Einfluss von Metaboliten aus dem Sekundärstoffwechsel von *Malassezia furfur* auf humane kultivierte Melanozyten.

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

vorgelegt von Monika Podobinska
aus Warschau

Gießen 2003

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD. Dr. med. Peter Mayser

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Sziegoleit

Tag der Disputation: 15.12.2003

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
2.	Krankheitsbild der Pityriasis versicolor	9
2.1	Klinisches Bild der Pityriasis versicolor	9
2.2	Manifestationsort	10
2.3	Manifestationsalter	11
2.4	Geschlechtspräferenz	11
2.5	Histologisches Bild der Pityriasis versicolor	11
2.6.	Melaninsynthese und Pigmentstörung	11
2.6.1	Rolle der Melanozyten in der Pigmentbildung	13
2.6.2	Pigmentsynthese	13
2.7	Immunologie der Pityriasis versicolor	16
2.8	Inzidenz	16
2.9	Kontagiosität	17
2.10	Prädispositionsfaktoren	17
2.11	Diagnose	17
2.12	Differentialdiagnose	19
2.13.	Therapie und Prognose	20
3.	Erreger der Pityriasis versicolor	21
3.1	Warum „*Malassezia furfur* “ ?	21
3.2	Epidemiologie von*Malassezia furfur*	21
3.3	Morphologie von *Malassezia furfur*	22
3.4	Pathomechanismen der Pityriasis versicolor	23
3.5	Problemstellung der vorliegenden Arbeit	24
4.	Materialien und Methoden	25
4.1	*Malassezia furf ur*	25
4.1.1	Stämme und Stammhaltung	25
4.1.1.1	Referenzstamm	25
4.1.1.2	Anzucht und Nährmedien	25

4.1.3	Bildung von Pigmenten und Fluorochromen	26
4.1.4	Kulturbedingungen	27
4.1.5	Pigmentgewinnung und Aufreinigung	27
4.1.6	Säulenchromatographie	28
4.1.7	Analytische und präparative Dünnschichtchromatographie	29
4.1.8	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	31
4.1.9	Weitere chemisch-analytische Methoden/Strukturaufklärung	32
4.2	Melanozytenkultur	33
4.2.1	Kulturverfahren	33
4.2.2	Gewinnung einer reinen Melanozytenkultur	34
4.2.3	Passagieren von Melanozyten	34
4.2.4	Einfrieren der Melanozyten	35
4.2.5	Auftauen von Melanozyten	35
4.2.6	Verwendete Kulturmedien	35
4.2.6.1	Melanozyten Medium nach Lerner	35
4.2.6.2	Kommerzielle Medien	36
4.2.6.2.1	Melanocyte Growth Medium M2	36
4.2.6.2.2	Melanocyte Growth Medium	37
4.2.6.2.3	Modifiziertes Melanocyte Growth Medium	38
4.2.7	Zusätze zu den Zellkulturmedien (Wachstumsfaktoren, Hormone, Vitamine)	38
4.3	Verwendete Methoden	41
4.3.1	Bestimmung der Zellzahl	41
4.3.2	Bestimmung der Vitalität	42
4.3.2.1	Trypan-Blau-Test	42
4.3.2.2	MTT-Test	43
4.3.3	Bestimmung der Proliferation (MTT-Test)	44
4.3.4	Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels FACS	44
4.3.5	Enzymatische Differenzierung der Apoptose durch Caspasen	46
4.3.6	„Höchst-Färbung“ (Färbung mit HOE 33342)	53
4.3.7	„Comet Assay“ (single cell gel elektrophoresis assay)	54
4.3.8	LDH-Freisetzung (Lactat-Dehydrogenase-Assay)	55

4.3.9	Reversibilität der Veränderungen	58
4.3.10	Einfluss des verwendeten Lösungsmittels DMSO auf die Parameter	58
4.3.11	Melaninbestimmung mittels Einbau von ^{14}C-(U) Tyrosin	59
4.3.12	Elektronenmikroskopie	60
4.3.13	Zytoskelettanfärbung mit Antikörpern	61
5.	Ergebnisse	63
5.1	Einfluss sekundärer Tryptophan-Metaboliten auf Melanozyten	63
5.2	Vitalität	73
5.3	Bestimmung der Proliferation (MTT-Test)	74
5.4	Differenzierung der Apoptose und Nekrose mittels FACScan	75
5.5	Enzymatische Differenzierung der Apoptose durch Caspasen	76
5.6	„Höchst-Färbung“ (Färbung mit HOE 33342)	77
5.7	„Comet Assay“ (single cell gel elektrophoresis assay)	79
5.8	LDH -Freisetzung (Lactat-Dehydrogenase-Assay)	80
5.9	Reversibilität der Veränderungen	80
5.10	Einfluss des verwendeten Lösungsmittels DMSO auf die Parameter	80
5.10.1	Vitalität mittels Trypan-Blau- und MTT- Tests	81
5.10.2	Proliferation mittels MTT- Tests	81
5.10.3	Apoptotische und nekrotische Wirkung mittels FACS	82
5.10.4	LDH-Freisetzung (Lactat-Dehydrogenase-Assay)	82
5.11	Melaninbestimmung mittels Einbau von ^{14}C-(U) Tyrosin	83
5.12	Elektronenmikroskopie	83
5.13	Zytoskelett-Anfärbung mit Antikörpern	85
5.14	Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	87
6.	Diskussion	91
7.	Zusammenfassung	100
8.	Verzeichnisse	103
8.1	Abbildungen	103
8.2	Abkürzungen	104
8.3	Fotos	106

8.4	Tabellen	107
8.5	Literatur	109
9.	Danksagung	122
10.	Ehrenwörtliche Erklärung	124
11.	Tabellarischer Lebenslauf	125

1. Einleitung

Pityriasis versicolor gehört zu den häufigsten superfiziellen Hautmykosen (60, 71). Sie tritt vermutlich nur beim Menschen auf, ist weltweit verbreitet und korreliert in ihrer Häufigkeit mit tropischen feuchtwarmen Bedingungen. Sie wurde zum ersten Mal 1801 von Wilan beschrieben und 1846 von Eichstedt als erregerbedingte Krankheit weiter spezifiziert.

1869 wurde die Entität international akzeptiert und in die lateinische, englische, französische, deutsche und italienische Sprache übernommen (90). In der englischen Literatur ist Pityriasis versicolor auch als „Tinea versicolor" bekannt (22), obwohl der Name den Erkrankungen durch Dermatophyten vorbehalten werden sollte (71).

Die Besonderheit von Pityriasis versicolor besteht in Pigmentstörungen der Haut, dabei treten sowohl hypo- als auch hyperpigmentierte Hautareale auf.

Sie finden sich sowohl in belichteten als auch unbelichteten Körperregionen und bedeuten für die Patienten oft ein großes Problem, vor allem kosmetischer Natur.

Zwar kommt es nach langzeitiger Behandlung zu Repigmentierungen, aber die Erkrankung ist bei empfänglichen Personen sehr rezidivfreudig. „Empfängliche" Personen sind Patienten, bei deren Erkrankung Prädispositionsfaktoren eine gewisse Rolle spielen.

Zwar sind die neuesten epidemiologischen Daten bekannt, das klinische, histologische und immunologische Bild wurde charakterisiert, jedoch bleibt die vor über 200 Jahren beschriebene Krankheit in ihrem Pathomechanismus unverstanden.

Die Unklarheiten bestehen vor allem bezüglich der charakteristischen Hautveränderungen.

So wurden als Erklärung für die Hyperpigmentierungen vergrößerte Melanosomen in solchen Hautläsionen gefunden (5), was auf eine verstärkte Melaninsynthese hindeuten könnte.

Widersprechend hierzu ist die Tatsache, das bei Vitiligo eine ähnliche Hyperpigmentierung auftritt. Diese Krankheit beruht aber auf einem autoimmunologisch induziertem völligen Untergang der Melanozyten, so dass eine verstärkte Melaninsynthese nicht möglich wäre (61). Es existieren noch mehrere Hypothesen zum Pathomechanismus der Pityriasis versicolor.

Sie werden in dieser Arbeit in Kapitel 3.4 („Pathomechanismen der Pityriasis versicolor"), ausführlicher beschrieben.

Wodurch jedoch die charakteristischen Symptome auf der Haut entstehen, ist bislang unbekannt.

Dieser Problematik gilt die vorliegende Promotionsschrift, die zur Klärung des Pathomechanismus der Pityriasis versicolor durch Untersuchungen an humanen Melanozyten beitragen möchte.

2. Krankheitsbild der Pityriasis versicolor

2.1 Klinisches Bild der Pityriasis versicolor

Die Pityriasis versicolor zählt zu den häufigsten superfiziellen Hefepilzmykosen der menschlichen Haut (60, 71).

Es gibt zwei Grundformen des Krankheitsbildes von Pityriasis versicolor (10, 71):

1) hyperpigmentierte Form von Pityriasis versicolor, bei der noch drei Unter-Formen unterschieden werden können:
- makulöse Form (auch erythematös bezeichnet, ggf. mit entzündlicher Komponente)
- perifollikuläre Form
- papulöse Form (seltener als die zwei oben genannten Formen)

2) hypopigmentierte Form von Pityriasis versicolor:
- Pityriasis versicolor alba (P.V. alba).

Die hyperpigmentierte Pityriasis versicolor wird durch multiple, runde, scharf begrenzte, fein kleieartig schuppende Maculae gekennzeichnet. Am Anfang der Erkrankung erscheinen die Maculae rötlich bis hellrosa und entstehen perifollikulär (perifollikuläre Form), mit der Zeit werden sie aber dunkler- milchkaffeefarbig bis dunkelbraun mit der Tendenz zu großflächiger Konfluenz (makulöse Form).
Bei der Pityriasis versicolor alba handelt es sich um scharf begrenzte, hellere Läsionen, die besonders bei Sonnenexposition sichtbar werden, die aber auch in nicht lichtexponierten Körperarealen entstehen (18).
Die hyperpigmentierten und hypopigmentierten Stadien können sowohl nebeneinander bestehen als auch sich ineinander umwandeln (4, 103, 121). Besonders deutlich wird das Phänomen bei UV-Belichtung (die hyperpigmentierten Läsionen werden zu den hypopigmentierten) und auf dunkler Haut, da hier die hypopigmentierten Regionen leicht sichtbar sind (80, 106).

Aus diesem Grunde wurde auch diese Krankheit **Pityriasis versicolor** benannt, wobei **versicolor** „Farbe wechselnd" bedeutet und das Farbphänomen des Krankheitsbildes beschreibt.

Am häufigsten ist die hyperpigmentierte Form.

Betroffene Patienten klagen vor allem über die ästhetische Beeinträchtigung der Haut, wobei die erythematöse, makulöse Form bei 33% der Patienten mit Juckreiz und Brennen, besonders beim Schwitzen, verbunden ist (22, 60, 71).

Foto 1: P.V. -die hyperpigmentierte Form

2.2 Manifestationsort

Bevorzugt werden die seborrhoischen Areale des oberen Körperstamms, auch aber bei Patienten in tropischem Klima Kapitillium, Gesicht (vor allem bei Kindern), Hals und die gut durchbluteten Beugen der großen Gelenke (14, 21, 22, 158). Es besteht auch die Möglichkeit des Befalls jeder anderen Körperregion wie zum Beispiel des männlichen Genitals, der Handinnenflächen oder der Fußsohlen (48, 60), die nicht über Talgdrüsen verfügen. Bei Befall dieser Regionen werden exogen applizierte Lipide als Ursache diskutiert (145).
Weitgehend nicht betroffen sind laut Literatur die Schleimhäute, Haare und Nägel, wobei allerdings *Malassezia*-Infektionen der Haare und Nägel schon beschrieben worden sind (102, 151).

2.3 Manifestationsalter

Am häufigsten tritt die Erkrankung bei Jugendlichen und jungen Menschen in der 2. und 3. Lebensdekade (27, 106, 115, 132, 164) auf. Seltene Manifestationen finden sich nach dem 60. (118) oder vor dem 10. Lebensjahr (54, 108, 117, 122, 153). Das Manifestationsalter wird durch die Veränderung der Hauptlipide in der Pubertätsphase erklärt (143).
Die seltenen Säuglingserkrankungen werden durch erhöhte Talgproduktion unter Einfluß der mütterlichen Hormone erklärt (80, 122, 174).

2.4 Geschlechtspräferenz

Dazu existieren in der Literatur widersprüchliche Meinungen. In (42, 48) wird eine Häufung bei Frauen beschrieben, während (27, 87, 126, 141, 143) eine bevorzugte Prävalenz bei Männern finden. Keine Geschlechtspräferenz der Erkrankung wird in (60, 106, 115) beschrieben.

2.5 Histologisches Bild der Pityriasis versicolor

Das histologische Bild betroffener Areale ist durch nur geringe morphologische Veränderungen gekennzeichnet (3), vor allem durch aufgelockerte oder kompakte Hyperkeratose, fakultativ Parakeratose, Akanthose und ein perivaskuläres lymphozytäres Infiltrat im oberen Korium (71).
Der Keim infiltriert das ganze Stratum corneum und dringt zwischen den Korneozyten, jedoch nicht in lebende Schichten der Epidermis ein (60, 134, 162).

2.6 Melaninsynthese und Pigmentstörung

Betroffene Patienten klagen im Verlauf der Erkrankung über fehlende Pigmentbildung in den betroffenen Hautarealen (P.V. alba). Diese wird insbesondere bei Belichtung deutlich, bei der die Umgebung normale Pigmentierung zeigt. Die depigmentierten Hautareale neigen allerdings nicht zu vermehrten Sonnenbränden (146). Zur Erklärung dieser Pigmentstörungen existieren mehrere Hypothesen:

1. Eine postinflammatorische Hypopigmentierung in Analogie zu dem der syphilitischen Roseola folgenden Leucoderm (33)- dieses Modell ist aber aufgrund der fehlenden Entzündung nicht akzeptabel.

2. Ein Pseudoleukoderm als Folge einer rein physikalischen Filterwirkung des Pilzrasens gegenüber UV-Strahlung (169) - diese Annahme ist widerlegbar durch das Auftreten der Erkrankung auch in unbelichteteten Arealen (16) sowie eine vollständige Depigmentierung bei dunkelhäutigen Menschen (80).

3. Toxische Einflüsse auf die Melaninsynthese- sie wurden insbesondere von der verzögert einsetzenden Repigmentierung abgeleitet.

Insbesondere ultrastrukturelle Untersuchungen konnten eine selektiv-toxische Schädigung der Melanozyten in den Läsionen einer P.V. alba nachweisen (24), verbunden auch mit einem gestörten Pigmenttransport (96, 129). Die Arbeitsgruppe um Breathnach (24) fand ausgeprägte Veränderungen der Melanozyten bis hin zu deren Untergang. Andere histochemische und elektronenmikroskopische Studien konnten diese melanozytotoxischen Effekte nicht bestätigen (34, 47), sie diskutierten - bei unveränderter Zahl und Zytologie der Melanozyten - eher eine Melaninbildungsstörung und einen gestörten Pigmenttransport. Mit Biopsiematerial aus den weißen Veränderungen einer Pityriasis versicolor alba ließ sich die Dopa-Tyrosinase-Reaktion (ein Marker für die Melaninsynthese) nicht durchführen (123). Dies kann unmittelbare Folge der melanozytotoxischen Wirkung sein, jedoch hemmten andererseits Ether-Extrakte aus Schuppenmaterial einer Pityriasis versicolor die Dopa-Tyrosinase-Reaktion in vitro (83), was die Anwesenheit von Inhibitoren der Tyrosinase vermuten ließ. Tyrosinase-Inhibitoren wurden 1978 von Nazzaro-Porro beschrieben und als Erklärung für die Depigmentierungen postuliert (169). Es handelt sich um Dicarbonsäuren, insbesondere um die Azelainsäure HO_2C-$(CH_2)_7$-CO_2H. Folgeuntersuchungen zeigten jedoch, dass diese Substanzen in ihren angenommenen in vivo-Konzentrationen gesunde Melanozyten in vivo und in vitro nicht beeinflussen konnten (25, 144). Zudem erbrachte der aus der Tyrosinasehemmung abgeleitete therapeutische Einsatz bei Hyperpigmentierungen und in der Melanomtherapie enttäuschende Ergebnisse (123). Die zunächst

enthusiastisch aufgenommene Theorie der Dicarbonsäuren als Agens der Depigmentierung hatte jedoch noch weitere Schwächen:

1) Nazzaro et al. mußten zur Gewinnung dieser Substanzen die Hefe-Zellen erst zerstören, denn sie sind nur im Zellinneren nachzuweisen (123).
2) Die kulturellen Voraussetzungen für die Synthese von Dicarbonsäuren bestehen in der Anzucht der Hefen in Olivenöl. Die Ableitung des pathogenetischen Prinzips der PV alba aus dem Lipidstoffwechsel kann aber nicht erklären, warum die Pityriasis versicolor (alba) nicht regelhaft auftritt, sobald der Erreger auf der Haut nachweisbar wird, sondern nur unter bestimmten Bedingungen, insbesondere bei starkem Schwitzen oder hoher Luftfeuchte.
3) Letztlich konnte dieses Modell auch nicht die Farbvarietäten und die Fluoreszenz der hyperpigmentierten Läsionen erklären.

2.6.1 Rolle der Melanozyten in der Pigmentbildung

Melanozyten entstammen der Neuralleiste, sind also ektodermaler Herkunft, und befinden sich an der dermal-epidermalen Grenzfläche der Haut. Sie bilden 2-4% der gesamten epidermalen Zellpopulation.
Sie leben in einer engen Symbiose mit den Keratinozyten, denen sie ihr Pigment in Form von Melanosomen weiterleiten. Die Zahl der von Melanozyten versorgten Keratinozyten wird als melano/epidermale Einheit bezeichnet und beträgt 36 (Keratinozyten pro Melanozyt).

2.6.2 Pigmentsynthese

Die wichtigste Rolle der Melanozyten besteht in der Produktion des Pigments, was mit vielen anderen lebensbedeutenden Prozessen verknüpft ist, wie: dem Schutz vor Lichtbestrahlung, der Thermoregulation, der Steuerung der Vitamin D Bildung und dem Schutz vieler Stoffwechselprodukte vor photochemischen Veränderungen (81).
Es werden grundsätzlich 3 Haupttypen von Pigment gebildet: Eu- , Phäomelanin und Trichochrome. Ihre Synthese ist ein komplexer, multifaktoriell-abhängiger Prozess, der ausschließlich in Melanosomen verläuft.

Eumelanin ist ein braunschwarzer, unlöslicher und gegen viele Chemikalien beständiger Polymerkörper im Gegensatz zu dem gelblich-rötlichen und in Alkalien löslichen Phäomelanin. Es gibt folgende Hauptunterschiede in der Eu- und Phäomelaningenese:

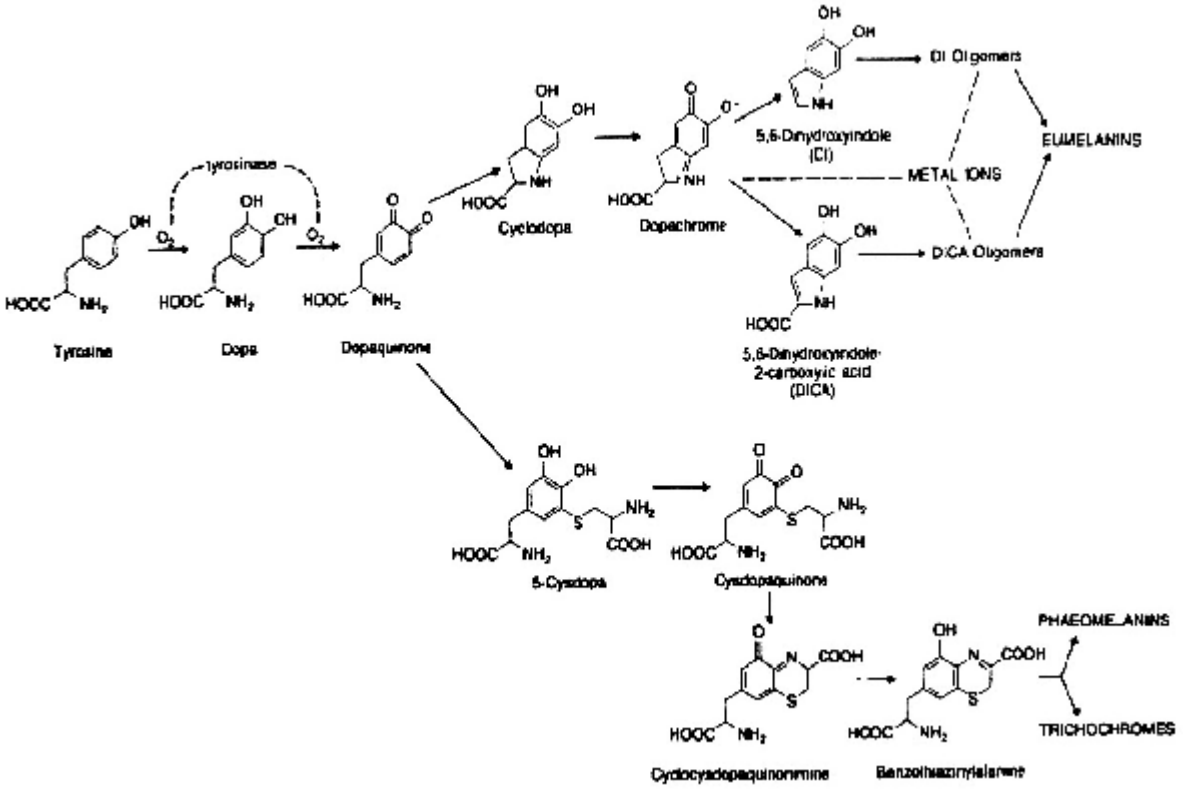
Tabelle 1 : Zusammenstellung der Eigenschaften des Eu- und Phäomelanins

Eigenschaft	**Eumelaningenese**	**Phäomelaningenese**
Melanosomen		
Form	elipsoidal	kugelförmig
Struktur	Lamellen oder Filamente	Microvesikel
Melanin		
Farbe	dunkelbraun bis schwarz	gelb bis rötlich-bräunlich
Löslichkeit	unlöslich in Säuren und Alkalien	löslich in Alkalien
Gehalt an:		
Stickstoff	6-9%	8-10%
Schwefel	0-1%	9-12%
Struktur	Dihydroxyindole	Benzothiacine
Zwischenstruktur	Dihydroxyindole	Cystinyldopa, Glutathionyldopa

Trichochrome sind phäomelaninartige, säurelösliche Pigmente, die einen hohen Anteil an Schwefelgehalt aufweisen.
Sie wurden in roten Federn, aber auch in Melanomzellen gefunden (12, 19, 79).
Die ersten Schritte in der Melaninsynthese werden von der Tyrosinase, einem multifunktionalem Enzym, katalysiert: die Hydroxylierung von L-Tyrosin (Monohydroxyphenylalanin) zu L-Dopa (L- 3,4-Dihydroxyphenylalanin), als auch die Oxydation von L-Dopa zu L-Dopachinon. L-Dopachinon bestimmt einen Verzweigungspunkt der weiteren Synthese. In Anwesenheit von L-Cystein oder anderen schwefelhaltigen Verbindungen entstehen Cysteinyldopa, Benzothiacin und letztendlich Phäomelanin. Durch eine intramolekulare Addition und einem damit

verbundenen Ringschluß zum Leukodopachrom, das schnell zu L-Dopachrom oxidiert wird, entstehen die Vorgänger des Eumelanins. Bei der Oxidation von Leukodopachrom zu L-Dopachrom wird L-Dopachinon zu L-Dopa reduziert. Das freiwerdende L-Dopa kann weiter durch die Tyrosinase erneut oxidiert werden.
L-Dopachrom ist das erste Produkt des Melaninstoffwechsels, das gefärbt ist (orangerot). Sein Absorptionsmaximum liegt bei 475 nm. Es ist ein instabiles Molekül und unterliegt einer spontanen Decarboxylierung (unter Freisetzung von CO_2) zu 5,6-Dihydroxyindol (DHI). DHI oxydiert weiter in Anwesenheit von Sauerstoff zu 5,6-Indolchinon, das spontan zu einem homopolymeren Eumelanin polymerisieren kann. Zusätzlich enthält das Eumelanin noch 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (DHICA). DHICA ist im Gegensatz zu DHI stabil und wird aus Dopachrom über die Dopachrom-Tautomerase gebildet. Die Produktion des Melanins ist eine Copolymerisation der Chinone und Indole. Eine sehr verkürzte und vereinfachte Pigmentsynthese zeigt die folgende Abbildung 1.

Abbildung 1: Pigmentsynthese (138)



2.7 Immunologie der Pityriasis versicolor

Histologisch kann nur ein geringes Infiltrat aus hauptsächlich T_h-Zellen nachgewiesen werden (148). Die humorale Abwehr fällt eher gering aus, Antikörper der Klasse IgG sind nur schwach erhöht (51, 71, 173). Eine Störung der zellvermittelten Immunität wurde nicht nachgewiesen (155). Die Frage, warum die außerordentlich hohe Pilzdichte im Stratum corneum, die Grundlage der einfachen Diagnostik der Erkrankung im Nativpräparat ist, nur zu einer sehr geringen Immunantwort seitens des Patienten führt, ist nicht abschließend geklärt.

Gueho et al. diskutierten in einem kürzlich erschienen Review (64) die Interaktion von *M. furfur* mit dem zellulären und humoralen Immunsystem bei Patienten mit *Malassezia*-assoziierten Erkrankungen. Dabei zeigte sich, dass in den meisten Studien insbesondere Lymphozyten von Patienten mit P.V. geringer auf antigene Extrakte der Hefe reagierten als gesunde Kontrollpersonen (155). Dennoch zeigt *M. furfur* Eigenschaften eines Adjuvans bei der Verabreichung mit anderen Antigenen, scheint also sehr wohl immunstimulatorisch wirksam zu sein. Auch die humorale Immunität bei Erkrankungen durch *M. furfur* zeigt kein einheitliches Bild, Antikörper gegen *M. furfur* sind nicht mit der Erkrankung korreliert und auch bei Gesunden nachweisbar (173), da die Hefe zur residenten Hautflora gehört. Insgesamt existiert derzeit kein einheitliches Konzept der Interaktion des Keimes mit dem humanen Immunsystem.

2.8 Inzidenz

Da die Krankheit nur geringe Beschwerden verursacht und oft unbemerkt verläuft, kann die Inzidenz nur geschätzt werden.

Eine besonders hohe Inzidenz findet sich in den tropischen und subtropischen Regionen. In Mexiko (58, 59) oder Samoa (107) erreicht sie bis zu 50%, in Nord- und Mitteleuropa dagegen nur 0,5 bis 1% (10).

2.9 Kontagiosität

Die Kontagiosität der Piytriasis versicolor ist sehr gering. Sehr selten werden in der Literatur Ansteckungsfälle beschrieben (132, 165). 1961 löste Burke (27) eine *Malassezia*-Infektion bei Patienten mit hohem Cortison-Spiegel aus.
Eine experimentelle Ansteckung eines gesunden Probanden erwies sich als sehr schwierig, so dass nicht alle Bedingungen einer Infektionskrankheit vorliegen (52).

2.10 Prädispositionsfaktoren

Zu den bekannten Prädispositionsfaktoren der Erkrankung zählen:

- tropisches, feuchtwarmes Makroklima
- vermehrte Schweißneigung verursacht durch Tragen okklusiver Kleidung (71)
- körperlich anstrengende Tätigkeit
- sportliche Betätigung und Sauna (61, 156)
- Allgemeinerkrankungen z.B.: Tuberkulose, Hyperthyreose (141)
- genetische Faktoren
- idiopatischer oder iatrogener Hyperkortizismus (17, 27, 29, 84)
- Schwangerschaft (143)
- Kontrazeptiva (143)
- Fehlernährung (27)
- medikamentöse Suppression(27, 143)
- Anwendung von lipidreichen Externa (106, 145)

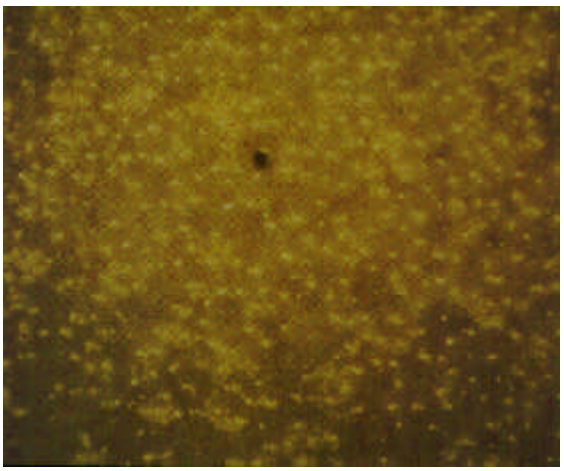
Mangelnde Körperhygiene scheint keinen Einfluss zu haben. Es wurden Rückfälle auch bei sorgfältiger Hygiene beschrieben (13).

2.11 Diagnose

Pityriasis versicolor wird meistens aufgrund ihrer klinischen Symptome diagnostiziert. Die Diagnose wird durch eine Woodlicht-Untersuchung und das KOH-Nativpräparat ergänzt.

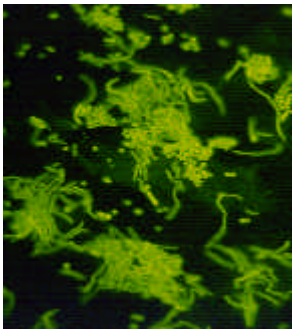
Im Woodlicht (UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm) lassen sich die Läsionen durch eine charakteristische gelblich-grünliche Fluoreszenz nachweisen. Dadurch kann auch die wirkliche Ausdehnung der betroffenen Areale bestimmt werden, die z.T. bei Tageslicht kaum sichtbar sind (71, 125).

Foto 2: gelbliche Fluoreszenz der P.V. Läsionen unter UV-Licht



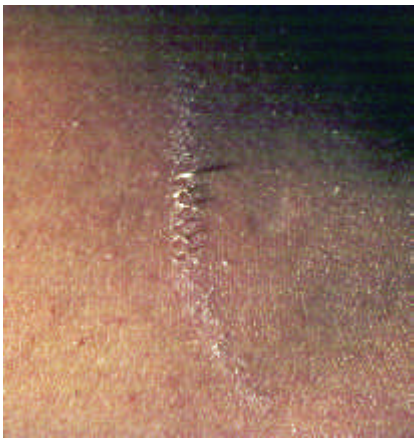
Im KOH- Nativpräparat kann der Erreger -*Malassezia furfur*- nachgewiesen werden. Es finden sich runde 2-4 µm große Sprosszellen, zwischen denen unverzweigte Hyphen mit einer Länge von 20 µm sichtbar sind (18).

Foto 3: Nativpräparat (KOH+ Unitex 2B, x 400)



Von großer klinischer Bedeutung ist das „Hobelspanphänomen“ - eine kleieförmige Schuppung, die beim Streichen mit einem Holzspatel über die Läsionen entsteht.

Foto 4: Hobelspanphänomen



Die Kultur wird selten angelegt und ist nicht besonders aussagekräftig, denn der Keim gehört zur residenten Hautflora. Die Veränderungen der Pityriasis versicolor zeigen zwar eine erhöhte Keimdichte (113), als pathogenetisch gilt jedoch bislang die Induktion von Hyphen durch unaufgeklärte Faktoren (59).

2.12 Differentialdiagnose

Aufgrund des klinischen Bildes der Pityriasis versicolor sollten folgende Erkrankungen bei der Diagnose in Betracht einbezogen werden:

- Vitiligo
- Melanoderma
- Leukoderma (Pseudoleukoderma) psoriaticum
- Leucoderma syphiliticum
- Cafe-au-lait Flecken
- Naevus anaemicus
- Eczema seborrhoicum
- Erythrasma
- Lepra pinta
- Frambösie

2.13 Therapie und Prognose

Die Behandlung der Pityriasis versicolor hängt von der Ausdehnung der Läsionen ab. Topisch werden Antimykotika verwendet, als besonders wirksam erwies sich die Gruppe der Azole – z. B. Ketoconazol, Itraconazol und Fluconazol.
Als wichtigster Angriffspunkt der Azole bei Pilzen wird die Hemmung der Ergosterolbiosynthese betrachtet (53, 116, 137, 157). Dies erfolgt durch die Hemmung der C14-Demethylierung der Sterolzwischenprodukte (z.B. Lanosterol) (53, 116) infolge Hemmung eines Cytochrom P450-abhängigen Enzymsystems (53, 72).
Auf molekularer Ebene gesehen, bindet der Stickstoff (N3 von Ketoconazol, N4 von Fluconazol) an das Häm-Eisenatom von Cytochrom P_{450}. Dadurch wird die Bildung des Superoxid-Fe^{+3}-Komplexes ($Fe^{+3}O^{-1}$), der für die Hydroxylierung von Methylsterol nötig wäre, verhindert (72). Ergosterol ist das Hauptsterol in der Pilzzellmembran (91, 160, 163).

Durch den Ergosterolmangel werden zahlreiche Membran- und Barrierefunktionen behindert und gestört (72), die Zellmembranpermeabilität ist erhöht, der Metabolismus gestört und das Wachstum wird gehemmt (116, 137), was schließlich zum Tod der Zelle führt.

Bei einer topischen Therapie wird die Behandlung des gesamten Körpers empfohlen, da das Hyphenstadium auch in der nicht betroffenen Haut erhöht ist (wirkstoffhaltige Shampoos oder Lösungen).
Die systemische Therapie (orale Gabe von Antimykotika) ist bei ausgedehnten Herden und häufigen Rezidiven indiziert.
Die Rezidivrate ist auch nach längerer antimykotischer Therapie hoch und beläuft sich auf 60-80% innerhalb von 1-2 Jahren.

Tabelle 2 (nächste Seite): Systemische Therapie der Pityriasis versicolor (in alphabetischer Reihenfolge)

Präparat	Dosierung	Literatur
Fluconazol	50 mg/ über 14 Tage oder 400 mg 1 x pro Monat	Faergemann 1992
Itraconazol	200 mg/d über 5-7 Tage	Delescluse 1990
Ketoconazol	200 mg/d über 10 Tage oder 400 mg 1 x pro Monat	Rausch 1984

3. Erreger der Pityriasis versicolor

3.1 Warum „ *Malassezia furfur*“?

Die erste Beschreibung der klinischen Symptome der Pityriasis versicolor verdanken wir Willan. 1846 hat Carl Ferdinand Eichstedt einen weiteren wichtigen Beitrag zu dieser Erkrankung geleistet. Er fand, dass es sich um eine erregerbedingte Krankheit handelt. Aus dem Schuppenmaterial isolierte er„Pilzfäden“ in reichlichen Mengen, die er weiter nicht klassifizieren konnte, und aus diesem Grunde auch nicht benannte. Den Namen „*Microsporum furfur*“ schuf 1853 Charles Robin aufgrund der optischen Ähnlichkeiten zu dem Dermatophyten*Microsporum audinii*.
Den heutigen Namen „*Malassezia furfur*“ und somit die Schaffung eines neuen Genus verdankt die „problematische“ Hefe H.E. Baillon, der sie zu Ehren des Pariser Pathologen Louis Charles Malassez so nannte.
Heutzutage gehören zu diesem Genus (aufgrund der molekularbiologischen, immunologischen und morphologischen Daten) folgende *Malassezia* Spezies: *Malassezia globosa* (65), *Malassezia obtusa* (65), *Malassezia restricta* (65), *Malassezia slooffiae* (65) und die nicht lipidabhängige Spezies *Malassezia pachydermatis* (20, 66).

3.2 Epidemiologie von *Malassezia furfur*

Malassezia-Hefen gehören zur residenten Mikroflora der menschlichen Haut (78, 176) und lassen sich leicht darauf nachweisen, dabei besonders am Kopf (78-97%) und am Stamm (92-100%) (113, 127, 143), in Talgdrüsenfollikeln, extrazellulär

zwischen den Hornzell-Lamellen, im Akroinfundibulum, dem oberflächennahen Anteil des Follikels (104, 120, 135, 136, 162, 172).
Besonders hoch steigt die Zahl des Erregers bei Eintritt der Pubertät, sinkt dagegen im Alter und im frühen Kindesalter, was einen Zusammenhang/Abhängigkeit zwischen Talgproduktion und der Besiedlung von diesen lipophilen Hefen bestätigt.
Die durchschnittliche Keimzahl auf einer unveränderter Haut beträgt $10x10^3$-$50x10^3$ Keime/cm², bei Pityriasis versicolor Patienten dagegen bis $450x10^3$ Keime/cm² (113, 172).
Diese Zahlen verweisen auf eine wichtige pathogene Rolle von *Malassezia furfur*, die Pathomechanismen bleiben aber weiter ungeklärt.

3.3 Morphologie von *Malassezia furfur*

Als Kultur auf Dixon-Agar bildet *Malassezia furfur* gelbliche Kolonien (siehe Foto), mit einem fruchtigen Geruch, für den die anwesenden?-Decalactone verantwortlich sind (97).

Foto 5: Kolonien von *Malassezia furfur* auf Dixon-Agar

Lichtmikroskopisch werden runde und ovale Hefezellen gefunden, die abhängig vom angewandten Nährmedium ineinander übergehen können (59, 143, 147, 152). Es finden sich auch stabile Varianten (38, 119, 143). Die Zellwand erscheint doppelt konturiert. Die runden Zellen erreichen im Durchmesser 3 µm und die ovalen eine Länge von 6 µm. Um die nestförmig und dicht zusammengelagerten Zellen befinden sich kurze Hyphenelemente. Dieses dimorphe Bild ist vor allem für das Schuppenmaterial von Patienten charakteristisch. Die Hyphenausprägung in einer

Kultur zu induzieren ist bis jetzt Dorn (44), Nazarro Porro (123) und Faergemann (52) gelungen und nur unter gezielten Kulturbedingungen möglich.
Die Reproduktion erfolgt ausschließlich asexuell. Aus einer Mutterzelle stülpen sich die knospenbildenden Zellen hervor, wodurch das Bild einer typischen flaschenförmigen Form entsteht (11).
Elektronenmikroskopisch wird von außen ausgehend eine dicke (ca. 0,12 µm), mehrschichtige (darunter elektronendichte und elektronendurchlässige Schichten) Zellwand sichtbar mit inneren Furchen, in die sich das Plasmalemm hineinstülpt.
Der Innenraum der Zelle ist vom durch das Plasmalemm abgegrenzten Protoplasma ausgefüllt. In der Zelle gibt es viele verschiedene Zellorganellen, darunter endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und lipidhaltige Vesikel (94).
Aufgrund des laminären Aufbaus der Zellwand und der positiven Diazonium-Blau-Reaktion (96) wird *Malassezia* zu den Basidiomyceten gerechnet.

3.4 Pathomechanismen der Pityriasis versicolor alba

Zum Mechanismus der Depigmentierung der Haut in den betroffenen Arealen existieren derzeit zwei Hypothesen:

1) Aufgrund einer physikalischen lichtabsorbierenden Wirkung der Schuppen bildet sich ein Pseudoleukoderm (92, 99, 103).
   Dieser Theorie widersprechen aber die Depigmentierungen der nicht belichteten Haut (16, 80) und auch die verzögert einsetzende Repigmentierung (60, 142).

2) Aufgrund ungeklärter toxischer Wirkungen wird die DOPA- Tyrosinase-Reaktion inhibiert mit der Folge einer eingeschränkten Melaninsythese (18, 34, 83, 146).
   Zur Unterstützung dieser Theorie könnten die beschriebenen Veränderungen in der Struktur der Melanosomen dienen (5, 24, 34, 86). Diese Autoren beobachteten in den hypopigmentierten Arealen bei normaler Melanozytenzahl eine Störung des Melanosomentransfers von Melanozyten in die benachbarten Keratinozyten. Die Melanosomen waren dabei anormal klein und aggregiert.

Außerdem wurden in der Literatur erregerbedingte zytotoxische Einflüsse auf die Melanozyten bzw. eine Inhibition der DOPA-Tyrosinase-Reaktion beschrieben (18, 34, 83, 146).
1978 hat Nazarro-Porro einen Tyrosinaseinhibitor- die Azelainsäure, eine vom Erreger synthetisierte C9-Dicarbonsäure, nachgewiesen. Durch ihre geringe Konzentration in vivo wird jedoch die mögliche Hemmung der Melaninsynthese in Frage gestellt (144).

Letztlich ist die charakteristische Depigmentierung der Haut bei Pityriasis versicolor ursächlich noch nicht befriedigend erklärt.

3.5 Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Wenn Tryptophan die einzige Stickstoffquelle im Nährboden von *Malassezia furfur* ist, so wird die Bildung von Pigmenten und Fluorochromen durch diese Hefe induziert. *Malassezia*-Hefen gelten als Krankheitserreger der Pityriasis versicolor. Das typische Krankheitsbild äußert sich in Hyperpigmentierungen der Haut, die im Woodlicht gelb-grün fluoreszieren (UV-Quelle, 366 nm). Diese können aber im Laufe der Erkrankung in hypopigmentierte Läsionen übergehen, in denen die Melaninsynthese eingeschränkt wird (Pityriasis versicolor alba).
Für das charakteristische Krankheitsbild von Pityriasis versicolor gibt es keine schlüssigen Erklärungen. Die vorliegende Arbeit möchte zur Klärung des Pathomechanismus der Depigmentierung beitragen. Dazu sollen folgende Fragen geklärt werden:

1) Gibt es Verbindungen / Sekundärmetaboliten im Stoffwechsel von *Malassezia furfur*, die humane Melanozyten beeinflussen können ?

2) Welcher Art ist diese Beeinflussung ? (Melaninsynthese, Transport, Vitalität ?)

3) Besteht ein pathogenetischer Bezug zur Hauterkrankung Pityriasis versicolor ?

4. Materialien und Methoden

4.1 *Malassezia furfur*

4.1.1 Stämme und Stammhaltung

4.1.1.1 Referenzstamm

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

4.1.1.2 Anzucht und Nährmedien

Die Anzucht des Stammes erfolgte auf modifiziertem (m) Dixon-Agar (65, 66) in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 32°C. Die Kulturen wurden in wöchentlichen Abständen auf frischen Agar weiterverimpft.

Nach Gueho et al. (78) besteht der modifizierte (m)-Dixon-Agar aus: 3,6% Malzextrakt, 0,6% Pepton, 2% getrocknete Ochsengalle, 1% Tween 40, 0,2% Glycerol, 0,2% Ölsäure, 1,2% Agar, Aq. dest. auf 100 ml.
Der Agar, der bei den Untersuchungen verwendet wurde, enthielt zwecks Kostenersparnis statt Glycerol und Ölsäure 0,4% Olivenöl und erwies sich als gleichwertig. Chloramphenicol und Cycloheximid wurden zur Vermeidung einer Kontamination zugesetzt (siehe Tabelle 3, nächste Seite).

Tabelle 3: Zusammensetzung des mDixon-Agars

Inhaltsstoff	**Menge pro 250 ml mDixon-Agars***	**Lieferfirma**
3,6% Malzextrakt	9 g	Malzextrakt-Buillon, Merck, Darmstadt, FRG
0,6% Pepton (Casein)	1,5 g	Pepton aus Casein, Merck
2% Ochsengalle	5 g	Dicfo, Detroit, USA
1% Tween 40	2,5 ml	Tween 40 Atlas, Sigma, St. Louis, USA
0,4% Olivenöl	1,0 ml	aus der Apotheke kaltsterilisiert
1,2% Agar	5 g	Agar Agar reinst, Merck
0,04% Cycloheximid	2 ml	Sigma Aldrich, Steinheim, FRG
0,005% Chloramphenicol**	0,0125 g	Merck, Darmstadt, FRG

* Die Inhaltsstoffe wurden eingewogen und mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt.
** Die Stammlösung besteht aus 6,25 mg Chloramphenicol / 1ml H_2O, wurde sterilfiltriert abgefüllt und bei-20?C aufbewahrt.

Die Bestandteile, außer Ölivenöl und Tween, wurden nach dem Einwiegen mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt, bei 1 bar über 30 min (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin, FRG) autoklaviert und auf etwa 50?C abgekühlt. Anschließend wurden 2,5 ml Tween 40 sowie 1,0 ml Olivenöl hinzugegeben und derfertige Agar wurde unter einer Uniflow Biohazard Laminar Flow Sicherheitsarbeitsbank (Gerätetyp UVUB1200,Uniequip Laborgerätebau, Martinsried, FRG) in Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegossen (jeweils 10 ml des Agars pro Petrischale).

4.1.3 Bildung von Pigmenten und Fluorochromen

Der Stoffwechsel von *Malassezia*-Hefen weist eine Besonderheit auf. Ist Tryptophan die einzige Stickstoffquelle im Nährboden, so bildet insbesondere die Species *M. furfur* ein braunes Pigment, das aus einer großen Anzahl bisher unbekannter Farbstoffe und Fluorochrome besteht (109).

4.1.4 Kulturbedingungen

Zur Induktion der Pigmentbildung wurde ein transparenter Pigment-Agar (P-Agar) verwendet, der keine Vitamine, Spurenelemente, Elektrolyte und Kohlenhydrate enthielt und nur noch aus einer Lipidquelle und der Aminosäure Tryptophan bestand. Zur Vermeidung einer Kontamination wurden Chloramphenicol und Cycloheximid zugesetzt.

Der P-Agar war folgendermaßen zusammengesetzt: 0,3 g L-Tryptophan (98%, Sigma Ultra), 2 g Agar (Agar Agar reinst, Merck, Darmstadt), 0,05 g Cycloheximid (Sigma Aldrich, Steinheim, FRG), 1000 µl Chloramphenicol (Merck,Darmstadt, FRG), 3 ml Tween 80 (Tween 80, Sigma, Deisenhofen) und 97 ml H_2O.

Die Mischung aus Cycloheximid, Chloramphenicol, Agar und Wasser wurde bei 1 bar über 30 min autoklaviert (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin, FRG), auf 50°C abgekühlt und mit L-Tryptophan und Tween 80 versetzt. Anschließend wurde der fertige P-Agar unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow Bench in Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) ausgegossen (jeweils 10 ml des Agars pro Petrischale).

4.1.5 Pigmentgewinnung und Aufreinigung

Da die Bildung des braunen Pigmentes durch *M. furfur* tryptophanabhängig ist, können als Bestandteile Derivate dieser Aminosäure vermutet werden.

Im Stoffwechsel des Tryptophans sind zwei grundlegende Synthesewege für Sekundärmetabolite beschrieben. Zum einen handelt es sich dabei um die Bildung von Ommochromen, Farbstoffe, die bei Gliederfüßern als Augen-, Haut- und Flügelpigmente sowie als Schlupfsekrete gefunden wurden (28, 29), zum anderen die Bildung von Indolen und Indolderivaten. Zur Auftrennung und Gewinnung einzelner Bestandteile des Pigmentes wurden die folgenden chromatographischen Methoden für Indolderivate eingesetzt.

Gewinnung des Rohextraktes

Die auf dem mDixon-Agar 6 Tage lang gewachsene Kulturen von CBS 1878 wurden mit einem sterilen Tupfer auf P-Agar ausgestrichen und danach 14 Tage bei 32?C im Brutschrank inkubiert. Während der Inkubation verfärbte sich der vorher

transparente Nährboden durch das Pigment dunkelbraun, und unter UV-Licht bei 254 und 366 nm wurden deutliche Fluoreszenzerscheinungen sichtbar.
Der Inhalt der Petrischalen (jeweils 20 Petrischalen) wurde mit einem haushaltsüblichen Pürierstab (Quelle, Fürth, FRG) feinkörnig zerkleinert und mit Ethylacetat (Merck, Darmstadt) über 48 Stunden extrahiert. Der Extrakt wurde über Glaswolle abfiltriert. So entstandenes Filtrat wurde mit einem gleichen Volumen Aqua dest. versetzt und ausgeschüttelt. Über einen Scheidetrichter trennten sich 2 Phasen: die obere gereinigte Ethylacetat-Phase und die untere Wasserphase mit Tween- und Agarresten. Die obere Phase wurde über einen Rotationsverdampfer getrocknet und in etwa 4 ml Ethanol aufgenommen.
Die Vorreinigung des Rohextraktes verbessert und beschleunigt den nachfolgenden Trennungsprozeß mittels Säulenchromatographie (Gelpermeationschromatographie mit Sephadex LH20).

4.1.6 Säulenchromatographie/(Gelpermeationschromatographie mit Sephadex LH20)

Lipophiles Sephadex LH 20 (Porengröße 25 – 100µ, Sigma) ist ein hydroxyproliertes Derivat des Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und wird für die Gelpermeationschromatographie, die Normalphasenverteilungs- und Adsorptionschromatographie von z. B. Lipiden, Steroiden, Fettsäuren, Hormonen und Vitaminen verwendet (73).

Über eine Mitteldruck-Säulenchromatographie wurde der Rohextrakt unter UV-Licht (Desaga-GmbH, Heidelberg, Type 131200) von 254 und 366 nm Wellenlänge in 7 einzelne Fraktionen aufgetrennt.
Die 7 einzelnen Fraktionen wurden in getrennten Glasgefäßen aufgefangen, mit einem Rotationsverdampfer getrocknet, in etwa 2,0 ml Ethanol aufgenommen und in 3 ml Glasröhrchen überführt.

Tabelle 4 : Die erhaltenen Fraktionen mit ihren charakteristischen Eigenschaften:

Nummer der Fraktion	Menge der Fraktion (ml)	Farbe/Charakterisierung
0	300	farbloser Vorlauf
1	100	braun
2	100	goldgelb
3	100	hellgelb
4	200	bräunlich
5	200	orange
6	200	blau
7	200	gelb

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

Sephadex LH 20 wurde regelmäßig regeneriert, um verminderte Trenneigenschaften durch Verschmutzung des Gels zu reduzieren. Nach jeder Chromatographie wurde über das auf der Säule verbliebene Sephadex etwa 1 ml 2 N HCl aufgeschichtet. Nach dem Einsickern wurde die Säule mit frischem Methanol gespült, bis der pH-Wert neutral wurde.

4.1.7 Analytische und präparative Dünnschichtchromatographie

Zur weiteren Auftrennung der Indol-Derivate wurde eine dünnschichtchromatographische Trennungherangezogen (57).
Jede Fraktion wurde danach auf DC-Platten Kieselgel 60 (Merck) aufgetrennt. Die Substanzen wurden mit Hilfe eines Camag Linomat IV aufgetragen und mit dem Laufmittel Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 entwickelt (Laufkammern: Desaga, Heidelberg; Filterpapier: 20 x 20 cm, Camag, Muttenz, Schweiz).

Tabelle 5 : Einstellung des Linomaten zur analytischen DC-Trennung der Fraktionen:

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	10 mm
Auftragsgeschwindigkeit	7 sec/µl
Startposition horizontal	10mm
Startposition vertikal	20 mm
Zwischenraum	7 mm
Aufzutragendes Volumen	20µl
Druck Hauptventil	? 100 bar
Druck Reduzierventil	5 bar

Tabelle 6 : Einstellung des Linomaten zur präparativen DC-Trennung der Fraktionen:

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	180 mm
Auftragsgeschwindigkeit	4 sec/µl
Startposition horizontal	10mm
Startposition vertikal	20 mm
Zwischenraum	0 mm
Aufzutragendes Volumen	300µl
Druck Hauptventil	? 100 bar
Druck Reduzierventil	5 bar

Anschließend wurde jede einzelne Fraktion über die Beschreibung der DC-Platten im sichtbaren Licht und UV-Licht bei 254 und 366 nm sowie die Rf-Werte (Quotient aus der Entfernung einer Substanz vom Startpunkt und Laufmittelstrecke) charakterisiert.

Die aufgetrennten Banden wurden angezeichnet, mit einem Einmalskalpell ausgekratzt, im Mörser fein zerkleinert und mit Ethylacetat und Wasser mehrmals geschüttelt. Dadurch ließen sich 2 Phasen trennen: die obere Ethylacetatphase mit dem Pigment und die untere Wasserphase mit dem abgesetztem Kieselgel. Anschließend wurde die Pigmentphase abpipettiert, zur Bindung von Restwasser mit

Natriumsulfat (Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz) versetzt und bei 25°C mit 4000 U/min über 5 min zentrifugiert (Programm 5, Hettich Zentrifuge, Rotana RP). Der Überstand wurde in ein 4ml-Glasröhrchen (neoLab Autosampler Vials, Heidelberg, FRG) überführt und unter einem Stickstoffstrom in einem Techne DRI-Block DB 3 (Thermo Dux, Heidelberg) bei 40?C getrocknet.

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

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

Präparative HPLC

Durch präparative HPLC können die trotz Vorreinigung noch recht komplexen Sephadex-Säulen-Fraktionen (durchschnittlich 5–10 Komponenten) über einen Gradienten mit einer LiChrospher-RP8 Säule (Merck, Darmstadt, 30x250 mm) mit entsprechender Vorsäule getrennt und in grösseren Mengen rein dargestellt werden. Als Gradientenpumpe dient die Gilson Masterpumpe M305 gekoppelt mit einer Pumpe Gilson Modell 302 (Gilson, USA) mit jeweils einem präparativen 50ml/min Pumpenkopf, gesteuert von einem Gilson 802-Modul. Die Detektion erfolgt mittels UV-Detektor (Holochrome, Gilson) bei 220 nm, die Chromatogramme werden mittels XY-Schreiber aufgezeichnet. Der verwendete lineare Gradient (180 min) läuft von 0–100 % Acetonitril bzw. 100–0 % Wasser (Lösungsmittel sind Gradient Grade von Merck, Darmstadt). Die Flussrate beträgt 5 ml/min, die eluierenden Verbindungen werden mittels Fraktionensammler (Super Frac, Pharmacia Biotech) kontinuierlich in 180 Fraktionen von je 5 ml aufgefangen und anschliessend lyophilisiert (Lyovac GT2). Die Fraktion wurden nach Chromatogrammverlauf, Farbe und Fluoreszenz kombiniert, lyophilisiert und nach analytischer HPLC eines Aliquots nochmals mittels eines im Verlauf flacheren und gespreizten Gradienten weiter aufgetrennt. Auch hier wurden entsprechende Fraktionen vereinigt und erneut lyophilisiert. Mit dem verwendeten Verfahren der kontinuierlichen Gewinnung der Fraktionen konnte sichergestellt werden, dass keine eluierende Substanz verloren ging. Anschließend wurde ein Aliquot zur analytischen HPLC verwendetund bei

ausreichender Reinheit im Zellkulturversuch eingesetzt bzw. oder per Express unter Stickstoffatmosphäre auf Trockeneis zur Strukturaufklärung an den Kooperationspartner in München geschickt.

Analytische HPLC

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

4.1.9 Weitere chemisch-analytische Methoden/Strukturaufklärung (AK Prof. Steglich, Organ. Chemie, LMU München)

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

4.2 : Melanozytenkultur

4.2.1 Kulturverfahren

Humane Vollhaut (überschüssige Hautanteile nach operativen Eingriffen) wurde unter sterilen Bedingungen von Fettgewebe befreit und 10 mal in Phosphatpuffer ohne Calcium und Magnesium gewaschen. Anschließend wurden die Proben auf einer planen Oberfläche fixiert und mit Hilfe eines Dermatoms kleine Hautstücke von 5 mm Breite und 2 cm Länge abgehobelt. Bei sehr kleinen Hautproben entfiel dieser Präparationsschritt. Die Hautstücke wurden 2 Std. bei 37°C bzw. über Nacht bei 4°C mit 0,25%-iger Trypsinlösung behandelt und anschließend die Epidermis von der Dermis getrennt. Die epidermalen Zellen wurden mechanisch durch Pipettieren in Hank`s-Medium mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penizillin/Streptomycin suspendiert. Die Suspension wurde gefiltert und zentrifugiert (10 Minuten, 200g, bei Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde in Melanozyten-Medium (F10-Nutrient-medium mit 5% fötalem Kälberserum, 1% Penizillin/Streptomycin, 85 nmol/l TPA, 0,1 nmol/l IBMX, 2,5 nmol/l Cholera-Toxin) resuspendiert und zur Unterdrückung des Fibroblastenwachstums mit 100 µg/ml Geneticin versetzt und 48 Std. in einer 10%-igen CO_2-Atmosphäre bei 37°C inkubiert (die Einwirkzeit darf höchstens 48 Std. betragen). Die Kultur wurde in Zelllkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) ausgesät und bei 37°C in 10% CO_2-Atmosphäre inkubiert. Das Kulturmedium wurde von Beginn an 3 mal in der Woche gewechselt.

Die Zellen wurden solange passagiert, bis die für alle Versuche entsprechende Zellzahl erreicht wurde. Die weitere Aufzucht der Melanozytenkultur erfolgte in großen Zellkulturflaschen (Polystyren, 175 cm^2) bei 5% CO_2 Begasung. Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt (30 ml/Flasche);bei beginnender Konfluenz des Zellbewuchses (etwa alle 14 Tage) wurden die Zellen passagiert. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) eingefroren und vor den Versuchen in der entsprechenden Menge aufgetaut.

Alle Zellkulturarbeiten mit Melanozyten wurden bei möglichst wenig Lichteinfall durchgeführt, um die Exposition der Zellen gegenüber UV zu minimieren und den Zerfall des TPAs im Medium zu vermeiden.

4.2.2 Gewinnung einer reinen Melanozytenkultur

Die primären Melanozytenkulturen sind oft mit Keratinozyten und Fibroblasten kontaminiert. Das Keratinozytenwachstum kann erfolgreich durch TPA unterdrückt werden. Fibroblasten werden selektiv durch den Zusatz von Geneticin gehemmt (68).

Zwecks Vernichtung der Fibroblasten in der Melanozytenkultur wurde 150µl Geneticin (100 µg/ml, Sigma, München) auf eine 75 cm^2 - Zellkulturflasche (Endkonzentration 100µg/ml) zugegeben, und die Zellen wurden daraufhin 48 Std. inkubiert. Danach wurde das Geneticin-haltige Medium durch Lerner-Medium ersetzt und die Zellen wurden wie oben beschrieben weiterkultiviert.

4.2.3 Passagieren von Melanozyten

Dazu wurden die Zellen nach dem Abgießen des Mediums mit 10 ml 0,25% Trypsin in HBSS mit 1% P/S abgelöst (2-3 min bei 37°C inkubiert) und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Zellkulturflasche wurde 2 mal mit je 5 ml HBSS mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 1% P/S nachgespült und diese Restzellsuspensionen in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Durch FKS wird Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden zentrifugiert (10 min bei 200g), das Pelett in 10 ml vom frischen Medium aufgenommen. Die entstandene homogene Suspension wurde im Verhältnis 1:2 aufgeteilt („gesplittet“) und neu ausgesät.

Tabelle 7 : Zusammenstellung der in der Zellkultur verwendeten Volumina

Kulturflasche	Kleine (25 cm^2)	Mittlere (75 cm^2)	Große(150cm^2)
Kulturmedium	5 ml	15 ml	30 ml
Waschen mit PBS	5 ml	10 ml	15 ml
0,2% EDTA(Titriplex III)	1 ml	2 ml	4 ml
Trypsin-Lösung	1 ml	2 ml	3 ml
Medium	5 ml	10 ml	15 ml
Lösung mit fetalem Kälberserum	2 ml	3 ml	4 ml

4.2.4 Einfrieren von Melanozyten

Nach dem Abgießen des Mediums wurden die Zellen abgelöst und in einem 50 ml Röhrchen zentrifugiert (Vorgang gleich wie beim Passagieren der Zellen). Danach wurde das Einfrier-Medium (50% fetales Kälberserum, 40% Medium MGM-M2, 10% DMSO) zugegeben, und darin wurden die Zellen sorgfältig suspendiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Suspension in ein 1,5 ml Röhrchen („Ampulle“) überführt und im Kühlfach bei –80 C° eingefroren. Bei dieser Temperatur verblieben die Melanozyten 1 bis 2 Tage und wurden anschließend in einen Stickstoffbehälter (-220°C) umgelegt.

4.2.5 Auftauen von Melanozyten

Die aus dem Stickstoffbehälter genommenen Ampullen wurden im Wasserbad bis zum Auftauen gelassen und sofort danach in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Medium aufgenommen. Danach wurden die Zellen 5 min zentrifugiert (1200 Umdrehungen/min), gezählt und für entsprechende Versuche ausgesät.

4.2.6 Verwendete Kulturmedien

4.2.6.1 Melanozytenmedium nach Lerner

Dieses Medium bestand aus: Nutrient Mixture F 10 (HAM) mit L-Glutamin (500 ml, Gibco, Eggenstein), TPA = Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (1 mg, Sigma, Deisenhofen), IBMX = 3-Isobutyl-1-Methyl-Xantine (100 mg, Sigma, Deisenhofen), Choleratoxin (1 mg, Calbiochem, Bad Soden), inaktiviertem fetalem Kälberserum (Gibco, Eggenstein) und Gentamycin (100 ml, Sigma, Deisenhofen).
Diese Bestandteile wurden vor dem Gebrauch in entsprechenden Konzentrationen vorbereitet (außer fetalem Kälberserum und Antibiotika) und eingefroren.
Eine Ampulle TPA wurde in 200µl DMSO gelöst (5 mg/ml), davon wurden 100 µl in 9900 µl HAM gegeben (50 µg/ml) und portioniert unter Lichtausschluss eingefroren (6 Monate haltbar).
Das IBMX wurde in 9 ml Ethanol gelöst (11,1 mg / ml) und portioniert eingefroren.

Das Choleratoxin wurde in Aq. dest. gelöst (100 µg/ml), steril filtriert und portioniert eingefroren.
Von den so erhaltenen Stammlösungen wurden folgende Mengen, je nach Mediummenge (50, 100, 500 ml) zugesetzt.

Tabelle 8 : Zusammensetzung der Bestandteile im Lerner-Medium nach verwendeten Volumina

Nutrient Mixture F 10 HAM	50 ml	100 ml	500 ml	Endkonzentration im Medium
TPA	52 µl	104 µl	520 µl	85 nM
IBMX	100 µl	200 µl	1 ml	0,1 mM
Choleratoxin	4,2 µl	8,4 µl	42 µl	0,1 nM
Fetales Kälberserum	2,5 ml	5 ml	2 5 ml	5%
Gentamycin	500 µl	1 ml	5 ml	1%

Das Lerner-Medium war nach der Anfertigung 2 Wochen bei 4°C und im Dunkeln stabil.

4.2.6.2 Kommerziell bezogene Medien

Die kommerziellen Medien („Ready to use Mediums“) wurden von der Firma Promo Cell (Heidelberg) bezogen. Diese Medien bestanden aus einem Basalmedium (500 ml) und einer Supplementmischung („SupplementMix“) (10 ml), die zu dem Basalmedium unmittelbar vor der Verwendung zugesetzt wurde.
Das Basalmedium wurde bei 4°C und das Supplement bei –20°C im Dunkeln aufbewahrt. Nach der Zugabe von Supplement waren die kompletten Medien 5 Wochen bei 4°C und im Dunkeln haltbar.

4.2.6.2.1 Melanocyte Growth Medium M2 (MGM2)

Dieses Medium ist serumfrei und enthält weder PMA (Phorbol-Myristate-Acetete) und TPA (Tetr a-Phorbol-Acetate) noch andere mögliche Mitogene.
Nach der Zugabe des Supplements enthält das Medium folgende Konzentrationen an Wachstumsfaktoren:

Tabelle 9 : Wachstumsfaktoren des MGM2-Mediums

Wachstumsfaktor	Endkonzentration pro ml Medium
Endothelial Cell Growth Supplement /Heparin (ECGS/H)	0,4%
Fetales Kälberserum	2%
Epidermal Growth Factor, human, recombinant	0,1 ng/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Basic Fibroblast Factor, human, recombinant	1 ng/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicin	50 µg/ml

4.2.6.2.2 Melanocyte Growth Medium (MGM)

Das Melanocyte Growth Medium enthält im Vergleich zu MGM2-Medium sowohl PMA als auch Phenol red und wurde zur radioaktiven Melaninbestimmung verwendet. Nach der Zugabe des Supplements enthält das Medium folgende Konzentrationen von Wachstumsfaktoren:

Tabelle 10 : Wachstumsfaktoren des MGM-Mediums

Wachstumsfaktor	Endkonzentration pro ml Medium
Basic Fibroblast Factor, human, recombinant	1 ng/ml
Bovine pituitar extract, 13 mg/ml	0,004 ml/ml
Phorbol 12-Mristate 13-Acetate	10 ng/ml
Phenol red	0,62/ml
Insulin	5 µg/ml
Hydrocortison	0,5 µg/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicin	50 µg/ml

4.2.6.2.3 Modifiziertes Melanocyte Growth Medium (MGM)

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Wachstumsfaktoren im MGM-Medium wurde noch 100 µl ß-Mercaptoethanol pro 500 ml zugesetzt. ß-Mercaptoethanol dient zur Stabilisierung von SH-Gruppen. Dieses Medium wurde bei der radioaktiven Melaninbestimmung verwendet.

4.2.7 Zusätze zu den Zellkulturmedien (Wachstumsfaktoren, Hormone, Vitamine)

Mit den heute zur Verfügung stehenden Kulturbedingungen können Melanozyten aus kleinen Hautproben gewonnen und herangezüchtet werden, um genügend Zellen für experimentelle Untersuchungen zu erhalten.
Mit der Möglichkeit der Gewinnung einer reinen Melanozytenkultur (46) wurden die Kenntnisse über die Wirkungsmechanismen der gebräuchlichen Mediumadditiva und die spezielle Bedeutung der jeweiligen Substanzen vertieft. Zu den wichtigsten Medienzusätze zählen: **Rinderhypophysenextrakt** (170), **4-O-Methyl-12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-3-Acetat (TPA), Choleratoxin** (46, 98), **der basische Fibroblasten- Wachstumsfaktor** (69, 70) und **Isobutylmethylxanthin (IBMX)** (98).

Die mitogene Wirkung von **Rinderhypophysenextract (BPE)** wird auf dessen hohen Gehalt an basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) zurückgeführt (56).

TPA bewirkt rezeptorvermittelt phänotypisch reversible Zelltransformationen durch die Aktivierung der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase C (32, 41, 43).

Choleratoxin ist ein guter Wachstumspromotor epithelialer Zellen, stammt von V. cholerae und aktiviert irreversibel die Adenylatzyklase. Das Toxin durchdringt die Zellmembran und addiert covalent die ADP-Ribosylgruppe von intrazellulärem NAD+ an die Alpha-Untereinheit von G_s-Proteinen. Die irreversibel modifizierte $G_{s?}$-Einheit aktiviert die Adenylatzyklase, ohne GTP hydrolisieren zu können. Somit bleibt GTP an $G_{s?}$ gebunden und die Adenylatzyklase ständig aktiv. Unter der

Wirkung Choleratoxins kann der intrazelluläre cAMP-Spiegel um mehr als das 100fache gesteigert werden (31, 74, 85). Wird zugleich der Abbau von cAMP durch die Hemmung der Phosphodiesterase mit **Isobutylmethylxanthin (IBMX)** gehemmt, kann der Effekt von Choleratoxin noch gesteigert werden (1).

Melanozytenstimulierendes Hormon (MSH)

Alpha-MSH ist ein Pepithormon mit 13 Aminosäuren, dessen Primärstruktur mit dem C-Terminus von ACTH identisch ist. Es wird bei Wirbeltieren in der Pars intermedia aus dem Vorläufermolekül Proopiomelanocortin hydrolytisch gebildet und bewirkt in der Haut von Amphibien und Fischen die Ausbreitung der Melanophoren. Seine Rolle bei Säugern und speziell bei Menschen ist noch nicht gänzlich geklärt. Es erhöht die Tyrosinaseaktivität über einen cAMP-mediierten Mechanismus (6, 55, 76). Da inzwischen eine Reihe weiterer Funktionen von Alpha-MSH bekannt sind wie z.B. die Modulation der immunologischen Reaktion, wird es auch als ubiquitäres Zytokin mit pigmentstimulierenden Effekten angesehen (128). Es konnte auch gezeigt werden, dass es beim Menschen wahrscheinlich auch in der Haut gebildet werden kann und durch UV-Strahlen induzierbar ist (15).

Steroidhormone

Melanozyten reagieren auf verschiedene Steroidhormone. Hyperpigmentierungen bei Schwangeren sind hierfür ein klinisches Beispiel (154). Die Hyperpigmentierungen korrelieren mit dem Östrogenspiegel. Progesteron und Androgene haben ähnliche Wirkungen. Welche funktionelle Rolle Steroidhormone und die besonders bei Melanomzellen vermehrt auftretenden Steroidrezeptoren spielen, ist noch unklar (49, 36).

Insulin wirkt bei zahlreichen Zellspezies rezeptorvermittelt als Induktor der Zellproliferation. Die Zellen reagieren innerhalb weniger Minuten auf den Zusatz von Insulin durch eine erhöhte Glucoseaufnahme. Für diese Sorfortreaktion ist keine de-novo Proteinsynthese notwendig. Die Bindung von Insulin an den membranständigen Rezeptor induziert die vermehrte Fusion permeasehaltiger Vesikeln mit der Zellmembran (39). Während für die Erhöhung der Glukoseaufnahmerate sehr niedrige Insulinkonzentration ausreichen (10^{-9}-10^{-10} mol/l), sind für die Wachstums-Stimulierung etwa 10^{-7} mol/l Insulin notwendig. Der

Rezeptor für Insulin hat ähnlich wie der EGF- Rezeptor Tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität (88). Man nimmt an, dass die Phosphorylierung verschiedener zytosolischer Proteine die Grundlage der Wachstumsförderung bildet. Die Identität und Funktion der phosphorylierten Proteine sind noch nicht vollständig bekannt.

Vitamin D3 (Cholecalciferol) erhöht in Kulturen menschlicher Melanozyten die Tyrosinasesynthese und erhöht die Dendritenzahl. Da Vitamin D3 photochemisch unter UV-Einwirkung gebildet wird, könnte dies zum Teil die sonnenbedingte Hautbräunung erklären (161). Bei Studien mit Melanozytenkulturen aus dem Präputium von Neugeborenen konnte diese Wirkung weder bei biologisch aktivem Vitamin D3 noch bei Metaboliten des Vitamin D-Stoffwechsels gefunden werden (105). Andere Autoren wiederum zeigten, dass Vitamin D3 von Melanozyten internalisiert werden kann und an spezifische Rezeptoren bindet (140). In Mäusehaut bewirkt Cholecalciferol eine Erhöhung von Dopa-positiven Melanozyten (2, 128). Die widersprüchlichen Aussagen lassen zur Zeit noch keinen endgültigen Schluß über die Bedeutung von Vitamin D für die Kontrolle der Melanogenese zu.

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist identisch mit Urogastron, einem Faktor, der ursprünglich aus Urin isoliert wurde und die Sekretion von Magensäure inhibiert (62). EGF wird in sehr unterschiedlichen Organen gebildet und wirkt nicht speziesspezifisch bei vielen verschieden Zelltypen (30). Das 6400 Da große globuläre Proteine mit 53 Aminosäuren hat 3 für seine biologische Aktivität essentielle Disulfidbrücken. Der EGF gehört zu einer Famile von Faktoren, die funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen und zum Teil an denselben Rezeptor binden (z.B.TGF-? , Vaccina Virusfaktor, shope fibroma growth factor, marcophage growth factor). Der EGF-Rezeptor ist ein Transmembranglycoprotein, das auf fast allen Zelltypen exprimiert wird. Die zytoplasmatische Seite des Receptors besitzt eine Tyrosin-Phosphokinase-Aktivität, die den Rezeptor selbst und andere zytoplasmatische Proteine phosphorylieren kann. Als second messenger fungiert Phosphatidylinositol. Für den proliferationsstimulierenden Effekt ist die Kinaseaktivität vermutlich essentiell. Zellen mit mutiertenRezeptoren, die EGF binden können, aber keine Kinaseaktivität aufweisen, werden nicht stimuliert. Die intrazelluläre Domäne des Rezeptors hat große Ähnlichkeit mit oncogenen Produkten wie c-erb B, v-erb B und Neuoncogen (67).

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren wirken in den Melanozytenkulturen stark mitogen. Es gibt 2 Haupttypen des FGF, die aufgrund ihres isoelektrischen Punktes unterschieden werden. Beide wurden ursprunglich aus Hirngewebe isoliert und haben eine hohe Affinität zu Heparin. Bei der Kultivierung der Hautzellen ist der von Keratinozyten sezernierte basische Fibroblasten growth factor besonders nützlich. Da Keratinozyten bFGF sezernieren können, nimmt man an, dass dieser Wachstumsfaktor wesentlich zu dem mitogenen Effekt von Keratinozyten oder Keratinozytenkulturüberständen auf Melanozyten beiträgt (26, 70). Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) ist ein potentes Mitogen für Melanozyten und kann in Melanozytenkulturen Phorbolester wie TPA ersetzen (69). Die mitogene Aktivität von Keratinozytenextrakten kann mit neutralisierenden Antikörpern gegen bFGF inhibiert werden. Dies spricht ebenfalls für eine zentrale Rolle des bFGF bei der Interaktion zwischen Keratinozyten und Melanozyten.

Nervenwachstumsfaktor (NGF) wirkt auf Melanozyten nicht mitogen, sondern induziert morphologische Veränderungen mit einer Zunahme der Dendriten. Dieser Effekt wird in Anwesenheit von Keratinozyten, die den NGF exprimieren können, verstärkt. In der Cokultur ist außerdem eine höhere Sensibilität für UV-Strahlen und dem damit verbundenen Anstieg der Melanogenese zu beobachten. Dies zeigt, dass auch der NGF an dem Zusammenspiel von Keratinozyten und Melanozyten beteiligt ist (175).

4.3 Verwendete Methoden

4.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden, wie unter „Passagieren der Zellen“ beschrieben, die Zellen abgelöst und suspendiert, der Suspension ein Aliquot von 100 µl entnommen und in der Neubauer- Zählkammer 2-fach im Lichtmikroskop (40x Vergrößerung) ausgezählt (Doppelbestimmung). Aus der Zählung, dem bekannten Suspensionsvolumen und der gegebenen Größe der Zählkammer lässt sich die Zellzahl der Suspension und damit die nötige Verdünnung für die Versuchsansätze bestimmen (133).

Berechnung:

$$\frac{100 \times 5 \times \text{Zellzahl} \times \text{ml Zellsuspension}}{0{,}4}$$

4.3.2 Bestimmung der Vitalität

4.3.2.1 Trypan-Blau-Test

Diese Methode beruhte auf dem dunkelblauen Anfärben avitaler Zellen durch die Trypanblau-Lösung. Die Lösung bestand aus: 0.4% Trypanblau, 0.8% NaCl und 0.06% K_2HPO_4, die sorgfältig steril gemischt und filtriert wurden.
Der Test war leicht und schnell durchzuführen, sowohl direkt in Zellkulturgefäßen als auch in der Neubauer-Zählkammer bei der Zellzahlbestimmung.
Bei der Zellzahlbestimmung (nach dem Ablösen und Zentrifugieren der Zellen wie bei „Passagieren der Zellen“) wurde Trypanblau-Lösung mit Zellsuspension im Verhältnis 1:1 gut gemischt und in das Hämozytometer überführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben im Lichtmikroskop (40 x Vergrößerung) ausgezählt. Dabei wurde die neue Verdünnung berücksichtigt.

Berechnung unter Berücksichtigung der Verdünnung durch die Trypan-Blau-Lösung:

$$\frac{100 \times 5 \times \text{Zellzahl} \times \text{ml Zellsuspension} \times 2}{0{,}4}$$

Während der Durchführung der Versuche wurde die Trypan–Blau-Lösung direkt in die Zellkulturgefäße (Microtiterplatten, Zellkulturflaschen) im Verhältnis 1:1 zum Kulturmedium gegeben, um die prozentuale Vitalität mittels Lichtmikroskop zu bestimmen.

4.3.2.2 Vitalitätsbestimmung mittels MTT-Test

Die Vitalität der Zellen wurde auch mit dem MTT-Assay (CellTiter 96R AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison WI USA) bestimmt.
MTT (3-[4,5-Dimethyl-2]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolinum bromid) ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, der durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem blauen wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Diese Umwandlung vollzieht sich ausschließlich in lebenden Zellen und spiegelt die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wieder. Der Farbumschlag ist zudem der Anzahl der vitalen Zellen proportional. Die Konzentration des reduzierten blauen Farbstoffes wurde photometrisch gemessen.

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 in 96-Microtiterplatten mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen, gelöst im Kulturmedium, inkubiert (n=10). Danach wurde das Medium abgesaugt und die Wells wurden sorgfältig mit Passagiermedium (RPMI 1640) gewaschen. Frisches MGM2-Kulturmedium (jeweils 100 µl pro Well) und MTT-Lösung (jeweils 20 µl pro Well) wurden zugegeben und die Zellen damit 2 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. In dieser Zeit hat sich das Medium bräunlich verfärbt. Die Microtiterplatten wurden im Dunkeln zum Elisaphotometer transportiert und bei 492 nm abgelesen (MTP Reader EAR 400 ATC, SLT Labinstruments, Österreich).

Ergebnisse der MTT-Messung:

Je höher der gemessene Extinktionswert, desto größer die Konzentration des Farbstoffes und damit der Anteil an vitalen Zellen in der untersuchten Probe. Die Ergebnisse werden als prozentualer Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe unbehandelter Zellen dargestellt:

$$\% \text{ Vitalität} = [\text{Extinktion(Test)} : \text{Extinktion(Kontrolle)}] \times 100$$

4.3.3 Bestimmung der Proliferation

Der Proliferationstest wurde nach der Methode von Hearing et al. (156) durchgeführt. Die Zellen wurden in der Zahl von 20 000 Zellen pro Well, pro 3 ml MGM-Medium, in die 6-Wells-Microtiterplatten (Greiner, Frickenhausen) ausgesät und über Nacht bis zur Adherenz bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, außer bei der Kontrolle, bei der nur Mediumwechsel erfolgte. Die Zellen wurden über 4 Tage (37°C; 5% CO_2) inkubiert. Dabei wurde nach 2 Tagen ein Mediumwechsel mit der gleichen Konzentration der zu untersuchenden Substanz vorgenommen. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, die Wells wurden mit 3 ml RPMI 1640 gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin/ EDTA trypsinisiert. Das Trypsin wurde nach 5 min mit 2,5 ml MGM-Medium inaktiviert. Nach dem sorgfältigen Suspendieren der Zellen in den einzelnen Wells wurde ein Aliquot von 100µl entnommen und in 96-Wells überführt (n=10).

Bei nicht adherenten Zellen (besonders bei der höchsten Konzentration der zu testenden Substanz) wurde der Inhalt in ein 15 ml Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt. Die Wells wurden sorgfältig 2 x mit 2 ml RPMI 1640 nachgewaschen und die Waschlösung zum Rest dazugegeben, um alle Zellen zu erfassen. Nach der Zentrifugation wurde das entstandene Pellet in 5 ml MGM-Medium suspendiert und 100 µl Aliquot (n=10) in 96-Wells überführt. Die Zellen wurden über Nacht bis zur Anheftung inkubiert (37°C; 5% CO_2) und am nächsten Tag wurde der MTT-Assay durchgeführt. Nach 2 Stunden Inkubation (37°C; 5% CO_2) wurden die Extinktionswerte abgelesen.

4.3.4 Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels FACS

In den frühen Apoptosestadien treten in der Zellmembran verschiedene Erscheinungen auf, zu den auch die Translokation des Phosphatidylserin (PS) gehört (7, 37, 50). Im normalen physiologischen Zustand befindet sich dieses Lipid auf der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran. Bei Apoptose wird es an der Oberfläche exponiert (166).

Annexin (ist ein Ca^{2+}-abhängiges , Phospholipid bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS (166). Aus diesem Grund wird Annexin zum Detektieren apoptotischer Zellen verwendet.
Die Anfärbung des Phosphatidylserin auf der äußeren Membran der apoptotischen Zellen wurde unter Verwendung von Annexin-V-Fluos (Roche, Mannheim) durchgeführt. Zur Abgrenzung der nekrotischen Zellen wurde zusätzlich eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt.

Folgende Lösungen wurden hergestellt:

Inkubationspuffer: 10 mM Hepes/ NaOH (ph 7,4), 140 mM NaCl, und 5 mM $CaCl_2$.

Propidiumiodid-Lösung (PJ): Ansatz aus einer Stammlösung , 50 µg/ml.

Annexin-V-Fluos Markierungslösung: Verdünnung von 20 µl der Annexin-V-Fluos Stammlösung in 1000 µl Hepes-Puffer mit Zugabe von 20 ml PJ.

Die Zellen wurden in der Zahl von 250 000 Zellen pro Well, pro 3 ml MGM-Medium, in die 6-Wells-Microtiterplatten (Greiner, Frickenhausen) ausgesät und über Nacht bis zur Anheftung bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, außer bei der Kontrolle, bei der nur Mediumwechsel erfolgte. Die Zellen wurden über 24 Stunden (37°C; 5% CO_2) inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden trypsinisiert, 15 min in 50% FBS inkubiert (um die Zellmembranintegration wiederzustellen) und anschließend 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Annexin-V-Fluos Markierungslösung resuspendiert und 15 min bei 20°C inkubiert. Danach wurde 0,4 ml Inkubationspuffer hinzugegeben und die Analyse der Zellen im FACScan (Celibur, Beckton Dickinson USA, Cellquest Software) durchgeführt.

Die Anregung erfolgte bei 488 nm, die Fluoreszenz des Fluoresceins wurde bei 515 nm, die des PJ bei 560 nm gemessen.
Das FACScan Gerät wurde auf eine Stichprobe von 10 000 Zellen eingestellt. Diese Stichprobe wurde durch wellenlängen-spezifische Detektion der Fluoreszenz

ausgezählt und auf die gesamte Zellzahl hochgerechnet. Je nach Qualität der erhaltenen Verteilungen sind dadurch Mehrfach-Messungen möglich. Jede fluoreszierend markierte Zelle emitiert je nach Markierung Licht spezifischer Wellenlänge, dessen Intensität von der Zellgröße, der Zellbreite und der Zellfläche abhängt. Mittels Photomultiplier (PMT, Photomultiplier tube) wird ein elektrisches Signal erhalten, das proportional zu der emitierten Lichtmenge und damit zur Zahl der markierten Zellen ist.

Die erhaltenen Daten wurden durch die Gerätesoftware in Form von Histogrammen dargestellt. Die Achsen der Histogramme zeigen jeweils die Intensität der jeweiligen Farbstoff-spezifischen Fluoreszenz an. Damit lässt sich jede Zelle nach ihrer Fluoreszenz einem Punkt des Histogramms zuordnen.

Jedes Histogramm ist in 4 Quadranten eingeteilt, in denen sich je nach Anfärbung der jeweiligen Zellpopulation Häufungen zeigen. Im rechten oberen Quadranten zeigt sich bei Zellhäufung z. B. eine bevorzugte Anfärbung mit beiden Farbstoffen. Apoptotische Zellen finden sich durch die bevorzugte Färbung mit Annexin V im rechten unteren Quadranten. Eine geringe Anfärbung mit beiden Farbstoffen findet sich im linken unteren Quadranten als Ausdruck unveränderter Zellen.

4.3.5 Enzymatische Differenzierung der Apoptose durch Caspasen

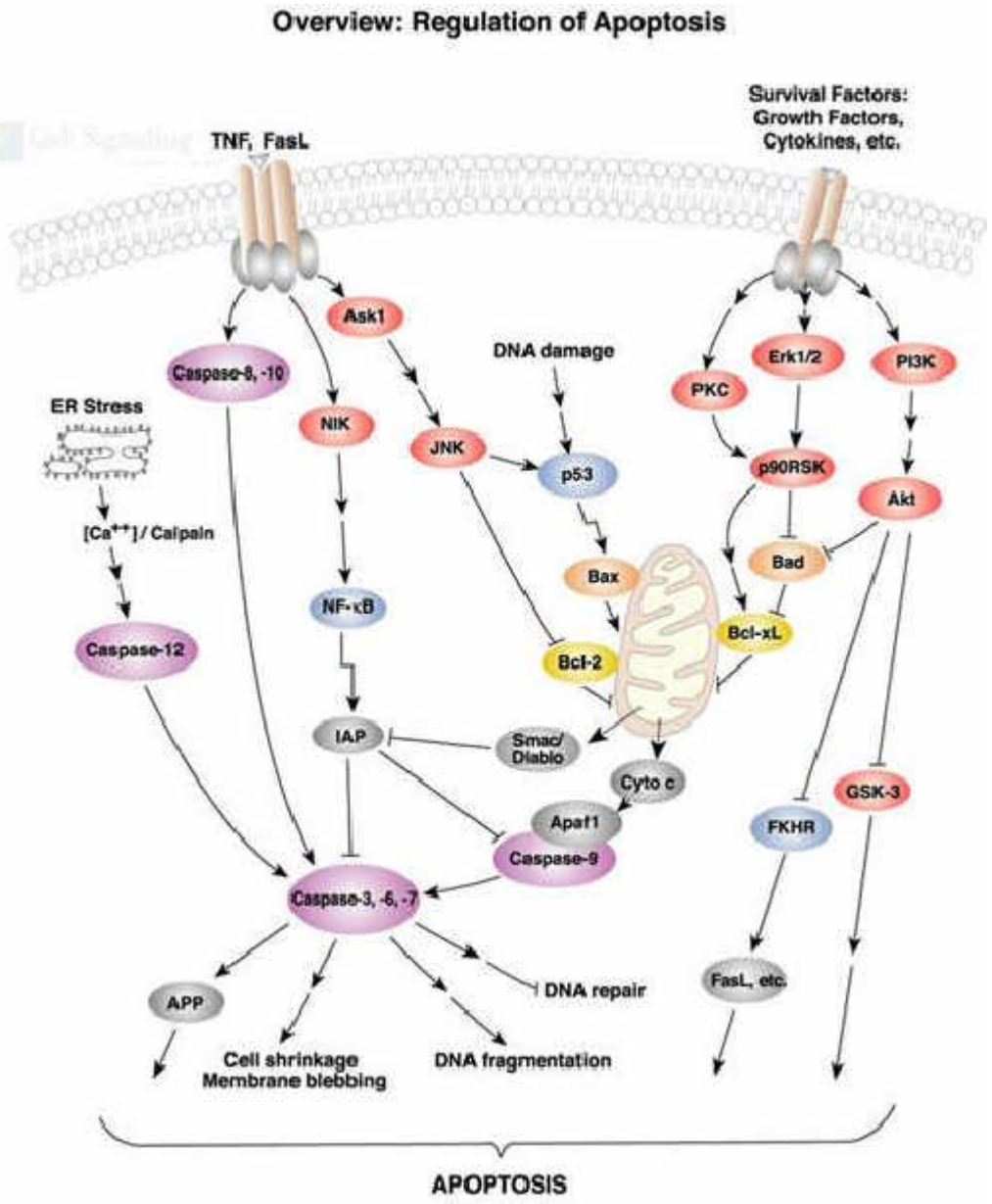
Eine führende Position in der Apoptosekaskade haben die Caspasen (**C**ysteinyl **As**partate-specific protein**ase,** 125). Diese Enzyme tragen ein Cystein im aktiven Zentrum und spalten nach einem Aspartat. Sie werden als inaktive Procaspasen synthetisiert.

Sog. Initiator- oder „upstream"- Caspasen (Caspase 8, 9, 10 und 12) werden durch pro-apoptotische Signale aktiviert und spalten die sog. Effektor- oder „downstream"- Caspasen.

Zur Eliminierung der Zelle führen die Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7), die die Zerstörung der Zell-Zell Interaktionen und des Zytoskeletts bewirken, die Fragmentierung der DNA und schließlich die Abschnürung der„apoptotic bodies".

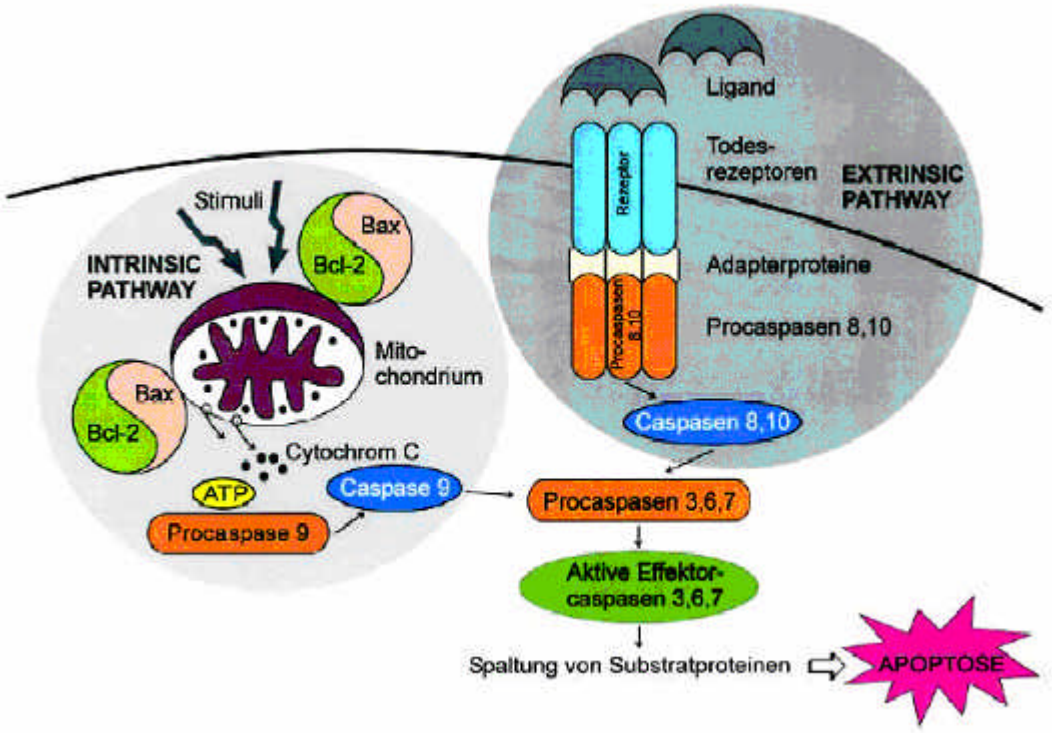
Die Aktivierung der Caspasen geht mit einer komplexen Signaltransduktionskaskade einher (siehe Abbildung 2, nächste Seite).

Abbildung 2 : Regulation der Apoptose im Überblick
(www.newenglandbiolabs.de/newpcst_d.html)



Dabei können die Mechanismen der Apoptose über die extrinsische bzw. intrinsische Signalkaskade („extrinsic“ oder „intrinsic pathway“) vermittelt ablaufen (siehe Abbildung 3, nächste Seite).

Abbildung 3 : Schema der Apoptosekaskade
(www.med.uni-heidelberg.de/anaes/download/10500905.pdf)



Bei der extrinsischen Apoptosekaskade handelt es sich um eine Rezeptor-vermittelte Reaktion, die durch die „Todesrezeptoren“ (z.B. Fas-/TNF-Rezeptor) der Superfamilie der TNF (tumor necrosis factor) und NGF (nerve growth factor) initiiert wird. Durch die Bindung der Rezeptor-spezifischen Liganden (z.B. FasL/TNF?) werden die Rezeptoren oligomerisiert. Die Initiator-Procaspasen 8 und 10 werden über Adapterproteine (z.B. FADD) an den Rezeptor-Liganden-Komplex gebunden und dort aktiviert (death inducing signaling complex DISC: 8, 9, 130).
Die intrinsischen Apoptosekaskade wird durch eine mitochondriale Dysfunktion induziert. Wegen einer erhöhten Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran wird das Cytochrom c in das Zytosol freigesetzt. Das Cytochrom c rekrutiert über das Adapterprotein Apaf-1 (Apoptosis protease actvating factor) die Procaspase 9 (131), welche auf diese Weise aktiviert wird. Eine wesentliche Rolle in der intrinsischen/mitochondrialen Apoptose spielt die Balance von Proteinen der Bcl-2-Familie. Die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2 und Bcl-xL), die im physiologischen Zustand in der Mitochondrienmembran liegen, verhindern die Cytochrom c-Freisetzung im Gegensatz zu den pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine

(Bax, Bad, Bim und BID), die nach entsprechender Stimulierung in die Mitochondrienmembran wandern und die Cytochrom c-Freisetzung begünstigen (63, 150).
Trotz einer Schematisierung der Apoptose und ihrer Gliederung in zwei Kaskaden wäre eine Vorstellung von zwei unabhängig voneinander ablaufenden Reaktionen falsch. So aktiviert beispielsweise die Caspase 8 (Initiatorcaspase der extrinsischen Apoptosekaskade) das pro-apoptotische Bcl-2-Protein BID und dieses wiederum aktiviert Bax, welches die Cytochrom c-Freisetzung stimuliert (100).
Die gemeinsame Endstrecke beider Apoptosekaskaden stellt die Aktivierung der Effektorcaspasen (3, 6 und 7) dar. Es ist anzunehmen, dass nach Apoptoseinduktion, gleich durch welchen „pathway“, letztendlich alle Caspasen und die meisten proapoptotischen Faktoren in der sterbenden Zelle aktiviert werden.

SDS-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Verfahren, mit dem eine Mischung von Proteinen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes getrennt wird.
Die Wandergeschwindigkeit der Proteine von der Kathode zur Anode wird durch ihre Masse bestimmt, die proportional zur Ladung der mit SDS behandelten Proteine ist.
Das SDS-Natriumdodecylsulfat ist ein stark negativ geladenes Detergenz, das alle nicht-konvalenten Bindungen in Proteinen zerstört und an hydrophobe Regionen bindet, wodurch es auch die Zellen lysiert. Die negativen Ladungen der gebundenen SDS-Moleküle stoßen sich ab und alle Proteine dissozieren in ihre Untereinheiten, wodurch sich die einzelnen Polypeptidketten vollständig entfalten können. Die linearen Polypeptidketten zeigen alle nahezu gleiche Ladungs/Masse-Verhältnisse.
Die Auftrennung erfolgte in einem Polyacrylamid-Gel, das aus Acrylamid-Monomer hergestellt wurde. Dabei richtet sich der Gehalt an Acrylamid nach der Größe der zutrennenden Proteine, d.h. die Auftrennung von Proteinen der Größe 35-60 kDa erfolgte in einem 12%-igen Gel.

Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden in 6- wells-Microplatten mit der Dichte von 5 x $10^{(5)}$ /6-well/ 2 ml MGM2-Medium ausgesät (n=3) und bis zur Anheftung über Nacht bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch ein frisches Medium mit unterschiedlich konzentriertem Malassezin ersetzt. Die Inkubation wurde für 2, 4 und 6 Stunden durchgeführt.

Nach der Entfernung des Mediums wurden die Wells einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden pro Well 80 µl von 3-fach SDS-Sample-Buffer (siehe Tabelle) zugegeben und für 5 min einwirken gelassen. Anschliessend wurden die Zellen mit Cellscrapers abgescharbt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Abzentrifugieren erfolgte viermalige Ultrabeschallung.

Tabelle 11 : Zusammensetzung des 3fach SDS-Sample-Puffer

Stoff	**Konzentration**	**Menge pro 100 ml 3fach SDS-Sample Puffer**	**Firma**
Tris	187,5 mM	2,27 g	USB, Cleveland, OH, USA
SDS	6%	6 g	ICN Biomedicals, Aurora,OH, USA
Glycerol	30%	30 ml	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	150 nM	2,3 g	Sigma, Tautkirchen
Bromphenolblau	0,3%	0,3 g	Merck, Darmstadt

Als Vorbereitung für die Gelelektrophorese wurden die Zellen mit 3fach SDS-Sample-Puffer behandelt.

Vorbereitung der Polyacrylamid-Gele

Zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurden 2 Gele: ein Sammel- und ein Trenngel aus entsprechenden Schichten gegossen.

Über dem eigentlichen Trenngel wurde das Sammelgel gegossen, das wenig Acrylamid enthielt. Zweck seiner Verwendung war, die Proteine zunächst an der Sammelgel / Trenngel- Grenzfläche zu sammeln, um anschließend bei höherer Spannung einen gleichzeitigen Übergang der Proteine in das Trenngel zu gewährleisten.

Dazu wurden zwei zusammengehörige Platten durch zwei am Rand gelegte Spacer (Peqlab, Erlangen) getrennt, in eine Geltasche gesteckt und in einem Gelgießstand eingespannt. Die Sammel- und Trenngellösungen wurden bis auf die APS (Ammoniumperoxisulfat-Lösung, Polymerisationsinitiator) in je einem 50 ml Zentrifugenröhrchen angesetzt.

Tabelle 12 : Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels:

Bestandteil	**12% Trenngel**	**Sammelgel**	**Firma**
Acrylamid/Bisacrylamid	6 ml	1,3 ml	Roth, Karlsruhe
4 x Tris/HCl pH 8,8 *	3,75 ml	--	USB, Cleveland, OH, USA
4 x Tris/HCl pH 6,8**	--	2,5 ml	USB, Cleveland, OH, USA
Aqua ad iniectabilia	5,25 ml	6,1 ml	
TEMED	10 µl	1 0 µl	Merck, Darmstadt
10% APS-Lösung (1g/ 10 ml)	100 µl	100 µl	Roth, Karlsruhe

* 1,5 M Tris (18 g/100 ml) und 0,4% SDS (0,4 g /100 ml)

** 0,5 M Tris (6,05 g/100 ml) und 0,4% SDS (0,4 g /100 ml)

Zunächst wurde der Sockel gegossen, für den 2 ml Trenngel-Lösung mit 200 µl APS-Lösung in einem 15 ml Zentrifugeröhrchen gemischt wurden und jeweils 1 ml davon zwischen die Glasplatten pipettiert wurde. Zu der restlichen Trenngel-Lösung wurden 100 µl APS-Lösung zugegeben und 4 ml dieser Mischung über den Sockel einpipettiert. Zur Verdrängung von Luftblasen wurde das gegossene Trenngel mit Ethanol überschichtet. Nach einer halben Stunde (Zeit der Gelpolymerisation) wurde das Ethanol abgegossen und das Sammelgel über das Trenngel einpipettiert (nach Zugabe von 100 µl der APS-Lösung). Zur Aussparung der Taschen (zur Beladung) wurde zwischen die Platten in das Sammelgel ein Kamm (Peqlab, Erlangen)

eingeführt. Nach der Polymerisation dieser Gelschicht wurden die Glasplatten mit dem Gel aus den Geltaschen genommen und indie Gelelektrophorese-Vorrichtung eingespannt. Die Gelelektrophorese-Vorrichtung wurde bis zu den Markierungen mit 1 x Läemmli-Puffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin und 0,1% SDS, pH 8,3) aufgefüllt und das Gel mit den Proben (15 µl/Tasche) geladen.
Zusätzlich wurde pro Gel ein Protein-Molekulargewichts-Marker (Mischung bekannter Proteine) aufgetragen. Zuerst wurde eine Spannung von 80V angelegt (bis die Proteine zur Sammelgel / Trenngel-Grenzfläche gewandert waren), dann wurde sie auf 120V erhöht. Die Elektrophorese wurde bei Erreichen der gefärbten Lauffront am Sockel gestoppt. Anschließend erfolgte eine Western-Blot-Analyse.

Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist ein sehr empfindliches und spezifisches Verfahren zum Protein-Nachweis.
Zuerst werden die Proteine mittels der SDS-Gelelektrophorese getrennt, um dann durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine PVDF-Membran transferiert zu werden. Diese Membran wurde dann mit dem Primär-Antikörper inkubiert, der spezifisch gegen das gesuchteProtein gerichtet ist. Zur Detektion des an der Membran gebundenen Primär-Antikörpers wird ein enzymmarkierter Zweit-Antikörper eingesetzt. In dieser Arbeit wurden die Antikörper gegen Caspase 8 und 9 eingesetzt. Der entsprechende Zweit-Antikörper war mit Horseradish-Peroxidase (HRP, Cell Signaling, Beverley, MA, USA) gekoppelt.
Die Membran und das Filterpapier wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz mit Methanol gewaschen und in Towbin (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol, pH 8,3) inkubiert, ebenso das Gel und die Transfer-Pads.
Der Protein-Transfer erfolgte nach folgendem Sandwich-Verfahren: Kathode, Transfer-Pad, Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, Filterpapier, Transfer-Pad, Anode wurden in dieser Reihenfolge zusammengefügt und in die Blotting-Kammer eingesetzt. Die so vorbereitete Blotting-Kammer wurde mit Towbin aufgefüllt und eine Spannung von 50V wurde für 45 min angelegt.
Danach wurde die Membran mit dem Gel eine Stunde mit dem Blocking-Puffer (5% BSA) und dann über Nacht in der Primär-Antikörper-Lösung inkubiert.

Am nächsten Tag, nach der Entfernung der Antikörper-Lösung, wurde die Membran 3x mit TBS-T (Tris buffered saline with 0,1% Tween, BioRad, Hercues, USA) gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem Zweit-Antikörper und ein Waschvorgang mit TBS-T (3x).
Zur Entwicklung der Proteinbanden wurde die Membran dann für 1-2 min mit LumiGlo (Cell Signaling, Beverley, MA, USA) inkubiert.
Nach der Enfernung des Entwicklers konnte die Membran auf einen Röntgenfilm exponiert und anschließend entwickelt werden.

Tabelle 13 : Verwendete Antikörper im Western -Blot

Primär/Erst-Antikörper	**Zweit-Antikörper**	**Blocking-Puffer**
Caspase 8 Cell Signaling, Beverley, MA, USA Molekulargewicht: 57 kDa, 43 kDa Verdünnung: 1: 2000	Anti-mouse IgG Antikörper Chalfont, UK Verdünnung: 1: 3000	(BSA)
Caspase 9 Cell Signaling, Beverley, MA, USA Molekulargewicht: 47 kDa, 35 kDa Verdünnung: 1: 1000	Anti-rabbit IgG Antikörper Cell Signaling MA, USA Verdünnung: 1: 3000	BSA

4.3.6 „Höchst-Färbung“ (Färbung mit HOE 33342)

Bei dem Farbstoff BisBenzimid (HOE 33342) handelt es sich um eine Substanz, die an adenin- und thymidinreiche Sequenzen bindet und somit spezifisch DNA im Zellkern anfärbt. Bei Vorliegen von apoptotischen Zellveränderungen werden dadurch charakteristische Veränderungen im Zellkern (apoptic bodies) sichtbar.

Der Farbstoff fluoresziert bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 360 nm blau.

Die Zellen wurden in den 4-wells-Lab Teks (Nunc) ausgesät ($1x10^5$/Well/750 µl MGM2.Medium) und über Nacht bis zur Anheftung bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden pro well 750 µl Medium mit Malassezin zugegeben und die Zellen wurden über 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, Stunden bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde das Medium abgezogen. Die Zellen wurden einmal mit PBS^{++} gewaschen und 30 min auf Methanol/Aceton (eiskalt, 1:1, 750 µl/Well) inkubiert. Danach erfolgte 3-faches Waschen mit PBS^{++}. 750 µl des Bisbenzimid-Farbstoffes (Fa. Riedel-de Haen,10 mg Farbstoff in 10 ml Aq. dest gelöst und 10-fach verdünnt mit PBS^{++}) wurden pro Well zugegeben und es folgte eine 30 min Inkubation bei 37°C, 5% CO_2. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Farbstofflösung abgezogen und die Zellen wurden 3 mal mit PBS^{++} gewaschen. Die Lab Teks wurden entrahmt und mit Immersionsöl (Mounting Fluit, Trinity Biotech) eingedeckelt. Danach erfolgte die mikroskopische Auswertung der Ergebnisse.

4.3.7 „Comet Assay" (single cell gel elektrophoresis assay)

Der **Comet Assay** (Apoptosis Detection Kits R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) auch **single cell gel elektrophoresis assay** genannt, ist ein empfindlicher Test, der die DNA-Schädigung in der Zelle detektiert und visualisiert. Das Prinzip des Tests basiert auf der Migration der denaturierten und gespaltenen DNA-Fragmente aus einer geschädigten Zelle unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes, während die unbetroffenen, spiralen Fragmente in der Zelle bleiben.
Die untersuchenden Zellen werden trypsinisiert und in einer flüssigen Agarose eingebettet. Nach der Behandlung mit einer alkalischen Lösung, die die eventuell bestehenden DNA-Fragmente denaturiert und hydrolysiert, wird die Elektrophorese durchgeführt und anschließend eine Färbung der Proben mit der fluoreszierenden Green Staining Solution.
Die schleifenförmigen DNA-Fragmente, „comets", die aus der Zelle auswandern, können auf diese Weise unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

50 x10^4 Zellen pro ein 6-well pro 2 ml MGM2-Medium wurden ausgesät und über Nacht bis zur Anheftung bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, außer bei der Kontrolle, bei der nur Mediumwechsel erfolgte. Nach 6 Std. Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS w/o Ca^{2+} und Mg^{2+} 2x gewaschen, trypsinisiert (2 ml Trypsin und 2 ml FKS) und bei 1200 U/min 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS w/o Ca^{2+} und Mg^{2+} aufgenommen und sorgfältig suspendiert. 50 µl der Suspension wurde mit 500 µl LMAgarose (42°C) vermischt und 75 µl der Mischung auf einen Superfrost Slide (Bestandteil des Comet Assays, vorbereitete Objektträger) pipettiert und über Nacht bis zur Trocknung im Dunklen bei 4°C gelassen.

Am nächsten Tag wurden die Proben ca. 1 Std. bei 4°C im Dunkeln in Lysis Solution (Bestandteil des Comet Assays) inkubiert und anschließend 30 min bei RT im Dunkeln in Alkali-Solution (frisch hergestellt aus 0,6 g NaOH Pellets, 250 µl 200mM EDTA und 49,75 ml Aq. dest.). Danach wurden die Proben 2 x 5 min bei RT in TBE buffer (108 g TrisBase, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA, 11 ml Aq. dest.) gewaschen und 10 min bei 25 V (1,786 V/cm) in der Elektrophoreseapparatur (BioRad, München) laufen gelassen.

Nach einem kurzen Abtropfen des TBE-Puffers wurden die Proben 5 min bei RT in EtOH fixiert und anschließend über Nacht bei 4°C zum Abtrocknen gelassen.

Am nächsten Tag wurden 50 µl Green Staining-Solution ((1 µl SYBR Green Stain in 10 ml TE buffer (pH 7,5; 12,11 mg Tris, 3,72 mg EDTA, für 50 ml Aq. dest.)) auf die Minigele pipettiert, die direkt danach unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden.

4.3.8 LDH-Freisetzung (Lactat-Dehydrogenase-Assay)

Zur Toxizitätsmessung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

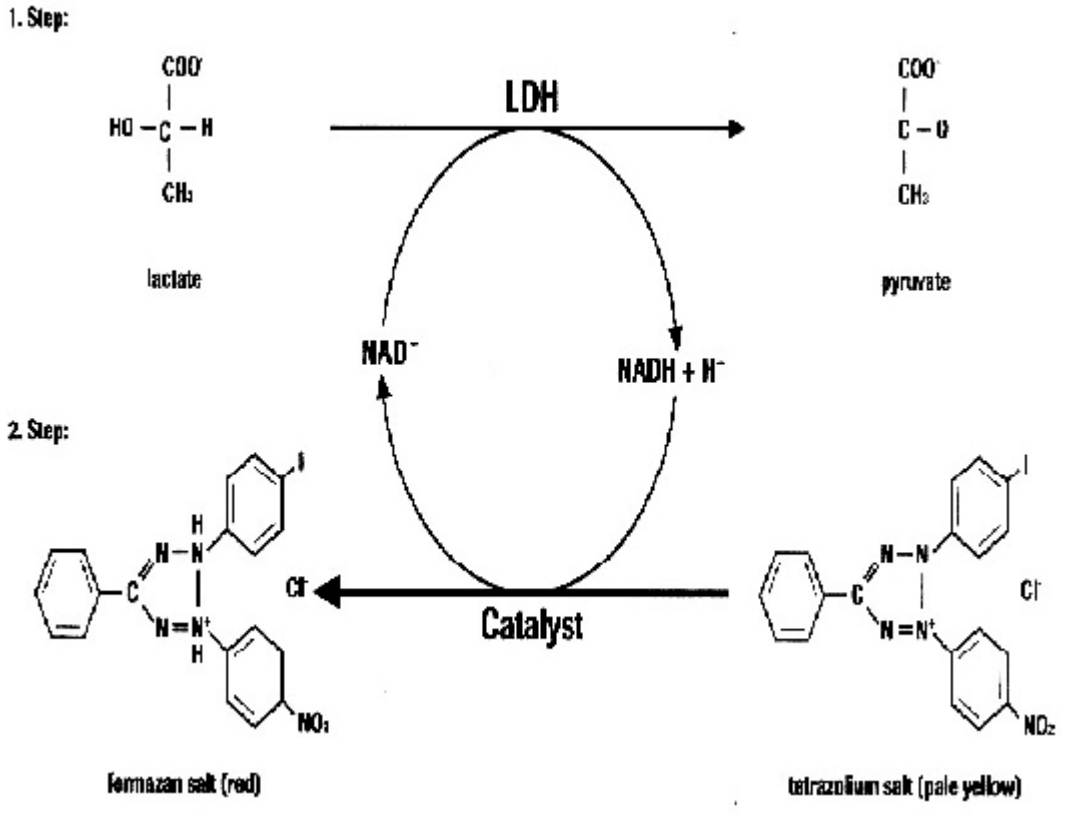
a) Unterscheidung geschädigter Zellen anhand des Färbeverhaltens gegenüber sogenannten „Vitalfarbstoffen“ wie Trypanblau, Eosin Y, Nigrosin oder Propidium Jodid. Dabei werden zerstörte lysierte Zellen nicht erkannt. Propidium Jodid wurde in der FACS-Analyse eingesetzt (siehe Kapitel 4.3.4: „Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels FACS“)

b) Freisetzung radioactiver Isotope (z. B. ^{51}Cr, ^{3}H-Prolin die zuvor in die Zellen eingebaut wurden, durch Schädigung der Zellen. Nachteile sind der Einsatz radioaktiver Isotope, die Notwendigkeit, die Zellen vor der eigentlichen Messung zu markieren sowie die hohe Spontanfreisetzung der Marker.

Deshalb wurde die Freisetzung eines zytoplasmatischen Enzyms alsMarker für toxische Einwirkungen verwendet.

Im LDH-Assay wird die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase im Zellüberstand bestimmt. LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, dass durch Einwirkung zytotoxischer Substanzen durch Zytolyse freigesetzt wird.
Die Messung erfolgt enzymatisch durch Umsetzung von zugegebenem Lactat zu Pyruvat unter Verbrauch von ebenfalls zugesetztem NAD^+, das zu $NADH^+$ umgesetzt wird. $NADH^+$ reduziert das als Reagenz zugesetzte Tetrazolium-Salz enzymatisch (Diaphorase) zum entsprechenden, wasserlöslichen, intensiv rot gefärbten Formazan, welches photometrisch bei 500 nm bestimmt wird. Dabei zeigt unverändertes, überschüssiges Tetrazolium-Salz keine Absorption bei 500 nm. Zur Messung wurde der „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ von Roche, Mannheim, verwendet.

Abbildung 4 (nächste Seite) : Schema der enzymatischen Reaktionen im LDH-Assay (Roche: Cytotoxicity Detection Kit, Instruction Manual, Version 5, 1999).



Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und5% CO_2 in 6-Well-Microtiterplatten mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen, gelöst im Kulturmedium, inkubiert (n=2). Gleichzeitig wurde eine„Background“ Kontrolle (2 ml MGM2-Medium ohne Zellen), eine“Low“ Kontrolle (spontane Freisetzung von LDH, Zellen mit 2 ml MGM2-Medium) und eine „High“ Kontrolle ((maximale Freisetzung von LDH durch vollständige Lyse der Zellen mit 2,760 ml MGM2 Medium und 240 µl Lyse-Puffer („Nonidet“, siehe auch Kapitel 4.3.11, „Melaninbestimmung mittels Einbau von ^{14}C-(U) Tyrosin“) durchgeführt. Danach wurde die 6-Well-Microtiterplatte zentrifugiert (10 Min. bei 250 g), ein Aliquot von 100 µl Medium von jedem Well in eine 96well-Microtiterplatte überführt (n=10) und Reagenz-Lösung (jeweils 100 µl pro Well) zugegeben und 30 min bei 15°C inkubiert. In dieser Zeit verfärbte sich das Medium rötlich. Die Microtiterplatten wurden im Dunkeln zum Elisaphotometer transportiert und bei 492 nm abgelesen (MTP Reader EAR 400 ATC, SLT Labinstruments, Österreich).

Auswertung der LDH-Messung:

Die steigende Anzahl der avitalen Zellen oder der mit beschädigter Membran ist proportional der erhöhten LDH-Aktivität im Zellüberstand. Die enzymatische LDH-Aktivität korreliert direkt mit der Konzentration des entstandenen Formazans. Damit ist seine Konzentration proportional zur Anzahl der avitalen oder toxisch beschädigten Zellen.

Berechnung der Zytotoxizität (%):

$$\frac{(\text{Experimentelle Probe} - \text{„Low“ Kontrolle}) \times 10^{2}}{\text{„High“ Kontrolle} - \text{„Low“ Kontrolle}}$$

4.3.9 Reversibilität der Veränderungen

Nachdem die zellulären Veränderungen einer Substanz zugeordnet werden konnten, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen inkubiert und die Veränderungen (nach 4 Std. der Einwirkungszeit, nach der die Veränderungen festzustellen sind) unter Mediumwechsel ohne Substanz über längere Zeit beobachtet, um z. B. eventuelle Reversibilität zu finden. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Morphologie, Konfluenz, Proliferation und Vitalität über 3 Wochen (Verdopplungszeit normaler Zellen) untersucht.

4.3.10 Einfluss von DMSO

DMSO - Dimethyl Sulfoxid - wurde in der Zellkultur als Lösungsmittel für die zu testenden Stoffe angewendet.
Dieser Stoff weist in höheren Konzentrationen toxische Wirkung auf die epithelialen Zellen, insbesondere ihre Membranen, auf. In den durchgeführten Versuchen wurde ein Anteil an DMSO von 1 µl pro 1 ml Medium nicht überschritten. Um die Wirkung von DMSO auf die Zellen zu charakterisieren, wurde eine Verdünnungsreihe mit den verwendeten Konzentrationen von DMSO angesetzt. Die damit behandelten Zellen wurden auf Vitalität, Proliferation, Nekrose und Apoptose geprüft, mittels der früher beschriebenen Methoden:

1. Vitalität mittels Trypan-Blau-Tests
2. Vitalität mittels MTT-Tests
3. Proliferation mittels MTT-Tests
4. Apoptotische Wirkung mittels FACS
5. Nekrotische Wirkung mittels FACS
6. Toxische Wirkung über LDH-Freisetzung

4.3.11 Melaninbestimmung mittels Einbau von ^{14}C-(U) Tyrosin

Die radioaktive Melaninbestimmung wurde nach der Methode von Victoria M. et al. durchgeführt (168).

Die vitalen Zellen wurden mit Hilfe des Trypan-Blau Tests im Hämozytometer ausgezählt, in 6-Wells Platten zu je 20 000 Zellen pro Well ausgesät und bis zur Adherenz bei 37°C, 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Jede zu testende Substanz wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen geprüft (n=4 pro Substanz und Konzentration). Es erfolgte gleichzeitig eine Kontrolle mit unbehandelten Zellen und eine Kontrolle mit einem bekannten Inhibitor der Melaninsynthese (Kojic Acid, Sigma, Deisenhofen) in 3 verschiedenen Konzentrationen.

Am nächsten Tag wurde das modifizierte MGM-Medium durch Medium mit den zu testenden Substanzen gewechselt. Als Marker der Melaninsynthese wurde hier L-[U-^{14}C]–Tyrosin (Ammersham, Freiburg) benutzt. Das radioaktiv markierte C-Atom ist also statistisch über das Molekül verteilt. Damit wird ausgeschlossen, dass z. B. durch Decarboxylierungen flüchtiges $^{14}CO_2$ aus einer ausschliesslichen Markierung der Carboxy-Gruppe gebildet wird, was die Messung verfälschen würde. Pro Well wurden 10 µl des radioaktiven Tyrosins eingesetzt (250 µCi). Die Zellen wurden 4 Tage mit den zu testenden Substanzen inkubiert (bei 37°C, 5% CO_2), einschließlich des Mediumwechsels nach 2 Tagen.

Nach dieser Zeit wurde das Medium entnommen, die Zellen mit Dulbecco`s Puffer ohne Ca und Mg (4°C) gewaschen, in 240 µl Lösung aus: 1% Nonidet P40 (Sigma, Deisenhofen), 0.01% SDS (Sigma, Deisenhofen), in 1 M Tris: HCl, pH 7.2 und Protease Inhibitor Coctail (SIGMA, Deisenhofen) gelöst und 1 Std. zur Lyse im Kühlschrank inkubiert.

Der „Coctail“ bestand aus: AEBSF (104 milimolar), Aprotinin (0.08 milimolar=80 micromolar), Leupeptin (2.1 milimolar), Bestatin (3.6 milimolar), Pepstatin A (1.5 milimolar), und E-64 (1.4 milimolar).

Die Detergenzlösung wurde einen Tag vor der Melaninbestimmung hergestellt und bei 4°C aufbewahrt. Die Protease-Inhibitoren wie Aprotinin, AEBSF und die Protease-Inhibitor Mischung wurden erst 1 Std. vor der Melaninbestimmung (10 µl Protease Coctail auf 1 ml Tris:HCl mit 1% Nonidet und 0.01% SDS) zugegeben.

Der Inhalt (Zell-Lysat) jedes einzelnen Wells wurde dann mit der Pipette in den Dot-Blot Apparat (BioRad, München) überführt und mittels Wasserstrahlvakuum (22 mm Hg) durch die Membran gesaugt. Das radioaktive, in saurem Milieu unlösliche Melanin und die Melaninprekursoren wurden an die Zeta-Probe blotting (BioRad, München) Membranen gebunden (15 min bei 23°C). Danach wurden die Membranen unter Vacuum getrocknet und 3 Mal mit 250 µl 0.1 HCl M mit 0.1 % unmarkiertem Tyrosin (Sigma, Deisenhofen) gewaschen.
Die Membranen wurden aus dem Dot-Blot Apparat herausgenommen und weiter 3 x für 20 Min mit 100 ml 0.1 M HCl gewaschen.
Nach dem Trocknen an der Luft wurden die Membranen zerteilt und die den Proben entsprechenden Stücke in Szintillationflüssigkeit (3 ml, RotiSzint eco plus, Roth,) mit dem Counter auf ^{14}C untersucht.

4.3.12 Elektronenmikroskopie

(in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. W. Kummer vom Institut für Anatomie und Zytobiologie der JLU Giessen).

Die vitalen Zellen wurden mit Hilfe des Trypan-Blau Tests im Häemozytometer ausgezählt, in 6-Wells Platten zu je 20 000 Zellen pro Well ausgesät und bis zur Adherenz bei 37°C, 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.
Danach wurden sie für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 in 6-Well-Microtiterplatten mit verschiedenen Konzentrationen (wie bei der LDH-Bestimmung) der zu untersuchenden Substanzen, gelöst im Kulturmedium, inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und pro Well 200 µl von der

GDA-(Glutardialdehyd)-Lösung einpipettiert. So fixierte Proben wurden weiter im Institut der Anatomie und Zellbiologie bearbeitet und von Prof. Kummer elektronenmikroskopisch ausgewertet.

4.3.13 Zytoskelett-Anfärbung mit Antikörpern

(in Zusammenarbeit mit Dr. med. A. Battmann vom Institut für Pathologie der JLU Giessen).

Die Zellen wurden auf den Glas-Objektträger (für Zellkultur, Becton Dickinson,NJ, USA) mit der Zelldichte $10x10^4$/ Kämmerchen (0,69 cm^2)/ 750 µl Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 bis zur Adhärenz inkubiert. Am nächten Tag wurde das Medium durch ein frisches Medium mit den verschiedenen Konzentrationen von Malassezin ersetzt und bei 37°C und 5 % CO_2 über 4 Std. inkubiert.

Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden 2 mal 10 min mit dem Medium gewaschen und anschließend in die Fixier-Lösung (250 µl pro Kammer) 2 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Fixier-Lösung bestand aus 2g Picrinsäure, 40 ml 1% Glutaraldehydlösung gelöst in 1L 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4.

Nach dieser Zeit wurde die Lösung entfernt und die Kammer wurden 3 mal mit TBS (Tris buffered saline) gewaschen. Das TBS bestand aus 56g Tris und 218,25 NaCl gelöst in 2,5 L Aq. dest. (pH=7,4) vor Gebrauch wurde mit Aq. dest. 10-fach verdünnt.

Anschließend wurden die Antikörper nach der Anleitung der herstellenden Firmen in Antibody Diluent S2022 (DAKO, Denmark) verdünnt und jeweils 200 µl zu den fixierten Zellen gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht im Dunkeln bei –4°C.

Am nächsten Tag wurden die Kammern 3 mal mit TBS gewaschen, und bei den Kammern mit eingesetzten polyklonalen Antikörpern wurde der entsprechende Zweit-Antikörper dazugegeben, hier Anti Rabbit Immumoglobulin MO737 (Verdünnung 1:250), mit anschließender 45-minutiger Inkubation bei RT. Die restlichen Kammern wurden mit dem Erst-Antikörper weiter inkubiert.

Die weiteren Etappen der Zytoskelett-Anfärbung wurden nach der Anleitung zum Detection Kit APAAP Mouse K5000 (DAKO, Denmark) durchgeführt.

Die Kammern wurden 3 mal mit TBS gewaschen und ein LINK-Antibody anti Mouse wurde in jede Kammer einpipettiert. Nach 30 min Inkubaton bei RT wurde der Antikörper entfernt und die Kammern 3 mal mit TBS gewaschen. Danach wurden jeweils 200 µl von APAAP Immunocytocomplex (DAKO Chemate™ K500, Denmark) einpipettiert. Nach 30 min Inkubation folgte 3-faches Waschen mit TBS und anschließend die Färbung mit einer Lösung nach Vorschrift. Die Lösung bestand aus fertigen Reagenzen: AP-Substrat Puffer, Chromogen Red 1,Chromogen Red 2, Chromogen Red 3 und Levamisol, und wurde nach der verwendeten Objektträgeranzahl angesetzt. Es erfolgte eine 20min Inkubation im Dunkeln bei RT und anschließendes Waschen (3 x) mit TBS.
Danach wurden die Kammern von den Objektträger entfernt und die Objektträger 2 min in Hämalaun-Lösung inkubiert (RT) und in lauwarmen Leitungswasser gewaschen, bis sich der Farbstoff blau verfärbt hatte (ca. 4-5 min). Die Objektträger wurden nochmals kurz mit Aq. dest. gewaschen, dann eingedeckelt (DAKO Glycerylgel) und mikroskopisch ausgewertet.

Tabelle 14: In der Zytoskelett-Anfärbung verwendete Antikörper

Antikörper	**Verdünnung**	**Angriffspunkt**	**Herstellerbezeichnung**
Melan A/ MART-1	1:50	20-22 kDa Dublet in Melan-A mRNA-positiven Melanomzellen	M 7196 DAKO, Clone A103
1A4, Smooth Muscle Actin	1:100	?-Isoform des zytoplasmatischen Aktins der glatten Muskulatur	MO 851 DAKO, Clone A14
Mouse Anti-Human Actin, Muscle Actin HHF35	1:200	?- und ?-Aktin-Isotypen der glatten Muskulatur der Skelett- und Herzmuskulatur	MO 635 DAKO
Anti MyoD1/ Rhabdomyosarcoma Marker	1:50	Epitop am C-Ende des MyoD1 Proteins (45 kDa)	CLA 96/1 medac
TBS, Negativkontrolle			

5. Ergebnisse

5.1 Einfluss sekundärer Tryptophan-Metaboliten auf Melanozyten

Um den Einfluss der Metabolite zu untersuchen, wurden primäre kultivierte Melanozyten zunächst mit den Fraktionen der Gelfiltration inkubiert (siehe Kapitel 4.1.5, „Pigmentgewinnung und Aufreinigung“). Dazu wurden 100 Kulturplatten bis zur Gelchromatographie aufgearbeitet (siehe Kapitel 4.1.6, „Säulenchromatographie“). Die erhaltenen sieben Fraktionen wurden jeweils halbiert, beide Hälften mittels Rotationsverdampfer eingeengt. Die eine Hälfte wurde weiterverarbeitet und die andere wurde zwecks Wiederholbarkeit der Versuche bei -20°C gelagert.

Die zunächst in den Versuchen eingesetzten Proben wurden zur Entfernung restlicher Lösungsmittel sowie Restwasser mit einem Stickstoffstrombei 42°C für 30 min getrocknet. Danach wurde das Gewicht jeder einzelnen Fraktion bestimmt (Gewicht des Röhrchens mit Substanz/Fraktion minus Gewicht des leeren Röhrchen):

Tabelle 15: Gewicht der Fraktionen

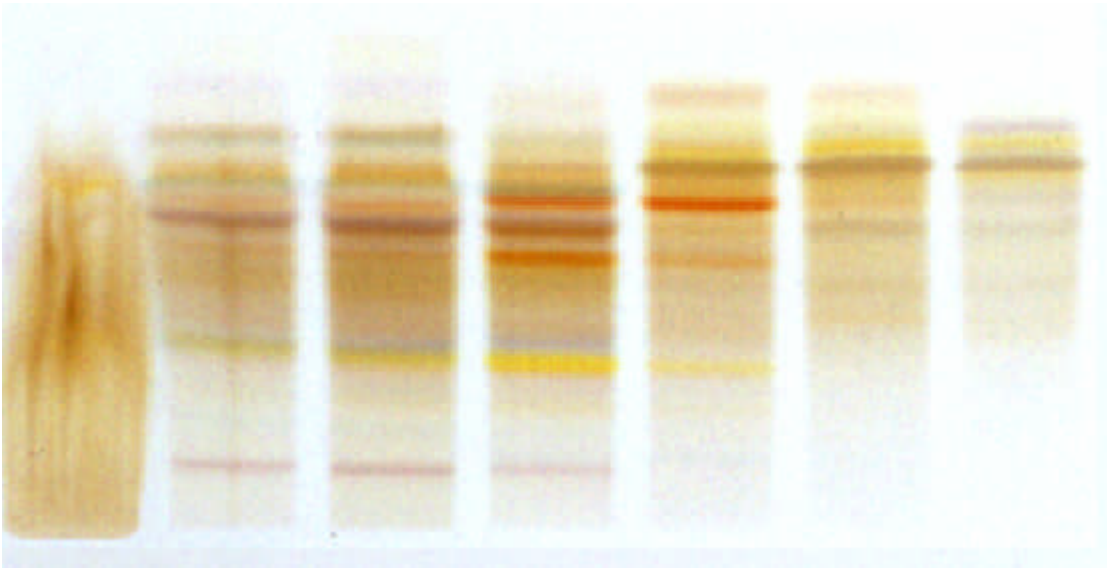
Fraktion	Gewicht (g)
1	nicht bestimmt*
2	0,247
3	0,171
4	0,180
5	0,164
6	0,220
7	0,168

*Fraktion 1 wurde nicht eingesetzt, da keine Trocknung möglich (Geruch nach Essigsäure und Ethylacetat auch nach 1Std. im Stickstoffstrom)

Jede Fraktion wurde jeweils in 1 ml DMSO gelöst.

Von jeder Fraktion wurde eine DC durchgeführt (Darstellung siehe Foto)

Foto 6: DC-Platte mit den 7 Hauptfraktionen
(Kieselgel 60; Toluol, Ethylformiat, Ameisensäure, 10:5:3).



1 2 3 4 5 6 7

Um den Einfluss dieser Fraktionen zu erkennen, wurde von jeder Fraktion ein Aliquot (50; 25; 12,5; 6,25; 3; 1,5; 0,8 µl) der obigen Lösungen mit 100 µL DMSO verdünnt. Von den erhaltenen Verdünnungen wurden jeweils 10 µl auf 2 ml MGM2-Medium zugesetzt und sorgfältig gemischt. Das so mit den Substanzen versetzte Medium wurde steril filtriert und nach einem Mediumwechsel zur Melanozytenkultur eingesetzt.

Die Zellen wurden mit den Substanzen über Nacht inkubiert und dann mit dem Auflichtmikroskop untersucht.

Dabei fanden sich ausgeprägte Veränderungen der Melanozyten, und zwar vorwiegend mit Fraktion 2 und 3. Dabei ist auf der DC-Analyse zu erkennen, dass sich die Fraktionen 2 und 3 in ihrer Zusammensetzung kaum unterscheiden.

Die Veränderungen äusserten sich in morphologischen Veränderungen der Zellen:

statt des dendritischen Aufbaues fanden sich bipolare Zellen, in den höchsten Konzentrationen auch völlig abgerundete Zellen. Diese Veränderungen waren bis in die vierte Verdünnung zu erkennen, darunter fanden sich Zellen mit normaler Morphologie.

Foto 7: Kontrollzellen

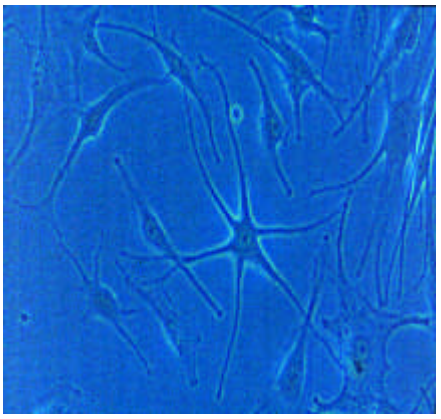
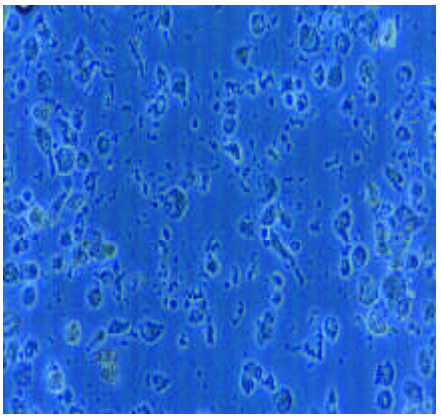
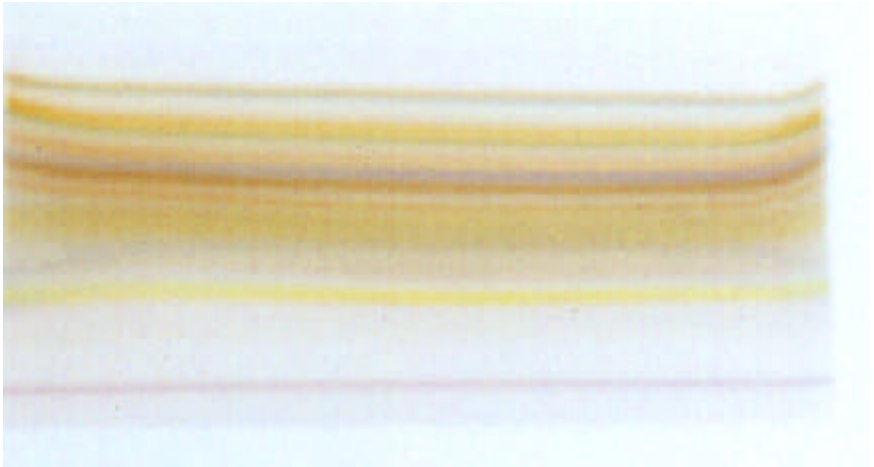


Foto 8: behandelte Zellen



Um den beobachteten Effekt weiter zu spezifizieren, wurde Fraktion 2 mittels präparativer DC weiter aufgetrennt. Es konnten 14 einzelne Banden/ Unterfraktionen gewonnen werden, die isoliert und wie im Methodenteil (siehe Kapiteln 4.1.5-4.1.8, „Pigmentgewinnung und Aufreinigung“ bis „HPLC“) beschrieben zur Gewinnung der Substanzen behandelt wurden.

Foto 9: DC-Platte der Unterfraktionen von der Hauptfraktion 2, (Kieselgel 60; Toluol, Ethylformiat, Ameisensäure, 10:5:3).



Im Einzelnen wurden folgende Fraktionen gewonnen:

Tabelle 16: Unterfraktionen der Hauptfraktion 2 nach der Auftrennung

DC-Unterfraktion	Rf.- Wert	Gewicht (g)
Auftragungsort der DC bis „Utes Violet“	0 -0.64	0.085
„Utes Violet“	0.64	0.104
Zwischen „Utes Violet“ und „Peters Gelb“	0.65-0.2	0.137
„Peters Gelb“	0.213	0.065
„Curry III“	0.262	0.166
von „Curry III“ bis „Blau“	0.362	0.158
„Blau“	0.383	0.056
„Marlenes Oliv“ und „Smaragdgrün“	0.384-0.425	0.190
„Ocker“	0.425-0.44	0.111
zwischen „Ocker“ und „Oberes Orange“	0.44-0.475	0.122
„Oberes Orange“	0.475	0.161
zwischen „Oberes Orange“ und „Unteres Lilablau“	0.476-0,496	0.121
„Unteres Lilablau“	0.496	0.143
„Falsches oberes Orange“	0.581	0.014
„Oberes Lilablau‘	0.617	0.017

Auf diese Weise wurde die gesamte Fraktion 2 aufgetrennt erhalten.
Da sich die relativen Anteile wie in der ursprünglich untersuchten Gesamtfraktion verhalten, wurden die erhaltenen Unterfraktionen alle in 100 µl DMSO gelöst und eine Verdünnungsreihe wie oben angegeben, durchgeführt.

Die mit den steril filtrierten Verdünnungen versetzten Zellen wurden jetzt stündlich auf Veränderungen hin untersucht.

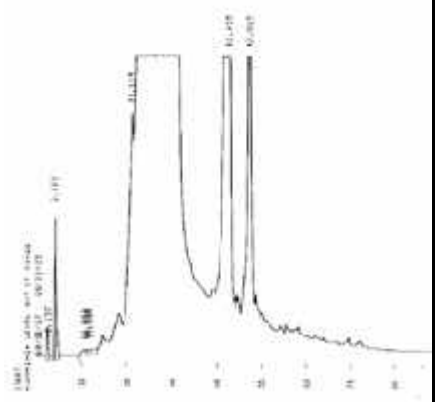
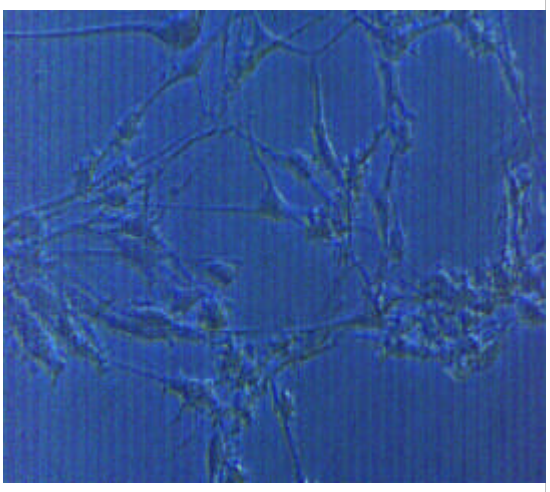
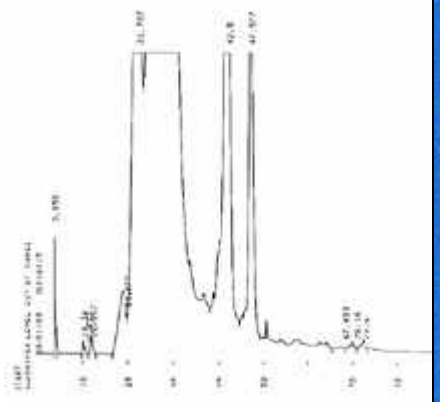
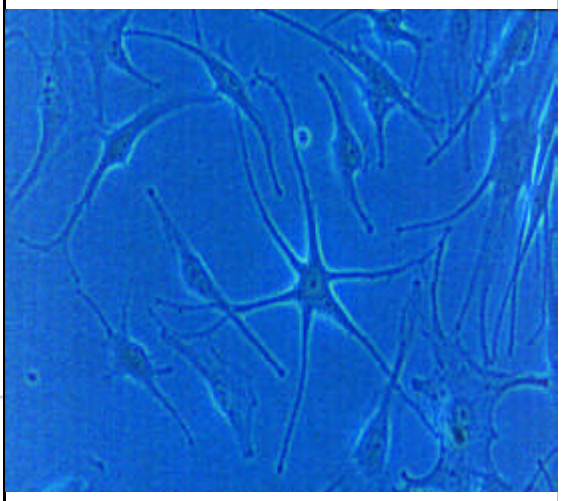
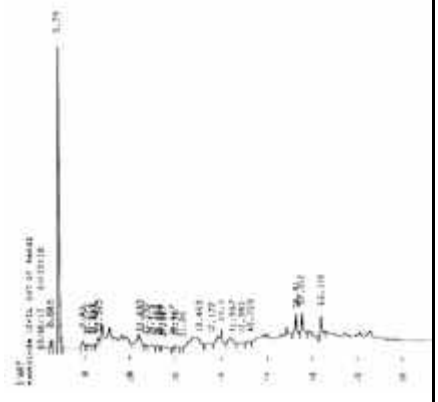
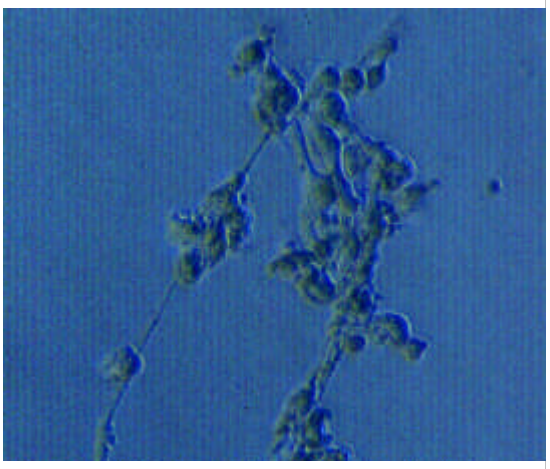
Nach 4 Stunden konnten stark ausgeprägte Veränderungen wie oben gefunden werden in Zellen, die mit den Unterfraktionen „Marlenes Oliv“ (MO), „Smaragdgrün“ (SG) und „Ocker“ (O) behandelt wurden (Rf-Wert von 0,384-0,44). Diese Banden lagen bereits in mittels präparativer HPLC aufgetrennter Form vor (Gradient 0-100% Acetonitril, Rest Wasser, 180 Fraktionen über 180 min), sodass hier ausgewählte Hauptfraktionen in der Zellkultur auf Aktivität geprüft werden konnten.
Im Einzelnen wurden folgende Komponenten der aufgetrennten Gesamtbanden (mit Angabe der zugehörigen, vereinigten Fraktionen nach präparativer HPLC) untersucht:
O6 (80-88)
MO6 (111-118)
SG8 (121-148)
SG2 (55-62)
MO10 (141-170).

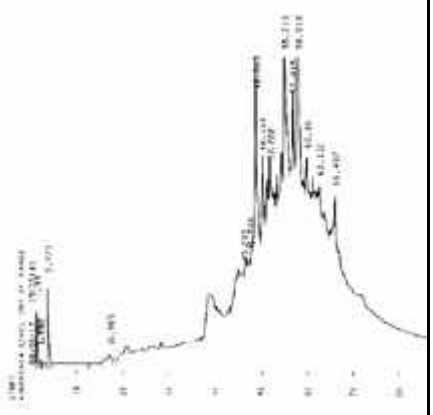
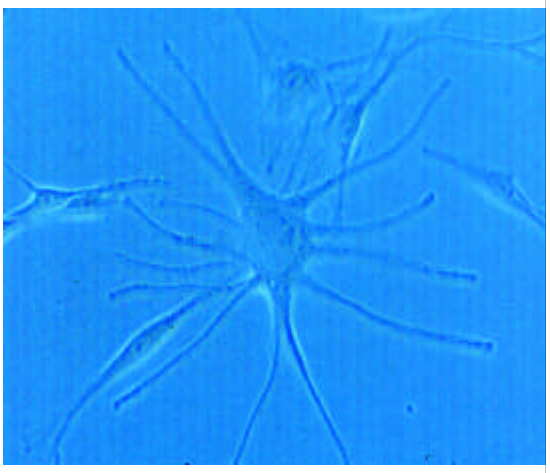
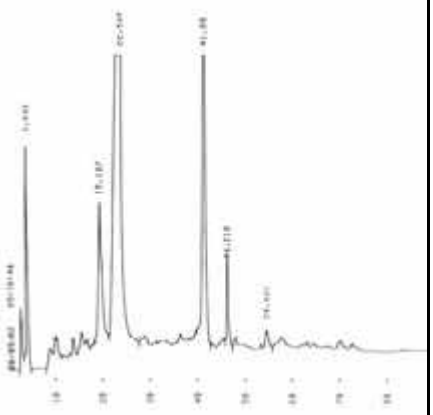
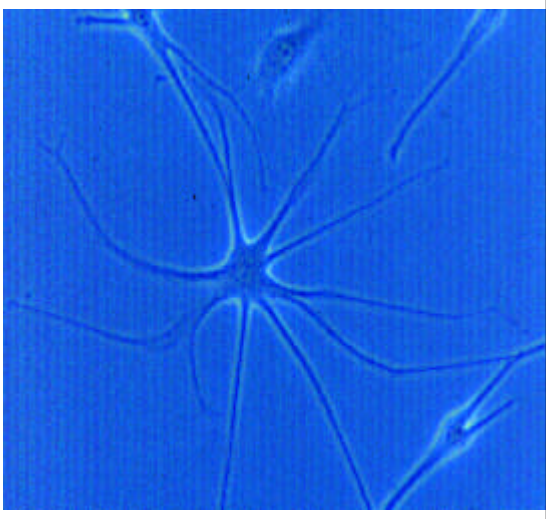
Die Auswahl der Stoffe erfolgte danach, dass darin ein möglichst „breites“ Spektrum an Komponenten (bezüglich Lipophilie) enthalten war (siehe HPLC-Läufe).
Mit den fünf ausgewählten HPLC-Fraktionen wurden, nach oben beschriebenem Vorgehen, Verdünnungsreihen hergestellt und in der Melanozyten-Kultur überprüft.

Innerhalb von 4 Stunden zeigten sich die bewussten Veränderungen in der Zellmorphologie bei O6 und SG2 in den ersten 4 Verdünnungs-Stufen.

Die Fraktion O6 wurde im folgenden weiter untersucht, da von ihr noch 10 mg zur Verfügung standen. SG2 lag nicht mehr in vorgetrennter Form vor. Da „O“ und „SG“ sich im Rf-Wert (siehe Tabelle 16) und der Zusammensetzung nicht wesentlich unterscheiden, wurde lediglich O6 weiter aufgereinigt.

Tabelle 17 (nächste Seite) : Die fünf ausgewählten HPLC-Fraktionen (HPLC-Lauf und die Wirkung auf die Zellen).

	Analytischer HPLC-Lauf	Wirkung auf Melanozyten
O 6		
MO 6		
SG 2		

SG 8		
MO 10		

Die Fraktion O6 wurde mittels präparativer HPLC (gespreizter Gradient von 40-70% Acetonitril, sonstige Bedingungen unverändert)in weitere acht Unterfraktionen aufgetrennt (mit Angabe der zugehörigen, vereinigten Fraktionen aus der präparativen HPLC):

O61 (10-12)

O62 (13-40)

O63 (41-46)

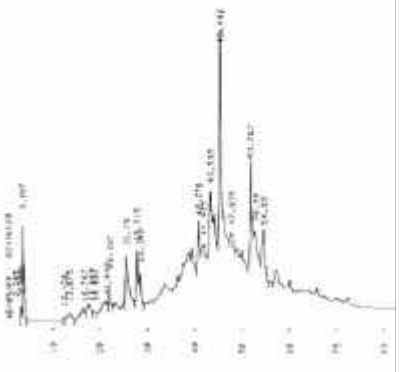
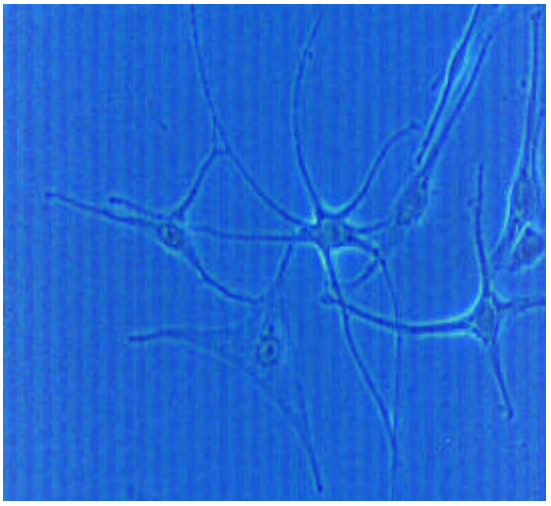
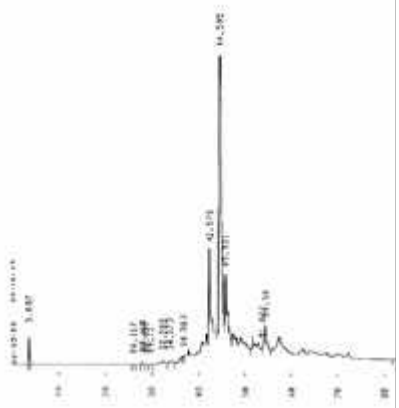
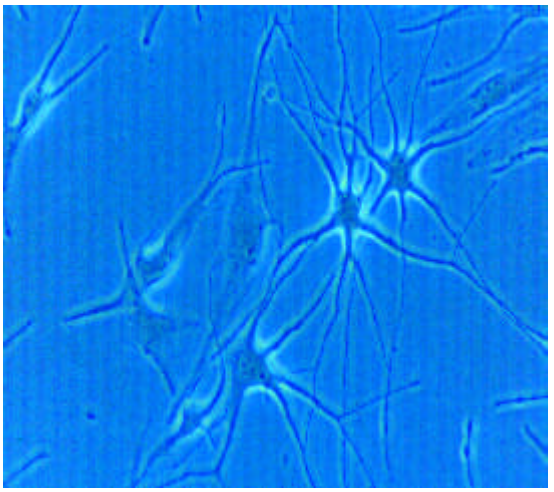
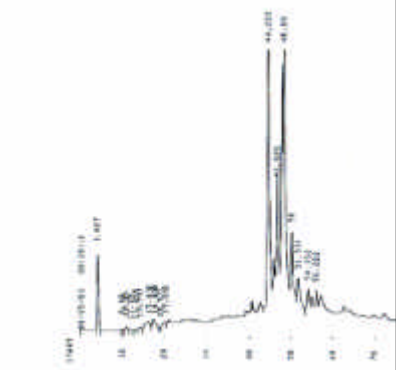
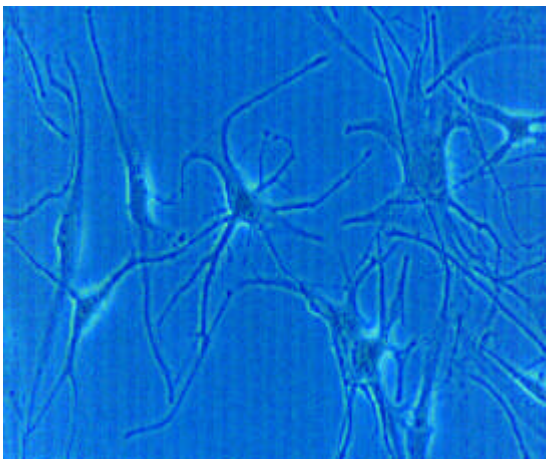
O64 (47-52)

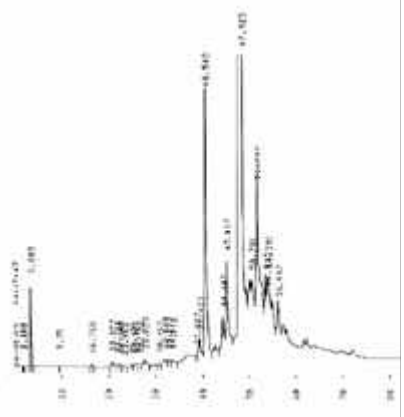
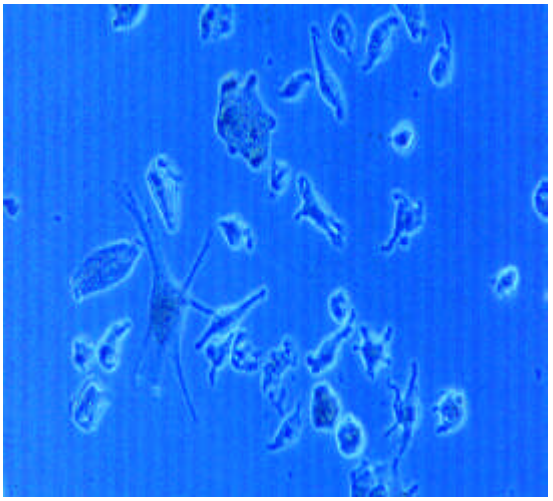
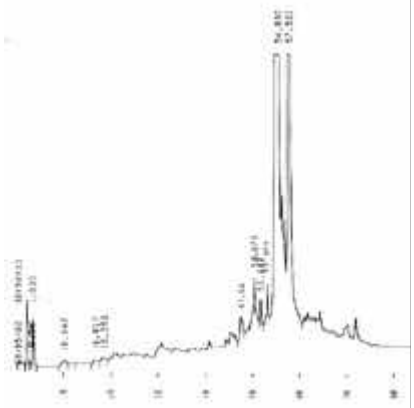
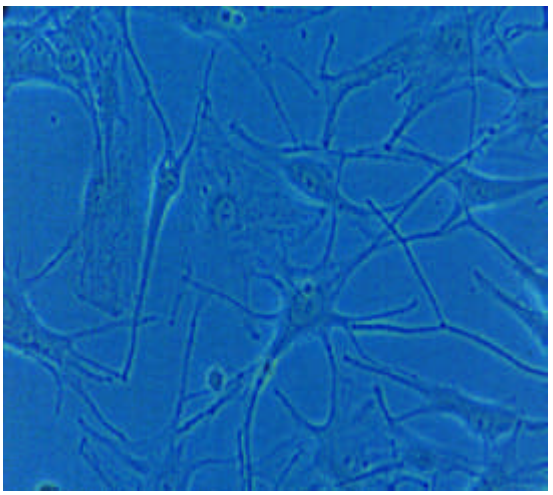
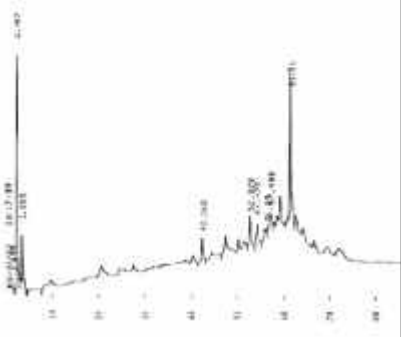
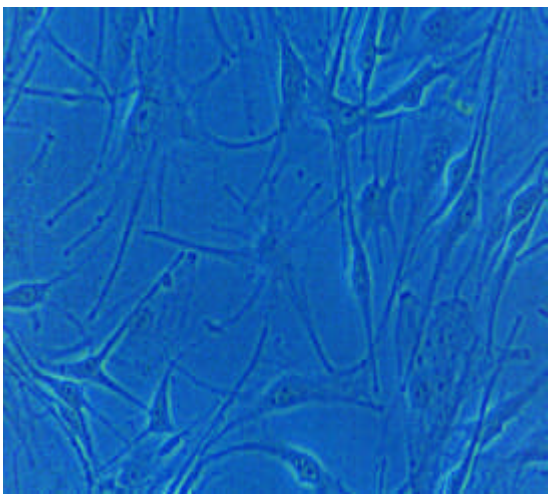
O65 (53-59)

O66 (60-64).

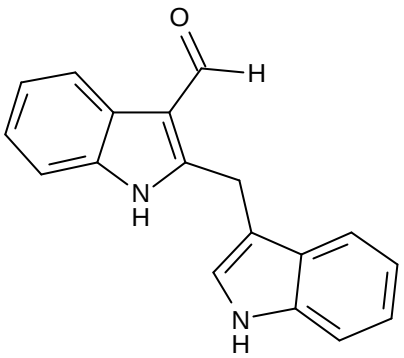
Von den Fraktionen O61-O66 wurden jeweils 0.5 mg in 100 µL DMSO gelöst und damit wurde weiter verfahren wie oben beschrieben. Die morphologischen Veränderungen traten jetzt nur noch in Fraktion O64 auf. Diese Substanz war laut analytischer HPLC weitgehend einheitlich. Ein Aliquot (1 mg) der Fraktion wurde nach München zur Strukturaufklärung geschickt. Die Substanz erwies sich bemerkenswerterweise als das kürzlich in diesem Projekt erstmals isolierte und synthetisierte Malassezin [2-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1*H*-indole-3-carbaldehyde] (171).

Tabelle 18 (nächste Seite) : HPLC-Unterfraktionen der Fraktion O6 (HPLC-Läufe und die Wirkung auf die Zellen).

O6 1		
O6 2		
O6 3		

O6 4		
O6 5		
O6 6		

Malassezin - [2-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1*H*-indole-3-carbaldehyde]



$C_{18}H_{14}N_2O$
MW 274.32

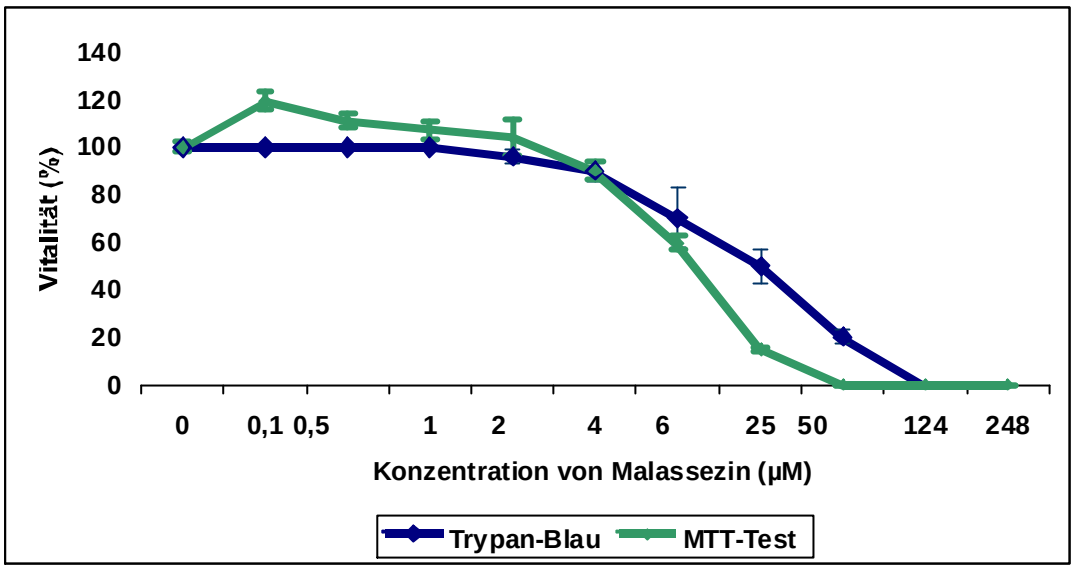
Bei Malassezin handelt es sich um einen farblosen Festkörper mit 2,3´-verknüpfter Bisindolylmethan-Struktur und Aldehydgruppe, welcher bisher ausschliesslich in Kulturen von *Malassezia furfur* nachgewiesen werden konnte (171).

5.2 Vitalität

Trypan-Blau Test und MTT-Test

Die Vitalität der Zellen wurde wie im Kapitel 4.3.2.1 („Trypan-Blau-Test“) und 4.3.2.2 („MTT-Test“) beschrieben, bestimmt. Im Trypan-Blau-Test wurden die dunkel-blau angefärbten Zellen im Hämozytometer ausgezählt. Im MTT-Test erfolgte eine spektrophotometrische Messung der Absorption. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Malassezin 24 Std. inkubiert.
Es wurde ein konzentrationsabhängiger Einfluss von Malassezin auf die Vitalität der Melanozyten beobachtet. Mit der aufsteigenden Konzentration dieses Stoffes stieg der prozentuale Anteil an avitalen Zellen. Dabei wurde auch ansteigende Zahl der abgelösten Zellen im Lichtmikroskop gefunden. Bei den drei höchsten Konzentrationen (248; 124; 50 µM) waren alle Zellen abgelöst, bei der Konzentration 25 µM war eine fast völlige Adhärenz zu sehen. Bei den mit weiteren kleineren Konzentrationen behandelten Zellen wurde vollständige Adhärenz beobachtet. Ähnliche Ergebnisse lieferte der MTT-Test.
Die folgende Abbildung (nächste Seite) zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Färbung.

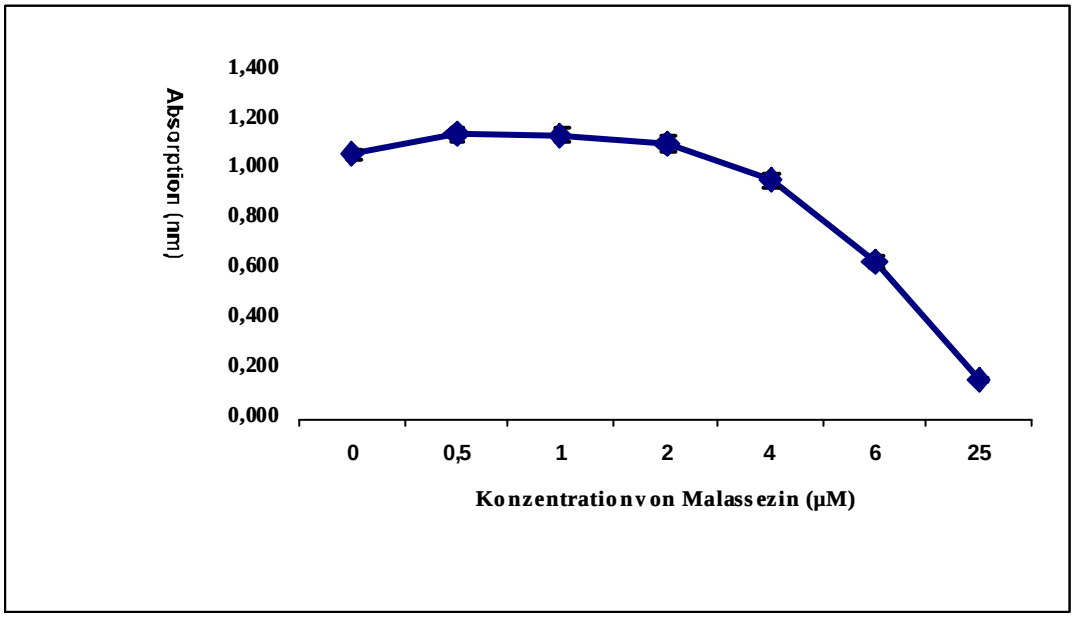
Abbildung 5: Vitalität (%) bestimmt mittels Trypan-Blau- (n=2, LD_{50}=25 µM) und MTT-Test (n=7, LD_{50} ca. 10 µM).



5.3 Bestimmung der Proliferation (MTT-Test)

Die Zellen wurden wie oben behandelt, allerdings über einen Zeitraum von 4 Tagen. Die Ergebnisse zeigt folgende Abbildung

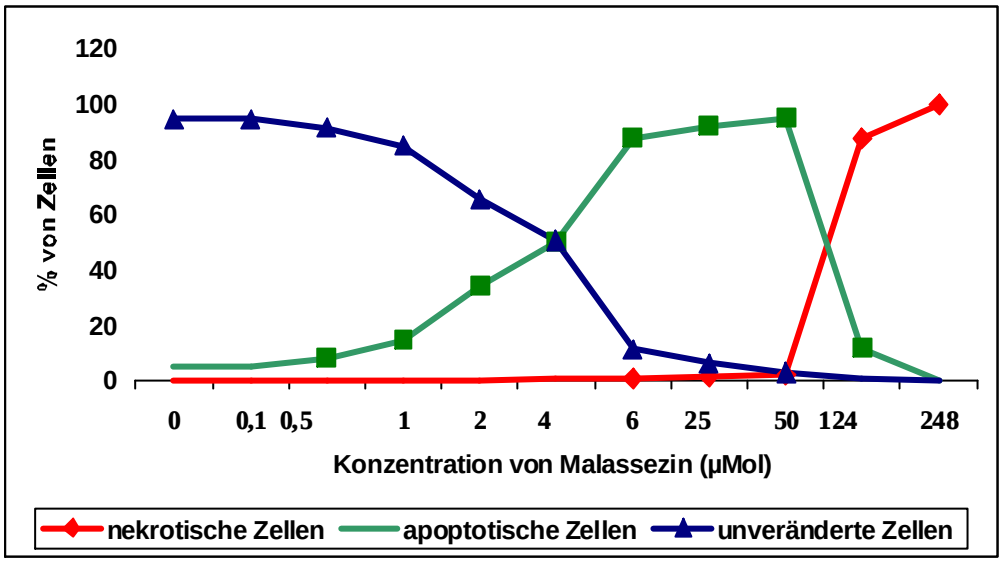
Abbildung 6: Bestimmung der Proliferation (MTTTest, n=8, ED_{50} ca. 10 µM)

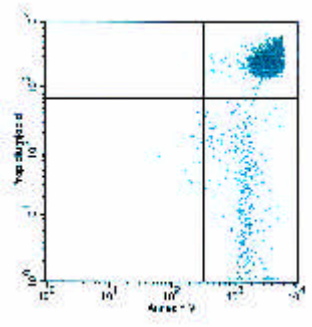


5.4 Differenzierung der Apoptose und Nekrose mittels FACScan

Dargestellt ist der bei der entsprechenden Konzentration von Malassezin auftretende Anteil an normalen, apoptotischen sowie nekrotischen Zellen.

Abbildung 7: Grafische Darstellung der FACScan-Anaylyse





Die folgenden Histogramme zeigen die Zellverteilung der unbehandelten Zellen (1) und der mit 50 µM (2) sowie mit 248 µM Malassezin (3) behandelten Zellen.

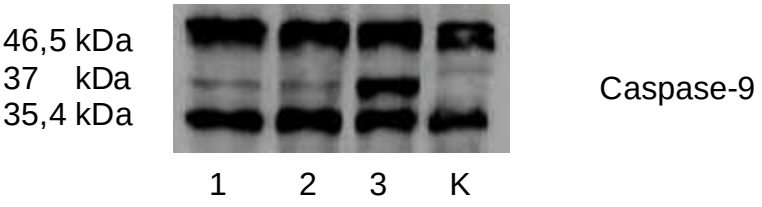
1) unbehandelte Zellen	2) Apoptose	3) Nekrose

5.5 Enzymatische Differenzierung der Apoptose durch Caspasen

Die Zellen wurden 2, 4 und 6 Stunden mit 3 verschiedenen Konzentrationen von Malassezin behandelt (25; 6; 4 µM).
Bei der Western-Blot-Analyse wurden die Antikörper gegen Caspase 8 und 9 eingesetzt.

Nach 2 Std. konnten keine Veränderungen in der Western-Blot-Analyse gefunden werden, sowohl bei den Proben mit eingesetztem Antikörper gegen die Caspase 8 als auch gegen die Caspase 9. Sie wurden sichtbar nach 4 und 6 Stunden, und blieben konstant. Die Veränderungen bezogen sich aber nur auf die Proben mit eingesetztem Antikörper gegen die Caspase 9.
Dabei wurde eine konzentrationsabhängige und kontinuierliche Reaktion mit dem Antikörper gegen die Caspase 9 visualisiert.
Bei den anderen Proben wurde keine Reaktion mit dem Antikörper gesehen.
Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen die Caspase 9 zeigt Abbildung 8.

Abbildung 8: Ergebnisse von Western-Blot



K-Kontrolle/unbehandelte Zellen
1- Zellen behandelt mit 4 µM Malassezin
2- Zellen behandelt mit 6 µM Malassezin
3- Zellen behandelt mit 25 µM Malassezin

5.6 „Höchst- Färbung“ (Färbung mit HOE 33342)

Die Zellen wurden mit 25 µM Malassezin über 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14,18 Std. behandelt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit erfolgte die„Höchst-Färbung“ und die mikroskopische Auswertung der Ergebnisse.

Foto 10: unbehandelte Zellen

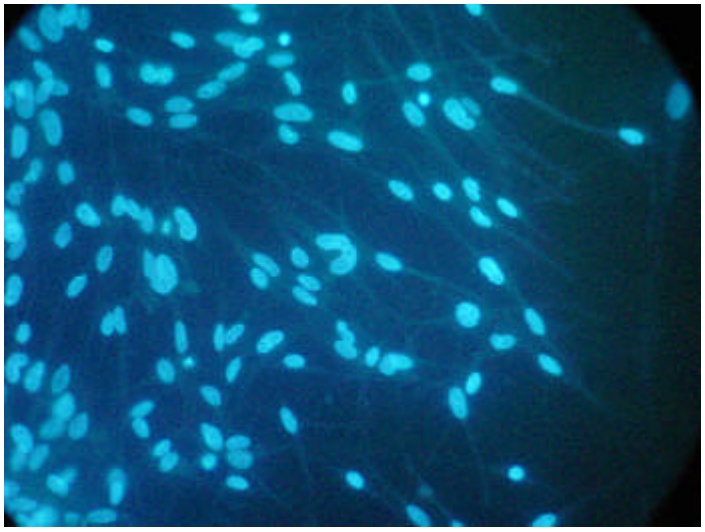


Foto 11: behandelte Zellen, nach 2 Std., keine wesentlichen Veränderungen im Zellkern

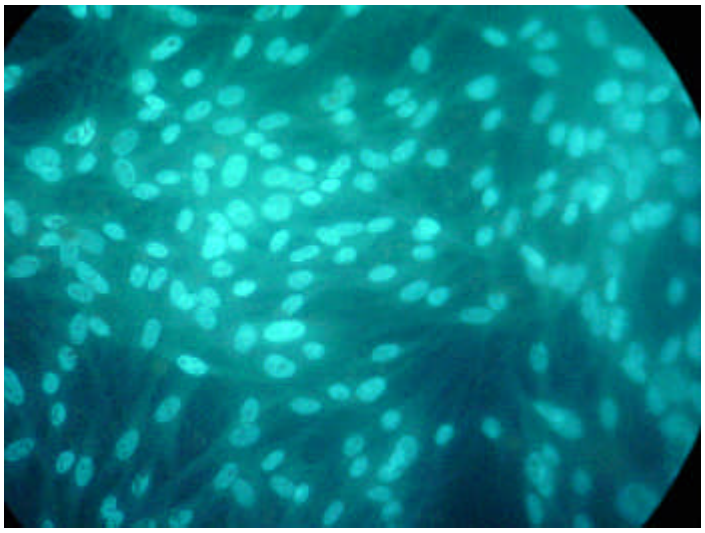


Foto 12: behandelte Zellen, nach 4 Std., Erscheinung von„apoptotic bodies“

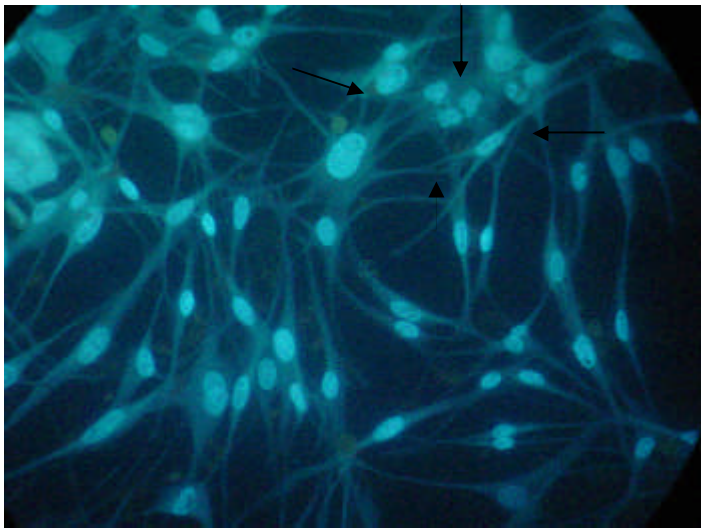


Foto 13: behandelte Zellen, nach 5 Std.;
mehrere Zellkerne mit„apoptotic bodies“, sichtbare Veränderungen im Zellkern

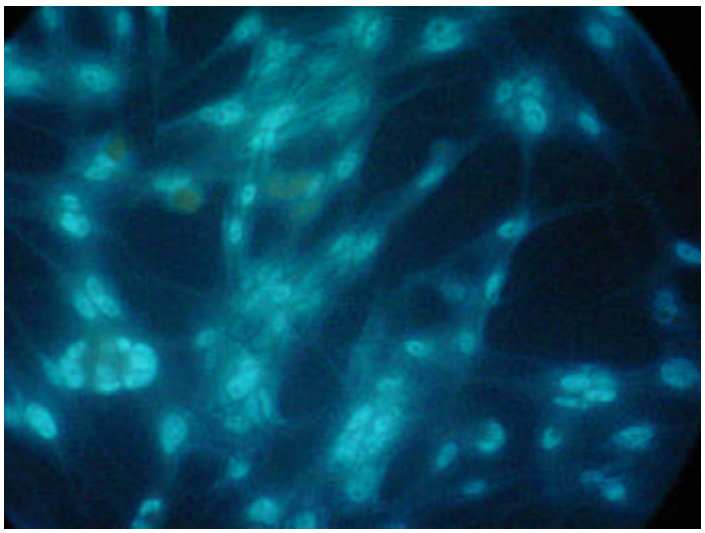
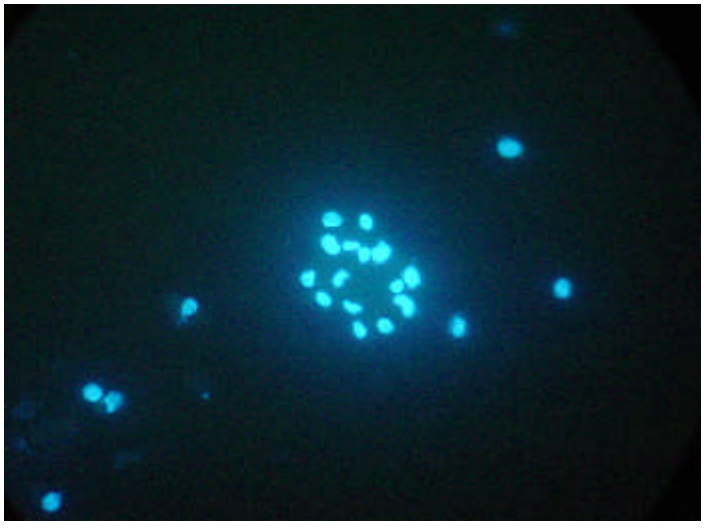


Foto 14: behandelte Zellen, nach 11 Std., Zellkernreste



5.7 „Comet Assay“ (single cell gel elektrophoresis assay)

Die Zellen wurden 6 Std. mit 25 und 6 µM Malassezin behandelt.

Foto 15: unbehandelte Zellen

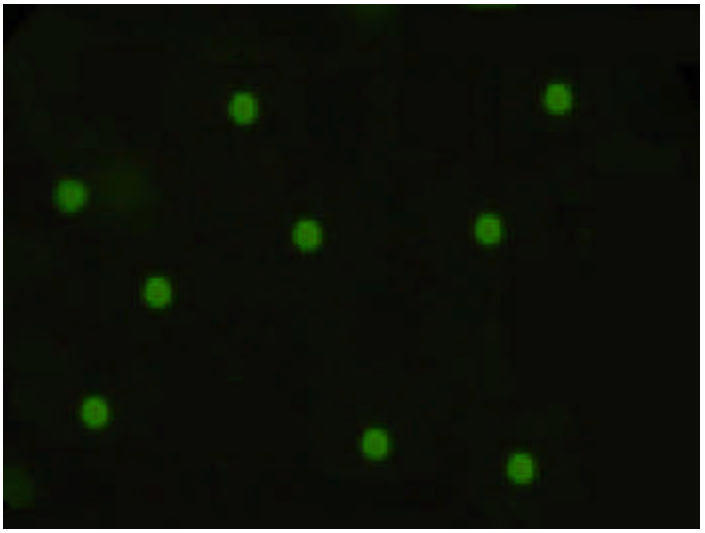


Foto 16: behandelte Zellen (6 µM Malassezin)

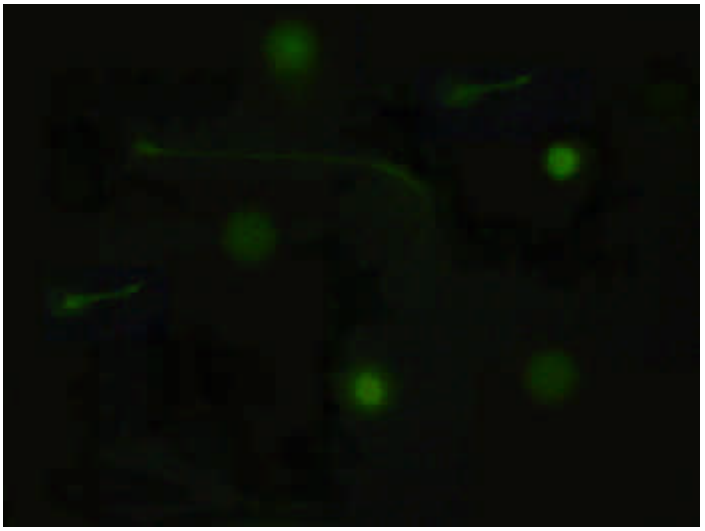
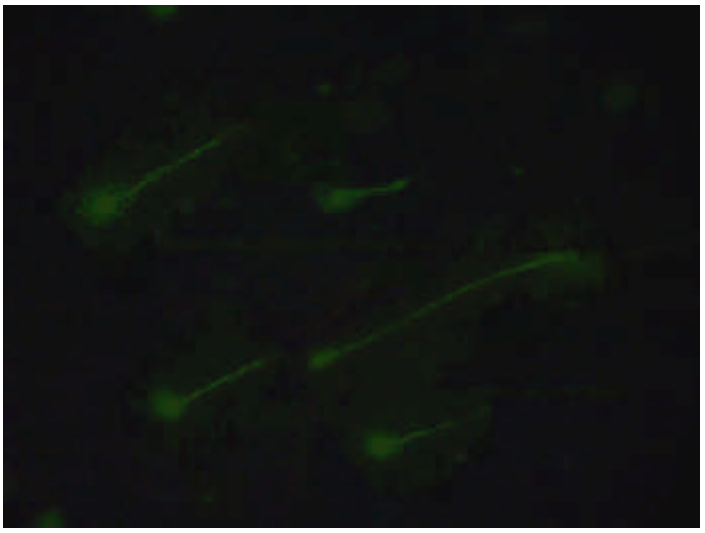
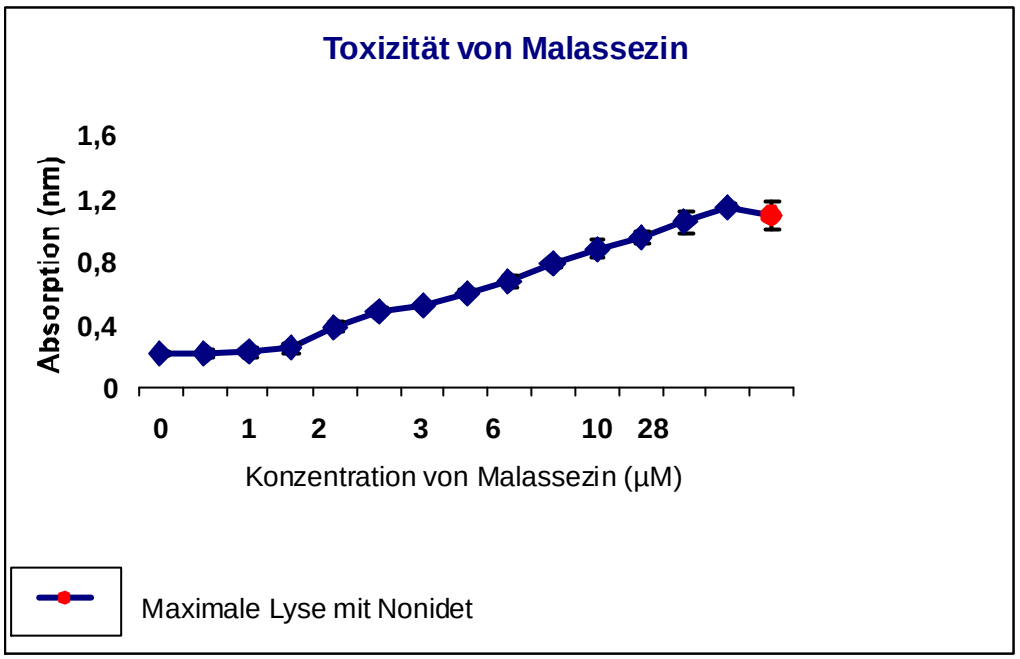


Foto 17: behandelte Zellen (25 µM Malassezin)



5.8 LDH-Freisetzung (Lactat-Dehydrogenase-Assay)

Abbildung 9: Ergebnisse der LDH-Freisetzung (n=4, LD_{50} ca. 3,4 µM)



5.9 Reversibilität der Veränderungen

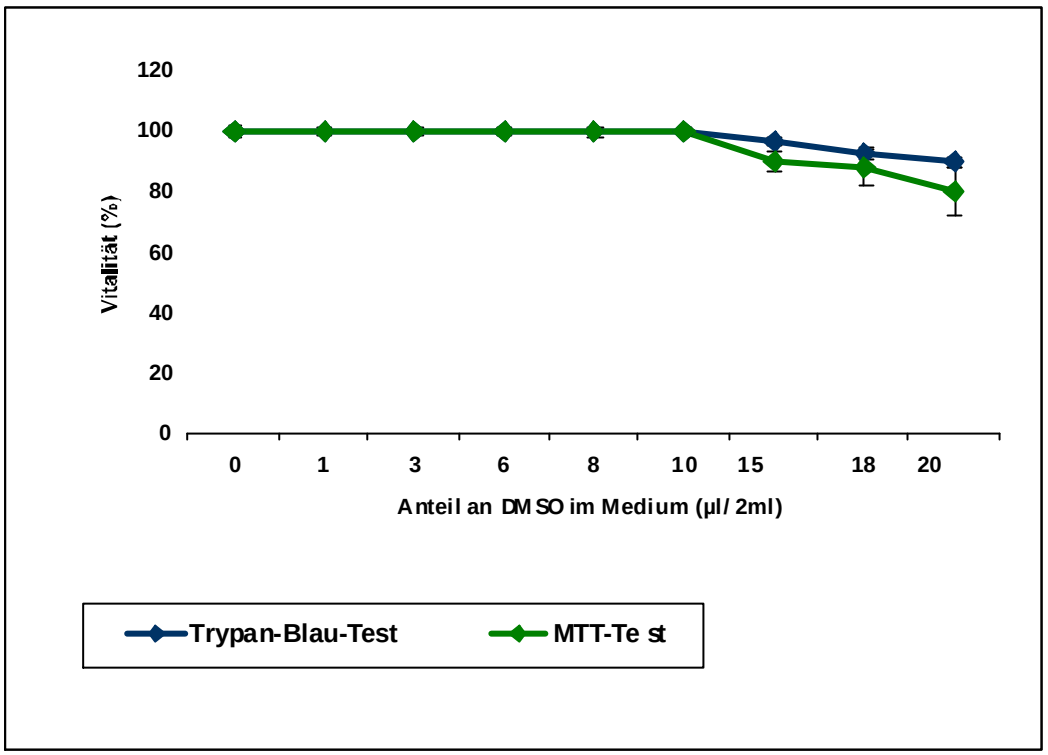
Die Zellen, die zuerst mit verschiedenen Konzentrationen von Malasezin behandelt waren, wurden dann mit frischem Medium versetzt und über den Zeitraum von 3 Wochen beobachtet. Es wurde keine Reversibilität der Veränderungen beobachtet (Konfluenz, Vitalität, Proliferation).

5.10 Einfluss des verwendeten Lösungsmittels DMSO auf die Parameter

Um einen Einfluss des verwendeten Lösungsmittels DMSO auszuschliessen, wurden konzentrationsabhängig die Einflüsse auf die verwendeten Parameter untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10-13 dargestellt. Fazit: In den Versuchen wurde maximal 0,5 µl auf 2 ml Medium verwendet. In diesem Konzentrationsbereich ist kein Einfluss des DMSO zu erkennen.

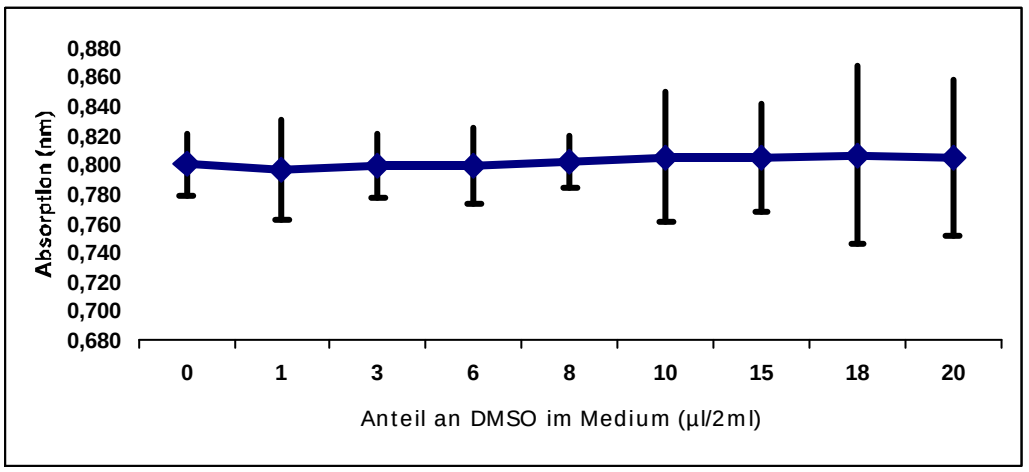
5.10.1 Vitalität mittels Trypan-Blau- und MTT- Tests

Abbildung 10: Einfluss von DMSO auf die Vitalität der Melanozyten (n=2 bei Trypan-Blau und n=5 bei MTT-Test).



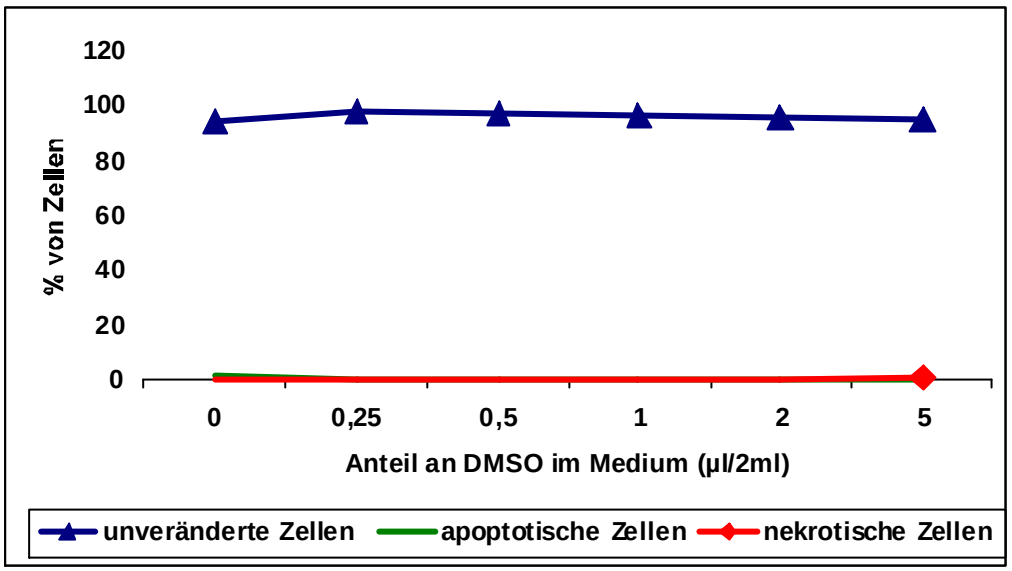
5.10.2 Proliferation mittels MTT- Tests

Abbildung 11: Einfluss von DMSO auf die Proliferation der Melanozyten (n=8)



5.10.3 Apoptotische und nekrotische Wirkung mittels FACS

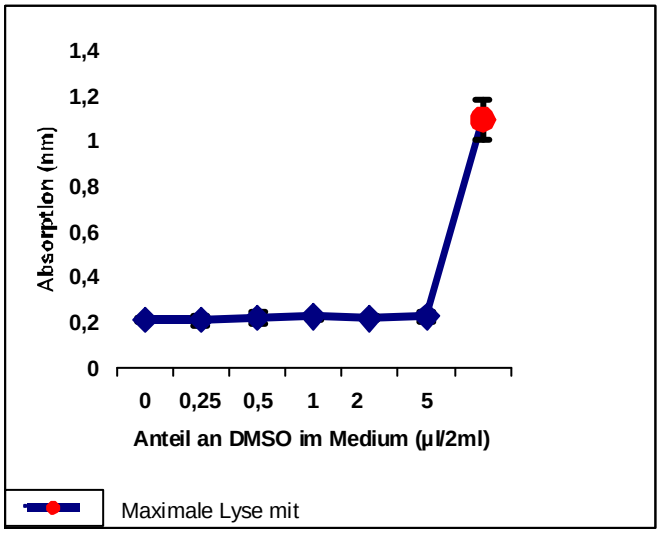
Abbildung 12: Einfluss von DMSO auf die apoptotischen und nekrotischen Veränderungen der Melanozyten



Der Anteil der Zellen mit apoptotischen bzw. nekrotischen Veränderungen fällt zusammen und ist vernachlässigbar gering.

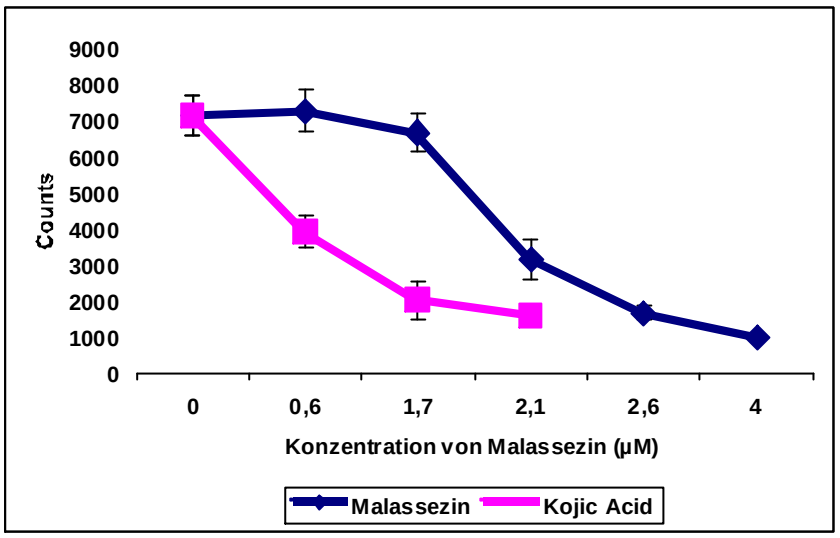
5.10.4 LDH Freisetzung (Lactat-Dehydrogenase-Assay)

Abbildung 13: Einfluss von DMSO auf die LDH-Freisetzung (n=4)



5.11 Melaninbestimmung mittels Einbau von ^{14}C-(U) Tyrosin

Abbildung 14: Ergebnisse der Melaninbestimmung mittels Einbau von ^{14}C-(U) Tyrosin (n=3)



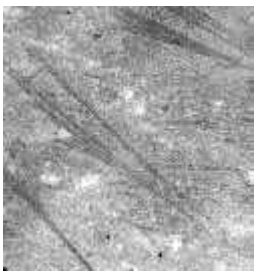
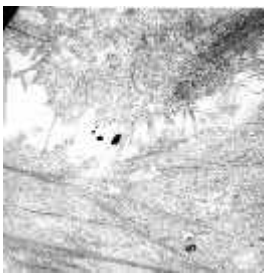
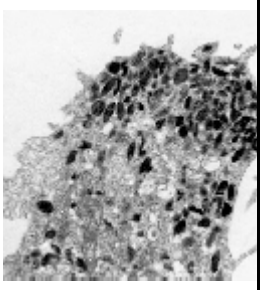
Dargestellt ist die radioaktive Markierung der lysierten und über eine Zeta-Probe-Membran filtrierten Zellen (Dot-Blot-Technik). Es fand sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Einbaurate des Tyrosins, bei Kojic acid deutlicher ausgeprägt als bei Malassezin.

5.12 Elektronenmikroskopie

Kontrollzellen (Fotos 18-21)

Die adhärent wachsenden Kontrollzellen der Melanozyten sind von unregelmäßiger Gestalt mit sehr langen Zellausläufern. An der Oberfläche sind teils keine Filopodien zu sehen. Die Zellen enthalten die üblichen Organellen, besonders auffallend sind die zahlreich anzutreffenden Melanosomen. Diese Melanosomen konzentrieren sich teils in den eben beschriebenen Zellfortsätzen. In Tangentialschnitten lassen sich in flach ausgezogenen Randbereichen der Zellen häufig auffallende zytoskelettäre Filamentbündeln vorwiegend radiärer Anordnung antreffen.

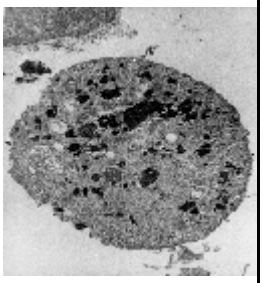
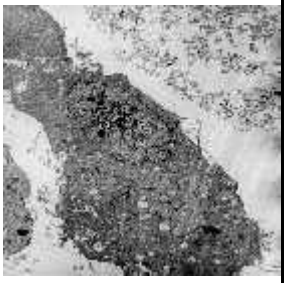
Fotos 18-21 Elektronenmikroskopie von unbehandelten Zellen

18	19	20	21
			

Behandelte Zellen (Fotos 22-25)

Die Zellen sind kugelig abgerundet. Filamentbündel wie bei den adhärenten Kontrollen sind nicht mehr zu erkennen. Die Zellen zeigen generelle Zeichen der Zellschädigung, ein nicht unerheblicher Teil ist vollständig lysiert. Durchgehendes Merkmal ist eine Vakuolisierung der Zellen, die teils mäßig bis dezent, teils äußerst augeprägt sein kann. Charakteristika der Apoptose sind kaum zu erkennen. Teils ist einzelnes blebbing an der Zellkontrollfläche zu erkennen, weitere Apoptose spezifische Merkmale allerdings kaum. Der Zellkern zeigt zwar durchaus Veränderungen, darunter auch teilweise Chromatinkondensierung, diese zeigt jedoch nicht das bekannte homogene Muster oder auch eine entsprechende Anreichung am Rande des Zellkerns. Auch die ausgeprägte Vakuolisierung spricht nicht für eine Apoptose. Melanosomen sind zwar teils zu erkennen, scheinen insgesamt aber seltener vorhanden zu sein, als in den gesehenen Kontrollzellen, ohne dies jedoch quantifiziert zu haben.

Fotos 23-26 Elektronenmikroskopie von behandelten Zellen

22	23	24	25
			

5.13 Zytoskelett-Anfärbung mit Antikörpern

Abbildung 15 nächste Seite : Ergebnisse der Zytoskelett-Anfärbung Vergrößerung 400x, **Querformat**!

Dargestellt sind die Ergebnisse der Anfärbung mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Legende rechts) sowie der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Malassezin (siehe Legende unten). Hauptkriterium ist die Anfärbung mit dem Antikörper, weshalb auf eine grössere Darstellung verzichtet wurde.

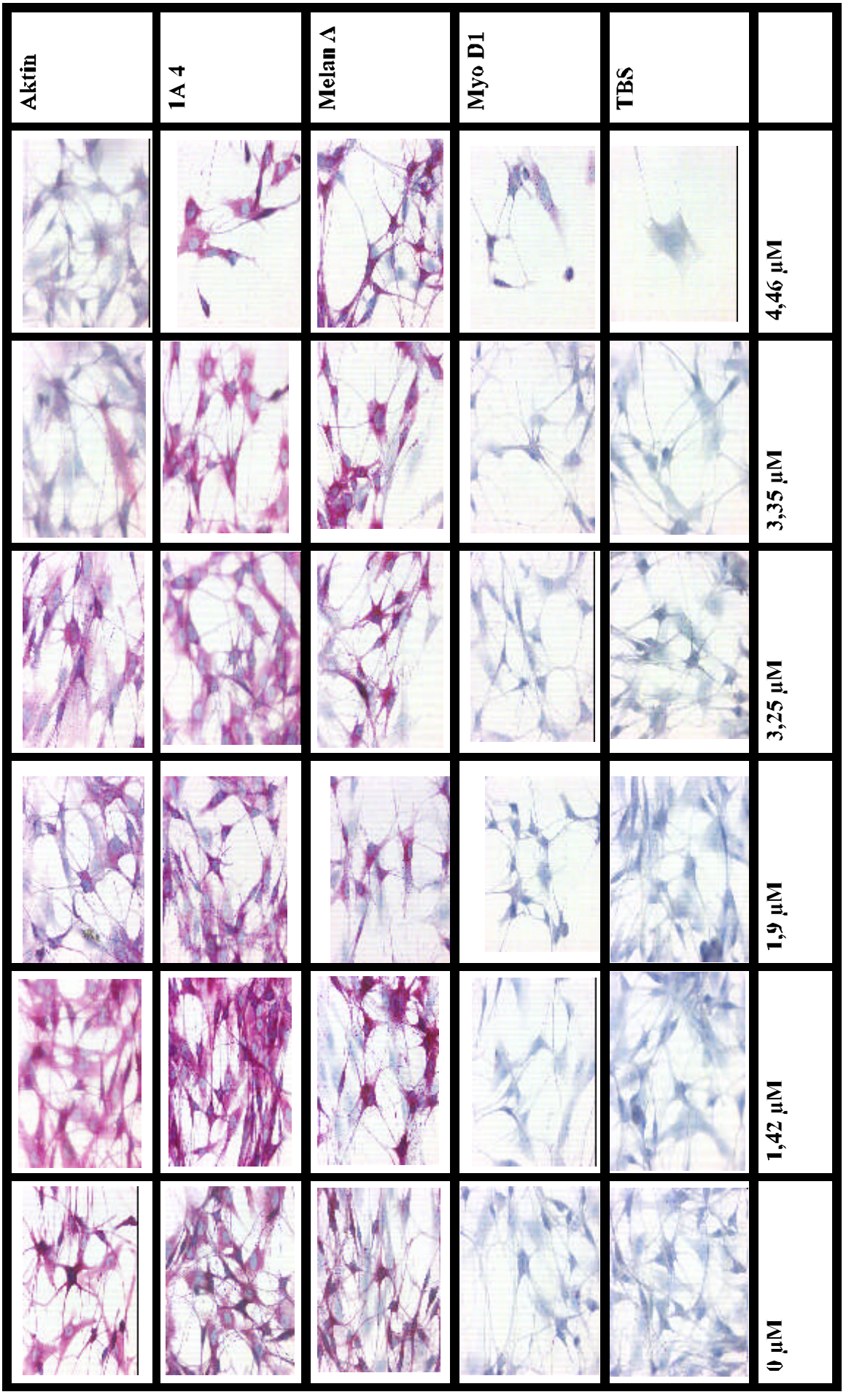
Ergebnisse:
Es folgt eine kurze Beschreibung der erhaltenen Färbungen:

Aktin:
Es findet sich eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme der Färbereaktion mit dem Antikörper HAF 35, wobei eine teils punktförmige, eine teils flächenhafte zytoplasmatische Anfärbung vorliegt.

1A 4:
Hier findet sich eine konzentrationsunabhängige und kontinuerliche Reaktion mit dem 1A 4-Antikörper mit kräftiger flächenhafter zytoplasmatischer Anfärbung

Melan A:
Hier findet sich ebenfalls (wie bei 1 A 4) eine konzentrationsunabhängige und kontinuierliche Reaktion mit dem Melan A-Antikörper mit teils kräftiger zytoplasmatischer, teils schwacher punktförmiger Reaktion (nur bei größerer Auflösung zu sehen)

MyoD1:
Hier findet sich eine kaum sichtbare, sehr schwache punktförmige zytoplasmatische Färbung.


Aktin
1A 4
Melan A
Myo D1
TBS
4,46 µM
3,35 µM
3,25 µM
1,9 µM
1,42 µM
0 µM

5.14 Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Tabellen zu Abbildung 5

Tabelle: Vitalität (%) im Trypan-Blau-Test

Konzentration von Malassezin (µM)	Wert 1 (%)	Wert 2 (%)	Mwt.	Stabw.
0	100	100	100	0
0,1	100	100	100	0
0,5	100	100	100	0
1	100	100	100	0
2	98	94	96	2,82842712
4	93	87	90	4,24264069
6	61	79	70	12,7279221
25	55	45	50	7,07106781
50	18	22	20	2,82842712
124	0	0	0	0
248	0	0	0	0

Tabelle: Vitalität (%) im MTT-Test

Konzentration von Malassezin (µM)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Mwt.	Stabw.
0	99,7	98,3	99,4	97,4	99	101,6	103,4	100	2,04
0,1	106	106	110	112	108	102	102	119,4	3,78
0,5	107	113	109	115	114	109	111	111	2,968
1	108	115	109	109	107	104	103	107,3	3,934
2	97,7	101	95	114	113	98,5	107	103,8	7,632
4	90	93,4	89	93,8	90	93,3	83,6	90,13	3,593
6	57,3	59,1	62,6	65,2	59,3	59,1	56,9	59,63	2,966
25	13,8	16,2	14,5	15,1	15,3	15,2	14,7	14,95	0,748
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
124	0	0	0	0	0	0	0	0	0
248	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle zu Abbildung 6: Bestimmung der Proliferation (MTT-Test)

Malassezin (µM)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mwt	Stabw
0	1,058	1,043	1,055	1,034	1,051	1,069	1,079	1,097	1,061	0,020
0,5	1,13	1,113	1,163	1,155	1,67	1,71	1,109	1,117	1,141	0,026
1	1,146	1,2	1,154	1,128	1 ,133	1,1	1,123	1,131	1,139	0,029
2	1,034	1,063	1,003	1,185	1,194	1,114	1,055	1,180	1,104	0,075
4	0,957	0,975	0,939	0,97	0,956	0,941	1,007	0,918	0,958	0,027
6	0,607	0,617	0,661	0,675	0,624	0,615	0,638	0,625	0,633	0,024
25	0,147	0,169	0,153	0,157	0,161	0 ,159	0,165	0,159	0,159	0,007

Tabelle zu Abbildung 7: Die Zusammenstellung der Ergebnisse von FACScan Analyse mit Malassezin

Konzentration von Malassezin (µM)	Nekrose (%)	Gesunde Zellen (%)	Apoptose (%)
0	0,1	94,67	5,23
0,1	0,18	94,69	5,13
0,5	0,23	91,53	8,24
1	0,24	84,92	14,84
2	0,26	65,56	34,18
4	0,58	50,59	50,01
6	0,78	11,48	87,74
25	1,58	6,38	92,04
50	2,03	2,92	95,05
124	87,72	0,53	11,69
248	100	0	0

Tabelle zu Abbildung 9: Ergebnisse der LDH- Freisetzung mit Malassezin

Malassezin (µM)	Wert1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mwt.	Stabw
0	0,212	0,224	0,218	0,206	0,215	0,00774597
0,5	0,189	0,215	0,207	0,245	0,214	0,02335237
1	0,241	0,198	0,203	0,254	0,224	0,02772484
1,5	0,264	0,234	0,217	0,277	0,248	0,02741046
2	0,412	0,365	0,406	0,357	0,385	0,0280119
2,5	0,468	0,506	0,47	0,501	0,48625	0,02003954
3	0,517	0,5 46	0,508	0,525	0,524	0,01622755
4	0,591	0,629	0,603	0,589	0,603	0,0184029
6	0,709	0,657	0,704	0,622	0,673	0,04128761
8	0,771	0,789	0,819	0,769	0,787	0,02315167
10	0,92	0,799	0,931	0,874	0,881	0,05998333
14	0,99	0,89	0,954	0,974	0,952	0,04387862
28	1,118	0,998	1,101	0,987	1,051	0,0680539
56	1,168	1,137	1,128	1,163	1,149	0,01951068
Nonidet	0,989	1,07	1,128	1,19	1,09425	0,08558183

Tabellen zu Abbildung 10: Einfluss vonDMSO auf die Vitalität der Melanozyten

Tabelle: Vitalität (%) im Trypan-Blau-Test

Anteil an DMSO im Medium(µL/2ml)	Wert 1	Wert 2	Mwt.	Stabw.
0	100	100	100	0
1	100	100	100	0
3	100	100	100	0
6	100	100	100	0
8	100	100	100	0
10	100	100	100	0
15	96	98	97	1,41421356
18	95	91	93	1,93
20	86	94	90	1,78

Tabelle: Vitalität (%) im MTT-Test

Anteil an DMSO im Medium (µL/2ml)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mwt.	Stabw.
0	99	100	98,7	101	95,8	100	2,04
1	101,6	98,7	99,4	102,1	101,3	100	1,48223
3	102,1	103	101,2	99,8	102	100	1,20083
6	99,7	100	102,5	101,1	103	100	1,46731
8	100,1	99,5	103	99,9	98,7	100	1,6334
10	102	99,3	101,3	99,6	100,2	100	1,14324
15	93	89	92	88	96	90	3,20936
18	95	80	87	91	84	88	5,85662
20	89	79	69	83	87	80	7,92465

Tabelle zu Abbildung 11: MTT-Test mit DMSO

Anteil an DMSO (µL/2 ml Medium)	Wert1	Wert2	Wert3	Wert4	Wert5	Wert6	Wert7	Wert8	Mwt.	Stabw
0	0,836	0,787	0,814	0,786	0,825	0,779	0,802	0,776	0,801	0,02092
1	0,822	0,832	0,753	0,768	0,778	0,758	0,827	0,839	0,797	0,03386
3	0,782	0,812	0,783	0,841	0,768	0,805	0,817	0,787	0,799	0,0222
6	0,773	0,818	0,821	0,775	0,768	0,779	0,837	0,824	0,799	0,02628
8	0,780	0,817	0,811	0,805	0,789	0,827	0,812	0,778	0,802	0,018
10	0,759	0,738	0,872	0,832	0,78	0,816	0,813	0,835	0,806	0,04396
15	0,72	0,825	0,84	0,83	0,789	0,83	0,819	0,79	0,805	0,0367
18	0,711	0,824	0,808	0,857	0,89	0,869	0,741	0,754	0,807	0,06114
20	0,752	0,79	0,823	0,823	0,875	0,713	0,880	0,784	0,805	0,05375

Tabelle zu Abbildung 12: Die Zusammenstellung der Ergebnisse von FACScan-Analyse mit DMSO

Anteil an DMSO (µl/2 ml Medium)	nekrotische Zellen (%)	unveränderte Zellen (%)	apoptotische Zellen (%)
0	0	94,47	1,52
0,25	0,04	97,72	0,21
0,5	0,06	97,67	0,14
1	0,08	96,89	0,23
2	0,12	95,75	0,18
5	0,57	95,34	0,26

Tabelle zu Abbildung 13: Ergebnisse der LDH-Freisetzung mit DMSO

Anteil an DMSO (µl/2ml Medium)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mwt.	Stabw
0	0,212	0,224	0,218	0,206	0,215	0,008
0,25	0,189	0,215	0,207	0,245	0,214	0,023
0,5	0,241	0,198	0,203	0,254	0,224	0,028
1	0,215	0,223	0,231	0,24	0,22725	0,011
2	0,228	0,217	0,227	0,213	0,22125	0,007
5	0,234	0,215	0,209	0,256	0,2285	0,021
Nonidet	0,989	1,07	1,128	1,19	1,09425	0,086

Tabellen zu Abbildung 14: Melaninbestimmung mittels Einbau von ^{14}C-(U) Tyrosin unter Einfluss von Malassezin

Konzentration von Malassezin (µM)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mwt.	Stabw
0	6586,66	7181,06	7680,79	7149,50333	547,747188
0,6	6690,55	7301,43	7853	7281,66	581,477119
1,7	6378,04	6362,6	7262,27	6667,63667	515,025436
2,1	1863,64	4403,57	3147,45	3138,22	1269,078602
2,6	1438,88	1713,64	1828,52	1660,34667	200,212305
4	1380,89	1262,63	1334,93	995,625	59,6168869

Konzentration von Kojic Acid (µM)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mwt.	Stabw
0	6586,66	7181,06	7680,79	7149,5033	547,74719
4	4301,73	3406,58	4062,28	3923,53	463,42427
6	1397,24	2298,91	2357,49	2017,88	538,28748
10	1749,52	1707,78	1283,14	1580,1467	258,06061

6. Diskussion

Pityriasis versicolor ist eine der häufigsten Mykosen der menschlichen Haut. Ihre Besonderheit besteht in Hypo- und Hyperpigmentierungen, die für die Patienten ein großes kosmetisches Problem darstellen.

Diese Depigmentierungen werden insbesondere bei Belichtung deutlich, bei der die Umgebung normale Pigmentierung zeigt; die Herde neigen allerdings nicht zu vermehrten Sonnenbränden (146).

Wie in der Einleitung beschrieben, existieren eine ganze Reihe von Theorien zum Mechanismus der Depigmentierungen, die aber alle entweder nicht haltbar sind oder nur Teilaspekte berücksichtigen.

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals der Versuch unternommen werden, den von Mayser et al. (112) neu entdeckten Tryptophan-Stoffwechselweg in *Malassezia furfur*, bei dem eine Vielzahl von Fluorochromen und Pigmenten, allesamt Indolderivate, entstehen, auf eine mögliche Beeinflussung von humanen Melanozyten zu untersuchen. Bisher konnte einpotenter Lichtschutz (110) sowie ein gelb-grün fluoreszierendes Lacton (111) isoliert werden, die beide für die geringe UV-Empfindlichkeit der Läsionen verantwortlich sein könnten, im Falle des Lactons auch für die differentialdiagnostisch wichtige Fluoreszenz der Läsionen im UV-Licht. Die aus Malassezia-Kulturen isolierten Pityriarubine sowie das Pityriaanhydrid stellen Verwandte des Arcyriarubins (Bis-Indolylmaleinimid) dar, eines potenten Proteinkinase C-Inhibitors, und könnten mit der gering ausgeprägten inflammatorischen Reaktion in PV-Herden assoziiert werden (93). Der Rohextrakt weist tyrosinaseinhibitorische Eigenschaften auf (159). In weitergehenden Untersuchungen konnte eine Hemmwirkung auf die Dopa-Anfärbung von Melanozyten in humaner Haut (Modell für die Melanogenese) gefunden und auf zwei bisher unbekannte Indolderivate zurückgeführt werden (40). Insgesamt ergibt sich der Eindruck, dass der neu entdeckte Stoffwechselweg eng mit den Pathomechanismen der Erkrankung zu korrelieren scheint. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit humane Melanozyten in Kultur den gesamten Produkten des Tryptophan-Metabolismus von *Malassezia furfur* ausgesetzt, um mögliche selektive Einwirkungen in Erfahrung zu bringen.

Nach Behandlung mit dem Rohextrakt aus Kulturen von *M. furfur* konnten schädigende Einflüsse auf die kultivierten Zellen beobachtet werden. Die

Veränderungen äusserten sich in der Morphologie der Zellen: statt des dendritischen Aufbaues fanden sich bipolare Zellen, in den höchsten Konzentrationen auch völlig abgerundete Zellen.

Da der Rohextrakt viele unbekannte Stoffe beinhaltet, wurde er in Unterfraktionen getrennt mit dem Ziel, die die Veränderungen auslösenden Verbindungen zu isolieren und zu identifizieren. Die gefundenen Veränderungen liessen sich durch das Verfahren auf eine Verbindung zurückführen. Die Strukturaufklärung erfolgte in München mittels ^{1}H- und ^{13}C-NMR (600MHz), hochauflösender Massenspektroskopie (HRMS) sowie FT-IR-Spektroskopie analysiert. Zur Aufnahme geeigneter Massenspektren standen verschiedene Ionisationsmethoden zur Verfügung (EI, ESI, FAB und CI). Die Substanz konnte als das schon bekannte Malassezin charakterisiert werden. Sie weist Eigenschaften eines potenten Ah-Rezeptoragonisten auf (171).

Da die Substanz bereits chemisch-synthetisch zugänglich war (171), wurde das Syntheseprodukt in den Zellkulturexperimenten eingesetzt. Dabei zeigte sich bezüglich der wirksamen Konzentrationen und der morphologischen Zellveränderungen kein Unterschied zur natürlichen Substanz, sodass diese in den weiteren Untersuchungen eingesetzt wurde. Zunächst wurde der Einfluss auf die Vitalität und Proliferation der Melanozyten untersucht. Die mit verschiedenen Konzentrationen behandelten Zellen wurden mittels Trypan-Blau Färbung untersucht. Dabei ergab sich bei den mit den höchsten Konzentrationen von Malassezin behandelten Zellen, dass die Mehrzahl avital war. Mit absteigender Konzentration von Malassezin nahm die Zahl der vitalen Zellen zu. Die avitalen Zellen waren leicht zu erkennen, in dem sie ihre Adhärenz verloren hatten und abgerundet waren. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Proliferationsrate, die mit der ansteigenden Zahl der avitalen Zellen sank. Bei den anderen, niedrigeren Konzentrationen von Malassezin mit geringem Einfluss auf die Vitalität fand sich auch ein geringgradiger Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

Um eine mögliche Reversibilität dieser Veränderungen nachzuweisen, wurde das Medium mit der zutestenden Substanz durch das MGM2-Medium ersetzt und die Zellen wurden 3 Wochen lang beobachtet. Die nicht adhärenten Zellen wurden zuerst zentrifugiert und danach ins frische Medium überführt. Bei den mit den höchsten Konzentrationen behandelten Zellen, die in der Mehrzahl avital waren, konnte keine Reversibilität beobachtet werden. Die Zellen wurden trotz langer

Inkubationszeit mit frischem Medium nicht adhärent und haben auch nicht proliferiert. Bei den adhärenten Zellen verlief das weitere Wachstum fast gleich wie bei den Kontrollzellen.

Die mit Malassezin gefundenen Veränderungen der Zellen entsprechen den Patientenbefunden der Arbeitsgruppe um Breathnach (24), die ausgeprägte Veränderungen der Melanozyten bis hin zu deren Untergang fand.

Ähnliche Aussagen liefern die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der mit Malassezin behandelten Zellen. Die Zellen sind kugelig abgerundet. Filamentbündel wie bei den adhärenten Zellen sind nicht mehr zu erkennen. Die Zellen zeigen generelle Zeichen der Zellschädigung, ein nicht unerheblicher Teil ist vollständig lysiert. Durchgehendes Merkmal ist eine Vakuolosierung der Zellen, die teils mäßig bis dezent, teils äußerst augeprägt ist. Charakteristika der Apoptose sind kaum zu erkennen, aber auch nicht abzulehnen. Teils ist einzelnes blebbing an der Zellfläche zu erkennen, weitere Apoptose-spezifische Merkmale allerdings kaum. Der Zellkern zeigte zwar durchaus Veränderungen, darunter auch teilweise Chromatinkondensierung, diese zeigt jedoch nicht das bekannte homogene Muster oder auch eine entsprechende Anreichung am Rande des Zellkerns.

Auch die ausgeprägte Vakuolisierung spricht nicht für eine Apoptose. Melanosomen sind zwar teils zu erkennen, scheinen insgesamt aber seltener vorhanden zu sein, als in den gesehenen Kontrollzellen, ohne dies jedoch quantifiziert zu haben.

Es ist sehr schwierig, eine Aussage bezüglich der apoptotischen und nekrotischen Erscheinungen durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der in vitro kultivierten Zellen zu treffen.

Dies könnte die Ursache darin haben, dass in der Zellkultur der späten Apoptose wegen nicht vorhandener phagozytierender Zellen zwangsläufig auch der Membranzusammenbruch folgt, was auch als „sekundäre Nekrose“ bezeichnet wird.

Eine gemeinsame Erscheinung ist die DNA-Fragmentierung, die bei der Apoptose gerichtet geschieht, bei der Nekrose hingegen durch freigesetzte lytische Enzyme zufällig erfolgt. Daran wird das Problem deutlich, in der Zellkultur zwischen nekrotischen und spätapoptotischen Zellen zu differenzieren. Ein weiteres Problem ist das Auftreten atypischer Apoptosen, bei denen ein oder mehrere Charakteristika fehlen können.

Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit mehrere unterschiedliche apoptosespezifische Nachweismethoden durchgeführt.

Um die Anwesenheit der apoptotischen Veränderungen in den behandelten Zellen sichtbar darzustellen, wurden dafür geeignete und spezifische Methoden angewendet: die sogenannte Höchst-Färbung (der Name kommt von der Fa. Höchst, die den Farbstoff herstellte) und der Comet Assay (Apoptosis Detection Kits R&D Systems/single cell gel elektrophoresis assay) basieren auf der Zellkernanfärbung. Bei der Höchst-Färbung wird ein Bisbenzimid-Farbstoff eingesetzt, eine Substanz, die an adenin- und thymidinreiche Sequenzen bindet und somit spezifisch den Zellkern anfärbt. Der Farbstoff besitzt die Eigenschaft, bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 360 nm blau zu fluoreszieren. BeimComet Assay wird die DNA an geschädigten Stellen hydrolysiert und denaturiert. Die danach folgende Elektrophorese induziert die Migration der denaturierten und gespaltenen DNA-Fragmente aus einer geschädigten Zelle unter dem Einfluss des elektrischen Feldes. Die unbetroffenen, spiraligen Fragmente der DNA bleiben in der Zelle. Die schleifenförmigen DNA-Fragmente, die aus der Zelle auswandern, können auf diese Weise unter einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Sie erinnern in ihrer Form an den Schweif eines Kometen, der im Fluoreszenzmikroskop auf schwarzem Hintergrund grünlich fluoresziert. In beiden Untersuchungen zeigten sich typische apoptotische Veränderungen der mit Malassezin behandelten Zellen.

Bei der Höchst-Färbung wurden die zell- und kernmorphologischen Veränderungen während der Apoptose beobachtet. Die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte wurden geringer, wobei sich die Zellen abrundeten. Nach 4-stündiger Inkubation mit Malassezin wurden sogar typische apoptotische Körperchen - sog. „apoptotic bodies“ beobachtet, die Folge der Abschnürungen der Zellmembran sind. Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur beschriebenen apoptotischen Veränderungen (Verlust der Zell-Zell- und Zell-Membran-Kontakte von Bortner, 23 und „apoptotic bodies“ von Holmgren, 75).

Bei dem Comet Assay wurden typische kometenschweifähnliche Färbungen durch auswanderte DNA-Fragmente beobachtet. Da die beiden Methoden eher zur qualitativen Detektion der apoptotischen Erscheinungen als zu ihrer Quantifizierung geeignet sind und die Apoptose als ein Prozess der auf vielen Ebenen gleichzeitig verläuft, erfasst werden sollte, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

Zu den apoptosespezifischen Methoden gehört die Annexin-Anfärbung und Auswertung der spezifisch gefärbten Zellen im Durchflußzytometer.

Die Apoptose wurde nicht nur bestätigt, sondern auch als dosisabhängige Reaktion charakterisiert. Steigende Malassezin-Konzentrationen führten zur verstärken Ausbildung apoptotischer Veränderungen, die schliesslich bei den höchsten Konzentrationen zur Nekrose der Zellen führten.

Die Ergebnisse, die im apoptotischen Konzentrationsbereich liegen, sind eindeutig. Die Ergebnisse im nekrotischen Bereich weisen auf entweder die früher erwähnte späte Apoptose- „sekundäre Nekrose“ in der Zellkultur, die schon als Nekrose detektiert wird oder aber auf eine primäre Nekrose.

Zur weiteren Charakterisierung der Veränderungen dieser Frage konnte eine andere apoptosespezifische Nachweismethode beitragen. Dabei handelt es sich um die Analyse der enzymatischen apoptotischen Reaktionen, hier um die Aktivierung der Caspasen. Caspasen sind Enzyme, die mit der komplexen Signaltransduktionskaskade der Apoptose einhergehen. Dabei können die Mechanismen der Apoptose über die extrinsische bzw. intrinsische Signalkaskade („extrinsic“ oder „intrinsic pathway“) vermittelt ablaufen.

Bei der extrinsischen Apoptosekaskade handelt es sich um eine Rezeptor-vermittelte Reaktion, die durch die Todesrezeptoren (z.B. Fas-/TNF-Rezeptor) der Superfamilie der TNF (tumor necrosis factor) und NGF (nerve growth factor) initiiert wird. Durch spezifische Bindung ihrer spezifischen Liganden werden die Procaspasen 8 und 10 aktiviert.

Die intrinsischen Apoptosekaskade wird durch eine mitochondriale Dysfunktion induziert. Wegen einer erhöhten Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran wird das Cytochrom c in das Zytosol freigesetzt. Das Cytochrom c rekrutiert über das Adapterprotein Apaf-1 (Apoptosis protease actvating factor) die Procaspase 9 (131), welche auf diese Weise aktiviert wird.

In dieser Arbeit wurden die Antikörper von Caspase 8 (der externe Weg der Apoptose) und 9 (der interne Weg der Apoptose) eingesetzt.

Zuerst wurden die Proteine mittels der SDS-Gelelektrophorese getrennt und dann durch die Western Blot-Analyse nachgewiesen.

Dabei konnten die Abbauproteine von Caspase 9 eindeutig nachgewiesen werden, sogar wird hier eine konzentrationsabhängige Aktivierung sichtbar. Im Fall von Caspase 8 wurden keine Abbauprodukte, die nach der Aktivierung entstehen, beobachtet, sowohl nach einer kurzzeitigen (4 Stunden) als auch nach einer langzeitiger (9 Stunden) Inkubation.

Diese Ergebnisse sprechen für den internen Apoptoseweg, der durch mitochondriale Dysfunktion entstehen. Durch diese Untersuchung wurde die Apoptose als allgemeine Reaktion in der Zelle auch auf enzymatischer Ebene bestätigt. Dabei ergab sich, dass auch hier ein konzentrationsabhängiger Prozess abläuft.

Neben der Apoptose können natürlich auch unspezifische Zellschädigungen erfolgen. Diese wurden auch bestätigt, und zwar mittels LDH-Test. Dabei wird die durch toxische Einflüsse bedingte Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms LDH gemessen als Parameter für eine toxische Zytolyse.

Die Toxizität von Malassezin ist dosisabhängig und wird schon in den Konzentrationen von 1 µM bestätigt. Dabei werden noch keine morphologischen Veränderungen in der Zelle beobachtet. Diese Ergebnisse würden die toxische Theorie der Depigmentierung von Pityriasis versicolor unterstützen.

Weitere wichtige Ergebnisse lieferte die Melaninbestimmung über den Einbau von ^{14}C - markiertem Tyrosin. Es wurde eine konzentrationsabhängige Inhibition des Einbaues gefunden, vergleichbar mit dem bekannten Tyrosinase-Inhibitor Kojic acid, was auf eine gestörte Melaninsynthese hinweisen würde. Der Einbau von radioaktivem Tyrosin ist parallel zu den im LDH-Test als toxisch gefundenen Konzentrationen eingeschränkt, so dass die gefundene Hemmung der Pigmentbildung eher auf toxische Effekte zurückzuführen ist als auf eine Hemmwirkung auf die Melaninsynthese. Frühere Befunde in vitro schliessen eine Tyrosinase-Hemmung durch Malassezin jedenfalls aus (159).

Die Anfärbung zytoskeletaler Elemente mittel immunhistochemischer Methoden zeigte bei den Aktin-Strukturen eine deutliche Verminderung der anfärbaren Elemente, und zwar bereits in Konzentrationen, bei denen die toxische LDH-Freisetzung noch minimal war. Der Einfluss auf Aktin-Strukturen im Verlauf der Apoptose wurde auch an anderen Zellen, z. B. an HL-60 Leukämie Zellen gezeigt (167) und dort verantwortlich gemacht für die morphologischen Zellveränderungen, sodass dieser Befund in das Gesamtbild passt, hier aber durch die funktionelle Bedeutung der Aktin-Strukturen besonderes Gewicht erhält. Aktin-Strukturen sind direkt am Melanosomen-Traffic beteiligt (95), sodass sich durch die Verringerung für die intra- und interzelluläre Melaninweitergabe an Keratinozyten ein hemmender Effekt ergeben könnte.

Aufschlussreich war auch die Anfärbung mit dem Antikörper Melan-A, der das melanosomenspezifische Protein MART-1 in Melanosomen sowie am

endoplasmatischen Retikulum (89) erkennt. Hier war im Verlauf der Konzentrationserhöhung von Malassezin keine Veränderung der Anfärbbarkeit zu erkennen, was darauf hinweist, dass die Synthese melanosomaler Strukturen nicht beeinträchtigt wird.

Die beobachtenden Wirkungen von Malassezin könnten auf seine Eigenschaft als Agonist des Arylhydrocarbon (AHR)-Rezeptors zurückzuführen sein. Dem AHR werden insbesondere Aufgaben bei der Regulation des Fremdstoffwechsels der Zelle zugeschrieben (149). Am besten untersucht ist seine Aktivierung durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (polychlorierte Dibenzo-p-Dioxine, Dibenzofurane, Biphenyle) sowie halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (Benzo(a)pyrene, Benzoflavone, aromatische Amine) mit der daraus resultierenden Induktion von Cytochrom P450 (CYP1A1). Neben seiner Rolle bei xenobiotischen Prozessen ist der AHR aber auch an der Kontrolle komplexer zellulärer Programme wie Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligt (82, 139). Dabei scheinen AHR-Agonisten sowohl zur Zellproliferation als auch zur Apoptose führen zu können, welcher Weg unter welchen Bedingungen eingeschlagen wird, ist unklar (139). Ob Melanozyten AHR-Rezeptoren aufweisen, ist bisher noch nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit hat erste Hinweise geliefert, dass solche Wechselwirkungen bestehen könnten. Die durch Malassezin bedingten Einflüsse passen sehr gut zu den bei der PV alba beobachteten Zellveränderungen. Inwieweit diese Veränderungen in vivo durch die Metabolite verursacht werden, bedarf allerdings noch eines direkten Nachweises. Dabei ist zu bedenken, dass die Läsionen der PV meistens großflächig auftreten mit erheblicher Anhäufung von M. furfur Hefen. Auf normaler unveränderter Haut wird die Erregerzahl mit 10 000-50 000 Erreger/cm^2 angegeben. Bei der Pityriasis versicolor steigt die Zahl bis auf 450 000 Erreger/cm^2 (114, 172). Deshalb ist es durchaus denkbar, dass durch die grosse Erregerzahl ausreichende Konzentrationen der Sekundärmetabolite vorliegen könnten, um die Zellveränderungen in der Haut auszulösen, insbesondere bei chronischen Verläufen.

Diese Ergebnisse könnten auch einen neuen Hinweis bezüglich der späten Repigmentierung bei der behandelten Pityriasis versicolor liefern. Es könnte vermutet werden, dass die Repigmentierung dann möglich wird, wenn der von Malassezia furfur produzierte Stoff nur noch in entsprechend geringer

Konzentration auf der Haut vorhanden wäre, die ein weiteres Wachstum und weitere Proliferation der Melanozyten nicht behindert.
Weiterhin muss geklärt werden, ob die beobachteten Effekte für Melanozyten spezifisch sind, oder ob auch Keratinozyten von den entsprechenden Effekten betroffen sind. Erste Befunde weisen darauf hin (Baron, M. Aachen, unveröffentlicht). Es könnte aber durchaus eine besondere Empfindlichkeit der Melanozyten im Vergleich zu anderen Zellen gegenüber Malassezin vorliegen, wie im Falle anderer, apoptose-auslösender Agentien (z. B. Daunomycin, 45).
Aus den gewonnen Befunden ergibt sich eine toxische Wirkung des Malassezins auf die humanen Melanozyten, die morphologische Veränderungen der Zellen und verminderte Melaninsynthese und einen gestörten Melanintransport verursacht und zu einem programmierten Zelltod führt.

Insgesamt ergibt sich zum einen ein interessantes und neues Modell für die Pathogenese der mit der Pityriasis versicolor einhergehenden Depigmentierungen, aber auch möglicherweise ein Ansatzpunkt für eine spezifische Therapie maligner Melanome.
Die eingangs gestellten Fragen sind daher wie folgt zu beantworten:

1. Screeninguntersuchungen zeigten Effekte von Metaboliten des Tryptophan-Stoffwechsels von *Malassezia furfur* auf kultivierte humane Melanozyten
2. Durch sukzessive Aufreinigung konnten die beobachteten Wirkungen insbesondere dem Malassezin zugeschrieben werden, einem im Trpytophan-Metabolismus von *Malassezia furfur* nachweisbaren Agonisten des Arylhydrocarbonrezeptors mit offenkettiger Struktur. Die Effekte sind dosisabhängig und umfassen eine Beeinflussung von Vitalität (Trypan-Blau, MTT-Test) und Proliferation sowie Induktion von Apoptose (ab 0,5 µM) und Nekrose (ab 50 µM). Auch die Melaninsynthese wird gehemmt, dies aber möglicherweise als Ausdruck einer allgemeinen Zellschädigung, da Malassezin keinen spezifischen Tyrosinase-Inhibitor darstellt.
3. Die beobachteten Veränderungen konnten dosisabhängig als apoptotisch charakterisiert werden, was als spezifische, AHR-vermittelte Wirkung des Malassezins verstanden werden kann, da ähnliche Erscheinungen bereits in Hepatomzellen (HepG2) unter dem Einfluss der bekannten AHR-Agonisten

Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol und dessen - 9,10-epoxid beschrieben wurden (35). Damit ergeben sich erstmals Hinweise auf eine AHR-vermittelte Reaktion von Melanozyten im Sinne der Apoptose.

Die beobachteten pharmakologischen Wirkungen von Malassezin auf humane Melanozyten könnten somit die Pathogenese der mit der Pityriasis versicolor einhergehenden Depigmentierungen erklären. Hierbei ist zu bedenken, dass im Tryptophan-abhängigen Sekundärmetabolismus von *M. furfur* weitere Substanzen zu vermuten sind, die synergistisch wirken könnten. Untersuchungen an humanen Melanomzellen könnten zudem Hinweise auf eine neue mögliche Therapieoption bei malignen Melanomen liefern.

7. Zusammenfassung

Pityriasis versicolor ist eine durch Hefepilz *Malassezia furfur* bedingte Erkrankung der Haut, die vor über 200 Jahren beschrieben wurde.
Die typische klinische Ausprägung dieser Krankheit besteht in der Ausbildung von bräunlichen Maculæ und zugleich Depigmentierungen auf der Haut.
Ein erklärendes Modell des Pathomechanismus wurde jedoch nicht gefunden.
In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Tryptophan-Metaboliten aus *Malassezia furfur* auf kultivierte humane Melanozyten untersucht. Darüber hinaus wurde versucht, die gefundene Wirkung mit den klinischen Erscheinungen der Pityriasis versicolor in Beziehung zu setzen.
Zunächst wurde ein Rohextrakt aus der Kulturen der Hefe isoliert, die Tryptophan als einzige Stickstoffquelle erhielten, und ins Zellkulturmedium zugegeben. Innerhalb von ersten Stunden nach der Zugabe konnten lichtmikroskopisch erhebliche morphologische Veränderungen beobachtet werden: statt des dendritischen Aufbaues fanden sich bipolare Zellen, in den höchsten Konzentrationen auch völlig abgerundete Zellen. Der Rohextrakt wurde dann solange mittels präparativer DC und präparativer HPLC gereinigt, bis eine einzige Verbindung isoliert werden konnte. Die in Gießen erhaltenen Proben wurden in München mittels ^{1}H- und ^{13}C-NMR (600MHz), Massenspektroskopie (HRMS) sowie FT-IR-Spektroskopie analysiert. Die Substanz erwies sich als das schon bekannte, aus *Malassezia*-Kulturen isolierte Malassezin.
Es wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Veränderungen durch Malassezin in der Melanozytenkultur charakterisiert. Dabei wurden die Zellen auf Vitalität, Proliferation und Reversibilität der Veränderungen untersucht. Sowohl die Vitalität (durchgeführt mit Trypan-Blau Färbung) als auch die Proliferation (MTT-Test) wurden konzentrationsabhängig durch Malassezin beeinträchtigt (LD_{50} ca. 10 µM).
Es fand sich ein typisch sigmoider Konzentrationsverlauf, d. h. in niedrigen Konzentrationen waren die Einflüsse eher gering im Vergleich mit den Kontrollzellen.
Elektronenmikroskopisch wurden generelle Zeichen der Zellschädigung nachgewiesen. Es wurden auch apoptotische Erscheinungen gefunden wie „blebbing“ an der Zelloberfläche, teilweise Chromatinkondensierung in dem

Zellkern. Die Melanosomen waren zwar teils zu erkennen, schienen insgesamt aber seltener vorhanden zu sein.

Um die Zellveränderungen zu spezifizieren, wurde zwischen Apoptose und Nekrose mittels FACS differenziert. Die Zellen wurden unter Verwendung von Annexin-V-Fluos (Roche, Mannheim) angefärbt, die als einer der Apoptose-spezifischen Marker gilt. Zur Abgrenzung der nekrotischen Zellen wurde zusätzlich eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Es wurde eine dosisabhängige Apoptose detektiert. Die nekrotischen Zellen wurden in den höchsten angesetzten Konzentrationen von Malassezin gefunden. Um die Apoptose weiter zu charakterisieren, wurde der Nachweis einer Aktivierung der Caspasen 8 und 9 durchgeführt.

Die Analyse zeigte eine erhebliche und dosisabhängige Aktivierung der Caspase 9. Diese Ergebnisse sprechen für einen internen Apoptoseweg, der durch mitochondriale Dysfunktion entsteht.

Apoptose-spezifische Veränderungen des Zellkernes wie sog. „apoptotic bodies“ , die Folge der Abschnürungen der Zellmembran sind, konnten in der sog. Höchst-Färbung beobachtet werden. Bei dem Comet Assay wurden komet-ähnliche Zellen, mit auswanderten DNA-Fragmenten beobachtet, was auch Apoptose-spezifisch ist.

Durch die Bestimmung der LDH- Freisetzung konnte eine toxische Wirkung von Malassezin nachgewiesen werden, die mit diesem Parameter schon bei geringen Konzentrationen zu messen war (ED_{50} ca. 3,4 µM). Die nachgewiesene Toxizität korreliert sehr gut mit der mitochondrialen Dysfunktion, die durch die Caspase-9-Aktivierung belegt wurde.

Auch die Untersuchung der Melaninsynthese über den Einbau von ^{14}C -markiertem Tyrosin ergab eine konzentrationsabhängige Inhibition, wobei natürlich diese auch Ausdruck einer allgemeinen Zellschädigung sein kann und keine spezifische Wirkung.

Die Anfärbung zytoskelettaler Elemente ergab bei der Aktin-Färbung einen Verlust der Anfärbbarkeit mit zunehmender Konzentration, wobei allerdings dieser Einfluss bereits unterhalb des durch LDH-Freisetzung bestimmten Toxizitätsbereiches erfolgte. Die Anfärbung des melanosomalen Proteins MART-1 zeigte keine Veränderung, was auf eine nicht eingeschränkte Synthese der melanosomalen Strukturen hinweist.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten weitere Einsichten in den Pathomechanismus der Pityriasis versicolor gewinnen. Die Untersuchungen der Einwirkung von Metaboliten der Hefe *M. furfur* auf kultivierte humane Melanozyten haben als prominentes melanozytotoxisches Prinzip unter der Vielzahl von Verbindungen den bereits bekannten AH-Rezeptoragonisten Malassezin ausgewiesen. Dies untermauert die Hypothese weiter, dass die Veränderungen in vivo durch die Metabolite von *Malassezia*-Hefen verursacht werden.

8. Verzeichnisse

8.1 Abbildungen:

Seite:

Abbildung 1:
Pigmentsynthese 15
Abbildung 2:
Regulation der Apoptose im Überblick 47
Abbildung 3:
Schema der Apoptosekaskade 48
Abbildung 4:
Schema der enzymatischen Reaktionen im LDH-Assay 57
Abbildung 5:
Vitalität (%) bestimmt mittels Trypan-Blau- und MTT-Test 74
Abbildung 6:
Bestimmung der Proliferation (MTT-Test) 74
Abbildung 7:
Grafische Darstellung der FACScan-Analyse 75
Abbildung 8:
Ergebnisse von Western-Blot 76
Abbildung 9:
Ergebnisse der LDH-Freisetzung 80
Abbildung 10:
Einfluss von DMSO auf die Vitalität der Melanozyten 81
Abbildung 11:
Einfluss von DMSO auf die Proliferation der Melanozyten 81
Abbildung 12:
Einfluss von DMSO auf die apoptotischen und nekrotischen
Veränderungen der Melanozyten 82
Abbildung 13:
Einfluss von DMSO auf die LDH-Freisetzung 82
Abbildung 14:
Ergebnisse der Melaninbestimmung mittels Einbau
von 14C-(U) Tyrosin 83

Abbildung 15:
Ergebnisse der Zytoskelett-Anfärbung 86

8.2 Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl
Apaf-1	Apoptosis protease actvating factor
APS	Ammoniumproxid Sulfat
Aq. dest.	Aqua destillata
BFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BPE	Rinderhypophysenextract
BSA	Bovine Serum Albumin
Caspasen	**C**ysteinyl **As**partate-specific protein**ase**
CI	Ionisation
DC	Dünnschichtchromatographie
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Dsoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECGS/H	Epidermaler Wachstumsfaktor / Heparin
ED_{50}	Effektive Dosis mit 50% des maximalen Effektes
EI	Elektronenimpact
EDT	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardement
FACScan	Durchflußzytometrische Scan Analyse
FKS	fetales Kälberserum
FT-IR-Spektroskopie	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
GDA	Glutardialdehyd
HAM	Nutrient Mixture F 10
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	Hochauflösende Massenspektroskopie
HRP	Horseradisch-Peroxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xantine
KDa	kiloDaltons
LD_{50}	Letale Dosis, bei der 50% der Zellen abgestorben ist
LDH	Lactat-Dehydrogenase
L-Dopa	L- 3,4-Dihydroxyphenylalanin
MGM	Melanocyte Growth Medium
MGM2	Melanocyte Growth Medium 2
M. furfur	*Malasszia furfur*
min	Minuten
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
MTT	3-[4,5-Dimethyl-2]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolinumbromid
Mwt.	Mittelwert
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NGF	Nervenwachstumsfaktor
PBS	Phosphat Buffered Saline
PMA	Phorbol-Myristate-Acetete
PS	Phosphatidyloserin
P.V.	Pityriasis versicolor
RT	Raum Temperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stabw.	Standardabweichung
Std.	Stunde/Stunden
TBS	Tris Puffer
TBS-T	Tris Puffer mit 0,1 % Tween
TPA	4-O-Methyl-12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-3-Acetat
U/min	Umdrehung/Minute
UV	Ultraviolett

8.3 Fotos: **Seite:**

Foto 1:
P.V. -die hyperpigmentierte Form 10
Foto 2:
Fluoreszenz der PV Läsionen unter UV-Licht 18
Foto 3:
Nativpräparat 18
Foto 4:
Hobelspanphänomen 19
Foto 5:
Kolonien von *Malassezia furfur* auf Dixon-Agar 22
Foto 6:
DC-Platte mit den 7 Hauptfraktionen 64
Foto 7:
Kontrollzellen 65
Foto 8:
behandelte Zellen 65
Foto 9:
DC-Platte der Unterfraktionen von der Hauptfraktion 2 65
Foto 10:
“Höchst-Färbung“, unbehandelte Zellen 77
Foto 11:
“Höchst-Färbung“, behandelte Zellen, nach 2 Std. 77
Foto 12:
“Höchst-Färbung“, behandelte Zellen, nach 4 Std. 78
Foto 13:
“Höchst-Färbung“, behandelte Zellen, nach 5 Std. 78
Foto 14:
“Höchst-Färbung“, behandelte Zellen, nach 11 Std. 78
Foto 15:
„Comet Assay“, unbehandelte Zellen 79
Foto 16:
„Comet Assay“, behandelte Zellen, (6,195 µM Malassezin) 79

Foto 17:
„Comet Assay“, behandelte Zellen, (24,78 µM Malassezin) 79
Fotos 18-21:
Elektronenmikroskopie von unbehandelten Zellen 84
Fotos 22-25:
Elektronenmikroskopie von behandelten Zellen 84

8.4 Tabellen: **Seite:**

Tabelle 1:
Zusammenstellung der Eigenschaften des Eu- und Phäomelanins 14
Tabelle 2:
Systemische Therapie der Pityriasis versicolor
(in alphabetischer Reihenfolge) 21
Tabelle 3:
Zusammensetzung des mDixon-Agars 26
Tabelle 4:
Die erhaltenen Fraktionen mit ihren charakteristischen Eigenschaften 29
Tabelle 5:
Einstellung des Linomaten
zur analytischen DC-Trennung der Fraktionen 30
Tabelle 6:
Einstellung des Linomaten
zur präparativen DC-Trennung der Fraktionen 30
Tabelle 7:
Zusammenstellung der in der Zellkultur verwendeten Volumina 34
Tabelle 8:
Zusammensetzung der Bestandteile im Lerner-Medium
nach verwendeten Volumina 36
Tabelle 9:
Zusammensetzung des MGM2-Mediums 37
Tabelle 10:
Zusammensetzung des MGM-Mediums 37
Tabelle 11 :
Zusammensetzung des 3fach SDS-Sample-Puffer 50

Tabelle 12:
Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels 51
Tabelle 13 :
Verwendete Antikörper im Western-Blot 53
Tabelle 14 :
In der Zytoskelett-Anfärbung verwendete Antikörper 62
Tabelle 15 :
Gewicht der Fraktionen 63
Tabelle 16:
Unterfraktionen der Hauptfraktion 2 nach der Auftrennung 66
Tabelle 17:
Die fünf ausgewählten HPLC-Fraktionen
(HPLC-Lauf und die Wirkung auf die Zellen) 68
Tabelle 18:
HPLC-Unterfraktionen der Fraktion O6
(HPLC-Läufe und die Wirkung auf die Zellen) 71

8.5 Literatur:

1. Abdel-Malek, Z., Swope, VB., Pallas, J., Krug, K., Nordlund, JJ.: Mitogenic, melanogenic, and cAMP responses of cultured neonatal human melanocytes to commonly used mitogens. *J. Cell. Physiol*. 150: 416-425, 1992
2. Abdel-Malek, ZA., Ross, R., Trinkle, L., Swope, V., Pike, JW., Nordlund, JJ.: Hormonal effects of vitamin D3 on epidermal melanocytes. *J. Cell. Physiol.* 136:273-280,1988
3. Ackerman, A.B.: Histologic diagnosis of inflammatory skin disease. 2nd edn., Baltimore: *Williams and Wilkins*, pp. 757-8, 1997 *Acta Derm. Venereol*. 64: 473-479, 1984
4. Adamson, H.G.: Pityriasis versicolor with subsequent leukodermic patches. *Brit. J. Derm.* 61: 322-322, 1949
5. Allen, H.B., Charles, C.R., Johnson, B.L.: Hyperpigmented tinea versicolor. *Arch. Dermatol*. 112: 1110-1112, 1972
6. Altmeyer, P., Bernd, A., Holzmann, H., Bacharach-Buhles, M., Halberstadt, E.: Alpha-MSH und Schwangerschaft/Alpha-MSH and Pregnancy. Zeitschr. *Hautkrankheiten* 64:577-580, 1989
7. Andree, H.A.M. et al.: Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to plana phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem*. 265: 4923, 1990
8. Ashkenazi, I A. und Dixit, V. M. : Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308, 1998
9. Baker, S. und Reedy, E.P.: Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, 3261-3270, 1998
10. Balus, L., Grigoriu, D.: Pityriasis versicolor. *Alsbach, Cilag GmbH*, 1982
11. 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
12. Barnicot, NA.: The pigment, trichsiderin, from human red hair.
13. Beare, JM.,Gentles, JC., MacKenzie, DWR.: Mycology in: Textbook of Dermatology, Bd. 1 (*Eds. Rook, A., Wilikinson, SD., Ebling, GJF*.) Oxford, Edinburgh, pp. 694-805, 1972
14. Bélec, L., Testa, J., Bouree, P.: Pityriasis versicolor in the Central African Republic: a randomized study of 144 cases. *J. Med. Vet. Mycol*. 29: 323-329, 1991

15. Bernd, A., Ramirez-Bosca, A., Diehl, S., Sewell, A., Holzmann, H., Alpha-MSH immunoreactivity is increased in isolated human skin biopsies after UVA/UVB radiation. *Eur. J. Dermatol*. 3: 402-406, 1993.
16. Blumenthal, H.: Tinea versicolor of the penis.*Arch. Derm*. 103: 461-462, 1971
17. Boardman, C.R., Malkinson, F.D.: Tinea versicolor in steroid treated patients. *Arch. Dermat*. 85: 44-52, 1962
18. Bojanovsky, A., Bohnert, E., Jung, E.G.: *Pityrosporum orbiculare* : Erreger verschiedener klinischer Bilder und Model einer Depigmentierungsart.
19. Boldt, P.: Zur Kenntnis des Trichosiderins, eines Pigments aus roten Haaren. *Naturwissenschaften* 51: 265, 1964
20. Bond, R., Anthony, R.M.: Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *J. Appl. Bacteriol*. 78: 537-542, 1995
21. Borelli, D.: Pitiriasis versicolor por *Malassezia ovalis*. *Mycopathologica* 89: 147-153, 1985 *Br. J. Derm*. 113: 687-697, 1987
22. Borelli, D., Jacobs, P.H., Nall, L.: Tinea versicolor: epidemiological, clinical and therapeutic aspects. *J. Am. Acad. Dermatol*. 25: 300-305, 1991
23. Bortner, C. D. und Cidlowski, J. A.: Volume regulation and ion transport during apoptosis. *Methods Enzymol.* 332, 421-433, 2000
24. Breathnach, A.S., Nazzaro-Porro, M, Martin, B.: Ultrastructure of skin in pityriasis versicolor. *Giorn. Ital. Derm*. 110: 457-469, 1975
25. Breathnach, A.S., Nazzaro-Porro, M., Passi, S.: Azelaic acid. *Br. J. Derm*. 111: 115-120, 1984
26. Burgess, WH., Maciag, T.: The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Ann. Rev. Biochem*. 58: 575-606, 1989
27. Burke, R.C.: Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infections in human beings. *J. Invest. Derm*. 36: 389-401, 1961
28. Butenandt, A., Biekert, E., Linzen, B.: Über Ommochrome VII. Mitteilung. Modellversuche zur Bildung des Xanthommatins in vivo.*Canad. J. Microbiol*. 23: 471-475, 1977
29. Canizares, O., Shatin, H., Kellert, A.J.: Cushings syndrome and dermatomycosis. *Arch. Derm*. 80: 705-709, 1959
30. Carpenter, G., Cohen, S.: Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem*. 48: 193-216, 1979

31. Cassel, D., Pfeuffer, T.: Mechanismus of cholera toxin actions covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 75: 2669-2673, 1978
32. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium acivated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem*. 257: 7847-7851, 1982
33. Castellani, A., Chalmers, A.: Manual of tropical medicine, 2nd edn., London, *Baillière Tindall & Cox*, 1913
34. Charles, C.R., Sire, D.J., Johnson, B.L., Beidler, J.G.: Hypopigmentation in tinea versicolor: A histochemical and electronmicroscopic study.
35. Chen, S., Nguyen, N.., Tamura, K., Karin, M., Tukey, RH.: The role of the Ah Receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278(21): 19526-33, 2003
36. Creagan, ET., Ingle, JN., Woods, J E., Pritchard, DJ., Jiang, NS.: Estrogen receptors in patients with malignant melanoma.*Cancer* 46 : 1785-1786, 1980
37. Creutz, C.E.: The annexins and exocytosis. *Science* 258, 924, 1992
38. Cunningham, A.C., Leeming, J.P., Ingham, E., Gowland, G.: Differentiation of three serovars of *M. furfur. J. Appl. Bacteriol* . 68: 439-446, 1990
39. Czech, MP.: Insulin action and the regulation of hexose transport. Diabetes 29: 399-409, 1980
40. Dahms, K.: *Inaugural-Dissertation* zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (im Schreiben)
41. Davis, RJ., Czech, MP.: Tumor promoting phorbol diesters cause the phosphorylation of epidermal growth factor receptors in normal human fibroblasts at threonine-654. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 82: 1974-1978, 1985
42. Degreef, H.: Clinical aspects of pityriasis versicolor.*Mykosen* 21, Suppl. 1: 146-149, 1978
43. Delclos, KB., Nagle, DS., Blumberg PM.: Specific binding of phorbol ester tumor promoters to mouse skin. *Cell* 19: 1025-1032, 1980
44. Dorn, M., Roehnert, K.: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Derm*. 69: 224-248, 1977

45. Drukala, J., Rajwa, B., Pietrzkowski, Z., Korohoda, W.: Comparison of daunomycin effects on human keratinocytes and melanoma HTB 140 cells. Image cytometry study. *Anticancer Res.*, 23(1A): 419-26, 2003
46. Eisinger, M., Marko, O.: Selective proliferationof normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2018-2022, 1982
47. El-Gothamy, Z., Abdel-Fattah, A., A.F.: Tinea versicolor hypopigmentation: histochemical and therapeutic studies. *Int. J. Derm*. 14: 510-515, 1975
48. El-Hefnawi, H., El-Gothamy, Z., Refai, M.: Studies on pityriasis versicolor in Egypt. II. Clinical and therapeutic. *Mykosen* 14: 483-490, 1971
49. Ellis DL., Wheeland RG., Solomon H.,Estrogen and progesterone receptors in congenital melanocytic nevi *J. Am.Acad. Dermatol*.12 :235-244, 1985
50. Fadok, V. et al.: Exposure to phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunology* 148,2207, 1992
51. Faergemann, J.: Antibodies to *Pityrosporum orbiculare* in patients with tinea versicolor and controls of various ages. *J. Invest. Derm.* 80: 133-135, 1983
52. Faergemann, J., Bernander, S.: Micro-aerophilic and anaerobic growth of Pityrosporum orbiculare. *Sabouraudia* 17: 171-179, 1981
53. Ferguson, DC., Hoenig, M.: Glucocorticoids, Mineralocorticoids and Steroidsynthesisinhibitors. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics(HR Adams, ed), *Iowa State University Press, Ames* (USA) 7: pp 622-655, 1995
54. Fournier, A., Sabouraud, R.: Syphiloide infantiles dérivant du pityriasis versicolor. *Bull. Soc. Derm. Syph*. 5: 251-257, 1894
55. Fuller, BB:, Lunsford, JB., Iman, DS.: ?-Melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in Cloudman S-91 mouse melanoma cell culture. *J. Biol.Chem*. 262:4024-4033, 1987
56. Galy, A., Jolivet, M., Jolivet-Reynaud, C., Hadden, J.: Fibroblast growth factor(FGF) and an FGF-like molecule in pituitary extracts stimulate thymic epithelial cell proliferation*Thymus* 15: 199-211, 1990
57. Gill, M,, Steglich, W.: Pigments of Fungi (Macromycetes). Progress in the Chemistry of Organic natural products Bd. 51; Wien New-York: *Springer Verlag*, 1987
58. Gonzales-Ochoa, A.: Pityriasis versicolor. Rev. Med. (Merx) 2: 81-82, 1956

59. Gordon, M.A.: The lipophilic mycoflora of the skin. I. In vitro culture of Pityrosporum orbiculare n.sp. *Mycologia* 43: 524-535, 1951
60. Götz, H.: Pityriasis versicolor. In: Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermatophyten. Handbuch für Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg.: A. Marchionini, H. Götz). Erg. Bd. IV/3, *Heidelberg: Springer Verlag*, 352-360, 1962
61. Götz, H.: Verzicht auf Sauna bei Pityriasis versicolor? *Med. Klinik* 75: 6-7, 1980
62. Gregory, H.: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 257: 325-327, 1975
63. Gross, A., Mcdonnell, J. M. und Korsmeyer S. J.: Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911, 1999
64. 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. *J. Med. Vet. Mycol*. 36. Suppl. 1: 220-9, 1998
65. Guého, E., Midgley, G., Guillot, J.: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 337-355, 1996
66. Guillot, J., Guého, E., Chevrier, G., Chermette, G.: Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Res. Vet. Sci*. 62: 22-25, 1997
67. Habenicht, A., (Hrsg.): Growth factors, differentiation factors, and cytokines. *Springer Verlag*, Berlin, 1990
68. Halaban, R., Alfano, FD.: Selective elimination of fibroblasts from cultures of normal human melanocytes. *In Vitro Cell Dev. Biol*.20: 447-450, 1984
69. Halaban, R., Gosh, S., Baird, A.: bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. *In Vitro Cell Dev*. 23: 47-52, 1983
70. Halaban, R., Langdon, R., Birchall, N., Cuono, C., Baisd, A., Scott, G., Moellmanm, G., Mc Guire, J.: Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J. Cell Biol*. 107: 1611-1619, 1988
71. Hay, R.J., Roberts, S.O.B., Mackenzie,D.W.R.: Pityriasis versicolor. In: Textbook of Dermatology (Champion RH, Burton JL, Ebling FJG, eds) 5th edn., Vol. 2. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*: pp. 1176-8, 1992

72. Heit, MC., Riviere, JE.: Antifungal and Antiviral Drugs. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics (HR Adams, ed), *Iowa State University Press, Ames* (USA) 7: pp 855-884, 1995
73. Henke, H.: Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20. Heidelberg: *Hüthig Verlag*, 1995
74. Holmgren, J.: Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature* 292: 413-417, 1981
75. Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I. und Falk, K. I. : Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93, 3956-3963, 1999
76. Hunt, G., Todd, C., Cresswell, JE., Thody, AJ.: ? -Melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle 4 Dphe 7? -MSH affect morphology , tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci*. 107: 205-211, 1994
77. Imamura, S., Tanaka, M., Furukawa, F., Danno, K.: Immunological aspects on pityriasis versicolor. *Jap. J. Med. Mycol*. 21: 157-161, 1980
78. Ingham, E., Cunningham, A.C.: *Malassezia furfur*. *J. Vet. Med. Mycol* . 31: 265-288, 1993
79. Jara JR., Aroca P., Solano F., Martinez JH., Lozano J.:The role of sulfhydryl compounds in mammalian melanogenesis: The effect of cystein and glutatione upon tyrosinase and the intermediates of the pathway. Biochim. Biophys. Acta 967: 296-303, 1988
80. Jeliffe, D.B., Jacobson, F.W.: The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. *J. Trop. Med. Hyg* . 57: 290-293, 1954
81. Jimbow, K., Fitzpatrick TB., Quevedo WC. Jr.: Formation, chemical composition and function of melanin pigments. In: Biology of the Integuement (Bereiter-HahnJ., Matoltsy AG., Richards KS. Eds. Vol. 2. *Springer Verlag* Berlin, Heidelberg, New York, pp. 278-292; 1986
82. Jones, C.L., Reiners, J.J.: Differentiation status of cultured murine keratinocytes modulates induction of genes responsive to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Arch Biochem Biophys 347(2):163-73, 1997
83. Jung, E.G., Bohnert, E.: Mechanism of depigmentation on pityriasis versicdor alba (Pva). *Derm. Res*. 256: 333-334, 1976

84. Jung, E.G., Truniger, B.: Tinea versicolor and Cushing´s Syndrome. *Dermatologica* 127: 18-22, 1963

85. Kahn, RA., Gilman, AG.: ADP-ribosylation of Gs promotes the dissociation of its alpha and beta subunits. *J. Biol. Chem.* 259: 6235-6240, 1988

86. 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

87. Karaoui, R., Bou-Resli, M., Al-Zaid, N.S., Mousa, A., Selim, M.: Clinical and epidemiological studies of tinea versicolor in Kuwait. *Mycosen* 23: 351-367, 1980

88. Kasuga, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Blithe, DL., Kahn, CR.: Tyrosine- specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2137-2141, 1983

89. Kawakami, Y., Battles, JK., Kobayashi, T., Ennis, W., Wang, X., Tupesis, JP., Marincola, FM., Robbins, PF., Hearing, VJ., Gonda, MA., Rosenberg, SA.: Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the charakterization of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol Methods*., 10, 202(1): 13-25, 1997

90. Keddie, F.M.: Tinea versicolor, 1846-1900. A historial 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*, pp.169-184, 1974

91. Kerwin, SC., McCarthy, RJ., VanSteenhouse, JL., Partington, BP., Taboada, J.: Cervical spinal cord compressioncaused by cryptococcosis in a dog: Successful treatment with surgery and fluconazole. *J Am Anim Hosp Assoc* 34(6): 523-526, 1998

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

93. Krämer HJ., Kessler D., Steglich W., Mayser P.: Pityriarubins A, B, and C: novel putative antiinflammatoric agents from Malassezia furfur; inhibition of respiratory burst in granulocytes. *Arch. Dermatol. Res* 294, 492, 2003.

94. Kreger-Van Rij; N.J.W., Veenhuis, M.: An electron microscope study of the yeast Pityrosporum ovale. *Arch. Mikrobiol*. 123-131, 1970

95. Kuroda, TS., Ariga, H., Fukuda, M.: The Actin-Binding Domain of Slac2-a/Melanophilin Is Required for Melanosome Distribution in Melanocytes, Mol *Cell Biol*. 23(15): 5245-55, 2003

96. Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E.: Medical Mycology. Philadelphia: *Lea & Febiger*, pp. 170-182, 1992

97. Labows, J.N., McGinley, K.J., Leyden, J.J.: Characteristic gamma-lactone odor production of the genus Pityrosporum. *Appl. Environm. Microbiol*. 38: 412-415, 1975

98. Lerner, AB., Halaban, R., Sidney, NK., Moellmanm, G.: Transplantation of human melanocytes. *J. Invest. Dermatol*. 89 :219-224, 1987

99. Lewis, G.M., Hopper, M.E.: Pseudoachromia of tinea versicolor. *Arch. Derm. Syph*. 34: 850-861, 1936

100. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. und Yuan, J.: Cleavage of BID by Caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501, 1998

101. Linzen, B.: The Tryptophane - Ommochrome pathway in insects in: Advances in insect physiology. ed.: Treherne, J.E., Berridge, M.J., Wigglesworth, V.B.; Vol. 10, London and New York: *Academic press*, 1974.

102. Lopes, J.O., Alves, S.H., Benevenga, J.P., Encarnacao, C.S.: Nodular infection of the hair caused by *Malassezia furfur*. *Mycopathologia* 125: 149-52, 1994

103. Lutz, A.: Korrespondenz. Honolulu, September 1891. *Mh. Prakt. Dermatol*. 14: 152-155, 1892

104. MacKee, G.M., Lewis, G.M., Spence, M.I., Hopper, M.E.: Dandruff and seborrhea: I. Flora of „normal“ and diseased scalps. *J. Invest. Derm*. I: 131-139, 1938

105. Mansur, CP., Gordon, PR., Ray, S., H olick, MF., Gilchrest, BA.: Vitamin D, its precursors, and metabolites do not effect melanization of cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol*. 91: 16-21, 1988

106. Marples, M.J.: The genus *Pityrosporum*. In: The Ecology of the Human Skin. *Springfield: C.C. Thomas*, pp. 408-422, 1965

107. Marples, M.J.: The incidence of certain skin diseases ain Western Samoa: A preliminary survey. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg* . 44: 319-332, 1950

108. Martin-Scott, I.: Pityriasis versicolor in children. *Brit. J. Derm*. 76: 199, 1964

109. Mayser, P., Imkampe, A., Winkeler, M., Papavassilis, C.: Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. *Arch. Dermatol. Res*. 290: 277-282, 1998

110. Mayser, P., Schäfer, U., Krämer, HJ., Irlinger, B., Steglich, W.: Pityriacitrin-an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast Malassezia furfur.*Arch Dermatol Res*. 294(3) :131-4, 2002

111. Mayser, P., Stapelkamp, H., Krämer, HJ., Podobinska, M., Wallbott, W., Irlinger, B., Steglich W.: Pityrialactone- a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *M. furfur*. *Antonie van Leeuwenhoek* (im Druck)

112. Mayser, P., Wille, G., Imkampe, A., Thoma, W., Arnold, N., Monsees, T.: Synthesis of fluorchromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophane as single nitrogen source. *Mycoses* 41: 265-271, 1998

113. Mc Ginley, K.J., Lantis, L.R., Marples, R.R.: Microbiology of tinea versicolor. *Arch. Dermatol*. 102:168-171, 1970

114. Mc Ginley, K.J., Leyden, L.J., Marples, R.R., Kligman, A.M.: Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff and seborrheic dermatitis. J. *Invest. Dermatol*. 64: 401-405, 1975

115. McAleer, R.: Pityriasis versicolor.*Aust. J. Derm*: 21: 42-46, 1980

116. McEvoy, GK.: AHFS Drug Information. *American Society of Hospital Pharmacists Inc*, Bethesda (USA); 2363 pp, 1992

117. Michalowski, R., Rodziewicz, H.: Pityriasis versicolor in children.*Brit. J. Derm*. 75: 397-400, 1963

118. Michalowski, R., Rodziewicz, H.: Pityriasis versicolor in the aged.

119. Midgley, G.: The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) yeasts in vivo and in vitro. *Mycopathologia* 106: 143-53, 1989

120. Montes, L.F., Wilborn, W.H.: Anatomical location of normal skin flora.

121. Moynahan, E.J.: Pityriasis versicolor alba (speckled torso syndrome) and mediterranean holidays.*Lancet* 2: 471-472, 1976

122. Nanda, A., Kaur, S., Bhakoo, O.N., Kauur, I., V aishnavi, C.: Pityriasis (tinea) versicolor in infancy.*Pediatr. Dermatol*. 5: 260-262, 1988
Nature 77:528-529;1956;

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

124.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

125.Nicholson, D. W. und Thornberry, N. A.: Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 299-306, 1997

126.Noble, W.C., Microbiology of Human Skin. London: *Lloyd-Duke*. pp. 3-65; 263-268, 1981

127.Noble, W.C., Midgley, G.: Scalp carriage of *Pityrosporum* species: The effect of physiological maturity, sex and race.*Sabouraudia* 16: 229-232, 1978

128.Nordlund, JJ.: ? -Melanocyte-stimulating hormone.A ubiquitous cytokine with pigmenting effects. *JAMA* 266: 2753-2754,1991

129.Oguchi, M.: Electron microscopic studies of melanocytes in the affected skin of tinea versicolor. *Acta Dermatol.* (Kyoto) 77: 187-92, 1982

130.Orlinick, J. R., Vainshaw, A. K. und Elkon, K. B.: Structure and function of Fas/fas ligand. *Int. Rev. Immunol.* 18, 293-308, 1999

131.Pan, G., O´Rourke, K. und Dixit, V. M.: Caspase 9, Bcl-XL, and Apaf-1 form aternary complex. *J. Biol. Chem.* 273, 5841-5845, 1998

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

133.Paul, J.: Zell- und Gewebekulturen. *De Gruyter*, New York, pp.343,347,350, 1979

134.Pierard, J., Dockx, P.: The ultrastructure of tinea versicolor and *Malassezia furfur*. *Int. J. Derm.* 11: 116-124, 1972

135.Plewig, G.: *Pityrosporum* in normal sebaceous follicles comedones, acneiform eruptions, and dandruff. *Mykosen*, Suppl. 1: 155-163, 1978

136.Plewig, G., Wolff, H.H.: Follikel-Filamente. *Arch. Derm.* Res. 255: 9-21, 1976

137.Plumb, DC.:Veterinary Drug Handbook Pharma Vet Publishing, *White Bear Lake (USA)*; 853 pp, 1999

138.Prota, G.:Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. Med. Res. Rev. 8: 525-556, 1988

139.Puga, A., Xia, Y., Elferink, C.: Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. Chem. Biol. Interact. 141: 117-130, 2002

140.Ranson, M., Posen, S., Mason, R.: Human melanocytes bind and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J.Bone Mineral. Res.* 1: 397,1986

141.Razack, E.M.A., Thambiah, A.S.: A clinical study pityriasis versicolor in Madras. *Sabouraudia* 15: 305-311, 1977

142.Rieth, H.: Pityriasis alba, eine kosmetisch besonders störende Pilzerkrankung der Haut. *Kosmetologie* 3: 58-63, 1973

143.Roberts, S.O.B., Lachapelle, J.M.: Confluent and reticulate papillomatosis and *Pityrosporum orbiculare*. *Br. J. Derm*. 81: 841-845, 1969

144.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.

145.Roed-Petersen, J.: Tinea versicolor and body lotions. *Acta Derm. Venereol*. 60: 439-440, 1980

146.Ruete, A.E.: Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor.

147.Salkin, I.F., Gordon, M.A.: Polymorphism of *Malassezia furfur*.

148.Scheynius, A., Faergemann, J., Forsum, U., Sjöberg, O.: Phenotypic characterisation in situ of inflammatory cells in pityriasis (tinea) versicolor.

149.Schmidt, J.V., Bradfield, C.A.: Ah receptor signaling pathways. Annu Rev Cell Dev Biol 12: 55-89, 1996

150.Shimzu, S., Narita, M. und Tsujimoto, Y.: Bcl-2 family proteins regulate the release of apogenic cytochrome C by the mitochondrial channel VDAC.*Nature* 399**,** 483-487, 1999

151.Silva, V., Moreno, G.A., Zaror, L., de Oliviera, E., Fischman, O.: Isolation of *Malassezia furfur* from patients with onychomycosis. *J. Med. Vet. Mycol*. 35: 73-74, 1997

152.Slooff, W.Ch.: Genus *Pityrosporum* Sabouraud. In: The Yeasts - A Taxonomic Study (Hrsg. J. Lodder) 2nd edition, Amsterdam: *North-Holland Publishing Company*, pp. 1167-1186, 1970

153.Smith, E.B., Gellerman, G.L.: Tinea versicolor in infancy.*Arch. Derm*. 93:362-363, 1966

154.Snell, RS.: Hormonal control of pigmentation in man and other mammals. In: Advances in Biology of Skin, Vol. 8, The Pigmentary System (Montagna W. Hu F., Eds.) *Pergamonn Press*, New York, pp. 447-466; 1967

155.Sohnle, P.G., Collins-Lech, C.: Cell-mediated immunity to *Pityrosporum orbiculare* in tinea versicolor. *J. Clin. Invest*. 62: 45-53, 1978

156.Stefanovic, M., Stefanovic, M., Medicijan, M.: Die Verbreitung der Pityriasis versicolor bei der Sportjugend. *Castellania* 4: 29-31, 1976

157.Steuber, S., Kroker, R.: Antiprotozoika. In: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren (*W Löscher, FR Ungemach & R Kroker, eds*), Parey, Berlin (D); pp 355-377, 1999

158.Terragni, L., Lasagni, A., Oriani, A.: Pityriasis Versicolor of the Face. *Mycoses* 34: 345-347, 1991

159.Thoma, W.: Tryptophanstoffwechsel von Malassezia furfur: Isolierung des ersten Metaboliten Malassezin. *Inaugural -Dissertation* zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (im Gutachtenverfahren)

160.Tiches, D., Vite, CH., Dayrell-Hart, B., Steinberg, SA., Gross, S. et al: A case of canine central nervous system cryptococcosis: Management with fluconazole,

161.Tomita, Y., Torinuki, W., Tagami, H.: Stimulation of human melanocytes by vitamin D3 possibly mediates skin pigmentation after sun exposure.*J. Invest. Dermatol.* 90: 882-884,1988

162.Tosti, A., Villardita, S., Fazzini, M.L.: The parasitic colonization of the horny layer in tinea versicolor. *J. Invest. Derm*. 59: 223-237, 1972

163.Vaden, SL., Heit, MC., Hawkins, EC., Manaugh, C., Riviere, JE.: Fluconazole in cats: Pharmacokinetics following intravenous and oral administration and penetration into cerebrospinal fluid, aqueous humour and pulmonary epithelial lining fluid *J Vet Pharmacol Ther* 20(3): 181-186, 1997

164.Vanbreuseghem, R.: Diagnostic et prévalence du pityriasis versicolor en Afrique. *Bull Soc. Franc. Mycol. Med*. 2: 165-166, 1973

165.Vanbreuseghem, R.: Introduction to the epidemiology of Pityriasis versicolor. *Mykosen* Suppl 1: 133-136, 1978

166.Vermes, I. et al.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39, 1995

167.Veselska, R., Zitterbart, K., Jelinkova, S., Neradil J., Svoboda, A.: Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells., *Oncol Rep*., 10(4): 1049-58, 2003

168.Virador, V.M., Kobayashi, N., Matsunaga, J., Hearing V.J.: A Standarized Protocol for Assessing Regulators of Pigmentation. *Analytical Biochemistry* 270, 207-219, 1999

169.Wertheim, L: Über Lichtwirkung und Leukoderma bei Pityriasis versicolor. *Derm. Zeitschr*. 38: 343-354, 1928

170.Wilkins, L., Gilchrest, BA., Szabo, G., Weinstein, R., Maciag, T., : The stimulation of normal human melanocyte proliferation in vitro by melanocyte growth factor from bovine brain *J. Cell Physiol.* 122: 350-361; 1985

171.Wille, G., Mayser, P., Thoma, W., et al: Malassezin – a novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast Malassezia furfur. *Bioorg Med Chem*, 9(4): 955-60, 2001

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

173.Wu, Y.C., Chen, K.T.: Humoral immunity in patients with tinea versicolor.

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

175.Yaar, M., Peacocke, M., Bhawan, J., Gordon, JL., Southmayd, JR., Gilchrest, BA.: Human keratinocytes contain nerve growth factor: a possible inducer for melanocytic dendricity and tropism *J.Invest.Dermatol*. 90 :619, 1988

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

9. Danksagung

Mein besonderer Dank richtet sich an:

Herrn PD. Dr. P. Mayser (Zentrum für Dermatologie und Andrologie der JLU-Giessen) für die Anregung zur Durchführung dieser Arbeit, seine Ermutigung sowie für seine großzügig gewährte Unterstützung in materiellen und menschlichen Belangen.

Herrn Dr. H.-J. Krämer (Klinische Pharmakologie) für fundierte Beratung und Hilfestellung, viele wertvolle Anregungen und sorgfältige HPLC-Analyse und -Aufreinigung der zu untersuchenden Stoffe, ohne die die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Aber auch seine ausgleichende Art in menschlichen Konflikten, die während eines solchen Vorhabens unvermeidlich sind, trug wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Schill (Zentrum für Dermatologie und Andrologie der JLU-Giessen) und seinen Mitarbeitern, für die nette Atmosphäre am Arbeitsplatz (Mykologisches sowie Andrologisches Labor der Hautklinik der JLU-Giessen).

Herrn Prof. Dr. Kummer (Institut für Anatomie und Zytobiologie der JLU Giessen), für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Melanozyten und die Hilfe bei der Bewertung der Ergebnisse, ebenso seinen Mitarbeitern Herrn Magdowski und Herrn Kripp für die aufwendige Vorbereitung der Präparate.

Frau Förste für Anfertigung des Nährbodens für *Malassezia furfur* und Hilfe bei anderen Laborarbeiten.

PD. Dr A. Bernd (Zentrum der Dermatologie und Venerologie der JWG Universität in Frankfurt am Main) für die Überlassung der humanen Melanozytenlinie und für viele wertvolle Anregungen zur Melanozytenkultivierung und-charakterisierung, allen seinen Mitarbeitern vom B-Labor, besonders Frau H. Büttner für die Einarbeitung in die Zellkultur und stets konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Grimminger , Herrn Prof. Dr. Seeger (Zentrum für Innere Medizin der JLU Giessen) und ihren Mitarbeitern möchte ich für die Möglichkeit danken, in ihren Labors zu arbeiten und Techniken der Zellkultivierung und des Versuchsaufbaues kennenzulernen. Besonderen Dank möchte ich Frau A. Tschuschner ausrichten für Ihre wertvollen Anregungen und sachverständige Ratschläge sowie Frau S. Krieck für ihre Hilfsbereitschaft bei FACS, trotz eigener aufwendiger Projekte.

Herrn Dr. Battmann (Institut für Pathologie der JLU Giessen), für die immunohistologische Untersuchung der Melanozyten und die Hilfe bei der Bewertung der Ergebnisse, ebenso seiner Mitarbeiterin Frau Ross für die Hilfestellung bei der aufwendigen Vorbereitung der Präparate.

Herrn Prof. Dr. Steglich und seinen Mitarbeitern vom Institut der organischen Chemie der LMU- München für die Aufklärung der chemischen Strukturen und die synthetische Herstellung von Malassezin.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung, dank deren der Aufenthalt in Deutschland und damit die Promotionsarbeit in der Hautklinik in Giessen möglich war.

Allen Mit-Doktoranden für eine nette Atmosphäre im Labor, die vielen motivierenden Gespräche innerhalb und außerhalb des Labors und Ihre Bereitschaft für Problemlösungen und gegenseitige Hillfe.

Meiner Familie und Freunden für stetige Motivation in guten und schlechten Zeiten und für das nie aufgegebene Glauben an mich und meine Arbeit.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen , die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten 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 in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

11. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Monika Podobinska
Geburtsdatum	02.11.1976
Geburtsort	Warszawa, Polen
Eltern	Vater: Maciej Podobinski, Pharmazeut
	Mutter: Malgorzata Podobinska, Dipl.-Volkswirtin
Staatsangehörigkeit	polnisch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1983 – 1991	Grundschule in Lódz, Abschluss mit Auszeichnung
1991 – 1995	Gymnasium in Lódz, Abschluss: Abitur mit Auszeichnung

Hochschulbildung/Promotion:

1995 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität in Lódz , Abschluss mit Diplom (Note: besser als gut)
2000 – 2001	Studienjahr an der Justus-Liebig-Universität Giessen in Rahmen des Erasmus/Sokrates Programms
2001 – 2003	Promotionsarbeit am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen

Berufspraktiken:

07/1996	Famulatur im Staatlichen-Klinischen Krankenhaus in Lódz, Fachrichtung: Pediatrie
08/1997	Famulatur im Allgemeinen Krankenhaus Rissen, Hamburg Fachrichtung: Chirurgie

07/1998	Famulatur im Spezialistischen Woiwodschaftskrankenhaus in Lódz, Fachrichtung: Innere Medizin
08/1999	Famulatur im Allgemeinen Krankenhaus in Nijmegen (Niederlande), Fachrichtung: Neurochirurgie
07/2000	Famulatur im Allgemeinen Krankenhaus Wien (Österreich), Fachrichtung: Dermatologie

Studentische Tätigkeiten:

1996 – 1997	Mitglied der Arbeitsgruppe der jungen Wissenschaftler an dem Institut der Physiologie der Medizinischen Universität in Lódz
1999 – 2001	Mitglied des Studentischen Wissenschaftlichen Vereins an der Medizinischen Universität in Lódz
2001 – 2002	Studentische Hilfskraft im Biochemischen Institut des Fachbereiches Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen

Publikationen:

Tosik M., Podobinska M.: Udzial kinaz i ATP w procesie konsolidacji pamieci (Die Teilnahme der Proteinkinasen und des ATP`s an dem Prozess der Konsolidation des Gedächtnisses), Annales Academiae Medicae Lodzensis, Lódz 1997

Podobinska M.: Metody leczenia luszczycy zwyklej (Die Methoden der Therapie von Psoriasis vulgaris), Annales Academiae Medicae Lodzensis 41, 85, Lódz 2000

Mayser P., Stapelkamp H., Krämer H.-J., Podobinska M., Wallbott W., Irlinger B. and Steglich W.: Pithyrialactone- a new flourochrome from the tryptophan metabolism of M. furfur . Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology 2003

Podobinska M., Krämer H-J., Bartsch A., Steglich W. and Mayser P.: A cytotoxic metabolite from Malassezia furfur: isolation and chemical identification as Malassezin". Archives of Dermatological Research 294, 512, 2003

Sprachkenntnisse:

Deutsch	fließend (Grosses Deutsches Sprachdiplom des Goethe Instituts Inter Nationes vom 25.02.2003 mit der Note gut)
Englisch	fließend
Russisch	sehr gut
Polnisch	Muttersprache