werden Cycloheximid und Chloramphenicol dazugegeben zur Verringerung des Kontaminationsrisikos. Da sie sehr temperaturempfindlich sind, werden diese Stoffe erst nach dem Autoklavieren bei 1bar über 30min, sterilfiltriert hinzu gegeben.

| |
|------------------------------|
| 36g Malzextrakt-Bouillon |
| 6g Pepton |
| 20g getrocknete Ochsen-galle |
| 10ml Tween 40 |
| 4ml Olivenöl |
| 20g Agar |
| 0,04g Cycloheximid |
| 8ml Chloramphenicol |
| Aqua dest. ad 1l |

Tabelle 2: mDixonagar

Je nach Versuchsaufbau wird Pepton als Stickstoffquelle durch gleiche Anteile (0,6g% ~ 28,5mmol) an Arginin ersetzt. Auf diesem Medium findet keine Pigmentbildung statt (Mayser & Pape 1998). In Versuch II soll die Wirkung von exogen zugeführtem Pityriacitrin beurteilt werden. Deswegen wurde bei der Anzüchtung der in diesem Versuch verwendeten *Malassezia*-Kulturen darauf geachtet, dass nicht durch einen Bestandteil des Nährmediums endogenes Pityriacitrin produziert wird.

Das Medium zur Induktion der Pigmentbildung von *Malassezia furfur* hatte folgende Zusammensetzung (nach Mayser & Wille 1998):

| |
|-----------------------|
| 30ml Tween® ultra |
| 20g Agar |
| 0,5g Cycloheximid |
| 0,05g Chloramphenicol |
| L-Tryptophan |
| Aqua dest. ad 1l |

Tabelle 3: Pigmentinduktionsagar

Nach Sterilisation und Abkühlen auf 50°C wird L-Tryptophan in der gewünschten Konzentration zugegeben. Der Zusatz von Cycloheximid und Chloramphenicol ist nicht essentiell zur Induktion der Pigmentbildung, wird jedoch auch hier zur Verringerung des Kontaminationsrisikos zugefügt.

B) *Candida albicans*

Das Medium für *Candida albicans* besteht aus

| |
|------------------|
| 15g Pepton |
| 19g D(+)-Glucose |
| 1g NaCl |
| 5ml Glycerin |
| 15g Agar |
| Aqua dest. ad 1l |

Tabelle 4: Kimmigagar

Die Dauerkultur von *Candida albicans* erfolgte bei Zimmertemperatur auf Kimmigagar. Die Kulturen wurden auch hier in wöchentlichen Abständen auf frischem Agar weiterverimpft.

Bei dem Versuch mit *Candida albicans* wurde darauf geachtet, mit höchstens 5 Tage alten Kulturen zu arbeiten. *Candida albicans* zeigt schon gutes Wachstum nach 2-3 Tagen.

C) *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*

Das Plattenmedium zur Dauerkultivierung und für Versuche mit *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* besteht aus

| |
|---|
| 23g Spezialpepton |
| 1g Stärke |
| 5g NaCl |
| 10g Agar |
| Aqua dest. ad 1l |
| 5% Schafblut, defibriniert nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C |

Tabelle 5: Blutagar

Die Blutagarplatten zur Stammhaltung der Staphylokokken wurden freundlicherweise von Prof. A. Sziegoleit, Institut für medizinische Mikrobiologie der JLU Giessen zur Verfügung gestellt. Die Dauerkultur der Bakterienstämme *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* erfolgte bei 37°C auf Blutagar. Die Kulturen wurden im Abstand von zwei Tagen mit einer sterilen Platinöse auf frischen Agar weiterverimpft. Es wurde mit Übernachtkulturen oder höchstens zwei Tage alten Bakterien gearbeitet.

Dieses und die weiteren oben angegebenen Kulturmedien wurden zu jeweils 10 bzw. 3ml unter einer Sterilarbeitsbank in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 bzw. 3cm Durchmesser gegossen.

Bei den Versuchen mit *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* wurde zusätzlich ein Flüssigmedium verwendet, welches für Trübungsmessungen mittels der Absorptionsphotometrie notwendig ist. Es weist folgende Zusammensetzung auf:

| |
|---|
| 27,5g Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt u. Peptone) |
| 2g D(+)-Glucose |
| 5g NaCl |
| 2,5g di-Natriumhydrogen- Phosphat |
| Aqua dest. ad 1l |

Tabelle 6: BHI-Medium (brain-heart-infusion-agar)

2.3. Eich- und Wachstumskurven

Zur quantitativen Beurteilung des Wachstums wurden Eichkurven von *Malassezia furfur*, *Candida albicans* und den *Staphylokokken* angefertigt (nach Mayser & Pape 1998).

Die Pilzkulturen wurden mit einer Platinöse vom Agar abgelöst und mit einem Stößel in einer Mörserschale homogenisiert und dann mit steriler 0,9%NaCl-lösung versetzt. In einem sterilen Glasröhrchen wurde die Suspension für 3 Minuten bei 20°C und 3000 Umdrehungen abzentrifugiert. Nach Absaugen des überstehenden NaCl wurde eine definierte Menge NaCl hinzu gegeben. Der auszuzählende Anteil der Lösung wurde nach gutem Durchmischen mit Hilfe eines Reagenzglasschüttlers auf 1:100 verdünnt. 10µl davon wurden mit einer Eppendorfpipette in eine Neubauerzählkammer pipettiert und im Erythrozytenmodus (5 Gruppenquadrate) gezählt. Die Zellzahl wird nach der Formel: $\text{Zellzahl} = S \times 50 \times V / \mu\text{l}$ berechnet (S= Summe der ausgezählten Zellen, V= Verdünnungsfaktor, in diesem Fall 100). $[N/ \mu\text{l} = S/ (V_k \times N_k) = S/ (0,25 \times 10^{-3} \mu\text{l} \times 80) = S/ (20 \times 10^{-3}) = S \times 50/ \mu\text{l}$; N/ µl = Anzahl der Zellen pro Mikroliter Suspension, S = Summe der ausgezählten Zellen in fünf Gruppenquadranten, V_k = Volumen über einem Kleinstquadrat ($0,25 \times 10^{-3}$), N_k = Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate ($16 \times 5 = 80$), zusätzliche Beachtung des Verdünnungsfaktors erforderlich]. Die verbliebene Lösung wurde abzentrifugiert und mit der entsprechenden Menge an NaCl aufgefüllt. Von der nun auf 10^6 Zellen/ µl eingestellten Pilzsuspension wurden die definierten Mengen abgenommen und in Reagenzgläschen gefüllt, die zuvor beschriftet und gewogen worden waren. Diese wurden bei 3000g und 3 Minuten abzentrifugiert und das überstehende NaCl abgesaugt. Die verbliebenen Pilzpellets wurden in ihren Glasröhrchen in einem Heizblock für 24 Stunden bei 65°C getrocknet. Anschließend wurden die Gläschen erneut gewogen. Die Differenz zwischen Leergewicht und Endgewicht ließ auf das Gewicht der entsprechenden Zellmengen schließen. Es wurden drei unabhängige Versuche pro Pilzstamm durchgeführt.

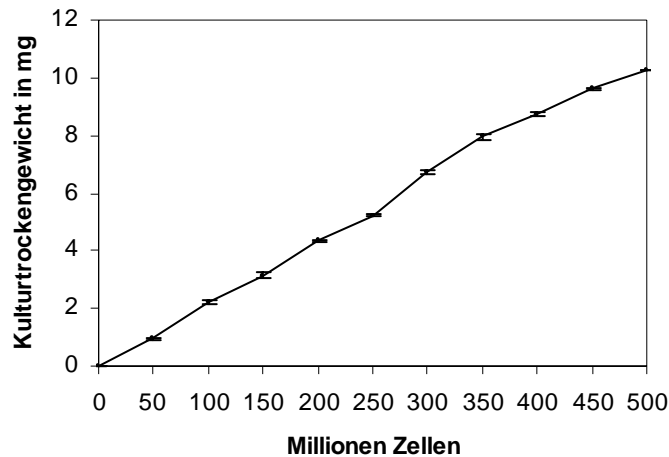
A) *Malassezia furfur*

Diagramm 1: Eichkurve *Malassezia furfur* (mDixonagar)
Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen

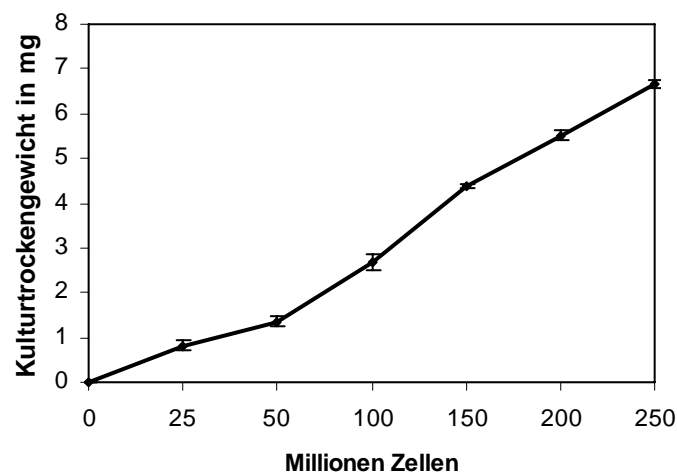
B) *Candida albicans*

Diagramm 2: Eichkurve *Candida albicans* (Kimmigagar)
Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen

C) *Staphylococcus epidermidis*

Um das Wachstum der *Staphylokokken* in Versuch IV quantitativ bestimmen zu können, erfolgten Trübungsmessungen, die zur Absorptionsphotometrie zählen. Bei der Absorptionsphotometrie werden chemische Reaktionen bzw. die Konzentrationen chemischer Verbindungen durch Messung von Licht bzw. der Lichtabsorption erfasst (www.wikipedia.org 2006). Licht (zumeist wird sichtbares Licht im Wellenlängenbereich von

400– 660 nm verwendet) wird durch Zellsuspensionen ab einer bestimmten Zelldichte gestreut (Yoshimura 1996, www.tu-dresden.de 2006, www.biorama.ch 2006). Die Trübungsmessung stellt somit eine indirekte Methode zur Ermittlung der Zellmasse dar. Die Verringerung des Strahlungsflusses (Intensität) wird als Extinktion bzw. als sog. optische Dichte OD an einem Photometer gemessen und ist unter bestimmten Bedingungen der Zelldichte proportional und kann somit zur Bestimmung der Zellmasse einer Zellsuspension herangezogen werden. Handelt es sich in der Suspension um Zellen einer konstanten durchschnittlichen Größe, besteht auch eine lineare Beziehung zwischen OD und Zellzahl. Die Messung erfolgte in diesem Fall bei $\lambda = 600$ nm (persönliche Mitteilung Prof. Sziegoleit, www.biologie.uni-erlangen.de 2006).

Für diese Eichkurven wurde von den *Staphylokokken* eine Keimstammlösung hergestellt. Dazu wurden 10 Kolonien einer Übernachtskultur in 4ml BHI überimpft. Eine Übernachtskolonie enthält etwa 10^7 Keime (persönliche Mitteilung Prof. Sziegoleit). Diese Lösung wurde mit Hilfe des Reagenzglasschüttlers durchmischt. Es entstand eine homogene Trübung. Von dieser Lösung wurden dann jeweils 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 und 500 μ l entnommen und in Küvetten auf jeweils 2ml BHI aufgefüllt. Die wurden durchmischt und anschließend sofort die Absorption gemessen. Die Ergebnisse werden durch die Diagramme veranschaulicht.

Von den Keimstammlösungen wurden noch Verdünnungsreihen vorgenommen. Von der Lösung wurden 0,4ml entnommen und in 3,6ml NaCl überimpft. So entsteht eine Verdünnung 1:10. Diese wurde weiter fortgeführt bis zu einer Verdünnung von 1:1000000. Von diesen Lösungen wurden dann jeweils 100 μ l entnommen und auf Blutagarplatten aufgetragen. Diese wurden dann über Nacht inkubiert und konnten nach 24 Stunden ausgezählt werden.

Bei der Ausgangslösung und den Verdünnungen 1:10 und 1:100 sind kaum Einzelkulturen zählbar. Bei der Verdünnung 1:1000 sind es auch noch zu viele zum Auszählen. Bei 1:10000 wäre es möglich zu zählen. Es sind geschätzt etwa 400-500 Kolonien. Das Auszählen erfolgte aber bei den Verdünnungen 1:100000 und 1:1000000.

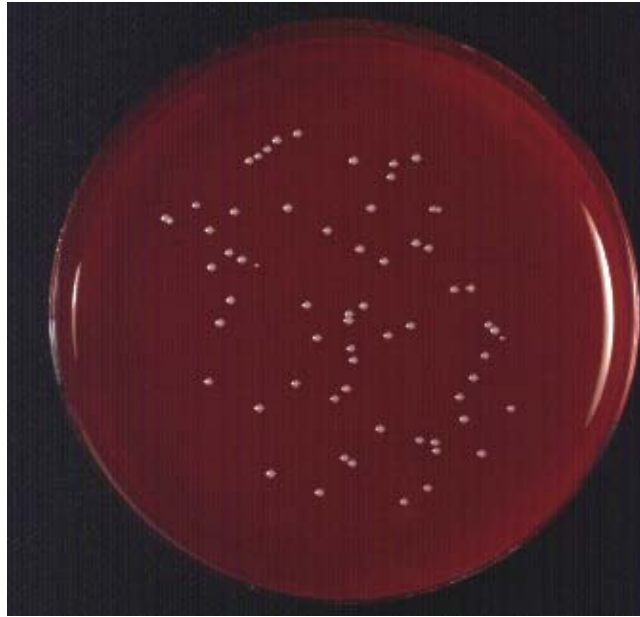


Abbildung 7: Einzelne Übernachtkolonien von *Staphylococcus epidermidis* zum Auszählen für die Keimzahlbestimmung (Verdünnung 1:100000)

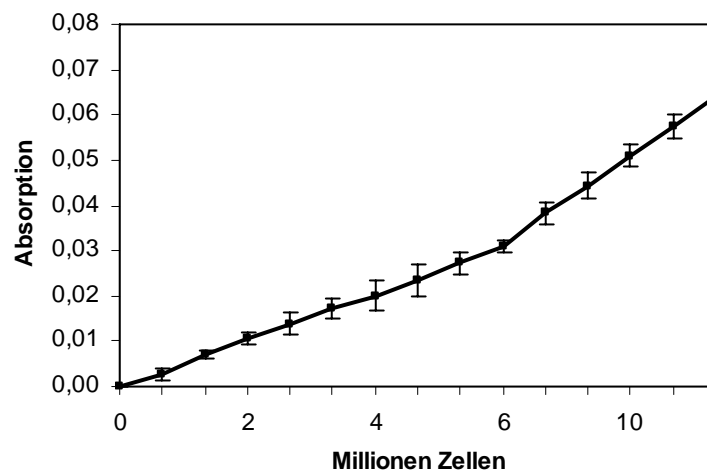


Diagramm 3: Eichkurve *Staphylococcus epidermidis*

Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen

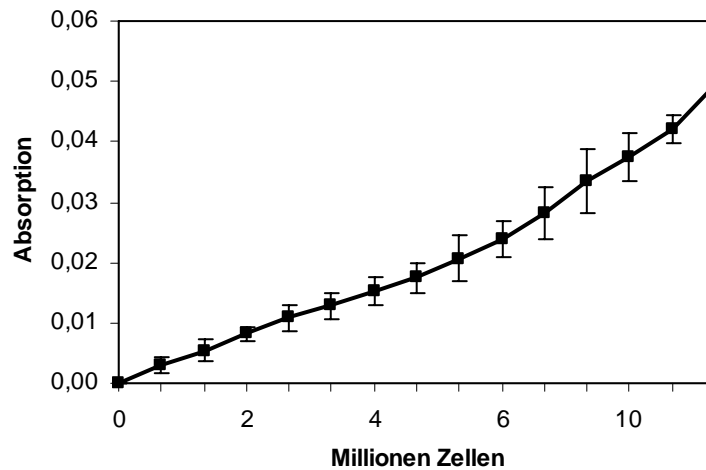
D) *Staphylococcus aureus*

Diagramm 4: Eichkurve *Staphylococcus aureus*

Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen

2.4. Gewinnung von Pityriacitrin

Die *Malassezia* Kulturen werden mittels eines sterilen Tupfers auf den Pigmentinduktionsagar verimpft und dann 14 Tage bei 30°C inkubiert. Es zeigt sich eine Braunfärbung/Pigmentbildung des zuvor transparenten Agars. Dann wird der komplette Inhalt der Petrischalen (etwa 20) mit einem handelsüblichen Pürrierstab zerkleinert und mit Ethylacetat versetzt und etwa zwölf Stunden stehen gelassen. Vor dem Abfiltrieren wird der Lösung das gleiche Volumen an destilliertem Wasser hinzu gegeben und durchgeschüttelt. Über einen Scheidetrichter lassen sich zwei Phasen trennen: eine Wasserphase, sowie die obere gereinigte Ethylacetatphase mit dem Pigment. Letztere wird im Rotationsverdampfer weiterverarbeitet und dann in Ethanol aufgenommen.

Diese Vorreinigung des Extraktes ermöglicht eine raschere und bessere Trennung bei der nachfolgenden Mitteldruck-Säulenchromatographie. Das Prinzip, welches hier zugrunde liegt, ist die Gelpermeations- und Ausschlußchromatographie. Moleküle unterschiedlicher Größe werden in einer flüssigen (mobilen) Phase durch eine feste (stationäre) Phase geführt. Infolge eines Siebeffektes erfolgt dabei eine Verteilung der Moleküle nach ihrer Größe. Verantwortlich für den Siebeffekt ist die stationäre Phase, die aus einem Gel besteht, das Poren bestimmter Größe aufweist: Moleküle, deren größter Durchmesser kleiner als die

Porenöffnung ist, verteilen sich in stationärer und mobiler Phase. Größeren Molekülen hingegen, die nicht in die Poren passen, steht ein relativ kleineres Verteilungsvolumen zur Verfügung. In der Folge werden sie schneller durch die Säule bewegt und so von den niedermolekularen Substanzen getrennt.

Der Rohextrakt wird unter UV-Licht der Wellenlänge 254nm visuell in einzelne Fraktionen aufgeteilt, die dann getrennt voneinander aufgefangen werden. Das Laufmittel ist Methanol, der Fluß beträgt etwa 19ml/ min bei Druckaufbau über einen Gummiball (Laufzeit der Säule etwa 130 Minuten, Elutionsvolumen etwa 2500ml). Als Säule wird eine Glassäule mit Filter verwendet (Säule NS 29 mit Fritte Durchmesser 30mm, Por 1, PTFE-Küken NS 14/ 2,5mm spitz ausgezogen, Nutzlänge ca. 525mm). Bei dem Trennmedium handelt es sich um Kieselgel Sephadex LH-20, ein hydroxypropyliertes Derivat des Sephadex G-25.

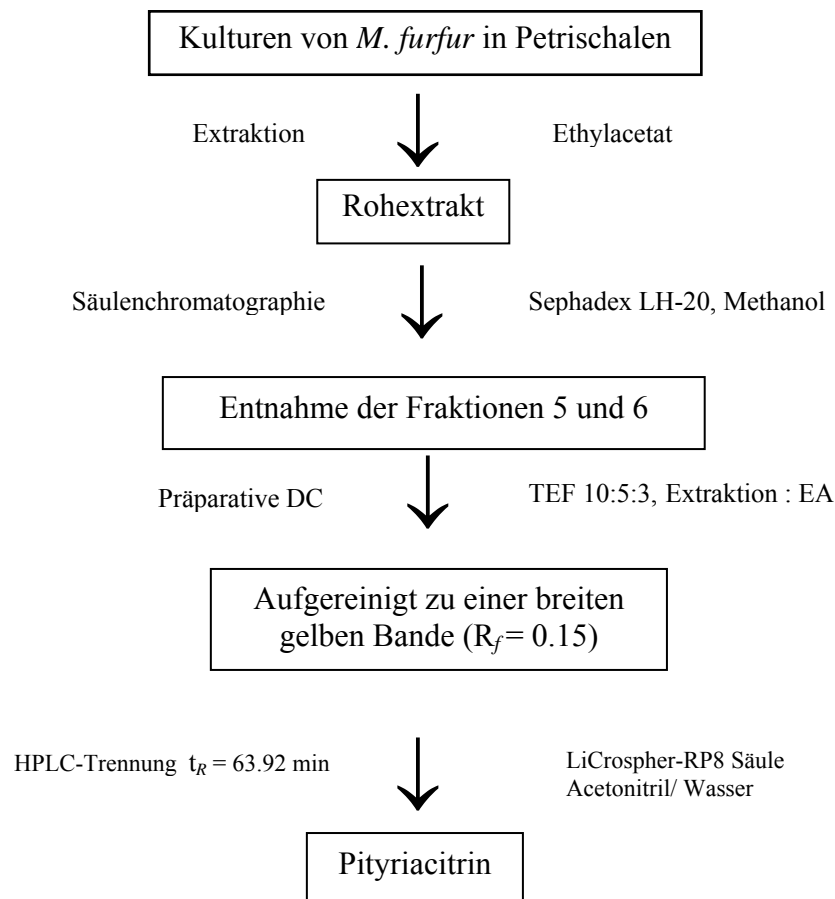
Für die Gewinnung von Pityriacitrin werden die Fraktionen 5 und 6 zur Trocknung im Rotationsverdampfer abrotiert, in 2ml Methanol wieder aufgenommen und in 4ml Glasröhrchen überführt. In diesen Fraktionen stellt sich die gelbe Bande mit dem Pityriacitrin am besten dar. Zur weiteren Aufbereitung erfolgt dann die präparative Dünnschichtchromatographie:

Die Fraktionen werden jeweils auf Kieselgel 60-Platten mit den folgenden Parametern des Linomaten:

| |
|--|
| Plattenbreite: 200mm |
| Bandenbreite: 180mm |
| Auftragungsgeschwindigkeit: 4-6sec/ µl |
| Startposition: 10mm |
| Abstand zwischen Banden: --- |
| Volumen: 180µl |
| Druck Hauptventil: > 100bar |
| Druck Reduzierventil: 4-5bar |
| Bandenbreite: 2mm |
| Abstand: 5,4mm |
| Laufmittelfront: 16,5cm |

weiter aufgetrennt und dann mit dem Laufmittel TEF = Toluol–Ethylformiat–Ameisensäure, 10 : 5 : 3 (200ml : 100ml : 60ml für 2 Kammern) (Gill und Steglich 1987) entwickelt.

Die entsprechende Bande wird mit einem Skalpell ausgekratzt, auf Papier gesammelt und zermörsert. Die Trennung vom Kieselgel erfolgt unter Zugabe von Ethylacetat und Aqua dest. (1 : 1). Es bildet sich ein Zweiphasensystem, welches in der oberen Phase Ethylacetat und die gewünschte Substanz, in der unteren Wasser-Kieselgel enthält. Die Ethylacetatphase mit dem gelösten Stoff (Pityriacitrin) wird mit einer Pipette abgenommen und in ein großes (50ml) Zentrifugenröhrchen überführt und Na₂SO₄ (ca. ½ Löffel) zur Bindung des restlichen Wassers hinzu gegeben. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 2500g über 3 Minuten. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wird in kleine verschraubbare Gläschen gefüllt, die Ethylacetatphase unter einem Stickstoffstrom (0,1bar) bei 40°C in einem Heizblock getrocknet.



(Abkürzungen: DC = Dünnschichtchromatographie; TEF = Toluol, Ethylformiat, Ameisensäure; EA = Ethylacetat; HPLC = High pressure/ performance liquid chromatography, t_R = Retentionszeit)

Diagramm 5: Gewinnung von Pityriacitrin (modifiziert, nach Mayser 1999)

Eine weitere Aufreinigung erhält man über präparative HPLC: Sie erfolgt über einen Gradienten mit einer LiCrospher-RP8 Säule und einer Lichrosorb RP18 Vorsäule. Als

Gradientenpumpe diente die Masterpumpe M305 gekoppelt mit einer Pumpe Modell 302 mit jeweils einem präparativen 50ml/ min Pumpenkopf, gesteuert von einem Gilson 802-Modul. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei 220nm. Der verwendete lineare Gradient (180min) erstreckt sich von 0 - 100% Acetonitril bzw. 100 - 0% Wasser, die Flußrate beträgt 5ml/ min. Die eluierenden Verbindungen werden mittels Fraktionensammler in 180 Fraktionen von je 5ml aufgefangen und anschließend mit einem Lyovac GT2 lyophilisiert. Es erfolgt eine Nachreinigung mit einem gespreizten Gradienten (hier 50 - 80% Acetonitril bzw. 0 - 20% Wasser) (Mayser 2002).

2.5. Tryptophanabhängige Lichtschutzfähigkeit

Hier sollte die Frage untersucht werden, ob ein sich ändernder Tryptophangehalt des Agar die UV-protective Wirkung des gebildeten Pigments beeinflusst. Bildet *Malassezia furfur* mehr UV-Protektoren oder bessere bei vermehrtem Tryptophanangebot? Erreicht die natürliche Pityriacitrinproduktion ein Plateau?

Der Pilz wurde auf Platten mit folgendem Gehalt an Tryptophan verimpft: 0,0; 5; 15; 30; 50mmol (~ 0g%; 0,12g%; 0,31g%, 0,61g%; 1,02g%) und 6 Tage inkubiert. Es sollte auf Unterschiede im Wachstum geachtet werden und ob sich die Farbe der Kolonien unterscheidet. Der Pilz wurde abgeerntet, auf 10^6 CFU/ μ l ausgezählt und mit der entsprechenden Menge an NaCl aufgefüllt. Eine geringere Verdünnung hätte zu große Zellzahlen und somit einen größeren Fehler mit sich gebracht. Dann wurden zwei Inokulationspunkte à 3 μ l auf einzelne Platten (\varnothing 3cm) aufgetragen und einer Bestrahlung mit 5 verschiedenen Dosen UVB-Licht (0; 500; 1000; 1500; 2000mJ/ cm²) unterworfen. Nach der Bestrahlung wurden die Platten verschlossen und bei 30°C inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Kolonien abgeerntet. Mit einer Platinöse wurden die Pilzkolonien der Inokulationspunkte vom Agar abgelöst und in ihre jeweiligen Glasröhrchen gebracht. Die Glasröhrchen sind zuvor beschriftet und dann gewogen worden. In den Glasröhrchen befand sich jeweils eine Menge von 2ml 0,9%iger NaCl-Lösung, um den Zellbrei zu lösen. Diese wurde über 3 Minuten bei 20°C und 3000 Umdrehungen abzentrifugiert und dann abgesaugt. Das Zellwachstum wurde durch direktes Wiegen der Kolonien nach Trocknen in einem Heizblock für 24h bei 65°C bestimmt. Hier wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

2.6. Konzentrationsabhängigkeit des Lichtschutzeffektes

Es sollte eine Dosis-/ Wirkungskurve erstellt werden, die eine Aussage darüber zuläßt, bei welcher Konzentration von Pityriacitrin der gewünschte Lichtschutzeffekt noch zu verzeichnen ist. Dazu wurde *Malassezia furfur* auf mDixonagar mit Arginin ausgestrichen. Nach 6tägiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen abgeerntet, einmal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in einer Neubauer Kammer auf 10^6 CFU/ μ l eingestellt und mit der entsprechenden Menge an 90% NaCl und 10% DMSO aufgefüllt. DMSO (Dimethylsulfoxid) ist ein Lösungsmittel aus der Chemie und Pharmakologie. Es dient als Trägerstoff für bestimmte Arzneimittel bei äußerlicher Anwendung (zum Beispiel Salben oder Cremes). In der Chemie dient es wie in diesem Fall aufgrund seiner Löslichkeit in Wasser und vielen lipophilen Flüssigkeiten als Lösungsmittel und Reaktionshilfe (med-serv.de 2006). Mit Hilfe einer Eppendorfpipette wurden fünf Punkte je Plattenhälfte einer Petrischale (\varnothing 10cm) mit mDixonagar mit jeweils 2 μ l der Zellsuspension beträufelt. Danach wurden die insgesamt 10 Inokulationspunkte mit jeweils verschiedenen Konzentrationen an Pityriacitrin (gelöst in DMSO) beimpft: 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0g μ g/ μ l (~ 0; 0,32; 1,62; 3,24; 4,86; 6,48; 8,10; 9,72; 11,34; 12,96 mmol). Nach dieser Art wurden 6 Platten hergestellt. Direkt im Anschluß wurden dann diese Petrischalen mit jeweils verschiedenen Dosen UVB-Licht bestrahlt: 0; 100; 500; 1000; 1500; 2000mJ/ cm². Nach der Bestrahlung wurden die Platten verschlossen und bei 30°C inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Kolonien mit einer Platinöse abgeerntet und in ihre jeweils entsprechenden Glasröhrchen gebracht. Die Glasröhrchen sind zuvor beschriftet und dann gewogen worden. In den Glasröhrchen befand sich jeweils eine Menge von 2ml 0,9%iger NaCl-Lösung, um den Zellbrei zu lösen. Diese wurde über 3 Minuten bei 20°C und 3000 Umdrehungen abzentrifugiert und dann abgesaugt. Das Zellwachstum wurde wieder durch direktes Wiegen der Kolonien nach Trocknung für 24h bei 65°C bestimmt. Hier wurden auch drei unabhängige Versuche durchgeführt.

2.7. Wirkung von Pityriacitrin auf *Candida albicans*

Es sollte untersucht werden, ob Pityriacitrin bei *Candida albicans* nach Inokulation auch einen UV-protectiven Effekt hervorruft.

Candida albicans wurde auf Kimmigagar angezüchtet. Die Zellen wurden nach 4-5-tägiger Inkubationszeit geerntet und auf 10^6 CFU/ μ l eingestellt und mit der entsprechenden Menge an 90%NaCl und 10%DMSO aufgefüllt.

In der vorliegenden Konzentration konnte keine Toxizität des DMSO gegen *Candida albicans* festgestellt werden. Die Toxizität wurde wie folgt ausgeschlossen: *Candida albicans* wurde einmal mit und einmal ohne DMSO auf Kimmigagarplatten inokuliert und anschließend inkubiert. Das Ergebnis wurde visuell beurteilt.

Von der oben angegebenen Suspension wurden dann 2 μ l auf 3 Inokulationspunkte je Plattenhälfte aufgetragen. Danach wurden die Punkte auf der linken Hälfte der Platte mit 2 μ l reinem DMSO und auf der rechten Hälfte 2 μ l mit einer Konzentration von 3,4 μ g/ μ l \sim 11mmol Pityriacitrin gelöst in DMSO überimpft. Dementsprechend wurden 6 Platten vorbereitet, die dann anschließend sofort bestrahlt wurden:

1. Platte: 0mJ/ cm², d. h. wurde nicht bestrahlt
2. Platte: 100mJ/ cm²
3. Platte: 500mJ/ cm²
4. Platte: 1000mJ/ cm²
5. Platte: 1500mJ/ cm²
6. Platte: 2000mJ/ cm²
7. Platte: nur 3 Punkte, zur Kontrolle, wurde nicht bestrahlt und auch nicht mit Pityriacitrin oder DMSO überimpft

Nach 7-tägiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und in ihre entsprechenden Glasröhrchen gebracht. Die Glasröhrchen sind zuvor beschriftet und dann gewogen worden. In den Glasröhrchen befand sich jeweils eine Menge von 2ml 0,9%iger NaCl-Lösung, um den Zellbrei zu lösen. Diese wurde über 3 Minuten bei 20°C und 3000 Umdrehungen abzentrifugiert und dann abgesaugt. Das Zellwachstum wurde wieder durch direktes Wiegen der Kolonien nach Trocknung für 24h bei 65°C bestimmt. Hier wurden fünf voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

2.8. Wirkung von Pityriacitrin auf *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus*

Wie reagieren andere Mikroorganismen, die auch auf der Haut vorkommen, wie z. B. *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* auf Pityriacitrin? Wirkt es toxisch oder vielleicht auch als Lichtschutz?

Staphylococcus aureus- und *Staphylococcus epidermidis*-Stämme wurden freundlicherweise von Prof. Sziegoleit, Institut für Mikrobiologie zur Verfügung gestellt. Diese wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen und inkubiert.

Um zu untersuchen, ob Pityriacitrin toxisch auf die Bakterien wirkt, wurden mit einer Stanze zwei Löcher pro Plattenhälfte gemacht. In die Löcher auf der linken Seite wurden jeweils 20µl reines DMSO gefüllt. In das obere Loch auf der rechten Seite wurden 20µl Pityriacitrin (11mmol in DMSO) und in das untere Loch 20µl Pityriacitrin (22mmol in DMSO) gefüllt. Die Wirkung dieses Agardiffusionstestes wurde nach einem und nach 7 Tagen beurteilt. Eine Toxizität von DMSO und Pityriacitrin in den vorliegenden Konzentrationen konnte nicht festgestellt werden. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt.



Abbildung 8: *Staphylococcus aureus* auf Blutagar als Übernachtskultur nach Beimpfen mit Pityriacitrin und/ oder DMSO

Darauf aufbauend wurden die *Staphylokokken* [ein Stamm *S. aureus* (VA 313) und drei Stämme *S. epidermidis* (VA 245, VA 262, SP 943)] wieder auf Blutagarplatten mit Hilfe einer Platinöse ausgestrichen, und zwar in ein definiertes kreisförmiges Areal (Ø 2cm) in der Mitte der Petrischalen. Dann wurde mit einer Eppendorfpipette das Areal auf der einen Platte mit 10µl Pityriacitrin à 11mmol überimpft, eine mit 10µl Pityriacitrin à 22mmol, eine mit

10µl reinem DMSO und eine ohne Zusatz. Die Platten mit Pityriacitrin und mit reinem DMSO wurden einer UVB-Bestrahlung von 1000mJ/ cm² ausgesetzt. Anschließend wurden die Platten inkubiert und nach 12, 24 und 48 Stunden visuell beurteilt.

Um quantitative Aussagen machen zu können, wurden pro Stamm sechs Quarzküvetten mit 2ml Flüssigmedium BHI bestückt und anschließend Bakterien hinzugegeben. Von den bereits erwähnten Keimstammlösungen wurden jeweils 200µl pro Küvette hinzugegeben

1. Küvette: Bakterien, ohne DMSO, ohne Pityriacitrin, ohne Bestrahlung
2. Küvette: Bakterien, mit DMSO, ohne Pityriacitrin, ohne Bestrahlung
3. Küvette: Bakterien, mit DMSO, mit Pityriacitrin(10µg/ml), ohne Bestrahlung
4. Küvette: Bakterien, ohne DMSO, ohne Pityriacitrin, mit Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²
5. Küvette: Bakterien, mit DMSO, ohne Pityriacitrin, mit Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²
6. Küvette: Bakterien, mit DMSO, mit Pityriacitrin (10µg/ml), mit Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²

Vor der folgenden Bestrahlung wurden die Küvetten noch mal mit Hilfe des Reagenzglasschüttlers gut durchgemischt. Dies erfolgte auch vor jeder Messung der Trübung. Die Bestrahlung erfolgte mit 1000mJ/cm². Sofort danach wurde mit einem Spektralphotometer die Absorption bei 600nm gemessen. Die quantitative Bestimmung erfolgte über Trübungsmessung. Danach wurden die Bakterien bei 37°C inkubiert. Des Weiteren wurde die Trübung nach 8, 24 und nach 32 Stunden gemessen. Nach Beendigung dieses Versuches wurden aus jeder Küvette Proben entnommen und eine Keimkontrolle durchgeführt. Dieser Versuch wurde mit einem *Staphylococcus-epidermidis* (VA 245)- und einem *Staphylococcus-aureus* (VA 313)-Stamm jeweils drei Mal durchgeführt.

2.9. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der medizinisch-wissenschaftlichen Beratung der Firma Dr. Buhck, Mayer, Schöps in Krefeld. Es kam die Statistiksoftware „STATISTICA“ (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) zur Anwendung.

Zusätzliche Informationen wurden freundlicherweise durch das Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität, Arbeitsgruppe Statistik, Dr. W. Papst erteilt.

Die Daten in Versuch I, II und III wurden über zweifaktorielle Varianzanalyse ausgewertet. Die statistische Betrachtung der Ergebnisse von Versuch IV erfolgte mittels des normalen U-Tests von Wilcoxon, Mann und Whitney.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß des Tryptophangehaltes auf die Lichtschutzfähigkeit von *Malassezia furfur*

Als erstes erfolgte hier die visuelle Beurteilung des Wachstums und der Pigmentbildung in Abhängigkeit vom Tryptophangehalt. Dazu wurde der Pilz auf den Nährböden mit den verschiedenen Mengen an Tryptophan nach sieben Tagen Inkubation begutachtet. Das Ergebnis soll im Folgenden wiedergegeben werden:

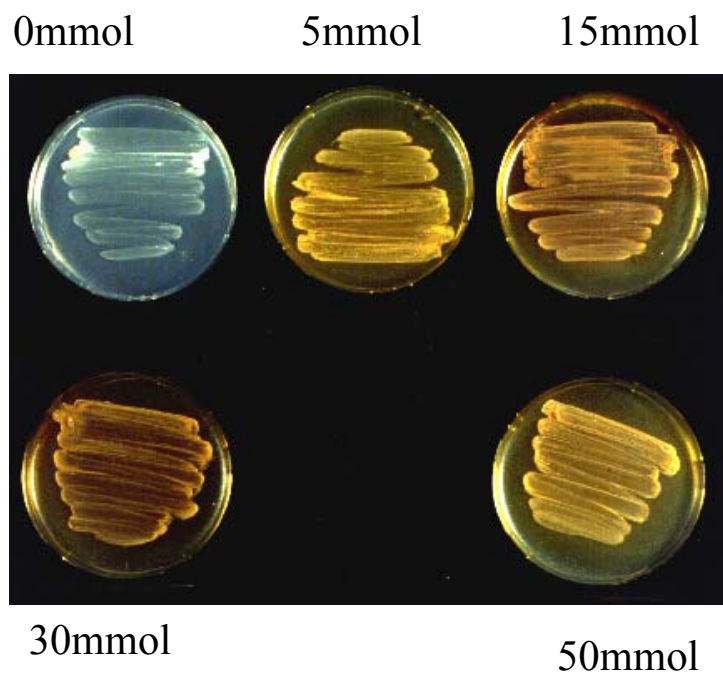


Abbildung 9: *Malassezia furfur* auf Agar mit 5x verschiedenem Gehalt an Tryptophan nach 7 Tagen Inkubation

Bei 0mmol Tryptophan zeigt sich schlechtes Wachstum, bei den anderen Nährböden jeweils gleich gutes normales Wachstum. Normales Wachstum bedeutet in diesem Fall, dass sich ein gleichmäßiger Pilzrasen gebildet hat, der dem Inokulationsareal von der Ausdehnung her entspricht. Die Konsistenz erscheint wie bei auf mDixonagar angezüchteten Zellen, und es sind stumpf-glänzende Kulturen zu erkennen.

Die Pigmentbildung nimmt mit vermehrtem Gehalt an Tryptophan zu, erfährt aber ab 15 mmol Tryptophan keine visuell beurteilbare Steigerung mehr.

| Tryptophangehalt | Wachstum und Pigmentbildung |
|------------------|---|
| 0mmol (0g%) | - schlechtes Wachstum - keine Pigmentbildung - Keine Verfärbung des Agar |
| 5mmol (0,12g%) | - normales Wachstum - hellbraune Pigmentbildung - hellbraune Verfärbung des Agar |
| 15mmol (0,31g%) | - normales Wachstum - tiefbraune Pigmentbildung - stärkere braune Verfärbung des Agar |
| 30mmol (0,61g%) | - normales Wachstum - tiefbraune Pigmentbildung - stärkere braune Verfärbung des Agar |
| 50mmol (1,02g%) | - normales Wachstum - tiefbraune Pigmentbildung - stärkere braune Verfärbung des Agar |

Tabelle 7: Wachstum und Pigmentbildung bei unterschiedlichem Tryptophanangebot

Um differenzieren zu können, ob der Gehalt des Tryptophans im Nährboden die Lichtschutzfähigkeit von *Malassezia furfur* beeinflusst, wurden von diesen Nährböden definierte Zellmengen entnommen und mit 5 verschiedenen UVB-Dosen bestrahlt und 7 Tage inkubiert. Vor dem Abernten wurde das jeweilige Wachstum der Pilzkolonien beurteilt:

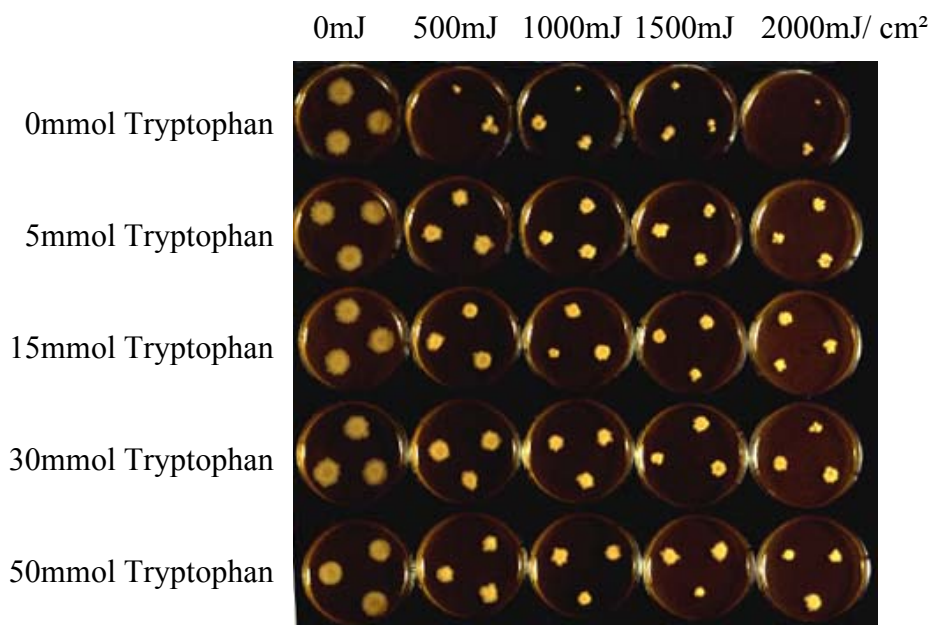


Abbildung 10: *Malassezia furfur* nach Bestrahlung mit UVB-Licht nach 7 Tagen Inkubation

| 0mmol Tryptophan | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien | 5mmol Tryptophan | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien |
|-------------------------|---|-------------------------|---|
| UVB-Dosis | | UVB-Dosis | |
| 0mJ/ cm ² | Ø 10-13mm Zellrasen | 0mJ/ cm ² | Ø 12-15mm Zellrasen |
| 500mJ/ cm ² | Ø 3-7mm Zellkulturen | 500mJ/ cm ² | Ø 3-10mm Zellkulturen |
| 1000mJ/ cm ² | Ø 3-5mm Zellkulturen, auf 4 von 9 Inokulationspunkten kein Wachstum | 1000mJ/ cm ² | Ø 3-8mm Zellkulturen |
| 1500mJ/ cm ² | Ø 3-4mm Zellkulturen, auf 4 von 9 Inokulationspunkten kein Wachstum | 1500mJ/ cm ² | Ø 3-4mm Zellkulturen, auf 3 von 9 Inokulationspunkten kein Wachstum |
| 2000mJ/ cm ² | Ø 2-3mm Zellkulturen, auf 3 von 9 Inokulationspunkten kein Wachstum | 2000mJ/ cm ² | Ø 3-4mm Zellkulturen, auf 2 von 9 Inokulationspunkten kein Wachstum |
| Bemerkungen | | Bemerkungen | Insgesamt besseres Wachstum als bei 0mmol |

| 15mmol Tryptophan | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien | 30mmol Tryptophan | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien |
|--------------------------|--|--------------------------|---|
| UVB-Dosis | | UVB-Dosis | |
| 0mJ/ cm ² | Ø 12-13mm Zellrasen | 0mJ/ cm ² | Ø 11-12mm Zellrasen |
| 500mJ/ cm ² | Ø 5-8mm Zellkulturen | 500mJ/ cm ² | Ø 7-8mm Zellkulturen |
| 1000mJ/ cm ² | Ø 3-9mm Zellkulturen | 1000mJ/ cm ² | Ø 6-9mm Zellkulturen |
| 1500mJ/ cm ² | Ø 3-5mm Zellkulturen | 1500mJ/ cm ² | Ø 3-7mm Zellkulturen |
| 2000mJ/ cm ² | Ø 2-3mm Zellkulturen | 2000mJ/ cm ² | Ø 4-5mm Zellkulturen |
| Bemerkungen | Gleiches Wachstum wie bei 5mmol | Bemerkungen | Ab 1000mJ/ cm ² besseres Wachstum als bei 5, 15 und 50mmol |

| 50mmol Tryptophan | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien |
|--------------------------|--|
| UVB-Dosis | |
| 0mJ/ cm ² | Ø 9-12mm Zellrasen |
| 500mJ/ cm ² | Ø 6-8mm Zellkulturen |
| 1000mJ/ cm ² | Ø 4-7mm Zellkulturen |
| 1500mJ/ cm ² | Ø 3-6mm Zellkulturen |
| 2000mJ/ cm ² | Ø 2-4mm Zellkulturen |
| Bemerkungen | Gleiches Wachstum wie 5 und 15mmol |

Tabelle 8: Wachstum mit unterschiedlichem Tryptophangehalt nach unterschiedlicher UVB-Bestrahlung

Bei den Kolonien, die nicht bestrahlt worden waren, zeigten sich flächige homogene Zellrasen. Die bestrahlten Pilzkulturen ließen sich eher als Zellhaufen beschreiben.

Nach dem Trocknen konnten die abgeernteten Zellen gewogen und die Zellzahl über die Eichkurven bestimmt werden. Das Ergebnis dieser Auswertung veranschaulicht folgendes Diagramm:

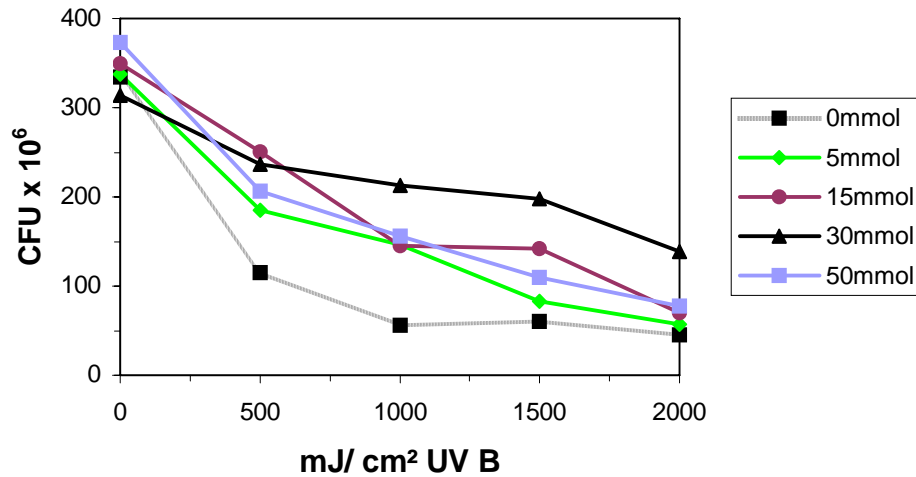


Diagramm 6: Einfluß einer UVB-Bestrahlung auf das Wachstum von *M. furfur*. Die Hefezellen wurden auf jeweils unterschiedlich tryptophanhaltigen Nährmedien angezchtet. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei Kolonien pro Versuch und dann erneut gemittelt über drei voneinander unabhängige Versuche

Grundsätzlich ist zu erkennen, dass die Wachstumsrate (d. h. indirekt Toleranz gegenüber UVB-Licht) bei steigender UVB-Stärke abnimmt.

Es zeigt sich, dass bei Fehlen von Tryptophan nur geringes Wachstum, das heißt schlechter Lichtschutz zu verzeichnen ist.

Weiter läßt sich ablesen, dass bei einem Gehalt von 5, 15 oder 50mmol Tryptophan im Nährboden ein deutlich besseres Wachstum und damit besserer UVB-Schutz zu finden ist. Aus dieser Reihe heraus sticht der Nährboden mit einem Tryptophangehalt von 30mmol. Die von ihm entnommenen Zellen wuchsen am besten nach erfolgter UVB-Bestrahlung.

Die *statische* Betrachtung erfolgte durch zweifaktorielle Varianzanalyse mit den festen Faktoren Tryptophan-Konzentration mit den Stufen 0, 5, 15, 30 und 50mmol und UVB-Dosis mit den Stufen 0, 500, 1000, 1500, 2000mJ/ cm². Sowohl für die Tryptophan-Konzentration als auch für Bestrahlungsdosis ist ein statistisch signifikanter Einfluß auf die Zellzahl nachzuweisen (beide $p < 0,0001$). Demgegenüber besteht keine statistisch signifikante Interaktion zwischen den beiden Faktoren. Das heißt, dass sich nicht ableiten läßt, dass die Abhängigkeit der Zellzahl von der UV-Dosis in den verschiedenen Kategorien der Tryptophan-Konzentration unterschiedlich sein muß ($p = 0,20$).

Es läßt sich sagen, dass bei ausschließlichen Betrachtung des Einflusses der Tryptophan-Konzentration der Vergleich der Kategorien 0mmol→ 30mmol statistisch bedeutsamer ist ($p < 0,00001$) als der Vergleich 0mmol→ 5, 15 oder 50mmol ($p < 0,025$, $p < 0,0002$ und $p < 0,0007$).

Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Tryptophankonzentrationen zu den jeweiligen UVB-Dosen und deren Interaktion ergibt sich folgendes:

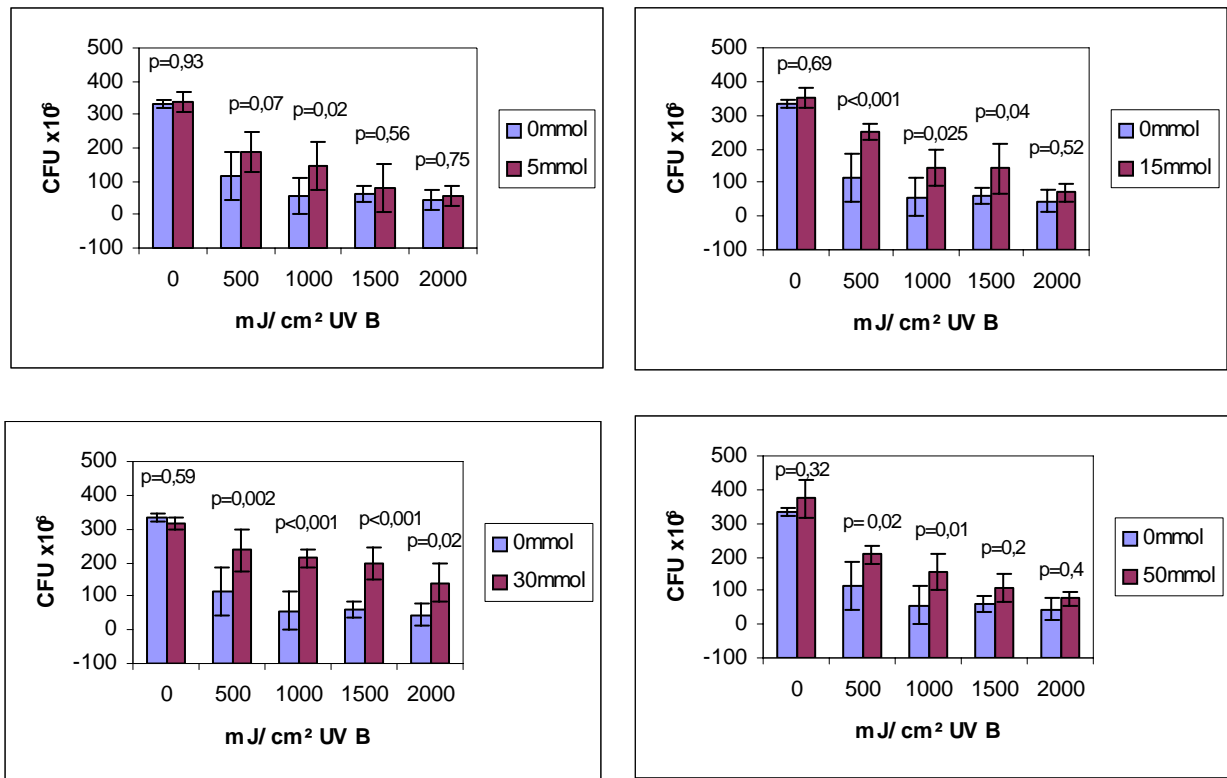


Diagramm 7: Paarweise Varianzanalyse

Als Fehlerbalken ist die Standardabweichung der jeweiligen Mittelwerte der Versuchsergebnisse eingezeichnet ($n = 3$).

3.2. Einfluß der Konzentration auf die Lichtschutzfähigkeit von *Pityriacitrin*

In diesem Versuch wurden die UV-Schutzwirkungen von exogen zugeführtem Pityriacitrin auf *Malassezia furfur* untersucht. Dazu wurde der Pilz mit verschiedenen Konzentrationen des Pityriacitrins überschichtet und bestrahlt. Jeweils zehn definierte Zellmengen *Malassezia furfur* wurden mit zehn verschiedenen Konzentrationen von Pityriacitrin überimpft und anschließend mit verschiedenen UVB-Dosen bestrahlt.

Auch hier wurde vor dem Abernten und Trocknen das Ergebnis visuell beurteilt:

| 0mJ/ cm² | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien | 100mJ/ cm² | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien |
|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| Pityriacitrin-konzentration | | Pityriacitrin-Konzentration | |
| 0,0µg/ µl | Ø 10-14mm Pilzrasen Einheitlich gleich gutes Wachstum | 0,0µg/ µl | Ø 7mm Pilzrasen Ø 8-12mm Pilzrasen, insgesamt etwas schwächeres Wachstum als bei 0mJ/ cm ² |
| 0,1µg/ µl | | 0,1µg/ µl | |
| 0,5µg/ µl | | 0,5µg/ µl | |
| 1,0µg/ µl | | 1,0µg/ µl | |
| 1,5µg/ µl | | 1,5µg/ µl | |
| 2,0µg/ µl | | 2,0µg/ µl | |
| 2,5µg/ µl | | 2,5µg/ µl | |
| 3,0µg/ µl | | 3,0µg/ µl | |
| 3,5µg/ µl | | 3,5µg/ µl | |
| 4,0µg/ µl | 4,0µg/ µl | | |

| 500mJ/ cm² | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien | 1000mJ/ | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien |
|------------------------------------|---|------------------------------------|--|
| Pityriacitrin-konzentration | | Pityriacitrin-konzentration | |
| 0,0µg/ µl | Ø 2-4mm Pilzkulturen | 0,0µg/ µl | Ø nur 2-3mm oder kein Wachstum |
| 0,1µg/ µl | | 0,1µg/ µl | |
| 0,5µg/ µl | | 0,5µg/ µl | |
| 1,0µg/ µl | Ø 3-5mm Pilzkulturen | 1,0µg/ µl | Ø 3-4mm Pilzkulturen |
| 1,5µg/ µl | | 1,5µg/ µl | |
| 2,0µg/ µl | Ø 6-9mm Pilzrasen Bis 2,0µg/ µl deutlich weniger Wachstum als bei 0mJ/ cm ² | 2,0µg/ µl | Ø 3-6mm Pilzkulturen |
| 2,5µg/ µl | | 2,5µg/ µl | Ø 4-9mm Pilzrasen |
| 3,0µg/ µl | | 3,0µg/ µl | |
| 3,5µg/ µl | | 3,5µg/ µl | |
| 4,0µg/ µl | | 4,0µg/ µl | |

| 1500mJ/ | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien | 2000mJ/ | Durchmesser und Wachstum der Zellkolonien |
|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| Pityriacitrin-konzentration | | Pityriacitrin-konzentration | |
| 0,0µg/ µl | Ø nur 2mm oder kein Wachstum | 0,0µg/ µl | Ø 1x2mm, sonst kein Wachstum |
| 0,1µg/ µl | | 0,1µg/ µl | |
| 0,5µg/ µl | | 0,5µg/ µl | |
| 1,0µg/ µl | | 1,0µg/ µl | |
| 1,5µg/ µl | Ø 1,5-4mm Zellkulturen | 1,5µg/ µl | Ø 2-5mm Zellkulturen Ø 5mm Zellkulturen Ø 4-7mm Zellrasen Ø 6-8mm Zellrasen |
| 2,0µg/ µl | Ø 3-7mm Zellkulturen | 2,0µg/ µl | |
| 2,5µg/ µl | Ø 4-9mm Zellkulturen | 2,5µg/ µl | |
| 3,0µg/ µl | | 3,0µg/ µl | |
| 3,5µg/ µl | | 3,5µg/ µl | |
| 4,0µg/ µl | | 4,0µg/ µl | |

Tabelle 9: Wachstum nach UVB-Bestrahlung und unterschiedlichen Pityriacitrinkonzentrationen

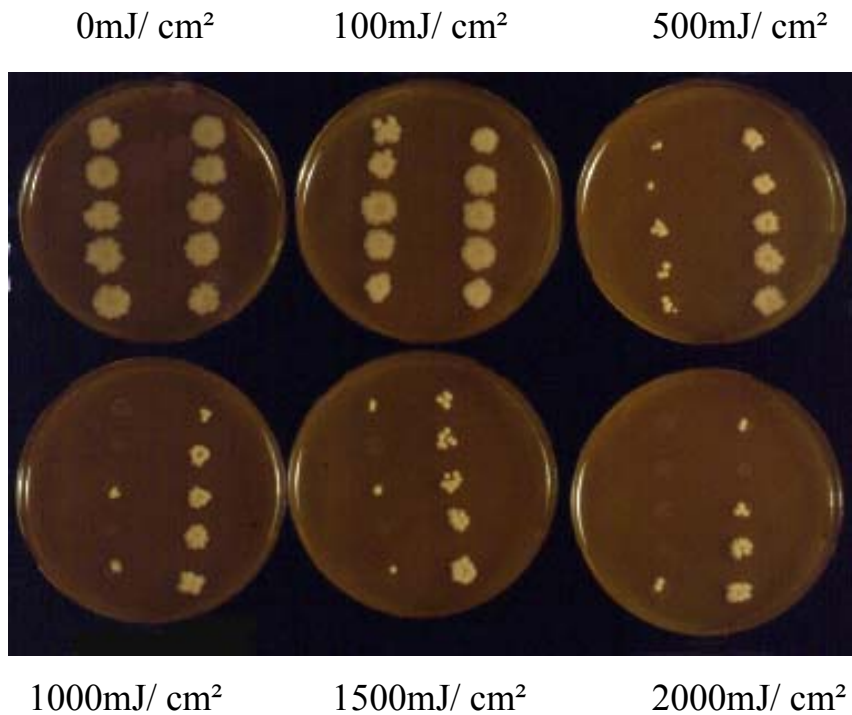


Abbildung 11: *Malassezia furfur* mit zehn verschiedenen Konzentrationen Pityriacitrin nach UVB-Bestrahlung nach 7 Tagen Inkubation

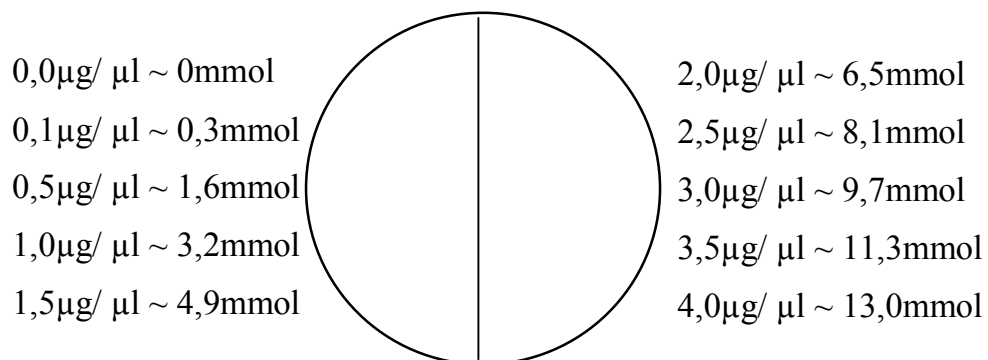


Abbildung 12: Schema der Pityriacitrinkonzentrationen auf der Agarplatte

Nach der Auswertung der Gewichte und Umrechnung in absolute Zellzahlen erhält man eine Konzentrationsreihe, von der ablesbar ist, wie sich die Wachstumsrate des Pilzes (UVB-Toleranz) bei verschiedenen Pityriacitrinkonzentrationen und verschiedenen UVB-Dosen verhält:

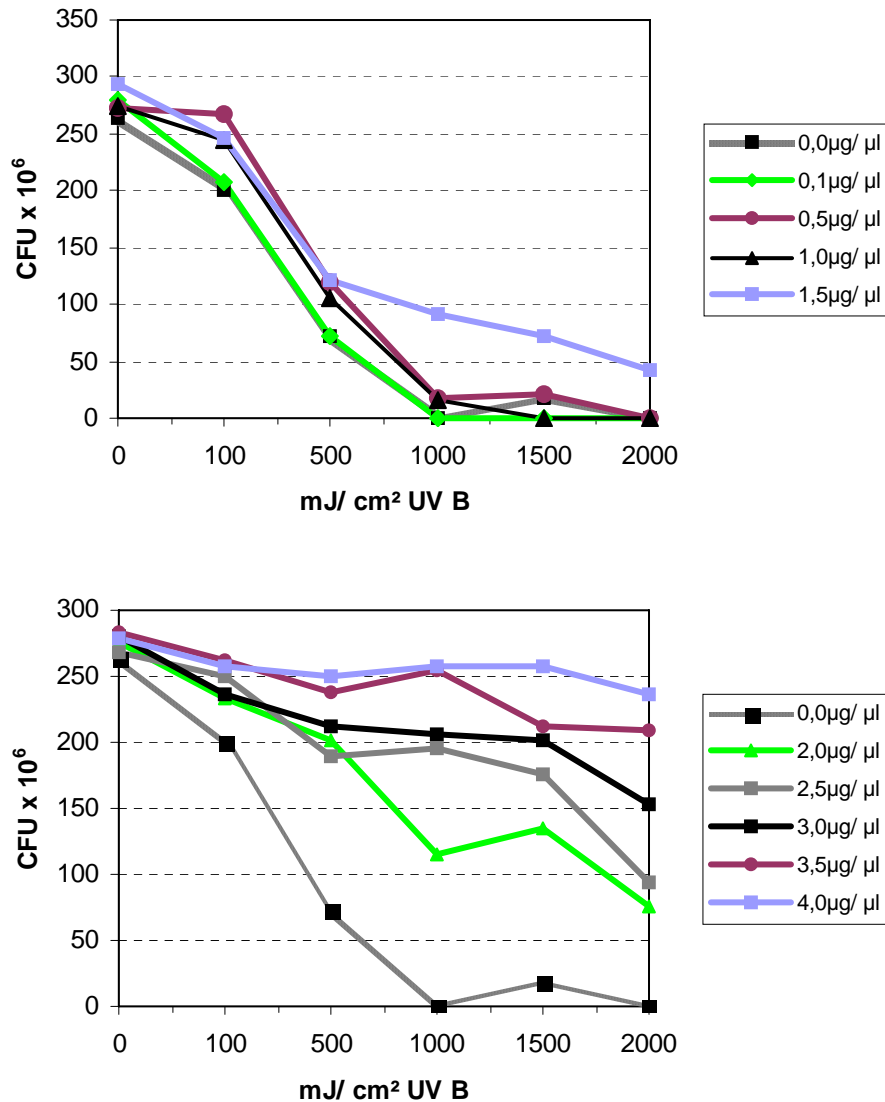


Diagramm 8: Einfluß einer UVB-Bestrahlung auf das Wachstum von *M. furfur*. Die Hefezellen waren mit verschiedenen Konzentrationen an Pityriacitrin überimpft. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

Bei den Konzentrationen 0 - 1,0µg/ µl zeigt sich ein deutliches Einknicken der Wachstumskurve schon bei UVB-Bereichen zwischen 100 und 500mJ/ cm². Bei Konzentrationen von 1,5 - 3,0µg/ µl läßt sich bessere UV-Toleranz des Pilzes ablesen, doch bei höheren UVB-Dosen ab 1500mJ/ cm² ist auch hier die Pityriacitrinkonzentration noch zu niedrig, um den Pilz deutlich zu schützen. Ab 3,5µg/ µl Pityriacitrin (~ ca. 11mmol) ist *Malassezia furfur* besonders bei hohen UVB-Dosen ausreichend geschützt, bei 4µg/ µl sogar so gut, dass kein nennenswertes Einknicken der Wachstumskurve zu erkennen ist.

Die statische Betrachtung erfolgte durch zweifaktorielle Varianzanalyse mit den festen Faktoren Pityriacitrinkonzentration und UVB-Dosis. Sowohl für den Pityriacitringehalt als auch für die Bestrahlung mit UVB-Licht ist ein statistisch signifikanter Einfluß auf die Zellzahl nachzuweisen (beide $p=0,00$). Werden beide Faktoren in Interaktion betrachtet, ist ebenfalls Signifikanz festzustellen ($p=0,00$). Es zeigt sich, dass die Zellzahl bei niedriger UVB-Dosis unabhängig von der Pityriacitrin-Konzentration im Mittel bei rund 250×10^6 Zellen liegt, während sie bei höherer UV-Dosis von niedrigen Werten beginnend, mit zunehmender Pityriacitrinkonzentration ansteigt und bei einem Pityriacitrin-Wert von $4,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ den gleichen Mittelwert erreicht (rund 250×10^6 Zellen) wie ohne Bestrahlung. Es läßt sich sagen, dass eine Steigerung der Konzentrationen an Pityriacitrin bei *Malassezia furfur* eine bessere UV-Toleranz zur Folge hat.

3.3. Einfluß von Pityriacitrin auf *Candida albicans*

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, inwiefern Pityriacitrin als Lichtschutz bei *Candida albicans* wirkt.



Abbildung 13: *Candida albicans* auf Kimmigagar nach 5 Tagen Inkubation

Dazu wurden definierte Mengen von *Candida albicans* entweder mit $2 \mu\text{l}$ reinem DMSO oder mit Pityriacitrin (11mmol , gelöst in DMSO) beimpft und anschließend verschiedenen UVB-Dosen ausgesetzt.

Die Pityriacitrinkonzentration wurde in Anlehnung an die Ergebnisse des zweiten Versuches gewählt. Dort zeigte sich, dass ab einer Konzentration von $3,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Pityriacitrin (\sim ca. 11mmol) und mehr *Malassezia furfur* auch bei hohen UVB-Dosen ausreichend geschützt ist.

Ein Vorversuch und mitlaufende Kontrollen zeigten, dass das DMSO in der vorliegenden Konzentration keinen toxischen Einfluß auf *Candida albicans* hat. Zuerst erfolgte wieder die visuelle Beurteilung des Wachstums nach Inkubation von 7 Tagen:

| Ohne Pityriacitrin | Wachstum | Mit Pityriacitrin | Wachstum |
|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| UVB-Dosis | | UVB-Dosis | |
| 0mJ/ cm ² | Ø 4-5mm creme gelbe Pilzrasen | 0mJ/ cm ² | Ø 4-5mm gelbliche Pilzrasen |
| 100mJ/ cm ² | Ø 3-4mm Pilzrasen | 100mJ/ cm ² | Ø 3-4mm Pilzrasen |
| 500mJ/ cm ² | Schwaches Wachstum bei 9 von 15 | 500mJ/ cm ² | Ø 3-4mm Pilzkulturen |
| 1000mJ/ cm ² | Ganz schwaches Wachstum bei 5 von 15 | 1000mJ/ cm ² | |
| 1500mJ/ cm ² | Kein Wachstum | 1500mJ/ cm ² | |
| 2000mJ/ cm ² | | 2000mJ/ cm ² | |

Tabelle 10: Wachstum mit und ohne Pityriacitrin nach UVB-Bestrahlung

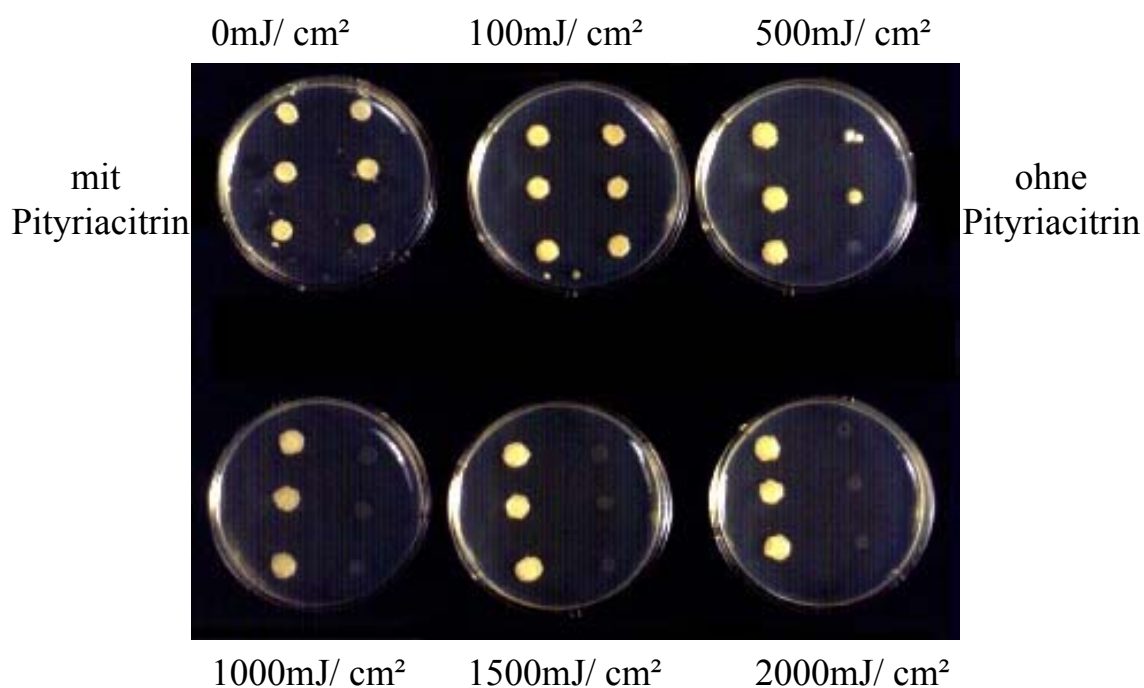


Abbildung 14: *Candida albicans* mit und ohne Pityriacitrin (11mmol, DMSO) nach Bestrahlung mit UVB-Licht nach 7 Tagen Inkubation

Anschließend wurde der Pilz abgeerntet, getrocknet und gewogen. Folgendes Diagramm zeigt die erhaltenen Werte:

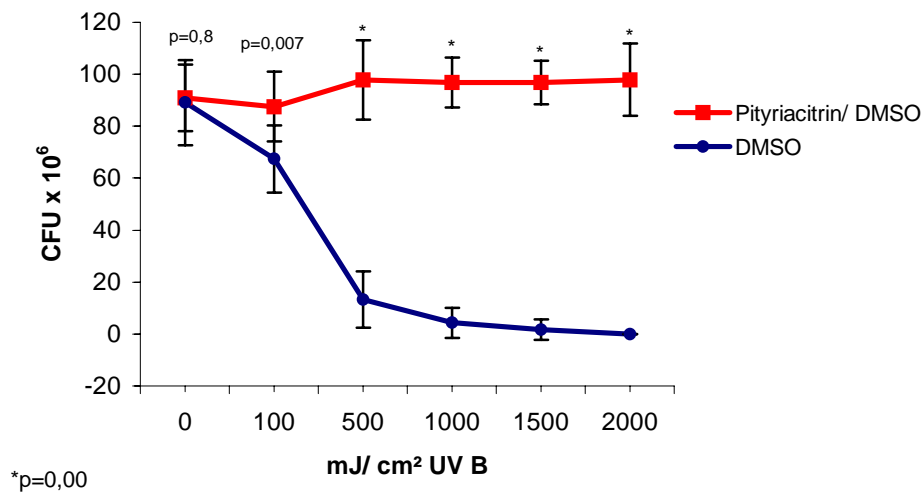


Diagramm 9: Einfluß einer UVB-Bestrahlung auf das Wachstum von *Candida albicans*. Die Hefezellen waren entweder mit Pityriacitrin in DMSO (11mmol) oder nur mit DMSO überdeckt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte±SD von fünf unabhängigen Werten pro Dosis

Bei unbestrahlter Situation sind fast identische Wachstumsraten zu erkennen (DMSO/ Pityriacitrin oder DMSO allein).

Im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen liegt bei den mit Pityriacitrin/ DMSO behandelten Zellen trotz Bestrahlung nur eine mittlere Wachstumsreduktion von 11% vor.

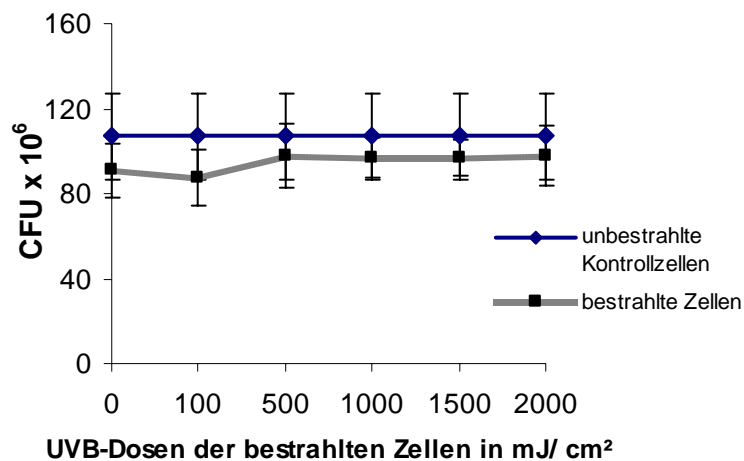


Diagramm 10: Vergleich von unbestrahlten Kontrollzellen zu den mit Pityriacitrin behandelten und bestrahlten Zellen. Die Ergebnisse der bestrahlten Zellen zeigen die Mittelwerte±SD der fünf voneinander unabhängigen Versuche. Während dieser Versuche wurden immer unbestrahlte Zellen aus der gleichen Kultur mitinkubiert. Der Mittelwert aus dem Wachstum dieser Kontrollzellen ist als reiner Vergleichswert anzusehen und korreliert nicht mit einer UVB-Bestrahlung (SD = 20)

Diese Reduktion ist wahrscheinlich dem Einfluß der Bestrahlung zu zuschreiben. Ein toxischer Einfluß des Pityriacitrins erscheint dagegen unwahrscheinlich. Nach absoluten Zellzahlen scheinen sie sogar besser gewachsen. Die statistische Betrachtung erfolgte durch zweidimensionale Varianzanalyse mit den festen Faktoren Pityriacitrin „Ja/ Nein“ und UVB-Dosis 0, 100, 500, 1000, 1500 und 2000mJ/ cm². Sowohl für das Pityriacitrin als auch für die UVB-Dosis ist ein statistisch signifikanter Einfluß auf die Zellzahl nachzuweisen (beide p=0,00). Beide Faktoren in Interaktion sind ebenfalls statistisch signifikant (p=0), so dass die postulierten Unterschiede zwischen den Stichproben als tatsächlich existent zu erachten sind. Bei den nur mit DMSO behandelten Zellen führt schon die Bestrahlung mit einer UVB-Dosis von 100mJ/ cm² zu einem statistisch signifikantem Einfluß (p=0,007). Sie führt hier zu einem verminderten Zellwachstum von 37%. Nach der Bestrahlung mit 500mJ/ cm² zeigt die Wachstumskurve der nur mit DMSO behandelten Zellen ein deutliches Einknicken (Wachstumsreduktion von 88%). Bei 1000mJ/ cm² läßt sich ein vermindertes Wachstum von 96%, bei 1500mJ/ cm² von 98% und bei 2000mJ/ cm² kein Wachstum mehr feststellen. Die Unterschiede zu den mit Pityriacitrin/ DMSO behandelten Zellen sind ab der UVB-Dosis 500mJ/ cm² und höher statistisch hoch signifikant.

Es läßt sich sagen, dass Pityriacitrin als Lichtschutz auf *Candida albicans* wirkt und keine toxischen oder antibiotischen Effekte aufweist.

3.4. Einfluß von Pityriacitrin auf *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus*

Die folgende Abbildung zeigt die Kulturmorphologie der eingesetzten Staphylococcen-Spezies auf ihrem Nährmedium.

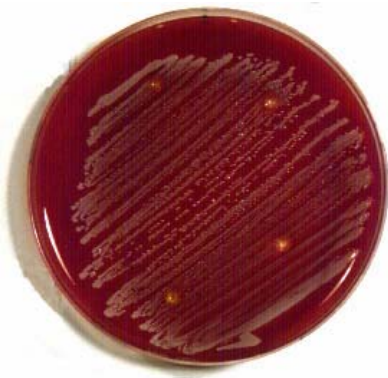


Abbildung 15: Links *Staph. aureus*, rechts *Staph. epidermidis* auf Blutagar nach 2 Tagen Inkubation

Bei den *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen zeigten sich weiße glänzende Bakterienrasen, bei den *Staphylococcus aureus*-Stämmen ging die Farbe der Bakterienrasen eher ins gelbliche.

Zur Überprüfung möglicher Effekte der Testsubstanzen Pityriacitrin bzw. DMSO auf die eingesetzten Bakterienstämme wurde ein Agardiffusionstest durchgeführt und die Wirkung nach einem Tag visuell beurteilt: Es zeigten sich keine Hemmhöfe oder gar wachstumssteigernde Wirkungen der hinzugefügten Substanzen. Es ließ sich nur beschreiben, dass sich die Bereiche des Blutagar, auf dem sich Bakterien befanden, anfingen, sich zu entfärben und blasser zu werden (hämolyisierender Metabolismus). Diese Beobachtungen ließen sich gleichermaßen bei *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* machen.

Es erfolgte noch eine Beurteilung nach 7 Tagen, bei dem sich bis auf die Veränderungen des Agar keine Toxizität oder sonstige Wirkung bemerkt werden konnte.



Staphylococcus epidermidis



Staphylococcus aureus

Abbildung 16: Plattendiffusionstest mit *Staphylokokken* und Pityriacitrin nach einem Tag

Links: Kontrolle mit 20 μ l DMSO

Rechts oben: 11 mmol Pityriacitrin in 20 μ l DMSO

Rechts unten: 22 mmol Pityriacitrin in 20 μ l DMSO

Dieser Versuch wurde mit drei verschiedenen *Staphylococcus aureus*- und drei verschiedenen *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen durchgeführt. Es konnten keine Unterschiede bei den zwei verschiedenen *Staphylokokkenarten* festgestellt werden. Zwischen den Stämmen gab es auch keine Varianzen.

Darauf aufbauend wurden die *Staphylokokken* wieder auf Blutagarplatten ausgestrichen und eine Platte mit 10µl Pityriacitrin à 11mmol überimpft, eine mit 10µl Pityriacitrin à 22mmol, eine mit 10µl reinem DMSO und eine ohne Zusatz. Die Platten mit Pityriacitrin und mit reinem DMSO wurden einer UVB-Bestrahlung von 1000mJ/ cm² ausgesetzt. Anschließend wurden die Platten inkubiert und nach 12, 24 und 48 Stunden visuell beurteilt. Hier standen ein *Staphylococcus aureus*- und drei *Staphylococcus epidermidis*-Stämme zur Verfügung, die untereinander nur sehr leichte Unterschiede zeigten.

Staphylococcus epidermidis

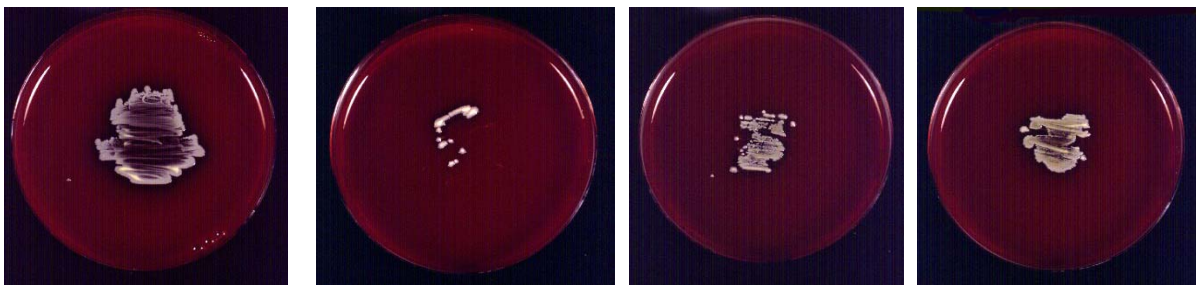


Abbildung 17: *Staphylococcus epidermidis* nach 24h Inkubation

- 1: Kontrolle ohne Zusatz und ohne Bestrahlung
- 2: Kontrolle mit 10 µl DMSO, Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²
- 3: 11 mmol Pityriacitrin in 10 µl DMSO, Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²
- 4: 22 mmol Pityriacitrin in 10 µl DMSO, Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²

Staphylococcus aureus



Abbildung 18: *Staphylococcus aureus* nach 24h Inkubation

- 1: Kontrolle ohne Zusatz und ohne Bestrahlung
- 2: Kontrolle mit 10 µl DMSO, Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²
- 3: 11 mmol Pityriacitrin in 10 µl DMSO, Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²
- 4: 22 mmol Pityriacitrin in 10 µl DMSO, Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²

Es zeigt sich, dass bei den Platten ohne Pityriacitrin aber mit Bestrahlung nur sehr schlechtes oder fast kein Wachstum der *Staphylokokken* zu sehen ist.

Bei Bestrahlung mit 1000mJ/ cm² zeigen sich bei den Platten, die zusätzlich mit Pityriacitrin präpariert wurden, deutliche Unterschiede im Vergleich zu denen ohne die Substanz. Es ist mehr Wachstum zu erkennen. Der Unterschied in der Steigerung der Pityriacitrinkonzentration und dadurch besserer UV-Schutz ist erkennbar. Nach 48 Stunden zeigt sich kein anderes Bild. Bei den Platten ohne Pityriacitrin aber mit Bestrahlung ist immer noch kein Wachstum zu erkennen, während sich auf den anderen die Ergebnisse von oben bestätigen und weiterhin Wachstum nachzuweisen ist.

Davon unabhängig wurden Konzentrationsreihen vorgenommen, die zeigten, dass DMSO in der vorliegenden Menge keinen nennenswerten Einfluß auf das Ergebnis hat.

Um quantitative Aussagen machen zu können, wurde eine weitere Methode entwickelt. Bei diesen Versuchen stand ein *Staphylococcus aureus*- und ein *Staphylococcus epidermidis*-Stamm zur Verfügung. Pro Stamm wurden sechs Quarzküvetten mit 2ml Flüssigmedium BHI bestückt und anschließend Bakterien hinzugegeben.

1. Küvette: Bakterien, ohne DMSO, ohne Pityriacitrin, ohne Bestrahlung
2. Küvette: Bakterien, mit DMSO, ohne Pityriacitrin, ohne Bestrahlung
3. Küvette: Bakterien, mit DMSO, mit Pityriacitrin(10µg/ml), ohne Bestrahlung
4. Küvette: Bakterien, ohne DMSO, ohne Pityriacitrin, mit Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²
5. Küvette: Bakterien, mit DMSO, ohne Pityriacitrin, mit Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²
6. Küvette: Bakterien, mit DMSO, mit Pityriacitrin (10µg/ml), mit Bestrahlung mit 1000mJ/ cm²

Laut Prof. Sziegoleit bewegen sich wirksame Konzentrationen von Antibiotika in Größenordnungen von 0,2-15µg / ml. Es wurde die Konzentration 10µg/ml gewählt \approx 30µmol Pityriacitrin.

Die Bestrahlung erfolgte mit 1000mJ/ cm². Sofort danach wurde mit einem Spektralphotometer die Absorption gemessen. Des Weiteren wurde die Trübung nach 8, 24 und nach 32 Stunden gemessen.

Das Ergebnis dieser Bestrahlungsversuche zeigen folgende Diagramme:

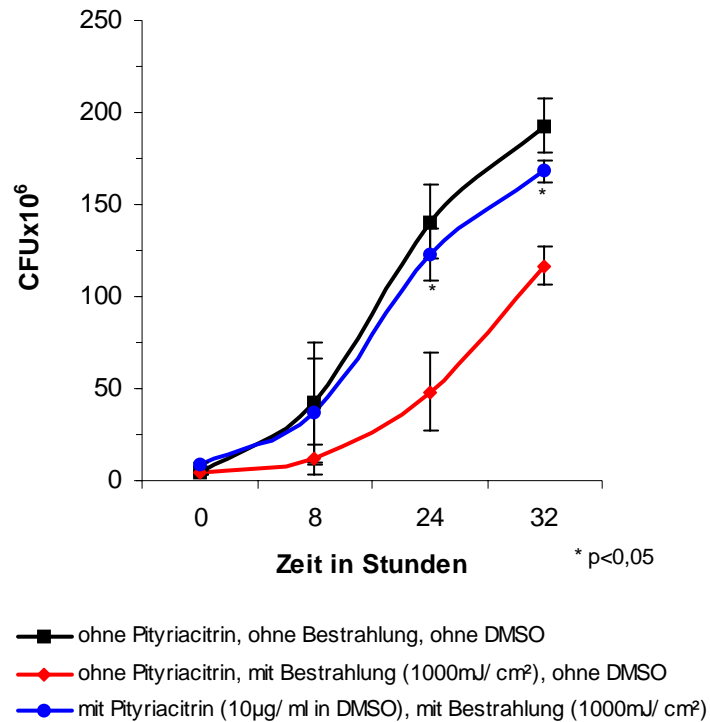


Diagramm 11: Einfluß von Pityriacitrin und UV-Licht auf *Staphylococcus epidermidis* (n=3)

Acht Stunden später ist das Wachstum von den Zellen, die mit Pityriacitrin behandelt und bestrahlt wurden, nur 12% geringer als von unbestrahlten Kontrollzellen. Bei den Zellen, die bestrahlt wurden, aber nicht mit Pityriacitrin behandelt worden sind, ist das Wachstum nach acht Stunden um 73% reduziert. Nach 24 Stunden bleibt das Wachstum der „Pityriacitrin-Zellen“ weiterhin nur um 13% reduziert im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen. Die Zellen ohne die Substanz sind im Wachstum um 66% reduziert. Der Vergleich der bestrahlten Zellen untereinander ist zu diesem Zeitpunkt signifikant ($p < 0,05$). Nach 32 Stunden zeigt sich ein nicht mehr so eindeutiges Bild. Die mit Pityriacitrin behandelten Zellen bleiben weiterhin im Wachstum nur um 13% reduziert. Die unbehandelten aber trotzdem bestrahlten Zellen haben nur ein vermindertes Wachstum von 40% weniger im Vergleich zu den Kontrollzellen. Das könnte auf einen gewissen Erholungseffekt schließen lassen. Der Vergleich der bestrahlten Zellen untereinander ist aber zu diesem Zeitpunkt weiterhin signifikant ($p < 0,05$).

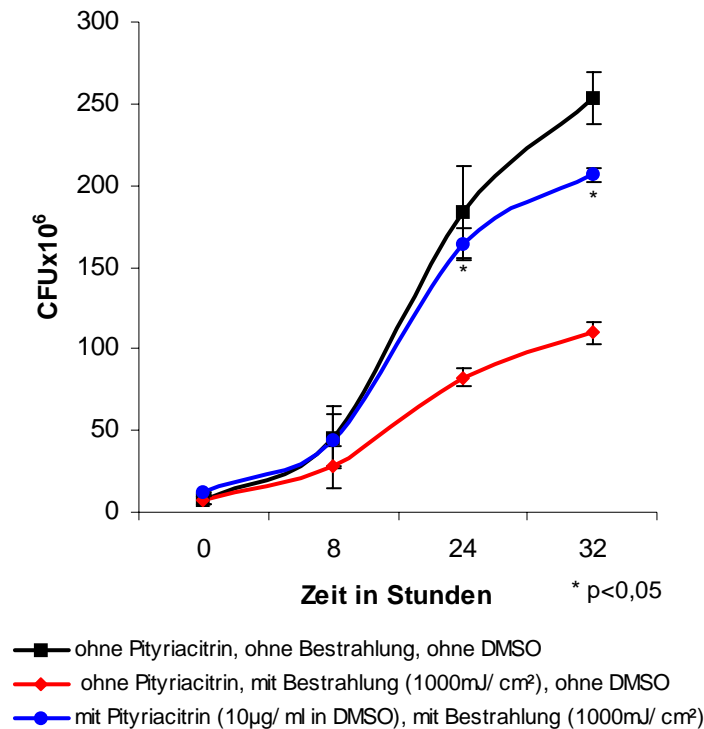


Diagramm 12: Einfluß von Pityriacitrin und UV-Licht auf *Staphylococcus aureus* (n=3)

Bei *Staphylococcus aureus* zeigt sich ein ähnliches Bild. Nach acht Stunden ist das Wachstum von den Zellen, die mit Pityriacitrin behandelt und danach bestrahlt wurden, sogar nur um 3% reduziert im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen. Bei den Zellen, die nicht mit Pityriacitrin behandelt worden sind und trotzdem bestrahlt wurden, ist das Wachstum nach acht Stunden um 39% reduziert. Nach 24 Stunden bleibt das Wachstum der „Pityriacitrin-Zellen“ weiterhin nur wenig reduziert im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen, in diesem Fall um 10%. Die Zellen ohne die Substanz sind dagegen im Wachstum um 55% reduziert. Der Vergleich der bestrahlten Zellen untereinander ist zu diesem Zeitpunkt wie auch bei *Staphylococcus epidermidis* signifikant ($p < 0,05$). Nach 32 Stunden sieht es ähnlich aus. Die mit Pityriacitrin behandelten Zellen bleiben weiterhin recht gering im Wachstum reduziert. Im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen haben sie ein Wachstum von 82%. Die unbehandelten aber trotzdem bestrahlten Zellen haben ein vermindertes Wachstum von 57% weniger im Vergleich zu den Kontrollzellen. Der Vergleich der bestrahlten Zellen untereinander bleibt zu diesem Zeitpunkt weiterhin signifikant ($p < 0,05$).

Die Diagramme zeigen, dass die Bakterien mit Pityriacitrin annähernd gleich gutes Wachstum zeigen wie die unbestrahlten Kontrollen. Der Unterschied zu den Bakterien, die ohne Pityriacitrin UVB-Licht ausgesetzt waren, ist deutlich zu erkennen.

Die *statische* Betrachtung erfolgt mittels des U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney.

Der besseren Übersicht wegen wurden die Kurven der mitlaufenden Kontrollen zum Einfluß des DMSO in diese Grafiken nicht eingefügt. Die Ergebnisse können den Rohdaten entnommen werden. Zusammengefaßt lässt sich sagen, dass die Zellen, denen DMSO zugesetzt worden ist und nicht bestrahlt wurden, gleiches Wachstum aufweisen, wie die völlig unbehandelten Kontrollzellen.

Die Zellen mit DMSO, die nicht mit Pityriacitrin beimpft wurden, aber der Bestrahlung ausgesetzt waren, zeigten eine Wachstumsreduktion gleich den bestrahlten Zellen ohne jeglichen Zusatz.

Ein Unterschied zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* können vorliegende Ergebnisse nicht belegen.

Diese Methodik stellte sich als anfällig gegenüber Keimverunreinigungen dar. Trotz peinlich genauer Einhaltung von Hygienemaßnahmen waren mehrere Versuche kontaminiert. Nach Beendigung der Versuche erfolgte eine visuelle Überprüfung der Trübung. Stellenweise zeigte sich eine über die Maßen dichte Trübung, die nicht dem gewohnten Bild entsprach. Zusätzlich wurden mit einer Pipette Proben entnommen und auf Kimmigagar und Blutagar inokuliert. In zwei Fällen zeigt sich Fremdwachstum von *Candida albicans*. Immer zeigte sich aber das jeweils entsprechende Wachstum der Bakterienzellen, so dass festzustellen ist, dass sich in den Küvetten lebende *Staphylokokken* befanden und nicht nur (zum Beispiel durch die UVB-Bestrahlung) abgestorbene Zellreste, die gemessen wurden.

Es stellt sich die Frage, warum bei den bestrahlten Bakterien ohne Pityriacitrin noch Wachstum zu verzeichnen ist. Zum einen ist die Durchdringung der mit Medium gefüllten Küvetten durch UV-Licht bedingt durch die Küvettendicke (Schwächung der Strahlung entsprechend dem Lambert-Beer-Gesetz) nicht gleichmäßig. Zu anderen könnte die absolute Phototoxizitätsdosis noch nicht erreicht worden sein.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht Effekte des Pityriacitrins, eines protektiv gegenüber UV-Strahlung wirkenden Pigmentes, auf verschiedene Mikroorganismen. Pityriacitrin wird von *Malassezia furfur* unter bestimmten Bedingungen synthetisiert. Dieser Hefepilz gehört zur residenten Flora der Haut und produziert mit Tryptophan als alleinige Aminosäure im Nährmedium Pigmente und Fluorochrome. Diese Stoffe sind von pharmakologischen und biologischen Interesse. Insbesondere Pityriacitrin ist von Bedeutung für die vorliegenden Studien. Es handelt sich hier um ein Indolderivat, welches Untersuchungen zur Folge ein Absorptionsspektrum im UVA, UVB und UVC-Bereich bietet und somit zu vermehrter UV-Toleranz des Pilzes führt. Dies könnte dem Pilz, der in den oberen Schichten der menschlichen Epidermis zu finden ist, helfen, sich gegen die Exposition des UV-Lichtes zu schützen. Schon Studien in den 30er Jahren zeigten, dass sich bei künstlicher UV-Bestrahlung in den depigmentierten Arealen (sog. Pityriasis versicolor alba) kaum Sonnenbrand ausbildet (Lewis 1936). Bisherige Untersuchungen ergaben, dass die Synthese von Tryptophan-Derivaten (Pigmenten und Fluorochromen) für *Malassezia furfur* einen Lichtschutz im UVA- und UVB-Bereich bewirkt (Mayser 1998, 1999, 2002). Zusätzlich konnte 1999 eine UV-Filterwirkung des Pigments nach topischer Anwendung bei freiwilligen Probanden nachgewiesen werden (Mayser 1999). Pityriacitrin, als Indolderivat des Tryptophan, kann einen auf π -Elektronen basierenden organischen UV-Schutz darstellen (Cockell 1998a).

Im ersten Teil der Untersuchungen wurde die endogene Pityriacitrinproduktion von *Malassezia furfur* in Abhängigkeit vom Tryptophanangebot und die daraus resultierende UV-Resistenz untersucht. Es wurde *in vitro* der Einfluß des Tryptophangehaltes getestet. Dazu wurde der Pilz auf Nährmedien mit unterschiedlichem Angebot an Tryptophan angezüchtet und anschließend unterschiedlich starker UVB-Strahlung ausgesetzt. Bei Abwesenheit von Tryptophan im Nährmedium zeigt sich nur wenig bis kein UV-protektiver Effekt. Die von dem Nährboden mit 30mmol Tryptophangehalt entnommenen Zellen wuchsen am besten nach erfolgter UVB-Bestrahlung. Einer Steigerung des UV-Schutzes durch Erhöhung des Tryptophankonzentration auf 50mmol kann nicht beschrieben werden. Weiter ließ sich ablesen, dass bei einem Gehalt von 5 und 15 mmol Tryptophan im Nährboden ein deutliches Wachstum nach Bestrahlung zu finden ist. Dies zeigt, dass selbst geringe Mengen an Tryptophan die Ausbildung eines UV-Filters gewährleisten. Über die Rolle von Tryptophan im Stoffwechsel der Epidermis ist noch wenig bekannt. Bisher sind auch eher geringe

Konzentrationen nachgewiesen worden (Burke 1962/63), die aber für die Pigmentsynthese ausreichend sind. Auf der Haut stellen freie Aminosäuren einen hohen Anteil der wasserlöslichen Bestandteile (Spier 1956). Der Gehalt an freien Aminosäuren auf der Haut zeigt auf mit *Tinea versicolor* erkrankten Arealen quantitative Unterschiede (Burke 1962), so dass ein Zusammenhang zwischen Aminosäurenstoffwechsel und mit *Malassezia furfur* assoziierten Krankheiten zu sehen sein könnte. Die Bedeutung dieser Versuche ist besonders vor dem Hintergrund des natürlichen Nährstoffangebotes zu werten und sind als erste Anhaltspunkte zu sehen. Es ist nicht geklärt, inwiefern die Zusammensetzung des Mediums, auf dem die Pigmentbildung überhaupt erst möglich ist, den Nahrungsmöglichkeiten von *Malassezia furfur* auf der menschlichen Haut entspricht. Zusätzlich ist zu diskutieren, inwiefern auf der Haut Zellmenge (Zellzahl pro cm²) und Tryptophanangebot zusammenhängen. Die Besiedlung mit *Malassezia furfur* bei der Pityriasis versicolor kann in erkrankten Arealen bis zu 450 000 Keime/ cm² betragen (Mc Ginley 1970). Durch diese hohe Erregerdichte könnte bei ausreichend hohem nutritiven Angebot an Tryptophan eine solche Konzentration an Pityriacitrin erreicht werden, die die *in vivo* beobachtete UV-Resistenz der depigmentierten Areale der Pityriasis versicolor alba erklären kann. Für *Malassezia furfur* könnte die relative Anreicherung von Tryptophan im Stickstoffangebot das Signal für die Pigmentsynthese sein und somit über die Ausbildung des Schutzmechanismus für das Überleben der Hefe gerade bei starker Sonneneinstrahlung sorgen. Das dafür notwendige Tryptophan könnte durch verschiedene Vorgänge vorliegen:

(a) Aminosäurenverluste im menschlichen ekkrinen Schweiß können eine Rolle in der Pathogenese spielen (Rothman 1949a&b, Liappis 1975, 1980), besonders da das Schwitzen als prädisponierend für Hauterkrankungen gilt (Borelli 1991). Starkes Schwitzen aufgrund von tropischem Klima und Wärme durch vermehrte UV-Strahlung könnte mit Abtropfen des Schweißes zu einem Verlust an hydrophilen Aminosäuren führen (Liappis 1980), während hydrophobe oder proteingebundene Aminosäuren auf der Haut zurückbleiben. Für heterozyklische Aminosäuren wie dem Tryptophan ist eine Albuminbindung im Serum beschrieben (Mc Menamy 1958) und somit auch eine Bindung an Hautoberflächenproteine denkbar. Diese relative Anreicherung von Tryptophan signalisiert eine vermehrte Wärme und UV-Belastung und induziert bei *M. furfur* die Synthese tryptophanabhängiger Pigmente als UV-Schutz. Es zeigte sich, dass *in vitro* eine Tryptophankonzentration von 50mmol im Vergleich zu 30mmol keinen verbesserten Lichtschutz hervorruft. Subjektiv schien es auch so, dass, bei der visuellen Beurteilung des Wachstumserfolges der Inkubation von *Malassezia furfur* nach sieben Tagen auf unterschiedlich tryptophanhaltigen Nährböden, bei 50mmol

sogar eine verminderte Pigmentierung zu erkennen war (s. S. 39, Abb. 9; der Effekt ist auf dem Foto stärker zu sehen als er in realitas festzustellen war). Somit sind der Pigmentproduktion und dem UV-Filtereffekt trotz steigendem Tryptophangehalt im Medium Grenzen gesetzt. Die physiologisch „sinnvolle“ Maximal-Konzentration scheint 30mmol zu sein. Darüber entstehen nach den vorliegenden Daten toxische Effekte. Möglich ist, dass die Kapazität der stoffwechselaktiven Substanzen im Pilz, die zur Metabolisierung des Tryptophans gebraucht werden, erschöpft ist, nachdem eine bestimmte Konzentration „abgearbeitet“ wurde oder dass die dann noch vorhandene Menge an Tryptophan als „vernachlässigbar“ angesehen wird. Dies lässt den Schluß zu, dass der Tryptophanabbau nicht einzig und allein zur Ausbildung eines UV-Schutzes dient, sondern auch noch andere Ursachen für diesen Sekundärmetabolismus der Hefe vorliegen.

(b) Es ist möglich, dass die relative Anreicherung der Aminosäure Tryptophan nicht durch Verlust anderer Stickstoffquellen durch Abtropfen mit dem ekkrinen Schweiß entsteht, sondern dadurch, dass Schwitzen zu einer Mikroemulsion auf der Haut führt. Das bedeutet, dass dann alle Nährstoffe gut gelöst sind. *Malassezia furfur* verstoffwechselt am besten kurzkettige Aminosäuren wie Alanin, Serin und Glycin. Heterozyklische Aminosäuren wie auch das Tryptophan werden dagegen schlechter metabolisiert (Mayser 1998). *Malassezia furfur* verstoffwechselt also zuerst die kurzkettigen Aminosäuren. Wenn diese dann verbraucht sind und dadurch auch ein entsprechendes Wachstum erreicht ist, liegt ein relatives Überangebot der anderen Aminosäuren (auch von Tryptophan) vor, was als Induktion zur Pigmentsynthese fungiert, da die Lebenserhaltung durch den Verbrauch der anderen Aminosäuren schon gesichert ist.

Tryptophan selbst ist aufgrund seiner molekularen Struktur in der Lage, UVB-Strahlung zu absorbieren (Cockell 1998b), ist aber auch für seine starke Photoreaktivität im UVB-Bereich mit Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bekannt (ROS: reactive oxygen species). Diese können Membran- und DNA-Schäden verursachen (Babu 1992). Durch den Abbau von Tryptophan und der Ausbildung von Pigmenten und Fluorochromen wäre somit die Entstehung schädlicher reaktiver Sauerstoffspezies minimiert (Hort 2005). Dies unterstreicht die oben angesprochene Vermutung, dass die Ausbildung des Sekundärmetabolismus nicht nur mit dem primären Ziel des UV-Schutzes verbunden ist, sondern auch eine Detoxifikation darstellen könnte, so dass dieser Stoffwechselweg in Zusammenhang mit der Pityriasis versicolor alba noch weiter geklärt werden muss.

Ein schlechtes aber vorhandenes Wachstum bei 0mmol Tryptophan ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass in dem Agar doch noch minimalste Spuren von Stickstoff enthalten

sind. Bekannt ist, dass *Malassezia furfur* Ammoniumsalze wie NH_4Cl , NH_4HSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Harnstoff, Kreatin, Kreatinin, Harnsäure und Allantoin verstoffwechseln kann (Mayser 1998). Möglich ist auch, dass bereits abgestorbene Zellen metabolisiert werden.

Zur weiteren Untersuchung des UV-Filtereffekts von Pityriacitrin wurde eine Dosis-/Wirkungskurve erstellt, von der ablesbar ist, bei welcher Konzentration von Pityriacitrin der gewünschte Lichtschutz zu verzeichnen ist. Dazu wurde *Malassezia furfur* mit verschiedenen Konzentrationen von Pityriacitrin beimpft und anschließend unterschiedlichen UVB-Dosen ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigen *in vitro* eine Konzentrations- und UV-Dosis-Abhängigkeit, also mehr Substanz bewirkt einen besseren UV-Filtereffekt. Dass ab circa 13mmol selbst höchste UVB-Dosen toleriert werden, unterstreicht die UV-protective Potenz der Substanz. Diese Konzentration könnte in Anlehnung zu der endogenen Pityriacitrinproduktion bei einem Tryptophangehalt von 30mmol im Nährmedium gesehen werden, da die von diesem Nährboden entnommenen Zellen am besten hohe UVB-Dosen toleriert haben.

Physikalische Bestrahlungsexperimente haben immer die Schwierigkeit, wie sie in die biologische und ökologische Wirklichkeit eingeordnet werden können. Von gemessenen Aktionsspektren kann eine sogenannter radiation amplification factor (RAF) erhoben werden. Vereinfacht ausgedrückt, gibt er den prozentualen Zuwachs an Strahlenschäden für ein Prozent Verlust an Ozonschichtstärke an. Diesen Untersuchungen zur Folge scheint es zum Beispiel so, dass die Syntheseleistung von UV-Protectiva bei einem zunehmenden Verlust der Ozon-Schicht keinen ausreichenden Schutz bieten wird (Rozema 2002).

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der biologischen UV-Dosimetrie, welche mit Hilfe von Biomolekülen wie Provitamin D₃, Uracil oder DNA oder Bakterien wie zum Beispiel *Bacillus subtilis* (DLR-Biofilm) die Strahlenschäden messbar machen (Rettberg 2002).

Bei den vorliegenden Versuchen ist zu beachten, dass es sich bei der Inokulation mit Pityriacitrin immer um ein Überimpfen, das heißt ein Überdecken der Mikroorganismen gehandelt hat. Ein rein physikalischer Schutz durch Auflagerung wurde schon mehrfach als Erklärung der depigmentierten Areale der Pityriasis versicolor alba vermutet (Kistiakovsky 1927, Wertheim 1928, Wise 1932, Lewis 1936, Borgers 1987). Dagegen spricht das Auftreten der Erkrankung in unbelichteten Arealen (Blumenthal 1971, Bojanovsky 1979) sowie eine vollständige Depigmentierung auch bei dunkelhäutigen Menschen (Jeliffe 1954). Eher zu vermuten sind toxische Einflüsse auf den Melaninstoffwechsel (Ruete 1933, Sulzberger in Lewis 1935, Chatterji 1972, Allen 1976, Jung 1976, Nazzaro Porro 1978, Karaoui 1981, Breathnach 1984, Leeming 1986, Nazzaro Porro 1986, Robins 1987, Galadari 1992, De Luca

1996, Krämer 2005b, Solano 2006). Dies zeigt, dass Pityriacitrin zwar durch seine besondere UV-protective Potenz das Ausbleiben eines Sonnenbrandes auf den mit Pityriasis versicolor alba erkrankten Arealen erklären kann, weitere pathogenetische Mechanismen wie Depigmentierung und Fluoreszenz der Läsionen aber in den übrigen Bestandteilen der Pigmente und Fluorochromen zu suchen sind.

Schon während der frühen Entwicklungsgeschichte bestand eine enge Korrelation zwischen Sonnenstrahlung und Biosphäre. UV-Strahlung nimmt in der Evolution eine besondere Stellung ein. Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass diese Energie schon bereits vor der Entstehung von Leben bei der Ausbildung von Oligonucleotid-ähnlichen Polymeren mit Stickstoffbasen als UV-Protektoren als Selektionsfaktor diente. Es ist möglich, dass die Variierung dieser Stickstoffanteile eine Grundlage bildet für die spätere Vielfältigkeit von Genomen (Cockell 2002, Mulkidjanian 2003). UV-Strahlung wird in diesem Zusammenhang als treibende Kraft, als Auslöser gesehen und nicht als schädigender Faktor. Gerade UVA-Strahlung hat durchaus positive Einflüsse wie zum Beispiel die Reflexion von Anthocyanin auf Blütenblättern, die dazu führt, dass diese von den befruchtenden Bienen erkannt werden oder die Spiegelung des UVA-Lichtes auf Schmetterlingsflügeln zur Wiedererkennung während der Paarung (Cockell 1999).

Um negativen Einflüssen entgegen wirken zu können, mussten Mikroorganismen Mechanismen entwickeln, um aus der damals viel stärkeren, da wahrscheinlich noch ungefilterten, aber doch lebensnotwendigen UV-Strahlung den größtmöglichen Nutzen zu ziehen und den geringsten Schaden davon zu tragen. Zu solchen Mechanismen zählen:

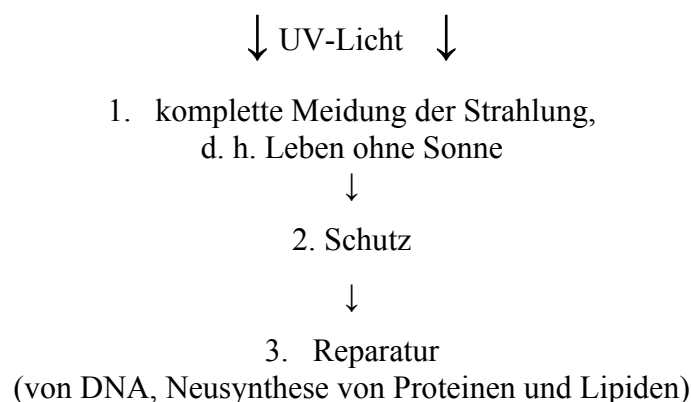


Diagramm 12 (nach Cockell 1999)

Zu den erwähnten Schutzmaßnahmen werden physikalische Methoden wie Absorption durch die Wasserschicht der Ozeane sowie Eisenverbindungen oder Schwefel gezählt (Cockell 1999, 2002). Die Entwicklung organischer UV-protektiver Substanzen eröffnete Organismen eine Vergrößerung ihres möglichen Lebensraumes. Eine weite Verbreitung finden Verbindungen wie Mycosporine-like amino-acids (in Mikroorganismen), Scytonemin (in Cyanobakterien), Pigmente (Korallen) (Salih 2000), Flavonoide (Pflanzen)(Garcia-Pichel 1993) oder das erwähnte Pityriacitrin (Nagao 1999), die eine große UV-Absorptionsfähigkeit aufweisen. Unter den Pilzen gibt es die Dematiaceen (Schwärzepilze), die dunkelbraune bis schwarze Pigmente (DHN-Melanin) bilden (Mayser 1996). Zu dieser Reihe ist natürlich auch das menschliche Melanin zu zählen (Cockell 1999, Langfelder 2003), da bekanntermaßen selbst geringe UV-Dosen ungünstige Effekte auf der menschlichen Haut bewirken (van der Vleuten 1996, Kindl 2000, Dummer 2001). Durch geändertes Freizeitverhalten und Verdünnung der Ozonschicht rückt der Einfluß von UV-Licht immer mehr in den Vordergrund (Hölzle 1997).

Da Schutz niemals hundertprozentig sein kann, kommen Reparaturmechanismen wie *photoreactivation* (mit zur Hilfenahme strahlungsabhängiger Enzymen), *recombination repair* und *excision repair* (u.a. „dark-repair“, lichtunabhängiges Ausschneiden von schadhafte DNA-Teilen) zum Tragen (Cockell 1999). Man nimmt an, dass diese Mechanismen im Zeitalter des Archaikums (vor 3800 – 2500 Millionen Jahren) ihren Ursprung haben. Die beteiligten Mikroorganismen (wie z. B. *Deinococcus radiodurans*) haben zum Teil solch beeindruckende Fertigkeiten entwickelt, dass allein die Reparatur ausreichend war, um der immens intensiven Strahlung dieses Erdzeitalters entgegenzuwirken (Cockell 2002). Das von *Malassezia furfur* synthetisierte Pityriacitrin eröffnet für den Pilz eine Überlebensstrategie zum Schutz vor UV-Strahlung, gerade weil diese Hefe in den oberen Schichten der Epidermis zu finden ist. Dies kann für den Pilz in seiner ökologischen Nische einen Vorteil bedeuten. Es ist offen, inwiefern die Produktion von Pityriacitrin Effekte auf die übrige Mikroflora ausübt, da dort ja nicht nur Hefen siedeln, sondern auch *Staphylokokkenspezies*, *Coryneforme* oder *Propionibakterien*. Wie weiter vorne ausgeführt, hat der tryptophanabhängige Sekundärmetabolismus von *Malassezia furfur* nicht nur UV-protektive Effekte, sondern ist möglicherweise auch als Schutzmechanismus in nutritiven Mangelsituationen zu sehen. Das Interesse an der Wirkung der gewonnenen biologisch aktiven Substanzen führte zur Testung an Mikroorganismen der kutanen Mikroflora, da offen ist, ob die positiven Resultate bei der *Malassezia*-Hefe auch auf andere Mikroorganismen zu übertragen sind oder dort sogar gegenteilige Effekte beschrieben werden müssen. Die

Hautflora ist ein fein abgestimmtes System, in dem sich die Bakterien und Pilze, zusätzlich zu physikalischen und chemischen Faktoren, dem Kampf um Nahrung und dem direkten Einfluß der anderen Konkurrenten stellen müssen. Im Folgenden wurde *in vitro* der Einfluß des Pityriacitrins untersucht. Bei diesen Studien handelt es sich erneut um Plattenversuche oder um Ergebnisse im Flüssigmedium. Die Möglichkeit einer Diffusion in den Mikroorganismus (mehr als eine rein physikalische Filterwirkung) und somit intrazelluläre Interaktion ist bei den Plattenversuchen wahrscheinlich, ebenso wie bei den Trübungsversuchen. Damit wäre eine analoge Situation gegeben wie bei der direkten Synthese von Pityriacitrin durch die Hefe. Die Bedeutung dieser Versuche ist besonders vor dem Hintergrund des Kolonisationsverhaltens der beteiligten Mikroorganismen und des natürlichen Nährstoffangebotes zu werten. Es ist zu klären, inwiefern *in vivo* ein direkter Kontakt der von *Malassezia furfur* synthetisierten Substanzen zu den übrigen Nischenbewohnern aussehen könnte.

Bei einem Vorversuch hatte sich gezeigt, dass Pityriacitrin bei *Candida albicans* einen Lichtschutz ausübt, aber auch dass den gefundenen Pigmentbestandteilen eine antibiotische Wirkung zu gesprochen werden kann (Mayser 1999). Diese könnte für *Malassezia furfur* Vorteile in der gemeinsamen ökologischen Nische gegenüber Bakterien oder anderen Mikroorganismen ergeben. *Malassezia furfur* reagiert auf UV-Strahlung empfindlicher als die anderen Hautkeime wie *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* oder *Candida albicans* (Faergemann 1987). Eine vermehrte Empfindlichkeit von *Malassezia furfur* im Vergleich zu *Candida albicans* bei UVB-Licht-Bestrahlung kann durch die stattgefundenen Versuche nicht bestätigt werden. Möglich ist, dass bei den Versuchen von Faergemann 1987 nicht *Malassezia furfur* vorlag. Die neue jetzt übliche Taxonomie der *Malassezia*-Spezies erfolgte ja erst nach Genom-Analysen im Jahr 1996 durch Guého.

Zur Überprüfung wurde *Candida albicans* einmal mit und einmal ohne Pityriacitrin inokuliert und verschiedenen UVB-Dosen ausgesetzt. Ab einer UVB-Dosis von $1\text{J}/\text{cm}^2$ wuchsen die Pilze ohne Pityriacitrin nicht mehr, wohingegen bei jenen mit Pityriacitrin kein wachstumshemmender Effekt der UVB-Bestrahlung festgestellt werden konnte.

Im Plattendiffusionstest mit *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* konnte keine Toxizität von Pityriacitrin aufgedeckt werden. Darauf aufbauend wurden die *Staphylokokken* ausgestrichen, mit verschiedenen Konzentrationen von Pityriacitrin überimpft und anschließend zusammen mit unbehandelten Zellen einer UVB-Bestrahlung ausgesetzt. Es zeigt sich, dass bei den Platten ohne Pityriacitrin aber mit Bestrahlung nur sehr schlechtes oder fast kein Wachstum der *Staphylokokken* zu sehen ist. Bei Bestrahlung zeigen sich bei

den Platten, die zusätzlich mit Pityriacitrin präpariert wurden, deutliche Unterschiede im Vergleich zu denen ohne die Substanz. Es ist mehr Wachstum zu sehen.

Zur Testung einer UVB-Filterwirkung wurden Quarzküvetten mit *Staphylokokken* in Flüssigmedium mit und ohne Pityriacitrin einmalig UVB-Strahlung ausgesetzt und inkubiert. Die Bakterien mit Pityriacitrin zeigten fast gleich gutes Wachstum wie die unbestrahlte Kontrolle. Pityriacitrin kann als UV-Filter bei *Candida albicans* und *Staphylokokken* wirken und zeigt keine Toxizität.

Ein Feuchtigkeitsstau auf der Haut wirkt prädisponierend für viele Hauterkrankungen und daraus resultiert auch eine Veränderung der kutanen Mikroflora. Deswegen stellt sich die Frage nach der Interaktion der Mikroorganismen. Faergemann zufolge beeinflussen sich *Staphylococcus epidermidis* und *Malassezia furfur* zumindest nicht gegenseitig in der Adhärenz an *stratum corneum* Zellen (Faergemann 1983). Es kann keine Konkurrenz bei der Inkubation festgestellt werden (Bond 1985). Eine Inhibition von Pilzen durch *Staphylokokken* ist nicht bekannt (Ryall 1981). Faergemann beschreibt eine Wachstumshemmung von *Pityrosporum orbiculare* gegenüber *S. aureus*, *S. epidermidis* und *Ps. aeruginosa*, besonders nach UVA-Bestrahlung, was auf einen phototoxischen Effekt auf diese Mikroorganismen schließen lässt (Faergemann 1988).

Malassezia furfur benötigt Kulturmedien mit langkettigen Fettsäuren (Ingham 1993), welche als essentielles Substrat auf menschlicher Haut ebenfalls enthalten sind (Nenoff, Reinl, Haustein 2001). Der Gehalt an freien Fettsäuren auf der Haut von Tinea versicolor Erkrankten zeigt quantitative Veränderungen, die dem Metabolismus von *Malassezia spp.* zugesprochen werden (Burke 1962). Marples Studie von 1972 zeigt, dass *Malassezia* Hefen unter normalen Bedingungen nur in geringem Maße und bei einer niedrigen Dichte von *Corynebacterium acnes* zur Bildung von freien Fettsäuren auf der Haut beitragen. Die Lipidquellen der Haut können aufgrund ihrer hohen Trägheit gegenüber Veränderungen als Pathogeneseursache eher in den Hintergrund treten (Downing 1969). In talgdrüsenreichen Arealen sind vermehrt freie Fettsäuren zu finden. Dies lässt den Rückschluß auf vermehrte bakterielle Lipolyse zu. Diese freien Fettsäuren dienen als Nahrung für *Malassezia furfur*. Es sind keine Erkenntnisse über Konkurrenzverhalten von *Malassezia furfur*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* oder *epidermidis* hinsichtlich des Lipidstoffwechsels bekannt. Es hat sich herausgestellt, dass Pityriacitrin sowohl für die eine als auch die andere Bakterien-Spezies als UV-Filter dienen kann. Da keine Toxizität des Pityriacitrins gegen *Candida albicans* und *Staphylokokken* festgestellt werden konnte, lässt dies möglicherweise den Schluß zu, dass der Sekundärmetabolismus von *Malassezia furfur in vivo* auch einen positiven Einfluß auf die

übrige Mikroflora haben könnte. Ein Zuviel an Aminosäuren hemmt das Wachstum von Bakterien (Noble 1992). Wie schon ausgeführt, kann aus dem Tryptophanabbau für *Malassezia furfur* eine Reduktion von ROS resultieren. Diese Syntheseleistung bedingt auch einen Schutz von Bakterien vor einem Zuviel an der Aminosäure Tryptophan, so dass die Hefe dadurch indirekt Bakterien schützen könnte. Es scheint so, dass die Mikroorganismen sich zu gemischten Mikrokolonien in den äußeren Schichten des *stratum corneum* in Nischen zusammen finden, in denen der Wärme- und Gashaushalt der Mikroatmosphäre und der Nahrungsgehalt der Oberflächenemulsion günstig sind. Aufgrund der Haut und Schleimhaut als mechanische Barriere, der Interaktion der Mikroflora, der zellulären Immunität sowie humoralen Abwehrmechanismen spielt sich ein mikrobielles Gleichgewicht ein, das ein weiteres Abwehrsystem gegen von außen eindringende Pathogene darstellt (Singh 1971). Andererseits wird eine unmittelbare topographische Kolonisation zusammen von *Malassezia*-Spezies mit Bakterien nicht beobachtet (Wolff 1976). Es ist eine große Menge an Inhibitoren bekannt, die von Mikroorganismen der Haut produziert werden. Sie reichen von niedermolekularen Stoffwechselendprodukten bis zu großen komplexen Proteinmolekülen wie Bakteriozine. Diese Metaboliten dienen den Mikroorganismen nicht nur zum einen dazu, sich gegeneinander im Konkurrenzkampf in der gemeinsamen ökologischen Nische zu behaupten (wie z. B. eine vermutete Inhibition von Dermatophyten durch Lipolyseprodukte *Malassezia furfur*, Weary 1968), sondern zum anderen wird angenommen, dass sie gegen die oben erwähnten Pathogene wirken (wie z. B. von *Staphylokokken* abgesonderte Lysozyme) (Noble 1992). Als bekanntester antibiotischer Effekt ist natürlich die Produktion des Penizillin durch die Schimmelpilze *Penicillium notatum* und *Penicillium chrysogenum* zu nennen (Pschyrembel 1998). Toxische Effekte könnten zum Beispiel die Gruppe der Pityriarubine ausüben, die eine schwach antibiotische Wirkung auf grampositive Bakterien haben (Irlinger 2004). Auch bei Bakterien ist die Produktion antibiotisch wirksamer Substanzen bekannt, wie z. B. von *Staphylokokken* gegen andere gram-positive Bakterien (Noble 1992).

Vermutungen zur Folge ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Pigment keine Anpassung an die menschliche Hautflora, sondern viel älter. Wahrscheinlich liegt der Ursprung bei Pflanzenpathogenen, den sog. Brandpilzen (Ustilaginomycetes). *Malassezia furfur* gehört genetisch zu dieser Spezies und wird zu der Unterklasse der Exobasidiomycetidae gezählt. Brandpilze sind eine Klasse der Basidienpilze (Basidiomycota). Es handelt sich bei den Ustilaginomycetes um obligate Parasitenpilze auf Pflanzen, vor allen Dingen auf Gräsern

(Wikipedia 2006 nach Dörfelt 1989). Deren Evolution begann mit Entwicklung der Grassteppen vor etwas 50 Millionen Jahren. Die Verbreitung von Brandpilzen geschieht sonst durch Wind aber auch durch Insekten, da die Brandpilze besonders die Blütenstände befallen (Wikipedia 2006 nach Dörfelt 1989). Während der Übersiedelung des Urmenschen aus dem Urwald in die Grassteppen, ist *Malassezia furfur* möglicherweise auf den Menschen übergewechselt, da er dort auch ein gutes Milieu fand. Untersuchungen zeigen, dass *Ustilago maydis*, genetisch sehr eng verwandt, auch zur Pigmentsynthese und der damit verbundenen Produktion von Pityriacitrin befähigt ist. Nach dem derzeitigen Stand können etwa fünfzig Hefe-Spezies benannt werden, die über diesen Syntheseweg die gleichen oder sehr ähnliche Pigmente und Indolderivate bilden (Mayser 2005). Damit haben die von *Malassezia furfur* synthetisierten Stoffe vermutlich wenig Auswirkung an die kutane Mikroflora, da sie in völlig anderen Zusammenhang entstanden sind. Des Weiteren führt der beschriebene Stoffwechselweg nicht zur vollständigen Erklärung der Pathogenese der Pityriasis versicolor alba, doch sollte das Pityriacitrin nicht als Pathogenitätsfaktor ausgeschlossen werden. Ob Pityriacitrin noch andere, bisher nicht festgestellte Wirkungen auf die Hautflora haben könnte, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Zahlreiche Produkte des tryptophanabhängigen Metabolismus von *Malassezia furfur* haben klinische und pharmakologische Besonderheiten (Wille 2001, Mayser 2003, Irlinger 2005). Eine dieser Substanzen, Malassezin, ist ein Aktivator des Aryl Hydrocarbon-Rezeptors und induziert Apoptosis in angezüchteten menschlichen Melanozyten (Krämer 2005b). Dies könnte eine Erklärung zur Pathogenese der Depigmentierung der Pityriasis versicolor alba liefern. Aufgrund einer möglichen Interaktion von Malassezin mit dem AHR Rezeptor und den daraus resultierenden Veränderungen von Keratinozyten könnte auch die charakteristische Schuppung der Pityriasis versicolor weiter geklärt werden (Baroni 2004, Chen 2004).

Es sind noch weitere Studien zum dem weit gefächerten Mikrokosmos der Hautflora zu machen, um die fein regulierten Mechanismen dieses Ökosystems zu ergründen. Wenn mehr über die Interaktion der Mikroorganismen auf der Haut bekannt wird, könnte dieses Wissen neue Therapiemöglichkeiten eröffnen, vielleicht auf Grundlage von gentechnisch veränderten Mikroorganismen. Bei der Interaktion von Mikroorganismen und deren Adhärenzprozessen sind für Zahnmediziner Untersuchungen interessant, die im Tierversuch die Möglichkeit zeigen, *Streptococcus mutans* als Ursache kariesfördernder Säuren an der Anheftung zu hindern (Noble 1992).

Zum einem kennt man zum Beispiel die DNA-Sequenz der epidermiolytischen Toxine, die von manchen *Staphylococcus aureus*-Stämmen produziert werden, nicht aber, warum

besonders die Haut von atopischen Dermatitis Patienten zahlreich mit diesen Bakterien besiedelt ist (Noble 1992). Hemmeffekte oder Stimulanzen auf die Hautflora müssen besonders im Hinblick auf den immer größer werdenden Einsatz von oralen und topischen Zubereitungen berücksichtigt werden, um deren Wirkung auf unsere wichtigen "mikrobiellen Gäste" zu kennen.

Zusammenfassend lassen sich die eingangs gestellten Fragen dahingehend beantworten:

1. Wie ist der Einfluß des Tryptophangehaltes auf die Lichtschutzfähigkeit von *M. furfur*? Der endogenen Pityriacitrinproduktion ist eine Grenze gesetzt ist (30mmol), darüber hinaus zeigen sich toxische Effekte. Der pigmentbildende Stoffwechselweg dient daher nicht nur allein der Ausbildung eines UV-Filters, sondern stellt zusätzlich einen Schutz vor übermäßigen und möglicherweise schädlichen Tryptophankonzentrationen dar.

2. Wie ist der Einfluß der Konzentration auf die Lichtschutzfähigkeit von *Pityriacitrin*? Es ist festzustellen, dass exogen zugeführtes Pityriacitrin in Abhängigkeit von der Konzentration die UV-Toleranz erhöht.

3. Wie ist der Einfluß von Pityriacitrin auf die kutane Mikroflora? Es können negative Effekte von Pityriacitrin auf die untersuchte humane Mikroflora ausgeschlossen werden können. Dies wurde anhand von Staphylokokken- und *Candida-albicans*-Stämmen gezeigt. Im Gegenteil dazu bewirkt dieses Stoffwechselprodukt des Hefepilzes *Malassezia furfur* einen UV-Schutz bei diesen Mikroorganismen, welches die Bedeutung dieser Verbindung als UV-Filter unterstreicht.

5. Zusammenfassung

Malassezia furfur gehört zur residenten Mikroflora der menschlichen Haut (Roberts 1969). Das Vorhandensein dieses obligat-lipophilen Pilzes ist aber auch mit der Erkrankung Pityriasis versicolor ("Kleienflechte") assoziiert (Eichstedt 1846). Eine Form dieser Hautmykose ist die Pityriasis versicolor alba, bei der sich Depigmentierungen der Haut zeigen, auf denen sich trotz UV-Provokation kaum ein Sonnenbrand ausbildet (Lewis 1936). Ein von *Malassezia furfur* gebildeter potenter UV-Filter konnte bereits vorgestellt werden (Mayser 2002). Jetzt wurde *in vitro* die Frage untersucht, welche Bedeutung der Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolismus von *Malassezia furfur* und die damit verbundene Produktion des Pityriacitrins für die Hefe selbst und auch für andere der Hautflora zugehörige Mikroorganismen haben könnte; ob Pityriacitrin toxisch wirkt und sich *Malassezia furfur* somit einen Vorteil in der gemeinsamen ökologischen Nische erarbeiten könnte oder ob es auch bei *Candida albicans* oder *Staphylokokken* UV-protektiv wirken könnte.

Vorliegende Ergebnisse zeigen, dass bei *Malassezia furfur* eine vermehrte Anreicherung mit Tryptophan im Nährmedium nicht zu einem beliebig steuerbarem UV-Schutz führt. Selbst geringe Mengen an Tryptophan gewährleisten die Ausbildung eines UV-Filters, was in Anlehnung an die möglicherweise auf der Haut vorhandenen Tryptophankonzentrationen zu sehen ist.

Eine Steigerung der Konzentration von exogen zugeführtem Pityriacitrin führt bei bestrahlten Zellen zu vermehrter UV-Toleranz. Ab $\sim 11\text{mmol}$ ist *Malassezia furfur* schon bei hohen UVB-Dosen ausreichend geschützt, ab ca 13mmol sogar so gut, dass keine nennenswerten Wachstumseinbußen zu erkennen sind.

Zur Überprüfung der Wirkung auf andere Mikroorganismen wurde *Candida albicans* einmal mit (11mmol) und einmal ohne Pityriacitrin auf Kimmigagar inokuliert, verschiedenen UVB-Dosen ($0,100, 500, 1000, 1500, 2000\text{mJ}/\text{cm}^2$) ausgesetzt und inkubiert. Ab einer UVB-Dosis von $1\text{J}/\text{cm}^2$ wuchsen die Pilze ohne Pityriacitrin nicht mehr, wohingegen bei jenen mit Pityriacitrin kein wachstumshemmender Effekt der UVB-Bestrahlung zu verzeichnen war.

Im Plattendiffusionstest mit *Staphylococcus aureus* und *epidermidis* konnte keine Toxizität von Pityriacitrin festgestellt werden. Darauf aufbauend wurden die *Staphylokokken* wieder auf Blutagarplatten ausgestrichen und eine Platte mit $10\mu\text{l}$ Pityriacitrin à 11mmol überimpft, eine mit $10\mu\text{l}$ Pityriacitrin à 22mmol , eine mit $10\mu\text{l}$ reinem DMSO und eine ohne Zusatz.

Die Platten mit Pityriacitrin und mit reinem DMSO wurden einer UVB-Bestrahlung von

1000mJ/ cm² ausgesetzt. Anschließend wurden die Platten inkubiert und nach 12, 24 und 48 Stunden visuell beurteilt. Es zeigte sich, dass bei den Platten mit reinem DSMO nur sehr schlechtes oder fast kein Wachstum der *Staphylokokken* erfolgte. Im Vergleich dazu waren bei den zusätzlich mit Pityriacitrin präparierten Platten deutliche Unterschiede zu verzeichnen: es war mehr Wachstum zu sehen.

Zur Testung einer UVB-Filterwirkung wurden Quarzküvetten mit *Staphylokokken* in Flüssigmedium (BHI) mit und ohne Pityriacitrin (30µmol) einmalig 1000mJ/cm² UVB ausgesetzt und inkubiert. Die Bakterien mit Pityriacitrin zeigten ein etwa gleich gutes Wachstum wie die unbestrahlte Kontrolle.

Pityriacitrin kann als UV-Filter bei *Candida albicans* und *Staphylokokken* wirken und zeigt keine Toxizität.

Summary

While *Malassezia furfur* belongs to the resident microflora of human skin (Roberts 1969), its existence is also associated with the disease pityriasis versicolor (Eichstedt 1846). One form of this dermatomycosis is pityriasis versicolor alba which is characterized by depigmented areas on which sunburn can hardly be provoked (Lewis 1936). A potent UV filter produced by *Malassezia furfur* was previously described (Mayser 2002). Now an *in vitro* study was performed to determine the effect of pityriacitrin on *Malassezia furfur* itself and on other human skin microorganisms, whether pityriacitrin is toxic, so that *Malassezia furfur* could gain advantage in the common ecological niche, or whether is it also a UV filter for *Candida albicans* or *staphylococci*.

More tryptophan in media does not automatically lead to better UV protection. Even few concentrations of tryptophan ensure the production of a UV filter, which might be correlated with the concentration on human skin.

More pityriacitrin means more UV tolerance of radiated cells. From ~ 11mmol upwards, *Malassezia furfur* is protected even against high UVB doses; at a concentration of 13mmol there is nearly no growth reduction after radiation.

For testing the effect on other microorganisms, *Candida albicans* was inoculated either with (11mmol) or without pityriacitrin on plates with Kimmig agar. After irradiation with single doses of 100, 500, 1000, 1500 or 2000mJ/ cm² UVB these plates were incubated. From a

UVB dose of 1J/ cm² upwards the fungi without pityriacitrin did not grow any longer, while those with pityriacitrin showed no growth reduction caused by UVB radiation.

In a diffusion test on blood agar with *staphylococcus aureus* and *epidermidis* no toxicity of pityriacitrin was ascertained. Thereafter *staphylococci* were inoculated either with 10µl pityriacitrin (11mmol/ DMSO), 10µl pityriacitrin (22mmol/ DMSO), pure DMSO, or without any addition. The plates with pityriacitrin and those with pure DMSO were irradiated with a single UVB dose of 1000mJ/ cm². Then they were incubated and visually assessed after 12, 24 and 48 hours. The plates with pure DMSO showed very poor staphylococcal growth or none at all. By comparison, on the plates inoculated with pityriacitrin there was a remarkable difference in that more growth had occurred.

For further testing of a UVB filter effect *staphylococci* were inoculated in quartz cuvettes in BHI medium, either with (30µmol) or without pityriacitrin, followed by irradiation with a single UVB dose of 1000mJ/ cm² and incubation. The bacteria with pityriacitrin showed nearly the same growth rate as the unexposed cells.

Pityriacitrin has a UV filter effect on *Candida albicans* and *staphylococci* and shows no toxicity.

6. Literaturverzeichnis

- Ahtonen, P., Lehtonen, O.P., Kero, P., Tunnela, E., Havu, V.: *Malassezia furfur*: Colonization of neonates in an intensive care unit. *Mycoses* 33: 543-547, 1990
- Allen, H.B., Charles, C.R., Johnson, B.L.: Hyperpigmented tinea versicolor. *Arch. Derm.* 112: 1110-1112, 1976
- Aspiroz, C. *et al.*: Isolation of *Malassezia globosa* and *m. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. *Mycopathologica* 154(3): 111-117, 2002
- Babu, V., Joshi, P.C.: Tryptophan as an endogenous photosensitizer to elicit harmful effects of ultraviolet B. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 29 (3): 296-8, 1992
- Bäck, O., Faergemann, J., Hornquist, R.: *Pityrosporum* folliculitis: a common disease of the young and middle aged. *J. Am. Acad. Dermatol.* 12: 56-61, 1985
- Barnes, W.G., Sauer, G.C., Arnold, J.D.: Scanning electron microscopy of tinea versicolor organism (*Malassezia furfur* = *Pityrosporum orbiculare*?) *Arch. Derm.* 107: 392-394, 1973
- Baroni, A., Perfetto, B., Paoletti, I., Ruocco, E., Canozo, N., Orlando, M., Buommino, E.: *Malassezia furfur* invasiveness in a keratinocyte cell line (HaCat): effects on cytoskeleton and on adhesion molecule and cytokine expression. *Arch Dermatol Res* 293:414-419, 2004
- Bechet, P.: Vitiligo? Tinea versicolor? *Arch. Dermat. & Syph.* 32: 960, 1935
- Bergbrant, I.M., Faergemann, J.: Adhärenz von *Malassezia furfur* an Stratum corneum-Zellen *in vitro*: eine Studie an gesunden Personen und Patienten mit seborrhoischem Ekzem. *Mycoses* 37: 217-219, 1994
- Bergbrant, I.M.: Seborrhoic dermatitis and *Pityrosporum ovale*: cultural, immunological and clinical studies. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* 167, 1991
- Blumenthal, H.: Tinea versicolor of the penis. *Arch. Derm.* 103: 461-462, 1971
- Boardman, C.R., Malkinson, F.D.: Tinea versicolor in steroid treated patients. *Arch. Derm.* 85: 44-52, 1962
- Boekhout, T., Bosboom, R.W.: Karyotyping of *Malassezia* yeasts: Taxonomic and epidemiological implications. *System. Appl. Microbiol.* 17: 146-153, 1994

- Bojanovsky, A., Bohnert, E., Jung, E.G.: *Pityrosporum orbiculare*: Erreger verschiedener klinischer Bilder und Model einer Depigmentierungsart. Akt. Derm. 5: 19-25, 1979
- Bojanovsky, A., Lischka, G.: *Pityrosporum orbiculare* bei akneiformen Eruptionen. Hautarzt 28: 409-411, 1977
- Bond, R., LLOYD, D.H.: Factors affecting the adherence of *Malassezia pachydermatis* to canine corneocytes in vitro. Veterinary Dermatology 7: 49-56, 1996
- Borelli, D., Jacobs, P.H., Nall, L.: Tinea versicolor: epidemiological, clinical and therapeutic aspects. J. Am. Acad. Dermatol. 25: 300-305, 1991
- Borgers, M. *et al.*: Pityriasis versicolor and *Pityrosporum ovale*. Int. J. Derm. 26, No.9: 586-589, 1987
- Breathnach, A.S., Nazzaro-Porro, M., Passi, S.: Azelaic acid. Br. J. Derm. 111: 115-120, 1984
- Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie. Berlin: Walter de Gruyter Verlag, 1989
- Burke, R.C.: Investigations in tinea versicolor: Lipid and aminoacid studies. Yale J. Biol. Med. 35: 206-221, 1962/63
- Burke, R.C.: Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infections in human beings. J. Invest. Derm. 36: 389-401, 1961
- Butenandt, A., Biekert, E., Linzen, B.: Über Ommochrome VII. Mitteilung. Modellversuche zur Bildung des Xanthommatins in vivo. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 305: 284-289, 1956
- Canizares, O., Shatin, H., Kellert, A.J.: Cushings syndrome and dermatomycosis. Arch. Derm. 80: 705-709, 1959
- Chatterji, A.: Observation on dopa reaction in the lesions of pityriasis versicolor. Indian J. Derm. 17: 4, 93-95, 1972
- Chen, T.A., Halliwell, R.E.W., Shaw, D.J., Hill, P.B.: Assessment of the ability of *Malassezia pachydermatis* to stimulate proliferation of canine keratinocytes in vitro. Am J Vet Res 65:787-796, 2004
- Chetty, G.N., Kamalam, A., Thambiah, A.S.: Pityriasis versicolor - a study of 200 cases in a tropical skin clinic. Mykosen 22: 234-246, 1979
- Cockell, C. S., Knowland, J.: Ultraviolet radiation screening compounds. Biol. Rev. 74: 311-345, 1999

- Cockell, C. S.: Biological effects of High Ultraviolet radiation on Early Earth- a theoretical Evaluation. *J. theor. Biol.* 193: 717-729, 1998a
- Cockell, C. S.: Ultraviolet radiation, evolution and the π - electron system. *Biol. J. Linnean Soc.* 63: 449-457, 1998b
- Cockell, C. S.: The ultraviolet radiation environment of earth and mars: past and present. In: *Astrobiology – The Quest for the conditions of life.* Hornek, G., Baumstark-Khan, C., eds. New York: Springer, 2002
- Crespo Erchiga, V. *et al.*: *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. *Br. J. Derm.* 143: 799-803, 2000
- Cunningham, A.C., Ingham, E., Gowland, G.: Humoral responses to *Malassezia furfur* serovars A,B, and C in normal individuals of various ages. *Br. J. Derm.* 127: 476-481, 1992
- Cunningham, A.C., Leeming, J.P., Ingham, E., Gowland, G.: Differentiation of three serovars of *M. furfur*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 439-446, 1990
- Dahl, M.V.: *Staphylococcus aureus* and atopic dermatitis. *Arch. Derm.* 119: 840-846, 1983
- De Almeida, Jr. Hiram, Mayser, P.: Absence of sunburn in lesions of pityriasis versicolor alba. *Mycoses* 49: 516, 2006
- De Luca, C., Picardo, M., Breathnach, A., Passi, S.: Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor. *Exp. Dermatol* 5 (1): 49-56, 1996
- Dörfelt, H.: *Lexikon der Mykologie.* Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, 1989 zitiert durch Wikipedia 2006
- Dorn, M., Roehnert, K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Derm.* 69: 244-248, 1977
- Dotz, W.I.: Tinea versicolor: a light and electron microscopic study of hyperpigmented skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 12: 37-44, 1985
- Downing, D.T., Strauss, J.S., Pochi, P.E.: Variability in the chemical composition of human skin surface lipids. *J. Invest. Derm.* 53: 322-327, 1969
- Dummer, R.: Die Schattenseiten der Sonne. In: *Die Haut, in der wir leben.* Burg, G., Geiges, M. L. Zürich: R&R Sachbuchverlag, 2001

- El-Gothamy, Z., Abdel-Fattah, A., Ghaly, A. F.: Tinea versicolor hypopigmentation: histochemical und therapeutic studies. *Int. J. Dermatol.* 14 (7): 510-5, 1975
- El-Gothamy, Z.: Amino acid metabolism of *Malassezia furfur*. *Annls Parasitol. Hum. Comp.* 56: 359-361, 1981
- El-Hefnawi, H., El-Gothamy, Z., Refai, M.: Studies on pityriasis versicolor in Egypt. I-III. *Mykosen* 14: 483-490, 1971
- Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Adherence of *Pityrosporum orbiculare* to human stratum corneum cells. *Arch. Derm. Res.* 275: 246-250, 1983
- Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Growth and filament production of *Pityrosporum orbiculare* and *Pityrosporum ovale* on human stratum corneum in vitro. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)* 63: 388-392, 1983
- Faergemann, J., Aly, R., Maibach, H.I.: Quantitative Variations in Distribution of *Pityrosporum orbiculare* on clinically normal skin. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)* 63: 346-348, 1983
- Faergemann, J., Fredriksson, T.: Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. *Acta Derm. Venereol.* 60: 531-33, 1980
- Faergemann, J., Fredriksson, T.: Experimental infections in rabbits and humans with *Pityrosporum orbiculare* and *P. ovale*. *J. Invest. Derm.* 77: 314-318, 1981
- Faergemann, J., Larkö, O.: The effect of UV-light on human skin microorganisms. *Acta Derm. Venereol.* 67: 69-72, 1987
- Faergemann, J., Larkö, O.: Phototoxicity of skin microorganisms tested with a new model. *Arch. Dermatol. Res.* 280: 168-170, 1988
- Faergemann, J., Tjernlund, U., Scheynius, A., Bernander, S.: Antigenic similarities and differences on the genus *Pityrosporum*. *J. Invest. Derm.* 78: 28-31, 1982
- Faergemann, J.: A new model for growth and filament production of *Pityrosporum ovale (orbiculare)* on human stratum corneum in vitro. *J. Invest. Derm.* 92: 117-119, 1989
- Faergemann, J.: Antibodies to *Pityrosporum orbiculare* in patients with tinea versicolor and controls of various ages. *J. Invest. Derm.* 80: 133-135, 1983
- Fegeler, K., Macher, E., Nolting, S.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Immunität bei der Infektion mit *Candida albicans*. *Mykosen* 21: 127-137, 177-189, 201-222, 1978

- Fox, H.: Pityriasis versicolor followed by apparent depigmentation. Arch. Derm. Syphilol. 15: 751-53, 1927
- Frey, H.P., Zieloff, K.: Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1993
- Galadari, I., el Komy, M., Mousa, A., Hashimoto, K., Mehregan, AH.: Tinea versicolor: histologic and ultrastructural investigation of pigmentary changes. Int. J. Dermatol. 31 (4): 253-6, 1992
- Garcia-Pichel, F. *et al.*: Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *gloeocapsa* sp. Appl. Environ. Microbiol. 59, No.1: 170-176, 1993
- Garcia-Pichel, F., Castenholz, RW: Occurrence of UV-absorbing mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. Appl. Environ. Microbiol. 59, No.1: 163-169, 1993
- Ghannoum, M. A. *et al.*: Adhärenzhemmung von *Candida albicans* an Mundschleimhaut-Epithelzellen durch Hefe-Glykolipide, Hefezellwand-Lipide und Epithelzell-Lipide. Mykosen 30, No. 8: 371-378, 1987
- Ghannoum, M. A. *et al.*: Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. Infect. Immunity 54, No. 1: 189-193, 1986
- Gordon, M.A.: Lipophilic yeast associated with tinea versicolor. J. Invest. Derm. 17: 267-272, 1951
- Grigoriu, D., Delacrétaz, J., Borelli, D.: Pityriasis versicolor. In: Lehrbuch der medizinischen Mykologie. Bern: Verlag Hans Huber: 177-186, 1984
- Gründer, K.: Mykosen der Haut. Medwelt 38: 1350-9, 1987
- Guého, E., Boekhout, T., Ashbee, H.R., Guillot, J., Van Belkum, A., Faergemann, J.: The role of the *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. Medical Mycology 36, Suppl.1: 220-229, 1998
- Guého, E., Meyer, S.A.: A re-evaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. Antonie van Leeuwenhoek 55: 245-251, 1989
- Guého, E., Midgley, G., Guillot, J.: The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 69 (1): 337-355, 1996

- Gupta, A. K. *et al.*: In vitro susceptibility of the seven *malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. Br. J. Derm. 142: 758-765, 2000
- Gupta, A. K., Bluhm, R., Summerbell, R.: Pityriasis versicolor. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 16 (1): 19-33, 2002
- Gupta, A. K., Batra R., Bluhm, R., Faergemann, J.: Pityriasis versicolor. Dermatol. Clin. 21: 413-429, 2003
- Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S., Ullmann, U.: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2005
- Hagler, A.N., Ahearn, D.G.: Rapid diazonium blue B test to detect basidiomycetous yeasts. Int. J. Syst. Bacteriol. 31: 204-208, 1981
- Hay, R.J., Roberts, S.O.B., Mackenzie, D.W.R.: Pityriasis versicolor. In: Textbook of Dermatology (Champion RH, Burton JL, Ebling FJG, eds) 6th edn., Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 1286-1290, 1998
- Hirai, A., Kano, R., Makimura, K., Duarte, E. R., Hamdan, J. S., Lachance, M.-A., Yamaguchi, H., Hasegawa, A.: *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 623-627, 2004
- Hof, H., Kretschmar, M.: Rationaler Einsatz von Antimykotika gegen Sproßpilzinfektionen. Immun. Infekt. 23: 209-215, 1995
- Hölzle, E.: Lichtschutz. In: Dermatologische Onkologie (Hrsg.: Garbe, C.). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1997
- Horner, W. E., Helbling, A., Salvaggio, J.E., Lehrer, S. B.: Fungal allergens. Clin. Microbiol. Rev. 8 (2): 161-179, 1995
- Irlinger, B., H.-J. Krämer, P. Mayser, W. Steglich: Pityriarubine, biologisch aktive Bisindolylspirane aus Kulturen der lipophilen Hefe *Malassezia furfur*. Angew. Chemie 116, issue 9: 1119-1121, 2004
- Irlinger, B., Bartsch, A., Krämer, H.-J., Mayser, P., Steglich, W.: New tryptophan metabolites from cultures of the lipophilic yeast *malassezia furfur*. ChemInform 36, issue 46, 2005
- Jeliffe, D.B., Jacobson, F.W.: The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. J. Trop. Med. Hyg. 57: 290-293, 1954

- Jung, E.G., Bohnert, E.: Mechanism of depigmentation on pityriasis versicolor alba (Pva). *Derm. Res.* 256: 333-334, 1976
- Karaoui, R., Bou-Resli, M., Al-Zaid, N.S., Mousa, A.: Tinea versicolor: Ultrastructural studies on hypopigmented and hyperpigmented skin. *Dermatologica* 162: 69-85, 1981
- Keddie, F.M.: Tinea versicolor, 1846-1900. A historical survey based on selections from the writings of the nineteenth century. In: *The diagnosis and treatment of fungal infections* (Hrsg.: H.M. Robinson jr.). Springfield: C.C. Thomas, 169-184, 1974
- Kindl, G.: Eingreifen bevor die Haut brennt. *Pharm. Ztg.* 21: 11-17, 2000
- Kistiakovsky, E.V.: Pityriasis versicolor and ultraviolet rays. *Arch. Derm. Syph.* 15: 685-689, 1927
- Krämer, H.J., Kessler, D., Hipler, U.C., Irlinger, B., Hort, W., Bodeker, R.H., Steglich, W., Mayser, P.: 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, 2005 (a)
- Krämer, H.J., Podobinska, M., Bartsch, A., Battmann, A., Thoma, W., Bernd, A., Kummer, W., Irlinger, B., Steglich, W., Mayser, P.: 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, 2005 (b)
- Lange, D. S. *et al*: Ketoconazole 2% shampoo in the treatment of tinea versicolor. *J. Am. Acad. Derm.* 39, No.6: 944-950, 1998
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., Brakhage, A.A.: Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 38 (2): 143-58, 2003
- Leeming, J.P., Holland, K.T., Bojar, R.A.: The in vitro antimicrobial effect of azelaic acid. *Br. J. Derm.* 115: 551-556, 1986.
- Lewis, G.M., Hopper, M.E.: Pseudoachromia of tinea versicolor. *Arch. Derm. Syph.* 34: 850-861, 1936
- Lewis, G.M.: Tinea versicolor (white). *Arch. Derm. Syph.* 31: 911-913, 1935

- Leyden, J., Nordstrom, K., McGinley, K.: Cutaneous Microbiology. Aus: Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin.. Edited bei L. Goldsmith. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1403-1424, 1991
- Leyden, J.L., Kligman, A.M.: Interdigital athlete's foot. Arch. Derm. 114: 1466-1472, 1978
- Liappis, N., Jäkel, A.: Über die Ausscheidung der freien Aminosäuren im menschlichen ekkrinen Schweiß. Arch. Derm. Res. 254: 185-203, 1975
- Liappis, N., Kochbeck, E., Eckhardt, G., Hahne, H., Kessler, K., Bantzer, P.: Aminosäurenverluste im menschlichen Schweiß. Arch. Derm. Res. 269: 311-323, 1980
- Lynfield, Y.L.: Skin diseases in twins. Arch. Derm. 110: 722-724, 1974
- Malassez, L.: Note sur le champignon de la pélade. Arch. Physiol. II, 1: 203-212, 1874
- Marples, R.R. *et al.*: *Staphylococcus aureus* in psoriasis. Arch. Derm. 107: 568-570, 1973
- Marples, R.R., Downing, D.T., Kligman, A.M.: Influence of *Pityrosporum* species in the generation of free fatty acids in human surface lipids. J. Invest. Derm. 58: 155-159, 1972
- Mayser, P., Gründer, K., Qadripur, S., Köhn, F.-M., Schill, W.B, de Hoog, GS.: Diagnostik, Klinik und Therapie der frühen Chromomykose an einem Fallbeispiel. Hautarzt 47: 693-701, 1996
- Mayser, P., Haze, P., Papavassilis, C., Pickel, M., Gründer, K., Guého E.: Differentiation of *Malassezia* spp. - selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *Malassezia furfur*. Br. J. Derm. 137: 208-213, 1997 (a)
- Mayser, P., Haze, P., Pickel, M.: Polidocanol sensitivity - a possible tool in the differentiation of *Malassezia* spp. Mycoses 40: 391-395, 1997 (b)
- Mayser, P., Imkampe, A., Winkeler, M., Papavassilis, C.: Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. Arch. Derm. Res. 290: 277-282, 1998 (a)
- Mayser, P., Pape, B.: Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophane derivatives. Antonie van Leeuwenhoek 73: 315-319, 1998 (b)
- Mayser, P., Pickel, M., Haze, P., Erdmann, F., Papavassilis, C., Schmidt, R.: Different utilization of neutral lipids by *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis*. J. Vet. Med. Mycol. 36: 7-14, 1998 (c)

- Mayser, P., Schäfer, U., Krämer, H.J., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityriacitrin - a ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. Arch. Derm. Res. 294: 131-134, 2002
- Mayser, P., Stapelkamp, H., Krämer, H.-J., Podobinska, M., Wallbott, W., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityrialactone - a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. Antonie van Leeuwenhoek 84: 185-191, 2003 (a)
- Mayser, P., Töws, A., Krämer, H.-J., Weiss, R.: Further characterization of pigment-producing *malassezia* strains. Mycoses 47 (1-2): 34-39, 2004
- Mayser, P., Wille, G., Imkamp, A., Thoma, W., Arnold, N., Monsees, T.: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophane as single nitrogen source. Mycoses 41: 265-271, 1998 (d)
- Mayser, P.: Habilitation, Universität Gießen, 1999
- Mayser, P.: Spaghetti mit Fleischklößchen und Hobelspanphänomene. *Malassezia*-Hefen – neue Erreger, Diagnostik und Therapie. ÄP Dermatologie 3: 36-37, 2003 (b)
- Mayser, P.: Tryptophan-dependent metabolites of *Malassezia furfur*: From chemistry to skin disease. Mycoses 48 (Suppl.2): 17-18, 2005
- Mc Ginley, K.J., Lantis, L.R., Marples, R.R.: Microbiology of tinea versicolor. Arch. Derm. 102:168-171, 1970
- Mc Ginley, K.J., Leyden, L.J., Marples, R.R., Kligman, A.M.: Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff and seborrhoeic dermatitis. J. Invest. Derm. 64: 401-405, 1975
- Mc Menamy, R.H., Oncley, J.L.: The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. J. Biol. Chem. 233: 1436-47, 1958
- Midgley, G.: Comparison of *Pityrosporum* (*Malassezia*) isolates by morphology and immunoelectrophoresis. Br. J. Derm. 113: 783-784, 1985
- Mittag, H.: Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. Mycoses 38: 13-21, 1995
- Mittag, H.: Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. I. Size and shape of the yeast cells and a consideration of their ploidy. Mycoses 37: 393-399, 1994

Mulkidjanian, A. Y., Cherepanov, D. A., Galperin, M. Y.: Survival of the fittest before the beginning of life: selection of the first oligonucleotide-like polymers by UV light. *BMC Evol. Biol.* 3: 12, 2003

Nagao, Tomokazu; Adachi, Kyoko; Nishida, Fumiko; Nishishima, Miyuki; Mochida, Kenichi. (Kaiyo biotechnology Laboratory K. K., Japan). The new ultraviolet ray absorbing material and its manufacturing method. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (1999), 6pp. CODEN: JKXXAF JP 11269175 A2 19991005 Heisei

Nakabayashi, A., Sei, Y., Guillot, J.: Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Medical Mycology* 38: 337-341, 2000

Nazzaro Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Mercantini, R.: Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J. Invest. Derm.* 69: 531-534, 1977

Nazzaro Porro, M., Passi, S., Caprilli, F., Nazzaro, P., Morpurgo, G.: Growth requirement and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. *J. Invest. Derm.* 66: 178-82, 1976

Nazzaro Porro, M., Passi, S.: Identification of tyrosinase inhibitors in cultures of *Pityrosporum*. *J. Invest. Derm.* 71: 205-208, 1978

Nazzaro Porro, M., Passi, S., Picardo, M., Mercantini, R., Breathnach, A. S.: Lipoxygenase activity of *Pityrosporum* in vitro and in vivo. *J. Invest. Derm.* 87: 108-112, 1986

Nenoff, P., Reinl, P., Haustein, U.-F.: Der Hefepilz *Malassezia*, Erreger, Pathogenese und Therapie. *Hautarzt* 52: 73-86, 2001

Noble, W. C.: The Skin microflora and microbial skin disease. Cambridge: Cambridge University Press, 1992

Ollert, M. *et al.*: Pathomechanismen bei Infektionen mit *Candida albicans*. *Hautarzt* 39: 498-503, 1988

Parisis, N., Stratigos, J., Marcelou-Kinti, U., Capetanakis, J.: Pityriasis versicolor in Griechenland und ihre Prädispositionsfaktoren. *Hautarzt* 28: 589-592, 1977

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, Hrsg.: C. Zink, 258. Aufl. Berlin: deGruyter Verlag, 1998

- Ray, T. L., Digre, K. B., Payne, C. D.: Adherence of *Candida* species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: Correlation with cutaneous pathogenicity. *J. Invest. Derm.* 83: 37-41, 1984
- Rettberg, P., Rothschild, L. J.: Ultraviolet radiation in planetary atmospheres and biological implications. In: *Astrobiology – The Quest for the conditions of life*. Hornek, G., Baumstark-Khan, C., eds. New York: Springer, 2002
- Roberts, S.O.B.: Pityriasis versicolor: A clinical and mycological investigation. *Br. J. Derm.* 81: 315-326, 1969
- Roberts, S.O.B.: *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. *Br. J. Derm.* 81: 264-269, 1969
- Robins, E.J., Breathnach, A.S., Bennet, D., Picardo, M., Passi, S., Nazzaro-Porro, M.: Ultrastructural observations on the effect of azelaic acid on normal human melanocytes and human melanoma cell line in tissue culture. *Br. J. Derm.* 113: 687-697, 1985
- Roed-Petersen, J.: Tinea versicolor and body lotions. *Acta Derm. Venereol.* 60: 439-440, 1980
- Rothman, S., Smiljanic, A.M., Murphy, J.C.: The nitrogenous material on normal human skin surface. *J. Invest. Derm.* 13: 317-318, 1949
- Rothman, S., Sullivan, M. B.: Amino-acids on the normal human skin surface. *J. Invest. Derm.* 13: 317-318, 1949
- Rozema, J. *et al.*: The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems – an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J. Photochem. Photobiol.*, B 66 (1): 2-12, 2002
- Ruete, A.E.: Pityriasis versicolor. In: *Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten* (Hrsg: Jadassohn, J.) Berlin: Springer Verlag, 11. Band, 696-710, 1928
- Ruete, A.E.: Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor. *Derm. Wochenschr.* 96: 333-6, 1933
- Rünger, T.M.: UV-Licht und Kanzerogenese. In: *Dermatologische Onkologie*. Garbe, C. (Hrsg.), Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1997
- Ryall, C., Holt, G. & Noble, W.C.: Interactions between dermatophyte fungi and Staphylococci or Brevibacterium *in vitro*. *J. Invest. Derm.* 76: 21-23, 1981

- Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kühl, M., Hoegh-Guldberg, O.: Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408: 850-3, 2000
- Scheynius, A., Faergemann, J., Forsum, U., Sjöberg, O.: Phenotypic characterisation in situ of inflammatory cells in pityriasis (tinea) versicolor. *Acta Derm. Venereol.* 64: 473-479, 1984
- Seeliger, H.P.R., Heymer, T.: *Malassezia furfur* (Robin 1853) Baillon 1889. In: Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt. Stuttgart, New York: Thieme, 78-81, 1981
- Singh, G., Marples, R.R., Kligman, A.M.: Experimental *staphylococcus aureus* infections in humans. *J. Invest. Derm.* 57, 149-162, 1971
- Smith, E.B., Gellerman, G.L.: Tinea versicolor in infancy. *Arch. Derm.* 93:362-363, 1966
- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., Ghanem, G.: Hypopigmentation agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res.* 19: 550-571, 2006
- Sohnle, P.G., Collins-Lech, C.: Activation of complement by *Pityrosporum orbiculare*. *J. Invest. Derm.* 80: 93-97, 1983
- Sohnle, P.G., Collins-Lech, C.: Relative antigenicity of *Pityrosporum orbiculare* and *Candida albicans*. *J. Invest. Derm.* 75: 279-283, 1980
- Somerville, D.A.: The normal flora of the skin in different age groups. *Brit. J. Derm.* 81: 248-258, 1969
- Spier, H.W., Pascher, G.: Zur analytischen und funktionellen Physiologie der Hautoberfläche. *Hautarzt* 7: 55-60, 1956
- Sternberg, T.H., Keddie, F.M.: Immunofluorescence studies in tinea versicolor. *Arch. Derm.* 84: 999-1003, 1961
- Sugita, T., Takashima, M., Shinoda, T., Suto, H., Unno, T., Tsuboi, R., Ogawa, H., Nishikawa, A.: New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J. Clin. Microbiol.* 40 (4): 1363-1367, 2002
- Sugita, T., Takashima, M., Kodama, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A.: Description of a new yeast species, *M. japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* 41 (10): 4695-4699, 2003

- Sugita, T., Tajima, M., Takashima, M., Amaya, M., Saito, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A.: A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrhoeic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* 48 (8): 579-583, 2004
- Sugita, T., Tajima, M., Amaya, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A.: Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* 48 (10): 755-759, 2004
- Terragni, L., Lasagni, A., Oriani, A.: Pityriasis versicolor of the face. *Mycoses* 34: 345-347, 1991
- Thoma, W., Krämer, H.-J., Mayser, P.: Pityriasis versicolor alba. *J. Eur. Acad. Derm. Venerol.* 19 (2): 147-152, 2005
- Van der Vleuten, C. J. M., Kroot, E.J.A., de Jong, E. M. G. J., van de Kerkhof, P. C. M.: The immunochemical effects of a single challenge with an intermediate dose of ultraviolet B on normal human skin. *Arch. Derm. Res.* 288: 510-516, 1996
- Walsh, G. *et al.*: Immunoglobulin E anti- *Staphylococcus aureus* antibodies in atopic patients. *J. Clin. Microbiol.* 13: 1046-1048, 1981
- Weary, P.E., Graham, G.F.: A simple medium for continuous subculture of *Pityrosporum orbiculare*. *J. Invest. Derm.* 47: 55-57, 1966
- Weary, P.E.: *Pityrosporum ovale*: Observations on some aspects of host-parasite interrelationship. *Arch. Derm.* 98: 408-422, 1968
- Weiss, R., Raabe, P., Mayser, P.: Sprosspilze der Gattung *Malassezia*: Taxonomische Einteilung und Bedeutung aus (veterinär-)medizinischer Sicht. *Mycoses* 43 (Suppl.1): 69-72, 2000
- Wertheim, L.: Über Lichtwirkung und Leukoderma bei Pityriasis versicolor. *Derm. Zeitschr.* 38: 343-354, 1928
- Wikler, J.R., Janssen, N., Bruynzeel, D.P., Nieboer, C.: The effect of UV-light on *Pityrosporum* yeasts: Ultrastructural changes and inhibition of growth. *Acta Derm. Venereol.* 70: 69-71, 1990
- Wille, G., Mayser, P., Thoma, W.: Malassezin – A novel agonist of arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9: 955-960, 2001

Wise, F., Sulzberger, M. B.: The yearbook of dermatology and syphilology. Chicago: Year Book Publishers Inc., p. 29, 1932

Wolff, H.H., Plewig, G.: Ultrastruktur der Mikroflora in Follikeln und Komedonen. *Hautarzt* 27: 432-440, 1976

Wroblewski, N., Bär, S., Mayser, P.: Missing granulocytic infiltrate in pityriasis versicolor – indication of specific anti-inflammatory activity of the pathogen? *Mycoses*, 48: 66, 2005

Wyre, H.W., Johnson, W.T.: Neonatal pityriasis versicolor. *Arch. Derm.* 117: 752-753, 1981

Yarrow, D., Ahearn, D.G.: *Malassezia* Baillon. In: The yeasts: A taxonomic study (Kreger van Rij NJW, ed), 3rd edn. Amsterdam: North Holland Publishing Company. 882-5, 1984

Yoshimura, M. *et al.*: Antimicrobial effects of phototherapy and photochemotherapy *in vivo* and *in vitro*. *Br. J. Derm.* 135: 528-532, 1996

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pityriasis versicolor.

Abbildung 2: Pityriasis versicolor alba.

Abbildung 3: *Malassezia furfur* unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Abbildung 4: *Malassezia furfur* auf Agar mit verschiedenem Gehalt an Tryptophan nach 7 Tagen Inkubation

Abbildung 5: Pityriacitrinmolekül

Abbildung 6: Absorptionsspektrum von Pityriacitrin

Abbildung 7: Einzelne Übernachtskulturen von *Staphylococcus epidermidis* zum Auszählen für die Keimzahlbestimmung

Abbildung 8: *Staphylococcus aureus* auf Blutagar als Übernachtskultur nach Beimpfen mit Pityriacitrin und/ oder DMSO

Abbildung 9: 1878 auf Agar mit 5x verschiedenem Gehalt an Tryptophan nach 7 Tagen Inkubation

Abbildung 10: 1878 nach Bestrahlung mit UVB-Licht nach 7 Tagen Inkubation

Abbildung 11: 1878 nach UVB-Bestrahlung nach 7 Tagen Inkubation mit zehn verschiedenen Konzentrationen an Pityriacitrin

Abbildung 12: Schema der Pityriacitrinkonzentrationen auf der Agarplatte

Abbildung 13: *Candida albicans* auf Kimmigagar nach 5 Tagen Inkubation

Abbildung 14: *Candida albicans* nach Bestrahlung mit UVB-Licht nach 7 Tagen Inkubation mit und ohne Pityriacitrin (11mmol)

Abbildung 15: Links *Staphylococcus aureus*, rechts *Staphylococcus epidermidis* auf Blutagar nach 2 Tagen Inkubation

Abbildung 16: Plattendiffusionstest mit Staphylokokken und Pityriacitrin nach einem Tag

Abbildung 17: *Staphylococcus epidermidis* nach 24h Inkubation

Abbildung 18: *Staphylococcus aureus* nach 24h Inkubation

8. Rohdaten

von 2.4.: Eichkurve *Malassezia furfur*:

| Millionen Zellen | Versuch 1 (mg) | Versuch 2 (mg) | Versuch 3 (mg) | Mittelwert | SD |
|------------------|----------------|----------------|----------------|------------|------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0,49 | 0,53 | 0,56 | 0,53 | 0,04 |
| 50 | 0,97 | 0,89 | 0,96 | 0,94 | 0,04 |
| 100 | 2,12 | 2,24 | 2,29 | 2,22 | 0,09 |
| 150 | 3,08 | 3,15 | 3,20 | 3,14 | 0,06 |
| 200 | 4,38 | 4,29 | 4,35 | 4,34 | 0,05 |
| 250 | 5,16 | 5,26 | 5,28 | 5,23 | 0,06 |
| 300 | 6,61 | 6,79 | 6,83 | 6,74 | 0,12 |
| 350 | 7,93 | 7,88 | 8,02 | 7,94 | 0,07 |
| 400 | 8,69 | 8,73 | 8,78 | 8,73 | 0,05 |
| 450 | 9,64 | 9,59 | 9,63 | 9,62 | 0,03 |
| 500 | 10,45 | 10,11 | 10,23 | 10,26 | 0,17 |

von 2.4.: Eichkurve *Candida albicans*:

| Millionen Zellen | Versuch 1 (mg) | Versuch 2 (mg) | Versuch 3 (mg) | Mittelwert | SD |
|------------------|----------------|----------------|----------------|------------|------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0,91 | 0,73 | 0,84 | 0,83 | 0,09 |
| 50 | 1,39 | 1,25 | 1,44 | 1,36 | 0,10 |
| 100 | 2,63 | 2,54 | 2,88 | 2,68 | 0,18 |
| 150 | 4,45 | 4,37 | 4,36 | 4,39 | 0,05 |
| 200 | 5,40 | 5,65 | 5,50 | 5,52 | 0,13 |
| 250 | 6,65 | 6,74 | 6,59 | 6,66 | 0,08 |

von 2.4.: Eichkurve *Staphylococcus aureus*:

| | Versuch 1 | Versuch 2 | Versuch 3 | Mittelwert | SD |
|-------------|---|---|---|---|--------|
| | Extinktion ΔE | Extinktion ΔE | Extinktion ΔE | Extinktion ΔE | |
| 0 μ l | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 25 μ l | 0,0016 | 0,0035 | 0,0040 | 0,0030 | 0,0013 |
| 50 μ l | 0,0034 | 0,0069 | 0,0059 | 0,0054 | 0,0018 |
| 75 μ l | 0,0068 | 0,0089 | 0,0088 | 0,0082 | 0,0012 |
| 100 μ l | 0,0085 | 0,0115 | 0,0127 | 0,0109 | 0,0022 |
| 125 μ l | 0,0105 | 0,0136 | 0,0145 | 0,0129 | 0,0021 |
| 150 μ l | 0,0129 | 0,0154 | 0,0175 | 0,0153 | 0,0023 |
| 175 μ l | 0,0149 | 0,0173 | 0,0201 | 0,0174 | 0,0026 |
| 200 μ l | 0,0169 | 0,0204 | 0,0246 | 0,0206 | 0,0039 |

| | | | | | |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 250µl | 0,0206 | 0,0241 | 0,0267 | 0,0238 | 0,0031 |
| 300µl | 0,0236 | 0,0287 | 0,0324 | 0,0282 | 0,0044 |
| 350µl | 0,0281 | 0,0335 | 0,0386 | 0,0334 | 0,0053 |
| 400µl | 0,0330 | 0,0389 | 0,0405 | 0,0375 | 0,0040 |
| 450µl | 0,0398 | 0,0423 | 0,0443 | 0,0421 | 0,0023 |
| 500µl | 0,0477 | 0,0496 | 0,0504 | 0,0492 | 0,0014 |

von 2.4.: Eichkurve *Staphylococcus epidermidis*:

| | Versuch 1 | Versuch 2 | Versuch 3 | Mittelwert | SD |
|-------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|
| | Extinktion ΔE | Extinktion ΔE | Extinktion ΔE | Extinktion ΔE | |
| 0µl | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 25µl | 0,0026 | 0,0040 | 0,0016 | 0,0027 | 0,0012 |
| 50µl | 0,0061 | 0,0069 | 0,0080 | 0,0070 | 0,0010 |
| 75µl | 0,0095 | 0,0103 | 0,0123 | 0,0107 | 0,0014 |
| 100µl | 0,0118 | 0,0134 | 0,0165 | 0,0139 | 0,0024 |
| 125µl | 0,0160 | 0,0158 | 0,0197 | 0,0172 | 0,0022 |
| 150µl | 0,0178 | 0,0186 | 0,0238 | 0,0201 | 0,0033 |
| 175µl | 0,0209 | 0,0217 | 0,0273 | 0,0233 | 0,0035 |
| 200µl | 0,0260 | 0,0259 | 0,0302 | 0,0274 | 0,0025 |
| 250µl | 0,0297 | 0,0311 | 0,0324 | 0,0311 | 0,0014 |
| 300µl | 0,0362 | 0,0378 | 0,0410 | 0,0383 | 0,0024 |
| 350µl | 0,0420 | 0,0435 | 0,0474 | 0,0443 | 0,0028 |
| 400µl | 0,0489 | 0,0502 | 0,0536 | 0,0509 | 0,0024 |
| 450µl | 0,0546 | 0,0578 | 0,0597 | 0,0574 | 0,0026 |
| 500µl | 0,0581 | 0,0654 | 0,0693 | 0,0643 | 0,0057 |

von 3.1.: Tryptophanabhängige Lichtschutzfähigkeit

| 0mmol Tryptophan | | | | | |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|------------|------|
| UVB-Dosis in mJ/ cm ² | Versuch 1 (mg) | Versuch 2 (mg) | Versuch 3 (mg) | Mittelwert | SD |
| 0 | 6,83 | 7,31 | 6,94 | 7,03 | 0,26 |
| 500 | 4,11 | 1,29 | 1,82 | 2,40 | 1,50 |
| 1000 | 1,14 | 0,00 | 2,38 | 1,17 | 1,19 |
| 1500 | 0,96 | 1,97 | 1,84 | 1,26 | 0,50 |
| 2000 | 1,64 | 0,85 | 0,32 | 0,94 | 0,67 |
| 5mmol Tryptophan | | | | | |
| UVB-Dosis in mJ/ cm ² | Versuch 1 (mg) | Versuch 2 (mg) | Versuch 3 (mg) | Mittelwert | SD |
| 0 | 6,93 | 7,80 | 6,57 | 7,10 | 0,63 |
| 500 | 5,20 | 2,67 | 3,81 | 3,89 | 1,26 |
| 1000 | 4,36 | 1,38 | 3,49 | 3,08 | 1,53 |
| 1500 | 2,66 | 0,00 | 2,53 | 1,73 | 1,50 |
| 2000 | 0,68 | 0,93 | 1,96 | 1,19 | 0,68 |

| 15mmol Tryptophan | | | | | |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|------------|------|
| UVB-Dosis in mJ/ cm ² | Versuch 1 (mg) | Versuch 2 (mg) | Versuch 3 (mg) | Mittelwert | SD |
| 0 | 6,67 | 7,50 | 7,88 | 7,35 | 0,62 |
| 500 | 5,88 | 5,02 | 4,86 | 5,25 | 0,55 |
| 1000 | 3,72 | 1,77 | 3,65 | 3,05 | 1,11 |
| 1500 | 3,75 | 1,17 | 4,04 | 2,99 | 1,58 |
| 2000 | 0,82 | 1,59 | 2,00 | 1,47 | 0,60 |
| 30mmol Tryptophan | | | | | |
| UVB-Dosis in mJ/ cm ² | Versuch 1 (mg) | Versuch 2 (mg) | Versuch 3 (mg) | Mittelwert | SD |
| 0 | 6,18 | 6,63 | 6,94 | 6,58 | 0,38 |
| 500 | 3,55 | 5,18 | 6,19 | 4,97 | 1,33 |
| 3,80 | 4,95 | 3,80 | 4,66 | 4,47 | 0,60 |
| 1500 | 3,06 | 4,59 | 4,83 | 4,16 | 0,97 |
| 2000 | 1,66 | 3,12 | 3,97 | 2,92 | 1,17 |
| 50mmol Tryptophan | | | | | |
| UVB-Dosis in mJ/ cm ² | Versuch 1 (mg) | Versuch 2 (mg) | Versuch 3 (mg) | Mittelwert | SD |
| 0 | 7,05 | 9,17 | 7,29 | 7,84 | 1,16 |
| 500 | 3,88 | 4,94 | 4,21 | 4,34 | 0,54 |
| 1000 | 2,04 | 3,52 | 4,23 | 3,26 | 1,12 |
| 1500 | 1,42 | 2,29 | 3,21 | 2,31 | 0,90 |
| 2000 | 1,23 | 1,58 | 2,08 | 1,63 | 0,42 |

von 3.2.: Konzentrationsabhängigkeit des Lichtschutzeffektes

| UVB-Dosis in mJ/ cm ² | 0mJ | 100mJ | 500mJ | 1000mJ | 1500mJ | 2000mJ |
|----------------------------------|------|-------|-------|--------|--------|--------|
| Gewicht in mg | | | | | | |
| Versuch 1 | 5,18 | 4,00 | 0,87 | 0,00 | 1,13 | 0,00 |
| Versuch 2 | 6,23 | 4,74 | 2,75 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 3 | 5,23 | 3,88 | 0,93 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | | | |
| Mittelwert 0,0µg/ µl | 5,55 | 4,21 | 1,52 | 0,00 | 0,38 | 0,00 |
| Standardabweichung | 0,59 | 0,47 | 1,07 | 0,00 | 0,65 | 0,00 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 5,77 | 3,96 | 0,40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 2 | 6,40 | 5,01 | 3,48 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 3 | 5,45 | 4,05 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | | | |
| Mittelwert 0,1µg/ µl | 5,87 | 4,34 | 1,52 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Standardabweichung | 0,48 | 0,58 | 1,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 5,43 | 5,80 | 2,31 | 1,09 | 1,28 | 0,00 |
| Versuch 2 | 5,99 | 5,85 | 3,35 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 3 | 5,76 | 5,18 | 1,83 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

| | | | | | | |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | | | |
| Mittelwert 0,5µg/ µl | 5,73 | 5,61 | 2,50 | 0,36 | 0,43 | 0,00 |
| Standardabweichung | 0,28 | 0,37 | 0,78 | 0,63 | 0,74 | 0,00 |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 6,08 | 4,92 | 1,69 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 2 | 6,07 | 5,38 | 3,02 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 3 | 5,18 | 5,07 | 1,95 | 0,98 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | | | |
| Mittelwert 1,0µg/ µl | 5,78 | 5,12 | 2,22 | 0,33 | 0,00 | 0,00 |
| Standardabweichung | 0,52 | 0,23 | 0,70 | 0,57 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 6,85 | 4,75 | 1,79 | 1,07 | 0,62 | 1,51 |
| Versuch 2 | 6,33 | 5,77 | 3,97 | 3,55 | 3,33 | 1,12 |
| Versuch 3 | 5,34 | 4,98 | 1,88 | 1,13 | 0,58 | 0,00 |
| | | | | | | |
| Mittelwert 1,5µg/ µl | 6,17 | 5,17 | 2,55 | 1,92 | 1,51 | 0,88 |
| Standardabweichung | 0,77 | 0,54 | 1,23 | 1,41 | 1,58 | 0,78 |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 5,93 | 4,46 | 4,01 | 1,53 | 2,54 | 1,23 |
| Versuch 2 | 6,45 | 5,63 | 5,18 | 3,97 | 3,86 | 2,61 |
| Versuch 3 | 4,97 | 4,63 | 3,47 | 1,79 | 2,11 | 0,97 |
| | | | | | | |
| Mittelwert 2,0µg/ µl | 5,78 | 4,91 | 4,22 | 2,43 | 2,84 | 1,60 |
| Standardabweichung | 0,75 | 0,63 | 0,87 | 1,34 | 0,91 | 0,88 |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 5,01 | 4,97 | 3,57 | 3,87 | 3,33 | 0,00 |
| Versuch 2 | 6,17 | 5,69 | 4,70 | 4,86 | 4,45 | 3,72 |
| Versuch 3 | 5,72 | 5,11 | 3,65 | 3,56 | 3,28 | 2,16 |
| | | | | | | |
| Mittelwert 2,5µg/ µl | 5,63 | 5,26 | 3,97 | 4,10 | 3,69 | 1,96 |
| Standardabweichung | 0,58 | 0,38 | 0,63 | 0,68 | 0,66 | 1,87 |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 5,36 | 4,59 | 3,90 | 3,84 | 3,42 | 2,17 |
| Versuch 2 | 6,32 | 5,27 | 5,28 | 5,35 | 5,72 | 4,76 |
| Versuch 3 | 6,01 | 5,04 | 4,18 | 3,77 | 3,56 | 2,74 |
| | | | | | | |
| Mittelwert 3,0µg/ µl | 5,90 | 4,97 | 4,45 | 4,32 | 4,23 | 3,22 |
| Standardabweichung | 0,49 | 0,35 | 0,73 | 0,89 | 1,29 | 1,36 |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 6,03 | 5,92 | 4,97 | 5,05 | 3,59 | 3,64 |
| Versuch 2 | 6,58 | 5,26 | 6,31 | 6,19 | 5,74 | 5,84 |
| Versuch 3 | 5,27 | 5,36 | 4,72 | 4,83 | 4,07 | 3,70 |

| | | | | | | |
|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|------|
| | | | | | | |
| Mittelwert 3,5µg/ µl | 5,96 | 5,51 | 5,00 | 5,36 | 4,47 | 4,39 |
| Standardabweichung | 0,66 | 0,36 | 0,30 | 0,73 | 1,13 | 1,25 |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 5,93 | 5,50 | 4,79 | 4,80 | 4,53 | 4,30 |
| Versuch 2 | 6,19 | 4,97 | 5,97 | 6,32 | 6,17 | 5,56 |
| Versuch 3 | 5,41 | 5,72 | 5,03 | 5,10 | 5,56 | 5,02 |
| | | | | | | |
| Mittelwert 4,0µg/ µl | 5,84 | 5,40 | 5,26 | 5,41 | 5,42 | 4,96 |
| Standardabweichung | 0,40 | 0,39 | 0,62 | 0,81 | 0,83 | 0,63 |
| Unbestrahlte Kontrolle | 1. 6,05 | 2. 5,92 | 3. 5,73 | MW 5,90 | SD 0,16 | |

von 3.3.: Lichtschutzpotenz von Pityriacitrin bei *Candida albicans*

| UVB-Dosis in mJ/ cm ² | 0mJ | 100mJ | 500mJ | 1000mJ | 1500mJ | 2000mJ |
|----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------|
| Gewicht in mg | | | | | | |
| Versuch 1 | 2,67 | 2,32 | 2,72 | 2,36 | 2,50 | 2,73 |
| Versuch 2 | 2,20 | 2,06 | 2,23 | 2,47 | 2,39 | 2,28 |
| Versuch 3 | 2,03 | 2,05 | 2,30 | 2,56 | 2,54 | 2,38 |
| Versuch 4 | 2,48 | 2,45 | 2,70 | 2,64 | 2,65 | 2,59 |
| Versuch 5 | 2,89 | 2,93 | 3,26 | 3,04 | 2,99 | 3,24 |
| | | | | | | |
| mit Pityriacitrin | | | | | | |
| Mittelwert | 2,45 | 2,36 | 2,64 | 2,61 | 2,61 | 2,64 |
| Standardabweichung | 0,35 | 0,36 | 0,41 | 0,26 | 0,23 | 0,38 |
| | | | | | | |
| Versuch 1 | 2,11 | 1,55 | 0,13 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 2 | 2,32 | 1,98 | 0,43 | 0,30 | 0,23 | 0,00 |
| Versuch 3 | 2,16 | 1,36 | 0,49 | 0,28 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 4 | 2,26 | 2,04 | 0,74 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Versuch 5 | 3,19 | 2,18 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | | | | | | |
| ohne Pityriacitrin | | | | | | |
| Mittelwert | 2,41 | 1,82 | 0,36 | 0,12 | 0,05 | 0,00 |
| Standardabweichung | 0,44 | 0,35 | 0,29 | 0,16 | 0,10 | 0,00 |
| Kontrolle | 1. 2,10 | 2. 2,96 | 3. 3,07 | 4. 2,72 | 5. 3,56 | MW 2,88 SD 0,53 |

von 3.4.: Lichtschutzpotenz von Pityriacitrin bei *Staphylococcus epidermidis*

| | Versuch 1 Extinktion ΔE | Versuch 2 Extinktion ΔE | Versuch 3 Extinktion ΔE | Mittelwert Extinktion ΔE | SD |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------|
| Küvette 1 0h | 0,0197 | 0,0265 | 0,0189 | 0,0217 | 0,0042 |
| Küvette 2 0h | 0,0169 | 0,0302 | 0,0205 | 0,0225 | 0,0069 |
| Küvette 3 0h | 0,0484 | 0,0410 | 0,0389 | 0,0428 | 0,0050 |
| Küvette 4 0h | 0,0183 | 0,0287 | 0,0231 | 0,0234 | 0,0052 |
| Küvette 5 0h | 0,0189 | 0,0322 | 0,0246 | 0,0252 | 0,0067 |
| Küvette 6 0h | 0,0469 | 0,0409 | 0,0368 | 0,0415 | 0,0051 |
| | | | | | |
| Küvette 1 8h | 0,0632 | 0,1814 | 0,3870 | 0,2105 | 0,1639 |
| Küvette 2 8h | 0,0650 | 0,1692 | 0,3793 | 0,2045 | 0,1601 |
| Küvette 3 8h | 0,0763 | 0,1846 | 0,3678 | 0,2096 | 0,1473 |
| Küvette 4 8h | 0,0265 | 0,0416 | 0,1032 | 0,0571 | 0,0406 |
| Küvette 5 8h | 0,0216 | 0,0896 | 0,1142 | 0,0751 | 0,0480 |
| Küvette 6 8h | 0,0745 | 0,1348 | 0,3478 | 0,1857 | 0,1436 |
| | | | | | |
| Küvette1 24h | 0,5865 | 0,7783 | 0,7436 | 0,7028 | 0,1022 |
| Küvette2 24h | 0,5987 | 0,7024 | 0,7265 | 0,6759 | 0,0679 |
| Küvette3 24h | 0,6056 | 0,7103 | 0,7362 | 0,6840 | 0,0691 |
| Küvette4 24h | 0,1583 | 0,2069 | 0,3596 | 0,2401 | 0,1068 |
| Küvette5 24h | 0,1677 | 0,2154 | 0,4035 | 0,2622 | 0,1247 |
| Küvette6 24h | 0,5489 | 0,6033 | 0,6897 | 0,6140 | 0,0710 |
| | | | | | |
| Küvette1 32h | 0,9087 | 1,0456 | 0,9362 | 0,9635 | 0,0724 |
| Küvette2 32h | 0,9164 | 0,9521 | 1,1358 | 1,0014 | 0,1177 |
| Küvette3 32h | 1,0035 | 0,9566 | 1,1463 | 1,0355 | 0,0988 |
| Küvette4 32h | 0,5214 | 0,5583 | 0,6427 | 0,5841 | 0,0508 |
| Küvette5 32h | 0,5396 | 0,5475 | 0,6218 | 0,5696 | 0,0454 |
| Küvette6 32h | 0,8493 | 0,8660 | 0,8041 | 0,8398 | 0,0320 |

Lichtschutzpotenz von Pityriacitrin bei *Staphylococcus aureus*:

| | Versuch 1 Extinktion ΔE | Versuch 2 Extinktion ΔE | Versuch 3 Extinktion ΔE | Mittelwert Extinktion ΔE | SD |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------|
| Küvette 1 0h | 0,0265 | 0,0187 | 0,0408 | 0,0287 | 0,0112 |
| Küvette 2 0h | 0,0259 | 0,0179 | 0,0393 | 0,0277 | 0,0108 |
| Küvette 3 0h | 0,0482 | 0,0376 | 0,0486 | 0,0448 | 0,0062 |
| Küvette 4 0h | 0,0228 | 0,0236 | 0,0388 | 0,0284 | 0,0090 |
| Küvette 5 0h | 0,0286 | 0,0201 | 0,0412 | 0,0300 | 0,0106 |
| Küvette 6 0h | 0,0502 | 0,0416 | 0,0483 | 0,0467 | 0,0045 |
| | | | | | |
| Küvette 1 8h | 0,0948 | 0,2320 | 0,2188 | 0,1819 | 0,0757 |
| Küvette 2 8h | 0,0901 | 0,2280 | 0,2219 | 0,1800 | 0,0779 |
| Küvette 3 8h | 0,1135 | 0,2310 | 0,2380 | 0,1942 | 0,0699 |

| | | | | | |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Küvette 4 8h | 0,0650 | 0,1643 | 0,1036 | 0,1110 | 0,0501 |
| Küvette 5 8h | 0,0670 | 0,1763 | 0,1005 | 0,1146 | 0,0560 |
| Küvette 6 8h | 0,1037 | 0,2174 | 0,2058 | 0,1756 | 0,0626 |
| | | | | | |
| Küvette1 24h | 0,6616 | 0,6736 | 0,8661 | 0,7338 | 0,1148 |
| Küvette2 24h | 0,6351 | 0,6464 | 0,8247 | 0,7021 | 0,1064 |
| Küvette3 24h | 0,6760 | 0,6582 | 0,8089 | 0,7144 | 0,0824 |
| Küvette4 24h | 0,3365 | 0,3035 | 0,3469 | 0,3290 | 0,0227 |
| Küvette5 24h | 0,3401 | 0,3347 | 0,3378 | 0,3375 | 0,0027 |
| Küvette6 24h | 0,6284 | 0,6999 | 0,6488 | 0,6577 | 0,0375 |
| | | | | | |
| Küvette1 32h | 0,9402 | 1,0603 | 1,0368 | 1,0124 | 0,0636 |
| Küvette2 32h | 1,0092 | 0,9458 | 1,1431 | 1,0327 | 0,1007 |
| Küvette3 32h | 0,9478 | 0,9322 | 1,0063 | 0,9621 | 0,0391 |
| Küvette4 32h | 0,4548 | 0,4079 | 0,4538 | 0,4388 | 0,0268 |
| Küvette5 32h | 0,3989 | 0,4264 | 0,5362 | 0,4538 | 0,0726 |
| Küvette6 32h | 0,8287 | 0,8414 | 0,8074 | 0,8258 | 0,0172 |

9. Herstellerverzeichnis

Ameisensäure, Merck, Darmstadt, Germany

Arginin, Sigma, Steinheim, Germany

Autoklav Typ 23, Melag, Berlin, Germany

Bacto Ochsengalle, Becton, Le Pont de Claix, France

BHI, Hirn-Herz-Bouillon, Merck, Darmstadt, Germany

Blutagar, Fa. Oxoid, Basingstoke, England

Chloramphenicol, Merck, Darmstadt, Germany

Cycloheximid, Calbiochem, Tochtergesellschaft von Merck, Darmstadt, Germany

D(+)-Glucose, Merck, Darmstadt, Germany

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Steinheim, Germany

Dixonagarpulver, Merck, Darmstadt, Germany

Ethylacetat, Merck, Darmstadt, Germany

Ethylformiat, Merck, Darmstadt, Germany

Fraktionensammler Super Frac, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden

Glassäule mit Filter, Fa. Peuffer, Hannover, Germany

Glycerin, Merck, Darmstadt, Germany

Halb-Mikrowaage, Firma Sartorius Modell R 180 D -*D1, Fa. Sartorius, Göttingen, Germany,

Heizblock Techne DRI-Block DB 3, Techne, Wertheim, Germany

Kieselgel Pharmacia, Uppsala, Schweden

Kimmigagar Merckoplate, Merck, Darmstadt, Germany

Kunststoffpetrischalen Ø10cm, greiner-bioone, Kremsmünster, Austria

Kunststoffpetrischalen Ø3cm, Becton Dickinson, Le pont de Claix, France

Laminar-air-flow Arbeitsbank, Uniflow UUUB 1200, Biohazard, geliefert von Uniequip, Martinsried, Germany

LiChrospher-RP8 Säule (30x250mm), Merck, Darmstadt, Germany

Linomat IV, Camag, Berlin, Germany

L-Tryptophan, Fluka, Buchs, Swisse

Lyovac GT2, Leybold-Heraeus, Hanau, Germany

Malzextrakt, Merck, Darmstadt, Germany

Methanol, Merck, Darmstadt, Germany

Na₂SO₄, Fluka Chemie AG, Buchs, Swisse

Natriumchlorid (0,9%), Braun, Melsungen, Germany

Olivenöl, aus der Apotheke kaltsterilisiert

Pepton, Merck, Darmstadt, Germany

Pipettenspitzen gelb & blau, Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Pumpe M305 & M302, Gilson, Villiers le Bel, France

Pürierstab, Quelle, Fürth, Germany

Reagenzglas 75x12mmØ, Assistent, Hannover, Germany

Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Swisse

Rotationsverdampfer Typ VVI, Heidolph-Elektro KG, Kelheim, Germany

Spektralphotometer DU 640, Beckmann Instruments, Fullerton, USA

Toluol, Merck, Darmstadt, Germany

Tween 40, Sigma, Steinheim, Germany

Tween 80 ultra, Sigma, Steinheim, Germany

UVB-Gerät UV 800, Fa. Waldmann, Villingen-Schwenningen, Germany ausgestattet mit
Philips Ultraviolett20W/ 12 Glühlampen

UV-Detektor Holochrome, Gilson, Villiers le Bel, France

Zentrifuge Rotana RP, Rotor 154mm Radius, Fa. Hettich, Tuttlingen, Germany

Statistiksoftware „STATISTICA“ (StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

Danksagung

Die Jahre lassen unsere Haut welken,
aber die Unfähigkeit zur
Begeisterung läßt die Seele welken.

Samuel Ullmann

Mein besonderer und ganz herzlicher Dank gilt Professor Dr. med. Peter Mayser. Ich danke ihm für die Geduld, die hervorragende Betreuung und sein Engagement.

Mein Dank geht auch an Professor Dr. med. Andreas Sziegoleit, der mir durch seine Unterstützung die Untersuchungen für einen Teil dieser Arbeit möglich gemacht hat.

Ich danke auch sehr PD Dr. Hans-Joachim Krämer, der durch seine Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Ulla Förste danke ich ganz besonders für die immer freundliche Hilfe bei Fragen rund um die Versuche und Labortechnik.

Für die statische Auswertung bedanke ich mich bei der Firma Dr. Buhck, Mayer, Schöps in Krefeld, für weitere Hilfestellung in Statistikfragen bei Dr. Wolfgang Papst, Arbeitsgruppe Statistik des Instituts für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität.

Ich danke allen Mitdoktoranden für die gegenseitige Unterstützung und Anleitung.

Vor allem danke ich meiner Familie und allen Freunden, auf deren Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

Lebenslauf

Name: Angelika Machowinski

Geburtsdatum: 11.09.1976
Geburtsort: 57537 Wissen

Anschrift: Schloßmannstr. 9
 40225 Düsseldorf

Email-Adresse: AMachowinski@gmx.de

Schulischer und beruflicher Werdegang:

- Sommer 1982 – Sommer 1986:
Grundschule Wissen
- August 1986 – Sommer 1988:
Gemeinsame Orientierungsstufe für Gymnasium und Realschule
- August 1988 – Juni 1995:
Gymnasium Wissen
- 20.06.1995:
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
- 01.10.1995 – 22.06.2001:
Studium der Zahnheilkunde an der JLU Gießen
- 22.06.2001:
Abschluß der zahnärztlichen Prüfung mit dem Gesamtergebnis: gut
- 03.07.2001:
Approbation
- seit August 2001:
Promotion bei Prof. Dr. med. Peter Mayser, Klinikum der JLU Gießen
- 01.07.03 – 28.02.05:
Assistenz Zahnärztin Mülheim/ Ruhr
- 01.03.05 – 30.09.05:
Assistenz Zahnärztin Düsseldorf
- seit 01.10.05:
selbständige Tätigkeit in eigener Praxis in Düsseldorf