

# **Tryptophan-abhängige Pigmentsynthese bei Brandpilzen**

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

vorgelegt von Peter Karl Mayer  
aus Zabrze (Hindenburg)

Giessen 2007

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

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Mayser

2. Gutachter: PD Dr. G. Lochnit

Tag der Disputation: 12.02.2008

## **Erklärung**

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

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Hintergrund und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Brandpilze</b>	<b>2</b>
1.2.1 <i>Malassezia</i> spp.	4
1.2.2 <i>Ustilago</i> spp.	5
1.2.2.1 <i>Ustilago maydis</i>	5
1.2.2.2 <i>Ustilago bullata</i>	6
1.2.2.3 <i>Ustilago cynodontis</i>	6
1.2.2.4 <i>Ustilago hypodites</i>	6
1.2.2.5 <i>Ustilago striiformis</i>	7
1.2.2.6 <i>Ustilago rabenhorstiana</i>	7
1.2.2.7 <i>Ustilago esculenta</i>	8
1.2.2.8 <i>Ustilago hordei</i>	8
1.2.2.9 <i>Ustilago vetiveriae</i>	9
1.2.2.10 <i>Ustilago avenae</i>	9
1.2.2.11 <i>Ustilago vaillantii</i>	9
1.2.2.12 <i>Ustilago longissima</i>	10
1.2.2.13 <i>Pseudozyma fusiformata</i>	10
1.2.3 <i>Sporisorium</i> spp.	10
1.2.3.1 <i>Sporisorium scitamineum</i>	11
1.2.3.2 <i>Sporisorium reilianum</i>	11
1.2.3.3 <i>Sporisorium raphidii</i>	12
1.2.4 <i>Exobasidium</i> spp.	12
1.2.4.1 <i>Exobasidium vaccinii</i>	12
1.2.4.2 <i>Exobasidium japonicum</i>	12
1.2.5 <i>Entyloma</i> spp.	13
1.2.6 <i>Tilletiopsis</i> spp.	13
<b>1.3 Pigmente</b>	<b>14</b>
1.3.1 Pityriacitrin	14
1.3.2 Pityriarubin	15
1.3.3 Pityriaanhydrid	16
1.3.4 Pityrialacton	16
1.3.5 Malassezin	17
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Kulturen und Anzucht</b>	<b>19</b>
2.1.1 Basidiomycetes; Klasse: Ustilaginomycetes (Brandpilze)	19
2.1.1.1 Ordnung Ustilaginales	19
2.1.1.2 Ordnung Malasseziales	20
2.1.1.3 Ordnung Exobasidiales	20
2.1.1.4 Ordnung Georgefischeriales	20
2.1.1.5 Ordnung Entylomatales	20
2.1.1.6 Ordnung Microstromatales	20
2.1.2 Anzucht auf Nährmedium	20
<b>2.2 Kulturbedingungen für die Pigmentbildung</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Pigmentgewinnung und Aufreinigung</b>	<b>22</b>
2.3.1 Pilz-Screening	22

2.3.2 Gewinnung des Rohextraktes	22
2.3.3 Säulenchromatographie	22
2.3.4 Dünnschichtchromatographie	24
2.3.5 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	26
2.3.5.1 Präparative HPLC	26
2.3.5.2 Analytische HPLC	27
2.3.6 Weitere chemisch-analytische Methoden/ Strukturaufklärung	28
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>29</b>
<b>3.1 PCR</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Pilz-Screening</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Säulenchromatographie</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Dünnschichtchromatographie</b>	<b>32</b>
3.4.1 Übersicht der Dünnschichtchromatogramme aller untersuchten Spezies	32
3.4.2 Detaillierte Bandenbeschreibung der untersuchten Spezies	35
<b>3.5 Analyse ausgewählter Banden</b>	<b>52</b>
3.5.1 Pityriacitrin	52
3.5.2 Pityriarubin	56
3.5.3 Pityriaanhydrid	59
3.5.4 Strukturbestimmung weiterer Stoffe	60
3.5.5 Versuch einer Datenanalyse	61
<b>3.6 Einteilung der Pilze in Gruppen</b>	<b>68</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
5.1 Summary	89
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>7. Liste verwendeter Abkürzungen</b>	<b>99</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>10. Anhang</b>	<b>105</b>
10.1 Für die Datenanalyse verwendete Dünnschichtchromatogramme anderer Spezies	105
10.2 Beispiel eines für die Rasteranalyse verwendeten Rasters	107
10.3 Rohdatenlisting für Datenanalyse	108

Lebenslauf

Danksagung

# **1. Hintergrund und Fragestellung**

## **1.1 Einleitung**

Im Jahr 2000 machten Tübinger Forscher eine interessante Entdeckung. Sie untersuchten eine Reihe von Pilzarten, um diese systematisch nach ihrer Abstammung zu ordnen. Bei der Auswertung von Gensequenzen mit Hilfe einer Gendatenbank tauchte überraschend *Malassezia furfur* inmitten der Brandpilze auf (BEGEROW, BAUER & BOEKHOUT, 2000). Dieser Pilz ist weltweit bekannt als Verursacher der Hautkrankheit Pityriasis versicolor. Außerdem wird er mit der Entstehung des seborrhoischen Ekzems in Verbindung gebracht. Eigentlich gelten Brandpilze als spezialisierte Pflanzenparasiten und verursachen nur sporadisch Infektionen beim Menschen. Umso erstaunlicher ist die enge genetische Verwandtschaft mit dem Hautpilz *Malassezia furfur*.

Malassezia Spezies können von der Haut verschiedener Säugetiere isoliert werden, jedoch ist ein pflanzenparasitäres Stadium von *Malassezia furfur* nicht bekannt (BEGEROW, BAUER & BOEKHOUT, 2000).

Bereits einige Jahre zuvor konnte eine Giessener Forschergruppe erstmalig nachweisen, dass die Aminosäure L-Tryptophan bei *Malassezia furfur* eine Pigmentbildung induziert. Bei Vorhandensein von Tryptophan als einziger Stickstoffquelle kommt es zu einer Braunfärbung des Nährbodens. Die hierbei entstehenden Pigmente und Fluorochrome werden mit dem Erscheinungsbild der Pityriasis versicolor in Verbindung gebracht (MAYSER ET AL., 1998, 2002; KRÄMER ET AL., 2005).

Mittlerweile konnte eine ähnliche Pigmentbildung auch bei anderen humanpathogenen Pilzen nachgewiesen werden (NIES, 2006). Eine Pigmentbildung bei pflanzenpathogenen Pilzen war bislang jedoch nicht bekannt. Da *Malassezia furfur* phylogenetisch zu den Brandpilzen gehört, stellt sich die Frage, ob eine Tryptophan-abhängige Bildung von Sekundärmetaboliten ein Phänomen von humanpathogenen Pilzen darstellt, oder ob auch pflanzenpathogene Pilze zur Bildung von Tryptophan-abhängigen Pigmenten befähigt sind. Die Klärung dieses Sachverhaltes soll Gegenstand dieser Dissertation sein und könnte die zukünftige Sichtweise über Malassezia-abhängige Hautkrankheiten und die Bedeutung der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese als Pathogenitätsfaktor verändern.

## 1.2 Brandpilze

Brandpilze (Ustilaginomyceten) stellen nach den Rostpilzen die zweitgrößte Gruppe von Pflanzenparasiten unter den Basidiomyceten dar. Sie umfassen ca. 1450 Spezies und 77 unterschiedliche Gattungen (VANKY, 2002). Ihre Spezies sind die Erreger der Brandkrankheiten. Aufgrund der großen Menge gebildeter Sporen erhalten die Wirtspflanzen ein verbranntes Aussehen. Allein in Europa sind 400 unterschiedliche Spezies von Brandpilzen bekannt (VANKY, 1994). Die Einteilung der Brandpilze gestaltete sich bislang als schwierig und uneinheitlich. Diesbezüglich werden in der Literatur viele unterschiedliche Angaben gemacht. Früher erfolgte die Einteilung nach morphologischen Eigenschaften, Charakteristik der Sporen und Ausbildung von Basidien (PIEPENBRING, 2003).

Neuere Untersuchung, die sowohl die Ultrastruktur der Pilze (BAUER, OBERWINKLER & VANKY, 1997) als auch deren DNA Sequenzen berücksichtigt (BEGEROW, BAUER & OBERWINKLER, 1997), schlagen eine Unterteilung der Ustilaginomyceten in drei Unterklassen und zehn Ordnungen vor.

Demnach können Ustilaginomyceten in Ustilaginomycetidae, Exobasidiomycetidae und Entorrhizomycetidae unterteilt werden.

Zu den Ustilaginomycetidae gehören die Ustilaginales und die Urocystales. Exobasidiomycetidae werden unterteilt in Tilletiales, Malasseziales, Exobasidiales, Georgefischeriales, Entylomatales, Doassansiales und Microstromatales. Zu den Entorrhizomycetidae gehört die Ordnung Entorrhizales.

Um phylogenetische Verbindungen unterschiedlicher Spezies darzustellen, erstellten BEGEROW ET AL. einen Stammbaum (siehe Abbildung 1), indem sowohl anamorphe als auch telemorphe Spezies Berücksichtigung fanden. Hierfür wurden 56 telemorphe und 19 anamorphe Ustilaginomyceten untersucht (BEGEROW, BAUER & BOEKHOUT, 2000) (siehe Abbildung 1).

Einige für diese Untersuchung relevanten Pilzspezies werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.



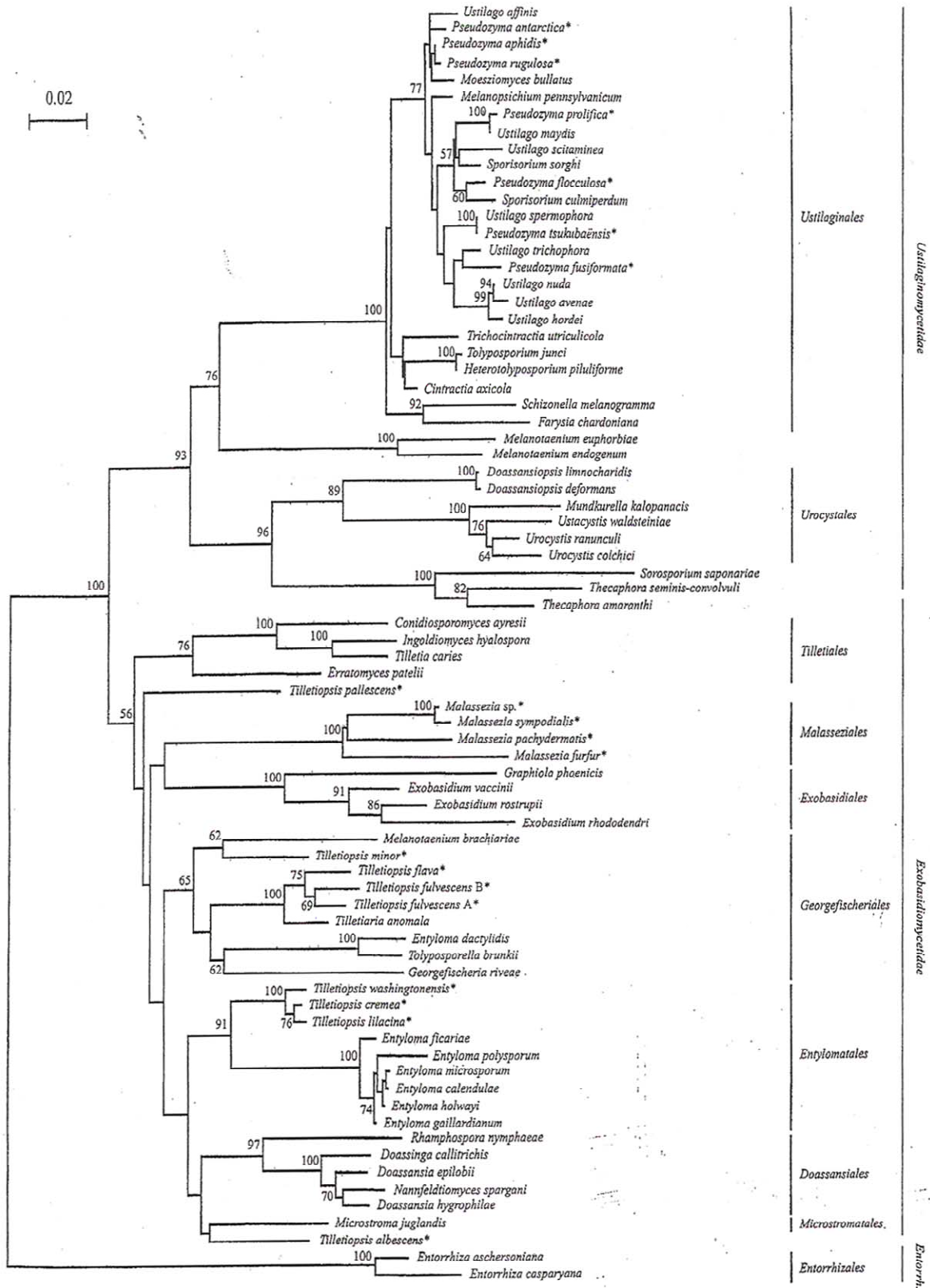


Abbildung 1: Phylogenese von Ustilaginomyceten. Anamorphe Spezies sind durch einen Stern gekennzeichnet (BEGEROW et al., 2000).

### 1.2.1 *Malassezia* spp.

Die Ordnung Malasseziales wird phylogenetisch den Exobasidiomycetidae zugeordnet. Die genaue Position der Malasseziales innerhalb dieser Gruppe ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt (BEGEROW, BAUER & BOEKHOUT, 2000).

Malasseziales fasst lipophile Hefen zusammen, die Teil der Pilzflora von warmblütigen Tieren sind (GUEHO ET AL., 1998). *Malassezia* Hefen kommen häufig auf der Haut gesunder Menschen vor und wechseln unter bestimmten Bedingungen in ein parasitisches Stadium, wo sie Krankheiten auslösen. Sie werden mit Krankheiten wie Pityriasis versicolor, seborrhoischer Dermatitis, Folliculitis und einer Reihe systemischer Infektionen in Verbindung gebracht (vgl. GUEHO ET AL., 1996; GUILLOT & GUEHO, 1995).

Eine besondere Rolle kommt hierbei der bereits 1846 von EICHSTEDT entdeckten Hefe *Malassezia furfur* zuteil. Dieser Pilz ist weltweit verbreitet und galt bislang als Hauptverursacher der Pityriasis versicolor. In manchen tropischen Regionen erkranken bis zu 40 Prozent der Menschen an dieser Krankheit. Die Rolle von *Malassezia furfur* bei der Pityriasis versicolor ist heute jedoch umstritten. Diese ist unter anderem bedingt durch die Schwierigkeit der Isolierung, Kultur und Differenzierung der einzelnen *Malassezia* Spezies (HORT ET AL., 2006).

Sowohl die sexuelle Phase, als auch ein pflanzenparasitisches Stadium von *Malassezia furfur* sind nicht bekannt (BEGEROW, BAUER & BOEKHOUT, 2000).

MAYSER ET AL. fanden 1998 heraus, dass bei Zugabe der Aminosäure Tryptophan *Malassezia furfur* zur Pigmentbildung angeregt werden kann. Bei näherer Untersuchung dieser Pigmente wurden einige bislang unbekannte Substanzen isoliert (siehe Kapitel 1.3), die mit dem Krankheitsbild der Pityriasis versicolor in Verbindung gebracht werden können (MAYSER ET AL, 2002; KRÄMER ET AL., 2005).



Abbildung 2: Pityriasis versicolor (SCHRIER, 2006)

## 1.2.2 *Ustilago* spp.

Heutzutage sind mehr als 250 Spezies der Gattung *Ustilago* bekannt. *Ustilago* befällt hauptsächlich Süßgräser (Poaceae). Die meisten *Ustilago* Spezies treten in Regionen mit gemäßigttem und subtropischem Klima auf (PIEPENBRING, 2003).

### 1.2.2.1 *Ustilago maydis*

Eine bekannte Spezies innerhalb der Gattung *Ustilago* ist *Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrandes. Er ist auf der ganzen Welt in Regionen verbreitet, in denen Mais angebaut wird, mit Ausnahme von Australien und Neuseeland (AINSWORTH, 1965). Der weltweit einzig bekannte Wirt ist der Mais (*Zea Mays*). Der Maisbeulenbrand bildet große beulenartige Auftreibungen, die mit schwarzen Sporen gefüllt sind und kann enorme Ernteschäden verursachen. In Süd- und Zentralamerika gilt er als Delikatesse und wird dort auch als Kaviar azteca verzehrt. Nach Verzehr kann es zu Vergiftungserscheinungen sowohl bei Menschen als auch bei Tieren kommen, die mit Symptomen wie Diarrhoe einhergehen können. Vermutlich wird diese Symptomatik durch Ergotamin-ähnliche Alkaloide verursacht.

Bezüglich der Humanpathogenität von *Ustilago maydis* sind in der Literatur Fälle von Ustilaginismus bei Kindern beschrieben, die mit Akropathien einhergehen (MAYERHOFER & DRAGISIC, 1938). Außerdem soll *Ustilago maydis* eine starke ergotaminartige Wirkung besitzen (vgl. DRAGISIC & VARICAK, 1935).

Molekulare und morphologische Eigenschaften deuten darauf hin, dass *Ustilago maydis* keine enge Verwandtschaft zu anderen Spezies der Gattung *Ustilago* hat. Vielmehr gehört er wohl der Gattung *Sporisorium* an. Diese Hypothese wurde durch DNA Untersuchungen bestätigt. Ebenso könnte er aber auch eine eigene Gattung bilden (PIEPENBRING ET AL., 2002).



Abbildung 3: Maisbrand (EMGENBROICH, O. D.)

### 1.2.2.2 *Ustilago bullata*

*Ustilago bullata* ist ein Brandpilz, der in vielen Ländern auf der ganzen Welt verbreitet ist. Er wächst vornehmlich in Regionen mit gemäßigttem und subtropischem Klima, unter anderem in Höhen von ca. 3000 m.

Sein Wirtsspektrum ist sehr breit. Er befällt vor allem Trespen (Bromus), wie z.B. die ährengrasähnliche Trespe (*Bromus Catharticus Vahl*) oder die Taube Trespe (*Bromus sterilis*) (PIEPENBRING, 2003). Zum Wirtsspektrum gehören ebenso die Quecken (Elymus) und die Gerste (Hordeum) (MORDUE & WALLER, 1981).

### 1.2.2.3 *Ustilago cynodontis*

*Ustilago cynodontis* kommt hauptsächlich in Regionen mit subtropischem Klima vor (USA, Mexiko, Cuba, Südafrika, Südeuropa, Asien und Indien). In südlicheren neotropischen Regionen, wie z.B. Costa Rica konnte er trotz Wirtsvorkommen nicht gefunden werden (PIEPENBRING, 2003). Er befällt hauptsächlich das Bermudagrass (*Cynodon dactylon*).



Abbildung 4: *Ustilago cynodontis* (Myco-Ual, O. D.)

### 1.2.2.4 *Ustilago hypodites*

*Ustilago hypodites* ist ein Brandpilz, der vor allem in gemäßigten und subtropischen Regionen lebt. Er kommt unter anderem in Höhen von über 3000 m vor. Das Wirtsspektrum ist sehr breit und beinhaltet viele unterschiedliche Gattungen. Dazu gehören unter anderem folgende Süßgräser (Poaceae): Quecken (Elymus), Pfriemengräser (Stipa) wie z.B. *Stipa curviseta* oder Rispengräser (Poa) (MORDUE, 1984).

### 1.2.2.5 *Ustilago striiformis*

*Ustilago striiformis* kommt hauptsächlich in Regionen mit gemäßigttem und subtropischem Klima vor, unter anderem in Höhen von 1900-2100 m. Er hat ebenfalls ein sehr breites Wirtsspektrum. Dazu gehören Bromus, Elymus, Poa usw. (MORDUE, 1981).



Abbildung 5 *Ustilago striiformis* (TAJINI, O. D.)

### 1.2.2.6 *Ustilago rabenhorstiana*

*Ustilago rabenhorstiana* ist auch bekannt unter dem Synonym *Ustilago syntherismae* (SCHOLZ, 1988).

Er befällt hauptsächlich die Gattung Fingerhirse (*Digitaria*) und kommt weltweit in subtropischen und klimatisch gemäßigten Regionen vor (MORDUE, 1995).



Abbildung 6: *Ustilago syntherismae* auf *Digitaria sanguinalis* (MAS ET AL., 2006)

### 1.2.2.7 *Ustilago esculenta*

*Ustilago esculenta* hat als Wirt *Zizania latifolia* Turcz. (*Z. aquatica* L.), auch bekannt unter den Namen Wasserbambus oder mandschurischer Wildreis. Er ist eng verwandt mit dem nordamerikanischen Wildreis (*Zizania aquatica* L.). Bei Befall kommt es zu einer Vergrößerung und galleartigen Verformung der Halme. Er wird in China und Japan als Delikatesse verzehrt. *Ustilago esculenta* kommt überwiegend in den asiatischen Regionen vor (MORDUE, 1991).



Abbildung 7: *Ustilago esculenta* (KENDRICK, 2001)

### 1.2.2.8 *Ustilago hordei*

*Ustilago hordei* ist der Verursacher des Hartbrandes. Sein Wirtsspektrum ist sehr breit. Außer Gerste (*Hordeum*) befällt er auch andere Gräser wie Hafer (*Avena*) und Roggen (*Secale*). Er kommt vor allem in Regionen mit gemäßigttem bis subtropischem Klima vor (WALLER & MORDUE, 1983).



Abbildung 8: *Ustilago hordei* (DARAZAU, 2006)

### 1.2.2.9 *Ustilago vetiveriae*

*Ustilago vetiveriae* hat als Wirt das Süßgras Vetiver (*Vetiveria zizanioides*). Dieses kommt in tropischen asiatischen Regionen vor.

### 1.2.2.10 *Ustilago avenae*

*Ustilago avenae* ist der Erreger des Haferflugbrandes. Er ähnelt in seinem Wirtsspektrum sehr stark *Ustilago hordei*. Ebenso wie dieser befällt er hauptsächlich Hafer, Gerste und Roggen. Er kommt in gemäßigten klimatischen Regionen vor (PUNITHALINGAM & WATERSTON, 1970).



Abbildung 9: *Ustilago avenae* (AGROSCOPE FAL RECKENHOLZ, O. D.)

### 1.2.2.11 *Ustilago vaillantii*

*Ustilago vaillantii* befällt hauptsächlich Liliengewächse (Liliaceae) und Hyazinthenengewächse wie z.B. Traubenhyazinten (Muscari) und Blausterne (Scilla) (MORDUE, 1984). Er ist weltweit verbreitet.



Abbildung 10. *Ustilago vaillantii* (BÖHLING, 2007)

#### **1.2.2.12 *Ustilago longissima***

*Ustilago longissima*, auch bekannt unter dem Namen *Ustilago filiformis*, befällt Süßgräser (Poaceae) der Gattung Schwaden (*Glyceria*). Hier verursacht er einen Streifenbrand. Die Blätter erscheinen hell, gelbgrün und haben ein verbranntes Aussehen. Der Pilz kommt hauptsächlich in nördlichen, klimatisch gemäßigten Regionen vor (MORDUE, 1991).

#### **1.2.2.13 *Pseudozyma fusiformata***

Bei der Gattung *Pseudozyma* handelt es sich um ungewöhnliche anamorphe Hefen. Sie sind häufig auf Pflanzen anzutreffen und befallen deren Blätter, Blüten und Früchte (BOEKHOUT & FELL, 1998; TRINDADE ET AL., 2002). Es wurden sieben Spezies der Gattung *Pseudozyma* durch BOEKHOUT UND FELL (1998) beschrieben:

*P. antarctica*, *P. aphidis*, *P. flocculosa*, *P. fusiformata*, *P. prolifica*, *P. rugulosa* und *P. tsukubaensis*.

Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass *Pseudozyma* zu den Ustilaginales gehören und wohl deren anamorphe Form darstellen (BOEKHOUT ET AL., 1995; BEGEROW ET AL., 2000). *Ustilago maydis* ist eng verbunden mit *Pseudozyma prolifica*. *Pseudozyma fusiformata* hat eine enge Verbindung zu *Ustilago trichophora* (BEGEROW ET AL., 2000) (vgl. Abbildung 1).

2003 ist es SUGITA ET AL. gelungen, *Pseudozyma* Erreger aus Patientenblut in Thailand zu isolieren. Es handelte sich hier um die Spezies *P. antarctica* und die zwei neuen Spezies *P. parantarctica* und *P. thailandica*. Dabei zeigten sich alle drei Spezies resistent gegenüber 5-Flucytosine.

#### **1.2.3 *Sporisorium* spp.**

Heutzutage sind mehr als 300 Spezies der Gattung *Sporisorium* bekannt. *Sporisorium* befällt ausschließlich Süßgräser (Poaceae), insbesondere die Unterfamilie Panicoideae. Hierzu gehören Pflanzenarten wie der Mais (*Zea mays*) und das Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*) (PIEPENBRING, 2003).

Spezies der Gattung *Sporisorium* kommen auf der ganzen Welt vor. Jedoch treten mehr Spezies in Regionen mit warmen als in Regionen mit gemäßigtem Klima auf (PIEPENBRING, 2003).



### 1.2.3.1 *Sporisorium scitamineum*

*Sporisorium scitamineum* ist der Erreger des Zuckerrohrbrandes. Er kommt überall dort vor, wo Zuckerrohr angebaut wird. *Sporisorium scitamineum* ist auch bekannt unter dem Namen *Ustilago scitaminea*. Zum Wirtsspektrum gehören folgende Poaceae: Zuckerrohr (*Sacharum officinarum*), *Sacharum robustum*, *Sacharum spontaneum* (PIEPENBRING, 2003).



Abbildung 11: *Sporisorium scitamineum* (GUPTA, O. D.)

### 1.2.3.2 *Sporisorium reilianum*

*Sporisorium reilianum* ist der Erreger des Maiskopfbrandes und des Sorghumkopfbrandes. Er kommt weltweit überall vor, wo Mais und Sorghum angebaut wird.

Man unterscheidet dabei zwei unterschiedliche Stämme. Der eine Stamm hat sich auf den Befall von Mais, der andere auf den Befall von Sorghum spezialisiert. (PIEPENBRING, 2003).



Head smut (*Sporisorium reilianum*) on corn.  
Courtesy Harold Kaufman, TAEX, 1996.

Abbildung 12: *Sporisorium reilianum* (KAUFMAN, 1996)

### 1.2.3.3 *Sporisorium raphidii*

*Sporisorium raphidii* ist auch bekannt unter dem Namen *Sporisorium anthracoideisporum*. Er kommt in Papua-Neuginea vor und befällt Süßgräser der Spezies *Pseudoraphis spinescens* (VANKY & SHIVAS, 1998).

### 1.2.4 *Exobasidium* spp.

Die Nacktbasidien (*Exobasidium*) gehören zur Ordnung der Exobasidiales. All diese Pilze sind im Besitz von Basidien, produzieren aber keine Fruchtkörper. Sie bilden stattdessen ein Hymenium an der Wirtsoberfläche aus. *Exobasidien* können viele unterschiedliche Symptome hervorrufen, von farbigen Punkten auf den Blättern über Bläschen und gallenartigen Deformitäten, bis hin zu Verfärbungen an der Blattoberfläche. Sie befallen hauptsächlich Blütenpflanzen, insbesondere Ericaceae (ING, 2001).

#### 1.2.4.1 *Exobasidium vaccinii*

*Exobasidium vaccinii* verursacht gallenartige Wucherungen und rötliche Verfärbungen an den Blättern der Heidelbeeren (*Vaccinium*). Er kann auch andere Gattungen der Heidekrautgewächse (Ericaceae), wie z.B. die Krähenbeere (*Empetrum*) befallen (ING, 2001). *Exobasidium vaccinii* kann abhängig vom Stamm lokale Infektionen auf Blättern oder Hypertrophien verursachen (BEGEROW ET AL., 2002).



Abbildung 13: *Exobasidium vaccinii* (KUNZE, 2006)

#### 1.2.4.2 *Exobasidium japonicum*

*Exobasidium japonicum* gilt als Verursacher der Azaleen-Ohrläppchenkrankheit. Azaleen sind kleinwüchsige Spezies der Gattung *Rhododendron*. Diese Spezies kommen ursprünglich aus Japan oder China. Ein Befall der Azaleen durch

*Exobasidium japonicum* ist relativ häufig. Die dabei gebildete Galle ist zunächst grüngelb, später orange rot und das Blatt erscheint geschwollen (ING, 2001).



Abbildung 14: *Exobasidium japonicum* (EMGENBROICH, O. D.)

### 1.2.5 *Entyloma* spp.

Es sind ca. 120 Spezies der Gattung *Entyloma* bekannt. *Entyloma* gehört zu den Exobasidiomycetidae und befällt hauptsächlich Korbblütengewächse (Asteraceae) der Abteilung Dicotyledon. *Entyloma* Spezies treten in erster Linie in feucht klimatischen Gebieten auf (PIEPENBRING, 2003).

### 1.2.6 *Tilletiopsis* spp.

*Tilletiopsis* Spezies befallen Blätter unterschiedlicher Pflanzen. Häufig sind sie auf Blättern zu finden, die zusätzlich von Mehltau oder Rostpilzen befallen sind (BOEKHOUT, 1991).

Phylogenetische Untersuchungen zeigten die Zugehörigkeit von *Tilletiopsis* Spezies zu den Exobasidiomycetidae. Hiervon gehört ein großer Teil zu den Georgefischeriales (BEGEROW ET AL., 2000) (Abb.1).

Die Spezies *Tilletiaria anomala* gehört ebenso zu den Georgefischeriales und konnte bislang nur auf Kulturen gefunden werden (BANDONI & JOHRI, 1972). Ein Wirtsspektrum von *Tilletiaria anomala* ist nicht bekannt.

### 1.3 Pigmente

Bei biologischen Pigmenten handelt es sich um Farbträger, die in Zellen und Geweben gelöst oder abgelegt sind und dort eine Vielzahl wichtiger Funktionen einnehmen können. Pilze sind in der Lage, eine Menge unterschiedlicher Pigmente zu bilden. Hierzu gehören Melanine, Carotenoide, Naphtoquinone, Phenoxazine, Flavonoide und indolhaltige Pigmente.

Eine Tryptophan-induzierte Pigmentbildung wurde erst relativ spät entdeckt und konnte zuerst bei dem Brandpilz *Malassezia furfur* gezeigt werden (MAYSER ET AL., 1998). Weiter Untersuchungen ergaben, dass auch andere humanpathogene Pilze in der Lage sind, eine solche Tryptophan-induzierte Pigmentbildung durchzuführen. (vgl. WENZEL ET AL., 2005; NIES, 2006). Nach einer Durchführung verschiedener Reinigungsmethoden konnten einige chemisch reine Stoffe aus dem Gesamtpigment bei *Malassezia furfur* isoliert und näher untersucht werden. Es handelte sich hierbei um unterschiedliche, bisher nicht bekannte Indolderivate mit verschiedenen zum Teil charakterisierten biologischen Eigenschaften.

#### 1.3.1 Pityriacitrin

Das Indolderivat Pityriacitrin ist ein gelber fettlöslicher Stoff. Er stellt möglicherweise aufgrund seiner breiten Absorption im UV-Bereich ( $\lambda_{\max}$  389, 315, 289, 212 nm) neben den bereits bekannten UV-Filtern Melanin bei Pilzen, Flavonoiden bei Pflanzen, Mycosporin-ähnliche Aminosäuren bei Mikroorganismen sowie Scytonemin bei den entwicklungsgeschichtlich sehr alten Cyanobakterien einen weiteren potenten biologischen UV-Filter dar. Diese UV protektive Wirkung von Pityriacitrin konnte auch am Menschen bestätigt werden. Die Bildung von Pityriacitrin könnte ein Grund dafür sein, warum es bei der Pityriasis versicolor trotz Hypopigmentierung der Haut zu keiner erhöhten Lichtempfindlichkeit der betroffenen Areale kommt (vgl. MAYSER ET AL., 2002).

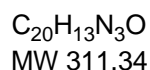
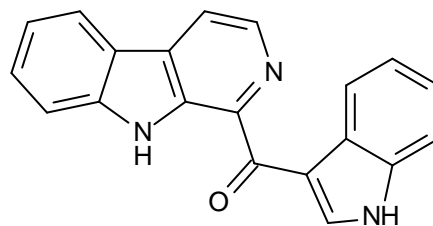


Abbildung 15: Pityriacitrin

### 1.3.2 Pityriarubin

Hierbei handelt es sich um orangefarbene Bisindolylspirane, die von einem hypothetischen Triketon oder von dessen Hydrat abstammen (IRLINGER ET AL., 2004). Die Pityriarubine haben eine enge strukturelle Verwandtschaft zu Bisindolylmaleimiden, die als Protein-Kinase-C-Inhibitoren bekannt sind. Sie können den oxidativen Burst bei neutrophilen Granulozyten unterdrücken und somit auch einen Erklärungsversuch für die geringe inflammatorische Aktivität der neutrophilen Granulozyten bei der Pityriasis versicolor bieten (KRÄMER ET AL., 2003; 2005). Es ist bislang gelungen, die Pityriarubine A, B und C bei *Malassezia furfur* zu isolieren.

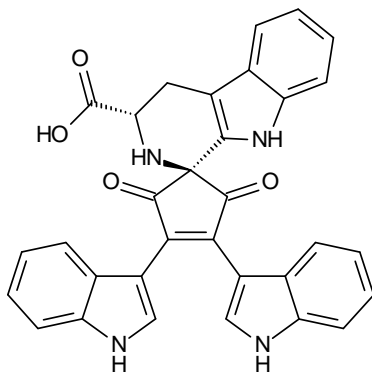


Abbildung 16: Pityriarubin A  
 $C_{32}H_{22}N_4O_4$   
 MW 526.55

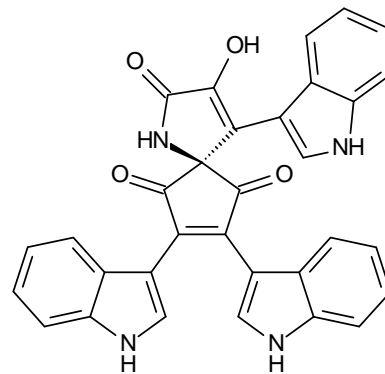


Abbildung 17: Pityriarubin B  
 $C_{32}H_{20}N_4O_4$   
 MW 524.53

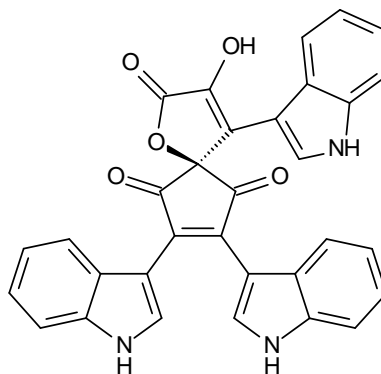


Abbildung 18: Pityriarubin C  
 $C_{32}H_{19}N_3O_5$   
 MW 525.51

### 1.3.3 Pityriaanhydrid

Das Pityriaanhydrid ist eine weitere orangefarbene Substanz, die nach Aufreinigung des Rohextraktes isoliert werden konnte. Im UV-Licht fluoresziert das Pityriaanhydrid orange bis rot. Bei der Synthese von Bisindolylmaleimiden tritt es als Zwischenprodukt auf (IRLINGER, 2002).

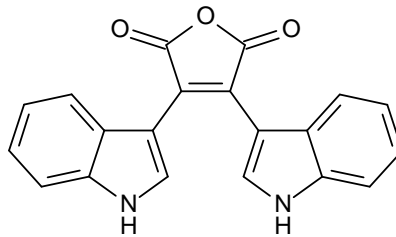


Abbildung 19: Pityriaanhydrid  
 $C_{20}H_{12}N_2O_3$   
MW 328.32

### 1.3.4 Pityrialacton

Das Pityrialacton ist ein Strukturisomer des Pityriaanhydrids. Unter UV-Licht fluoresziert es gelbgrün und könnte einen Erklärungsansatz für die Fluoreszenz von Läsionen bei der Pityriasis versicolor liefern (MAYSER ET AL., 2003).

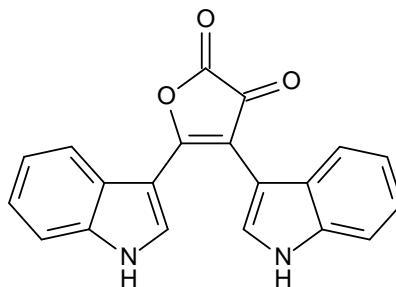
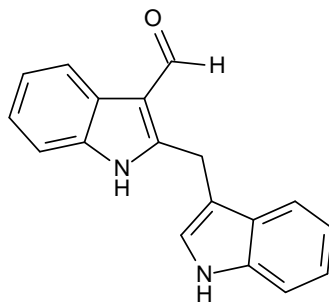


Abbildung 20: Pityrialacton  
 $C_{20}H_{12}N_2O_3$   
MW 328.32

### 1.3.5 Malassezin

Bei dieser Substanz handelt es sich um ein 2,3-Methylenbisindolyl-3-carbaldehyd. Malassezin ist ein Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Agonist und führt zur Apoptose von Melanozyten. Dieses könnte möglicherweise die Hypopigmentierung der Haut bei der Pityriasis versicolor erklären (KRÄMER ET AL., 2005).



**Abbildung 21: Malassezin**  
 $C_{18}H_{14}N_2O$   
MW 274.32

## 1.4 Fragestellung

Vor dem oben beschriebenen Hintergrund erscheinen Untersuchungen sinnvoll, ob der Tryptophan-abhängige Stoffwechselweg auch unter den pflanzenpathogenen Pilzen verbreitet ist. Da *Malassezia furfur* phylogenetisch zu den Brandpilzen gehört, wurden bei dieser Arbeit unterschiedliche Brandpilze auf diese Eigenschaft hin näher untersucht.

Für diese Dissertation ergaben sich dabei die folgenden Fragestellungen:

1. Gibt es außer *Malassezia furfur* noch andere Brandpilze, die in der Lage sind, eine Tryptophan-abhängige Pigmentsynthese durchzuführen?
2. Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten können bei den untersuchten Pilzen in Bezug auf die Pigmentbildung festgestellt werden?
3. Welche methodischen Möglichkeiten bieten sich, um die untersuchten Pilze miteinander zu vergleichen?
4. Wie ist die Pigmentbildung aus dem Blickwinkel der Pathogenität zu werten?
5. Ergeben sich aus der Analyse des Pigmentstoffwechsels bei verschiedenen Brandpilzen auch Hinweise auf dessen Evolution?



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Kulturen und Anzucht

#### 2.1.1 Basidiomycetes; Klasse: Ustilaginomycetes (Brandpilze)

Bei dieser Arbeit wurden ausschließlich Basidiomyceten der Klasse Ustilaginomycetes untersucht. Die hierbei verwendeten Isolate stammen aus dem Labor von Prof. Begerow der Universität Tübingen sowie aus dem Max-Planck-Institut (MPI) Marburg, Abteilung für terrestrische Mikrobiologie (Direktorin Prof. Kahmann). Alle untersuchten Spezies wurden durch Prof. Begerow und das Max Planck Institut Marburg mittels PCR sequenziert und in ihrer Identität bestätigt.

##### 2.1.1.1 Ordnung Ustilaginales

Für diese Untersuchung wurden die folgenden Spezies der Ordnung Ustilaginales verwendet:

<b>Spezies</b>	<b>Referenz</b>
<i>Ustilago Maydis</i> , Holiday	WHO-01; HD-01
<i>Ustilago filiformis</i>	MPI Marburg
<i>Ustilago striiformis</i>	B 372
<i>Ustilago vetiveriae</i>	B 375
<i>Ustilago esculenta</i>	DSM 4458
<i>Ustilago hypodites</i>	B 368
<i>Ustilago bullata</i>	F 146
<i>Ustilago bullata</i>	F 558
<i>Ustilago rabenhorstiana</i>	DSM 4501
<i>Ustilago cynodontis</i>	DSM 4457
<i>Ustilago cynodontis</i>	F 864
<i>Ustilago hordei</i>	MPI Marburg
<i>Ustilago vaillantii</i>	FO 37732
<i>Ustilago segetum</i>	F 32
<i>Ustilago avenae</i>	B 380
<i>Pseudozyma fusiformata</i>	MPI Marburg
<i>Sporisorium scitamineum</i>	MPI Marburg
<i>Sporisorium reilianum</i>	MPI Marburg
<i>Sporisorium raphidii</i>	B 266

Tabelle 1: Übersicht untersuchter Spezies der Ordnung Ustilaginales

### 2.1.1.2 Ordnung Malasseziales

Aus der Ordnung Malasseziales wurde als einzige Spezies *Malassezia furfur* untersucht. Von den anderen *Malassezia* Spezies konnte bislang nur die nicht-lipophile *Malassezia pachydermatis* Spezies zur Pigmentbildung auf Tryptophan-Agar angeregt werden (MAYSER ET AL., 2004).

### 2.1.1.3 Ordnung Exobasidiales

Aus der Ordnung Exobasidiales wurden die folgenden Spezies verwendet:

Spezies	Referenz
<i>Exobasidium vaccinii</i>	F 546
<i>Exobasidium vaccinii</i>	F 542
<i>Exobasidium japonicum</i>	F 521

Tabelle 2: Untersuchte Spezies der Ordnung Exobasidiales

### 2.1.1.4 Ordnung Georgerfischeriales

Die folgenden Georgerfischeriales Spezies wurden näher untersucht:

Spezies	Referenz
<i>Tilletiaria anomala</i>	F 19
<i>Tilletiopsis minor</i>	F 3320 CBS 545.51

Tabelle 3: Untersuchte Spezies der Ordnung Georgerfischeriales

### 2.1.1.5 Ordnung Entylomatales

Aus der Ordnung Entyloma wurde *Entyloma polysporum* F 971 untersucht.

### 2.1.1.6 Ordnung Microstromatales

Hier wurde als einzige Spezies *Tilletiopsis albescens* F 3314 verwendet.

## 2.1.2 Anzucht auf Nährmedium

Die Anzucht der Pilze erfolgte zunächst auf Kimmig-Agar (Merck, Darmstadt).

Der Agar hatte die folgende Zusammensetzung (g/Liter): Peptone e carne 15,0; Natriumchlorid 1,0; D(+)-Glucose 19,0; Agar-Agar 15,0 und zusätzlich Glycerin 5,0 ml.

## 2.2 Kulturbedingungen für die Pigmentbildung

Manche Pilze sind in der Lage, bei Anwesenheit der Aminosäure Tryptophan als einziger Stickstoffquelle Pigment zu bilden. Das entstandene Pigment besteht aus einer großen Anzahl von Substanzen, die sich in der Dünnschichtchromatographie als Vielzahl von Banden und Fluorochromen zeigen, die bislang zum größten Teil noch unbekannt sind. Eine solche Art der Pigmentbildung konnte zuerst bei der Hefe *Malassezia furfur* nachgewiesen werden (MAYSER ET AL., 1998). Hierbei wurde ein transparenter, um Vitamine, Spurenelemente, Elektrolyte und Kohlenhydrate reduzierter Minimalagar verwendet. Dieser Minimalagar bestand nur noch aus einer Lipidquelle und der Aminosäure Tryptophan.

Der in dieser Studie verwendete Minimalagar wurde zusätzlich mit Glucose ergänzt, weil die hier gezüchteten Pilze im Gegensatz zu *M. furfur* nicht obligat lipophil sind und eine Kohlenhydratquelle benötigen.

Die Zugabe von Tween erwies sich für das Wachstum der Pilze zwar nicht als essentiell, verbesserte jedoch die Lipophilie des Nährbodens. Aufgrund dessen konnte das Pigment besser in den Agar diffundieren und der Verfärbungsprozess beschleunigt werden. Der bei dieser Arbeit verwendete Nährboden (1bGlc-Medium) hatte die folgende Zusammensetzung:

- Agar-Agar (Agar-Agar reinst, Merck)
- D(+)-Glucose (wasserfrei für biochemische Zwecke, Merck)
- Aqua ad injectabilia (zum Befeuchten und Reinigen, Baxter)
- Tween 80 (Tween 80, Sigma, St. Louis, USA)
- L-Tryptophan (Min, 98%, Sigma ultra)

Um 300 ml Nährboden herzustellen, wurden 6 g Agar-Agar und 3 g D(+)-Glucose eingewogen und mit Aqua dest. auf 300 ml aufgefüllt. Danach wurde das erzeugte Gemisch mit dem Autoklaven (Melag Autoklav Typ 23, Melag, Berlin) bei 1 bar über 30 min erhitzt ( $T=120^{\circ}\text{C}$ ). Nach Abkühlen wurden 9 ml Tween 80 und 0,9 g L-Tryptophan hinzugegeben. Anschließend wurde unter einer Uniflow Biohazard Laminar Flow Sicherheitsbank (Gerätetyp UVUB1200, UNiequip Laborgerätebau, Martinsried) jeweils 15 ml des Nährbodens in eine Kunststoffpetrischale (Nunc, Roskilde, DK) gegossen.

Nach Verfestigen und Erkalten des Agars wurden die Pilzkulturen mit einem sterilen Tupfer unter der Sicherheitsbank ausgestrichen.

## **2.3 Pigmentgewinnung und Aufreinigung**

### **2.3.1 Pilz-Screening**

Um die Pilze auf Pigmentbildung zu testen, wurde zu Beginn der Untersuchung ein Pilz-Screening durchgeführt. Dabei wurden die auf Kimmig Agar angezüchteten Pilze mit einem sterilen Tupfer ausgestrichen und auf dem 1bGlc-Nährboden für ca. 14 Tage bei Raumtemperatur (ca. 22-25°C) angezüchtet. So konnte überprüft werden, ob sich die Pilze zur Pigmentbildung anregen ließen.

### **2.3.2 Gewinnung des Rohextraktes**

Um den für die Untersuchung benötigten Rohextrakt zu gewinnen, wurden jeweils ca. 50 Agarplatten (1bGlc) mit vorher positiv getesteten Spezies beimpft. Anschließend wurden diese für ca. 4 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit zeigte sich die auf Pigmentbildung zurückzuführende typische bräunliche Verfärbung des Agars, die sich auch nach längerem Inkubieren nicht mehr veränderte.

Die Kulturen mit dem Agar wurden nun aus den Schalen entfernt, mit einem Pürrierstab zerkleinert und mit Ethylacetat übergossen. Nach einer Verweildauer von 12-24h wurde das Extrakt mittels Glaswolle abfiltriert und anschließend in einem Scheidetrichter mit Aqua dest aufgegossen und vermischt. Nach einer Wartezeit von 15 bis 30 Minuten teilte sich das Gemisch in zwei Phasen, einer oberen Ethylacetat Phase und einer unteren Wasser Phase mit Agar und Fettresten. Nach erfolgter Trennung wurde dem Ethylacetat Pigmentgemisch zur Bindung des Restwassers wasserfreies Natriumsulfat (Fluka) hinzugegeben. Das Ethylacetat-Pigmentgemisch wurde nochmals abfiltriert und in einem Rotationsverdampfer (Typ VVI, Heidolph-Elektro KG, Kehlheim) getrocknet. Das entstandene stark visköse Pigment wurde mit einer geringen Menge Methanol aufgenommen.

Bis zur weiteren Aufreinigung wurde das Rohextrakt lichtgeschützt bei minus 18°C in Autosampler-Gewindeflaschen (Volumen 1,8 ml) aufbewahrt.

### **2.3.3 Säulenchromatographie**

Die weitere Auftrennung des Rohextraktes erfolgte durch Säulenchromatographie. Es wurde eine Säule mit einer Nutzlänge von ca. 525 mm (NS29 mit Fritte, Durchmesser 30 mm, Por. 1, PTFE-Küken NS 14/2,5 mm spitz ausgezogen, Fa. Pfeuffer, Hannover) verwendet. Als Träger diente Sephadex LH 20 (Sigma), ein hydroxypropyliertes Derivat des Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Das Rohextrakt wurde auf die Säule aufgetragen und unter UV Licht (Gerät: Desaga GmbH, Heidelberg, Type 131200) von 366nm durch farblich scharf abgrenzbare Banden in einzelne Fraktionen aufgeteilt. Als Laufmittel wurde Methanol verwendet. Um den Fluß zu beschleunigen, wurde mittels Gummiball ein Druck über der Säule erzeugt. Die Laufzeit einer Säule betrug ca. zwei Stunden. Die einzelnen Fraktionen wurden in unterschiedlichen Glasbehältern aufgefangen und mittels Rotationsverdampfer getrocknet. Den getrockneten Fraktionen wurde je ca. 2ml Methanol zugeführt, und in zwei Autosampler-Gewindeflaschen (Volumen 1,8 ml) aufbewahrt. Der Säulenchromatographie liegt das Prinzip der Gelpermeations- und Ausschlußchromatographie zu Grunde. Hierbei werden Moleküle mit unterschiedlicher Größe in einer flüssigen (mobilen) Phase durch eine feste (stationäre) Phase geführt.

Die stationäre Phase besteht aus einem Gel dessen Poren eine bestimmte Größe haben. Es kommt zu einem Siebeffekt mit einer Verteilung der Moleküle nach ihrer Größe.

Moleküle mit einem Durchmesser kleiner als den der Porenöffnungen verteilen sich in stationärer und mobiler Phase. Größeren Molekülen, welche nicht durch die Porenöffnung passen, steht ein relativ kleineres Verteilungsvolumen zur Verfügung. Diese werden von den kleineren Molekülen getrennt und schneller durch die Säule bewegt.

Um verminderte Trenneigenschaften durch Verschmutzung des Gels zu reduzieren, wurde Sephadex LH 20 regelmäßig gereinigt. Zur Reinigung wurden zwei Methoden verwendet:

Methode A:

Dem Sephadex wird 0,2 N NaOH zugeführt und unter gelegentlichem Schwenken über Nacht inkubiert (keinen Magnetrührer verwenden). Das NaOH wird am folgenden Tag über eine Nusche abgesaugt und das Sephadex mit Aqua dest. gewaschen bis sich ein neutraler pH-Werte einstellt.

Methode B:

Das Sephadex verbleibt nach erfolgter Chromatographie auf der Säule. Es wird mit 1 ml 2 N HCl aufgeschichtet. Die Säule wird nach dem Einsickern mit Methanol gespült, bis ein neutraler pH-Wert erreicht ist.

### 2.3.4 Dünnschichtchromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie erfolgt eine weitere Auftrennung der gewonnenen Fraktionen. Hierfür wurden Kieselgel 60-Platten (Merck) verwendet. Zum Auftragen der einzelnen Fraktionen wurde ein Linomat IV (Camag, Muttenz, Switzerland) benutzt, der die folgende Einstellung hatte:

Plattenbreite	200 mm
Bandenbreite	15 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	12 sec/ $\mu$ l
Abstand zwischen den Banden	10 mm
Startposition	23 mm
Volumen	15 $\mu$ l
Druck am Hauptventil	>100 bar
Druck am Reduzierventil	4-5 bar

Tabelle 4: Einstellung des Linomaten für die analytische Trennung der Fraktionen

Anschließend wurde die Kieselgelplatte in eine Kammer mit einem Laufmittelgemisch gestellt. Das Laufmittel war aus Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 zusammengesetzt. Wenn das Laufmittel eine Höhe von 17,5 cm erreicht hatte, wurde die Platte aus der Kammer herausgenommen und unter eine Abzugshaube zum Trocknen gestellt.

Anschließend wurde die Platte fotografiert. Beim Fotografieren wurde der Camag Reprostar 3 verwendet. Das hierbei eingesetzte Wincats Programm hatte die in der Tabelle 5 beschriebene Einstellung. Um die pH-Abhängigkeit der vorliegenden Banden zu überprüfen, wurden die Banden mit einer Glaspipette unter einer Abzugshaube mit HCl bzw.  $\text{NH}_3$  bedampft.

Image 1	Aufnahme bei Tageslicht
Image 2	Aufnahme bei 366 nm
Image 3	Aufnahme bei 254 nm
Image 4	Aufnahme bei Tageslicht nach Bedampfung mit Salzsäure (rauchend, 37%, Merck)
Image 5	Aufnahme bei 366 nm nach Bedampfung mit Salzsäure (rauchend, 37%, Merck)
Image 6	Aufnahme bei Tageslicht nach Bedampfung mit Ammoniaklösung (reinst, Merck)
Image 7	Aufnahme bei 366 nm nach Bedampfung mit Ammoniaklösung (reinst, Merck)

Tabelle 5: Einstellung des Wincats Programms beim Fotografieren der Dünnschichtplatten

Im Anschluss wurde mit Hilfe des Programms Wincats der Rf-Wert der einzelnen Banden bestimmt (Rf-Wert: Strecke Start-Fleck/Strecke Start-Lauffront). Dies bietet eine Möglichkeit, die Banden zu charakterisieren.

Die Banden wurden nun miteinander verglichen. Die aus vorausgegangenen Untersuchungen bereits bekannten Banden (IRLINGER ET AL., 2004; MAYSER ET AL., 2003; KRÄMER ET AL., 2003; MAYSER ET AL., 2002; MAYSER ET AL., 1998) dienten hierbei als Orientierungshilfe und wurden gegebenenfalls zum Vergleich als Standards aufgetragen. In der nachfolgenden Tabelle werden die bereits bekannten Banden dargestellt:

Rf-Wert	Farbe	Name
0,46	Gelb-rot	Pityriaanhydrid
0,19	Gelb-grüne Fluoreszenz bei 366 nm	Pityrialacton
0,14	Gelb-rot	Pityriarubin A
0,27	Gelb-rot	Pityriarubin B
0,38	Gelb-rot	Pityriarubin C
0,15	Hellgelb	Pityriacitrin
0,38	Schwach gelb	Malassezia-Indol A
0,14	Farblos	Malassezia-Indol B
0,38	Orange	MO58
0,28	Farblos	Indolylmilchsäure
0,27	Gelb-grün	Malasseziacarbazol
0,54	Gelb	FNG49
0,64	Braunrot, UV rötlich-braun	Indol
0,09	Hellblaue Fluoreszenz	Tryptophan

Tabelle 6: Auflistung bekannter Banden

Markante Banden wurden ausgewählt und in weiteren Verfahren näher untersucht. Diejenigen Fraktionen, die die ausgewählten Banden enthielten, wurden mit dem Linomat erneut aufgetragen. Der Linomat war dabei wie folgt eingestellt:

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	165 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	8 sec/ $\mu$ l
Startposition	20 mm
Abstand der Banden	0
Volumen	500 $\mu$ l

Druck am Hauptventil	> 100 bar
Druck am Reduzierventil	5 bar

Tabelle 7: Einstellung des Linomaten zur präparativen Trennung der Fraktionen

Anschließend wurde die Dünnschichtplatte in eine Laufkammer mit dem Laufmittelgemisch Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure Verhältnis 10:5:2 gestellt und entwickelt. Das hierbei im Gegensatz zur analytischen Trennung verwendete 10:5:2 Laufmittelverhältnis erwies sich für die präparative Trennung als vorteilhaft.

Nach Trocknung der Platte wurde die gewünschte Bande mit Bleistift markiert und mit einem Einmalskalpel ausgekratzt. Das ausgekratzte Kieselgel wurde mit Mörser und Pistil zerkleinert und mit Ethylacetat und Aqua dest. aufgegossen.

Es bildeten sich zwei Phasen heraus: Eine wasserhaltige untere Phase und eine ethylacetathaltige obere Phase. Die wasserhaltige untere Phase beinhaltete das Kieselgel, die ethylacetathaltige obere Phase enthielt das gelöste Pigment. Die obere Phase wurde mit einer Einmalpipette abpipettiert und zur Bindung des Restwassers mit wasserfreiem Natriumsulfat (Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz) versetzt. Anschließend wurde die Flüssigkeit mittels Rotationsverdampfer abrotiert, bis die Lösung einen hohen Grad an Viskosität erreicht hatte. Die Lösung wurde in Autosampler überführt und unter einem Stickstoffstrom bei 40° C in einem Techne DRI-Block DB (Thermo Dux, Heidelberg) getrocknet.

### **2.3.5 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)**

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

#### **2.3.5.1 Präparative HPLC**

Durch präparative HPLC können die trotz Vorreinigung noch recht komplexen Sephadex-Säulen-Fraktionen (durchschnittlich 5 – 7 Komponenten) über einen Gradienten mit einer LiChrospher-RP8 Säule (Merck, Darmstadt, 30x250mm) 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 (LKB, Schweden) aufgezeichnet. Der verwendete lineare Gradient (180 min) läuft von 0 – 100 % Acetonitril bzw. 100 – 0 % Wasser (Lösungsmittel sind Gradient Grade von Merck, Darmstadt). Die Flussrate beträgt 5 ml/min. Die eluierenden Verbindungen werden mittels Fraktionensammler (Super Frac, Pharmacia Biotech) in 180 Fraktionen von je 5 ml aufgefangen und anschliessend lyophilisiert (Lyovac GT2). Die Fraktionen wurden nach Chromatogrammverlauf, Farbe und Fluoreszenz kombiniert, lyophilisiert und nach analytischer HPLC eines Aliquots nochmals mittels eines im Verlauf flacheren und gespreizten Gradienten weiter aufgetrennt. Auch hier wurden entsprechende Fraktionen vereinigt und erneut lyophilisiert. Anschliessend wurde ein Aliquot zur analytischen HPLC verwendet oder per Express unter Stickstoffatmosphäre auf Trockeneis zur Strukturaufklärung an den Kooperationspartner nach München geschickt. An der Technischen Universität München wurde durch weitere chemisch analytische Methoden eine Strukturaufklärung durchgeführt. (siehe unten).

#### **2.3.5.2 Analytische HPLC**

Die analytische HPLC wird durchgeführt, um die gewonnenen Unterfraktionen auf Reinheit zu überprüfen. Sie wurde hier hauptsächlich zu Kontrollzwecken eingesetzt. Dabei wurde eine Reversed-Phase-Säule (RP-18, 4 × 250 mm, stationäre Phase Shandon ODS Hypersil 3 µm, Life Science International LTD, Cheshire, England) verwendet. Die Elution erfolgte mittels Hochdruck-Gradienten (Gynkotek Gradientenpumpe 480, Gynkotek, Germering). Als mobile Phase wurde Acetonitril-Wasser (linearer Gradient von 0 – 100% Acetonitril bzw 100 – 0% Wasser über 100 min) bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Die Detektion eluierter Substanzen erfolgte bei 220 nm (Detektor UV-Detektor 785, bai, Bensheim).

Die Chromatogramme wurden mittels eines Thermoschreibers (Gynkotek C-R 6A Chromatopac, Gynkotek, Germering) bei einer Schreibergeschwindigkeit von 2mm/min aufgezeichnet. Der Probenauftrag erfolgte mittels eines Autosamplers (Alcott Modell 738, Bischoff Analysentechnik, Leonberg) in einem Volumen von 100 µl.

### **2.3.6 Weitere chemisch-analytische Methoden**

Die aus Gießen erhaltenen Proben wurden am Institut für Organische Chemie und Biochemie II der Technischen Universität München durch Dr. Spiteller mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR (600MHz), Massenspektroskopie (HRMS) sowie FT-IR-Spektroskopie analysiert. Zur Aufnahme geeigneter Massenspektren standen 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.

Diese Untersuchung wurde ausschließlich in München durchgeführt. Daher wird hier auf eine ausführliche Darstellung der dort verwendeten Methoden verzichtet. Verwiesen sei an dieser Stelle auf die Dissertation von Dr. G. WILLE (2000).

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 PCR**

Bei dieser Studie wurden 27 Brandpilze untersucht. Zu Beginn der Untersuchung wurden alle Brandpilze mittels PCR durch Prof. Begerow Universität Tübingen und das MPI Marburg getestet. Hiermit wurde bestätigt, dass es sich bei den untersuchten Pilzen um die entsprechende Spezies handelte.

Die in Tabelle 8 und 9 beschriebenen und beim Pilz-Screening untersuchten Pilze konnten alle durch Sequenzierung zugeordnet werden.

### **3.2 Pilz-Screening**

Im Anschluss an die PCR wurde ein Pilz-Screening durchgeführt. Im ersten Schritt wurde der beimpfte, tryptophanhaltige 1bGlc-Agar nach abgelaufener Inkubationszeit optisch inspiziert, um erste Hinweise über eine eventuelle Pigmentbildung zu erlangen. Eine Braunfärbung des Agars deutete darauf hin, dass eine Pigmentbildung stattgefunden hat (siehe Abbildung 22).



Abbildung 22: Pigmentbildung auf Tryptophan-Agar

Es ergab sich folgendes Ergebnis:

Von den 27 untersuchten Spezies wurden 17 als positiv getestet, d.h. sowohl Wachstum als auch Pigmentbildung konnten festgestellt werden. Acht Spezies zeigten zwar ein schwaches Wachstum, bildeten aber kein Pigment aus. Zwei Spezies zeigten weder Wachstum noch Pigmentbildung. Tabelle 8 und 9 geben eine Übersicht über alle getesteten Pilzspezies.

Die als Pigment-positiv getesteten Pilze wurden nachgezüchtet und nach einer Inkubationszeit von vier Wochen abgeerntet und weiterverarbeitet.

Tabelle 8 zeigt alle Pilzspezies, die auf Tryptophan-Glucose-Agar sowohl zu Wachstum als auch zur Pigmentbildung angeregt werden konnten (rot hervorgehoben).

<u>Spezies</u>	<u>1b+1% Glc</u>
<i>Ustilago maydis</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Ustilago vetiveriae</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Ustilago striiformis</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Ustilago esculenta</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Ustilago hypodites</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Ustilago bullata</i> 146	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Ustilago bullata</i> 558	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Ustilago rabenhorstiana</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Ustilago cynodontis</i> DSM 4457	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Pseudozyma fusiformata</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Sporisorium scitamineum</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Sporisorium reilianum</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Sporisorium raphidii</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Exobasidium vaccinii</i> F546	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Exobasidium japonicum</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Tilletiaria anomala</i>	<b>Wachstum</b> Pigment
<i>Malassezia furfur</i>	<b>Wachstum</b> Pigment

Tabelle 8: Pigment-positiv getestete Spezies

Tabelle 9 bietet eine Übersicht über alle Pilzspezies, die auf Tryptophan-Glucose-Agar nicht zur Pigmentbildung angeregt werden konnten. Diejenigen Spezies, die jedoch Wachstum zeigten wurden blau hervorgehoben.

<b><u>Spezies</u></b>	<b><u>1b+1% Glc</u></b>
<i>Ustilago filiformis</i>	schwaches Wachstum kein Pigment
<i>Ustilago hordei</i>	schwaches Wachstum kein Pigment
<i>Ustilago cynodontis F 864</i>	schwaches Wachstum kein Pigment
<i>Tilletiopsis albescens</i>	schwaches Wachstum kein Pigment
<i>Tilletiopsis minor</i>	schwaches Wachstum kein Pigment
<i>Entyloma polysporum</i>	schwaches Wachstum kein Pigment
<i>Ustilago vaillantii</i>	schwaches Wachstum kein Pigment
<i>Ustilago segetum</i>	schwaches Wachstum kein Pigment
<i>Exobasidium vaccinii F 542</i>	kein Wachstum kein Pigment
<i>Ustilago avenae</i>	kein Wachstum kein Pigment

Tabelle 9: Pigment-negativ getestete Spezies

### 3.3 Säulenchromatographie

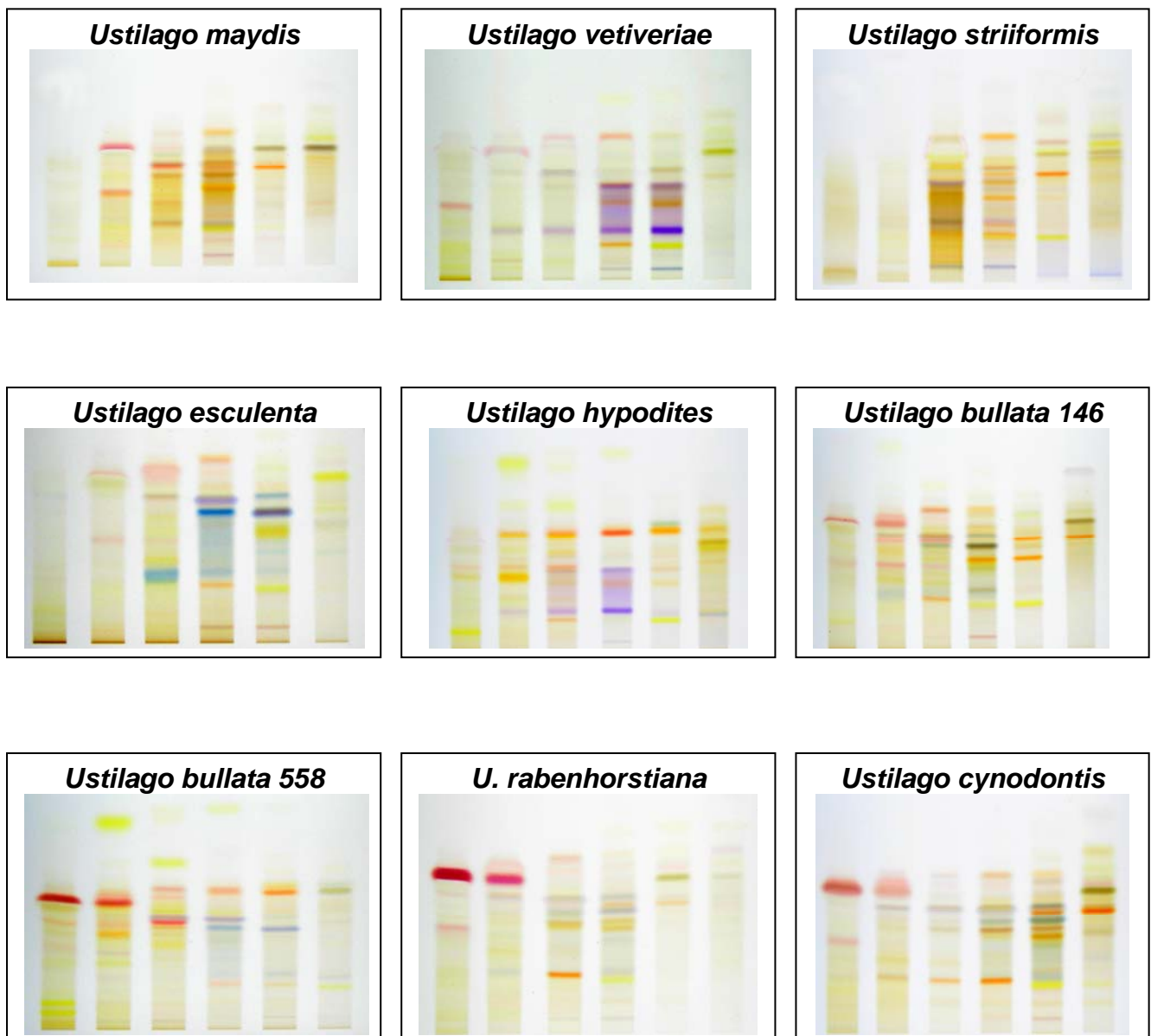
Bei der Säulenchromatographie fand eine Auftrennung des gewonnenen Rohextraktes in Fraktionen statt. Die unter Tages- und UV-Licht beobachteten unterschiedlichen Farben ermöglichten die Gewinnung von Fraktionen. Je nach Pilz konnte in sechs bis acht Fraktionen unterteilt werden. Jede Fraktion hatte im Tageslicht sowie aufgrund ihrer Fluoreszenz unter UV-Licht eine andere Farbe. Die Pilze zeigten überwiegend Unterschiede in der farblichen Ausprägung ihrer Fraktionen.

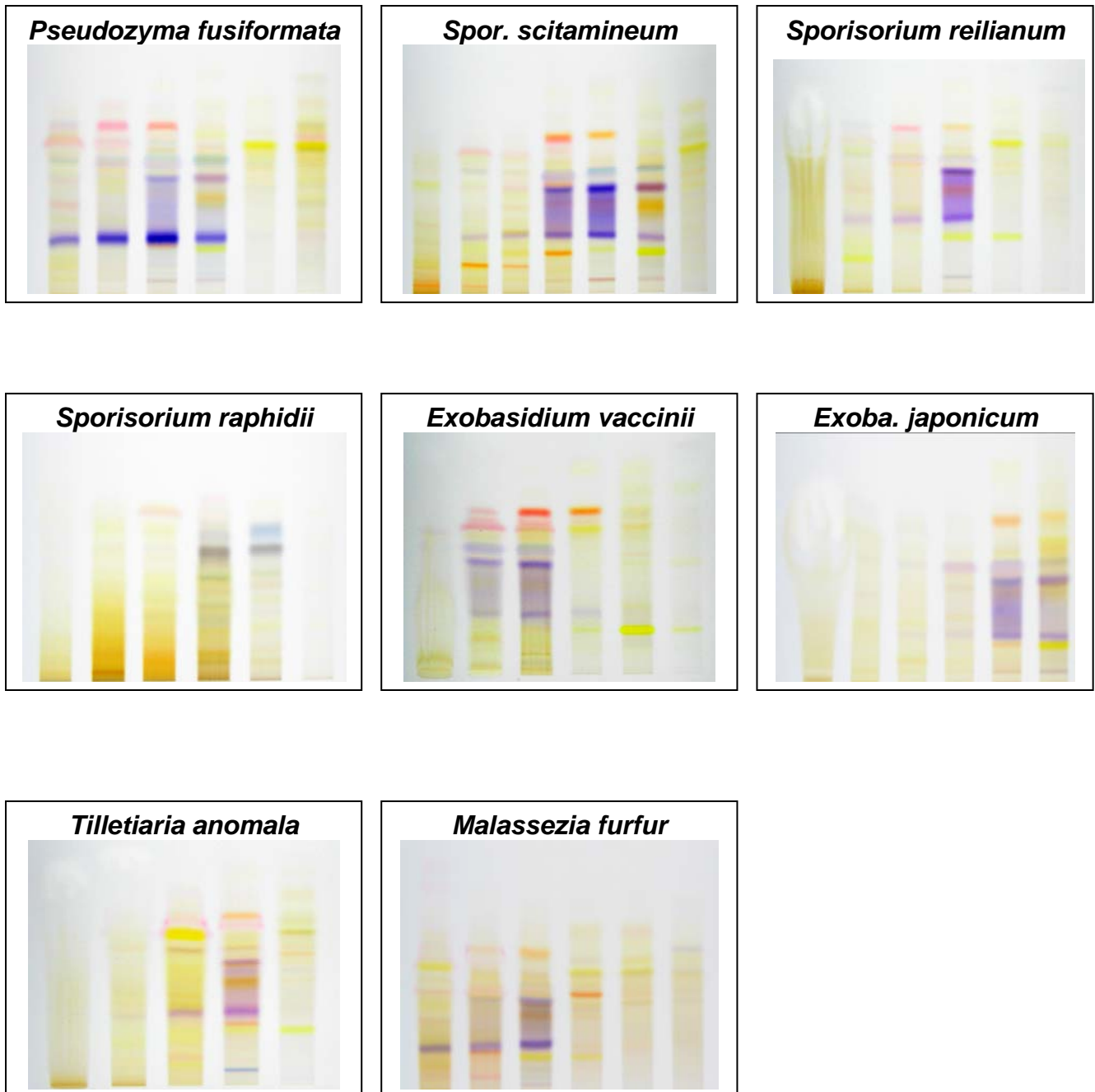
### 3.4 Dünnschichtchromatographie

Die bei der Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen wurden nun mittels Dünnschichtchromatographie näher untersucht. Die erste Fraktion konnte wegen ihres hohen Lipidgehaltes nicht verwendet werden und wurde verworfen.

Die folgenden Tageslichtaufnahmen zeigen die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie in einer Übersicht:

#### 3.4.1 Übersicht der Dünnschichtchromatogramme aller untersuchten Spezies





Es konnte erstmals gezeigt werden, dass *Malassezia furfur* nicht der einzige Brandpilz ist, der in der Lage ist, auf Tryptophan-Agar eine Pigmentsynthese durchzuführen. Bei allen 17 Pigment-positiv getesteten Pilzen konnte anhand der Dünnschichtchromatographie die Bildung unterschiedlicher Pigmente und Fluorochrome gezeigt werden.

Betrachtet man die farbliche Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen, so stellt man auf den ersten Blick fest, dass es eine Menge Unterschiede im Vergleich der

Pilze miteinander gibt. Ebenso können aber auch viele Gemeinsamkeiten beobachtet werden, die auf den ersten Blick nicht unbedingt offensichtlich erscheinen.

Im nächsten Schritt wurden alle 17 Pigment-positiven Pilze einzeln beschrieben und deren Banden klassifiziert. Dieses bildete die Grundlage für die weiteren Untersuchungen.

Es wurden unterschiedliche Kriterien zur Beschreibung und Klassifikation einzelner Banden herangezogen.

Je nach Spezies wurden fünf bis sieben unterschiedliche, parallel laufende Fraktionen nebeneinander aufgetragen. Jede Fraktion bestand aus mehreren sich farblich unterscheidenden Banden. Jede Bande wurde durch ihre Farbe bei Tageslicht, unter UV-Licht, nach Bedampfung mit HCl und NH<sub>3</sub> beschrieben. Die Bedampfung mit HCl und NH<sub>3</sub> diente der Überprüfung einer möglichen pH-Abhängigkeit der Farben der vorliegenden Banden.

Die Höhe einer Bande wurde sowohl als absolute (mm) - Lauffhöhe als auch durch den R<sub>f</sub>-Wert (Strecke Start-Fleck/Strecke Start-Lauffront) angegeben. Alle erhaltenen Informationen wurden tabellarisch festgehalten. Die Strecke vom Auftragpunkt der Fraktionen (1,5 cm oberhalb des unteren Plattenrandes) bis Ende der Lauffront betrug hierbei 16 cm. Die Strecke der Lauffront wurde auf 17,5 cm normiert.

Durch die genaue Untersuchung der Hefe *Malassezia furfur* in vorangegangenen Arbeiten war sowohl die farbliche Zusammensetzung einzelner Fraktionen in der Dünnschichtchromatographie als auch die chemische Struktur mancher Metabolite bekannt (vgl. Material und Methoden Tabelle 6) und wurde als Orientierungshilfe für die weiteren Untersuchungen der neuen Pilze herangezogen. Aufgrund der Farbe und Lauffhöhe bereits von *Malassezia furfur* bekannter Banden und der darin enthaltenen Stoffe, konnten bei der nun folgenden, detaillierten Bandenbeschreibung bereits Vermutungen über den Inhalt bestimmter Banden geäußert werden.



## 3.4.2 Detaillierte Bandenbeschreibung der untersuchten Spezies

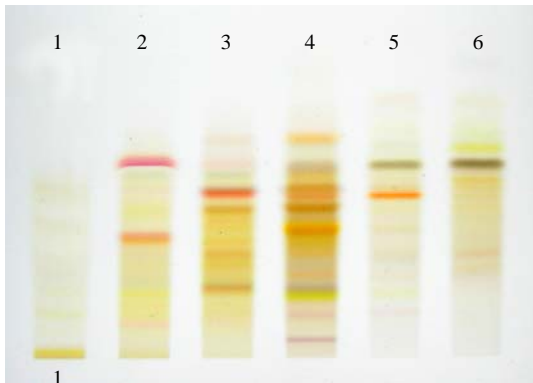
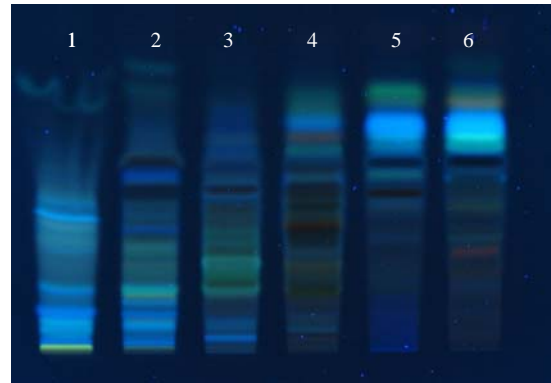
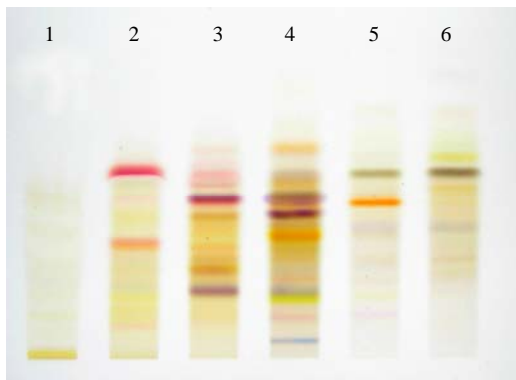
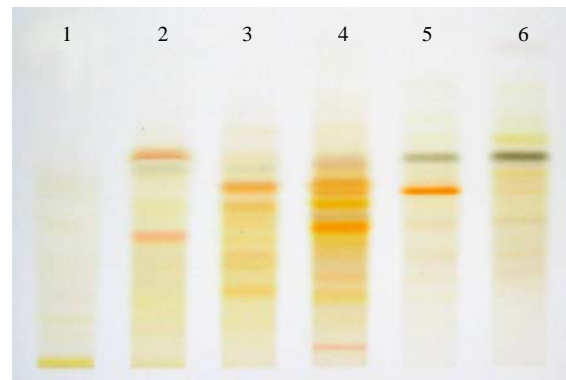
*Ustilago maydis*Abbildung 23a: Tageslichtaufnahme *U. maydis*Abbildung 23b: UV-Licht Aufnahme *U. maydis*

Abbildung 23c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 23d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,04	6	4	violett	-----	blau	orange	
0,06	11	2	orange	hellblau	orange	-----	
0,09	18	4	violett	-----	violett	-----	
0,13	20	4	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,14	22	3	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,17	26	4	orange	-----	orange	orange	
0,21	33	3,4	orange	-----	orange	orange	
0,24	38	2	rot	-----	rot	orange	
0,25	40	4	orange	orange	orange	orange	Pityriarubin B
0,29	47	3,4	orange	-----	orange	orange	
0,32	50	4,5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,33	51	3	rot	-----	rot	orange	
0,34	53	3,4	grau	-----	violett	-----	
0,39	60	3	rosa	-----	rosa	-----	
0,39	60	4	grau	-----	grau	orange	
0,39	60	5,6	grüngelb	-----	grüngelb	grau	
0,39	61	2	rot	-----	rot	orange	
0,41	65	6	gelb	türkis	gelb	gelb	
0,43	68	4	orange	orange	orange	-----	Pityriaanhydrid

Tabelle10: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Ustilago maydis*

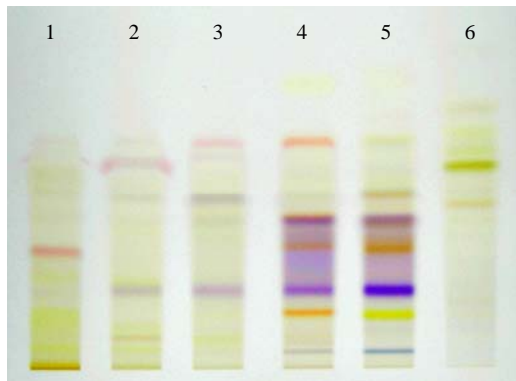
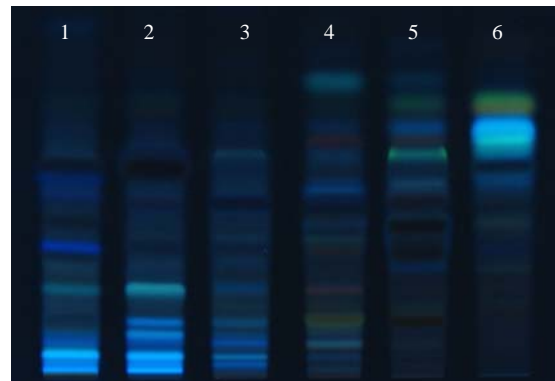
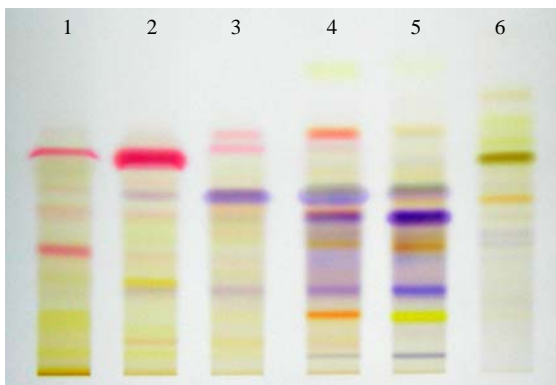
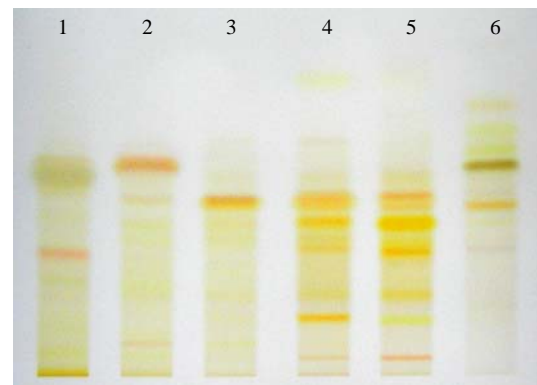
*Ustilago vetiveriae*Abbildung 24a: Tageslichtaufnahme *U. vetiveriae*Abbildung 24b: UV-Licht Aufnahme *U. vetiveriae*

Abbildung 24c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 24d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,04	6	4,5	blau	-----	blau	orange	
0,06	10	2	orange	blau	orange	orange	
0,11	17	5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,12	18	4	orange	orange	orange	orange	Pityriarubin A
0,15	25	2,3,4,5	violett	-----	violett	orange	
0,23	35	1	rot	-----	rot	orange	
0,24	38	4,5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,29	46	4,5	violett	-----	violett	orange	
0,29	47	4,5	orange	-----	orange	orange	
0,32	51	6	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,33	53	3,4	blau	-----	blau	orange	
0,34	54	5	orange	-----	violett	orange	
0,40	63	1,2	rosa	-----	rosa	orange	
0,40	63	6	grüngelb	-----	grüngelb	grau	
0,44	70	3	rosa	-----	rosa	-----	
0,44	70	4	orange	rot	orange	-----	Pityriaanhydrid
0,55	88	4	gelb	türkis	gelb	gelb	

Tabelle 11: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Ustilago vetiveriae*

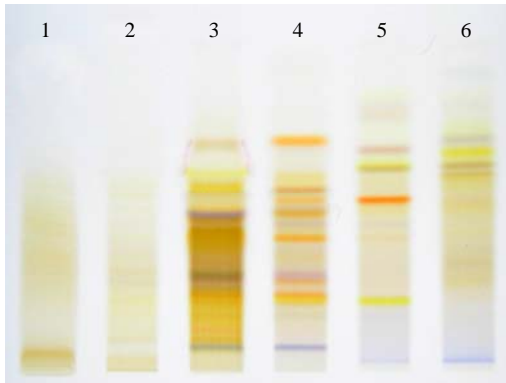
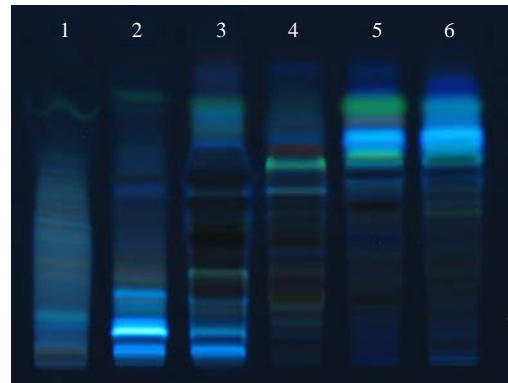
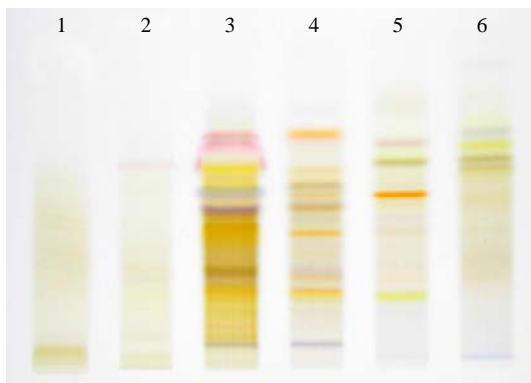
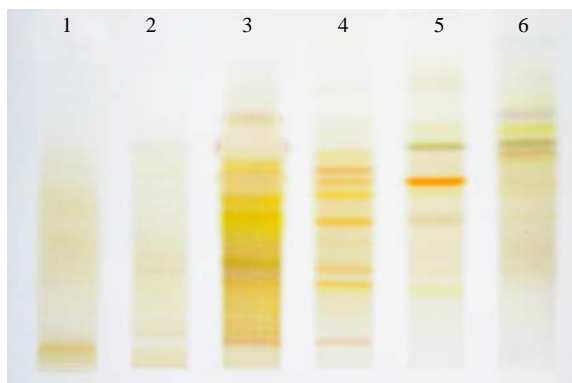
*Ustilago striiformis*Abbildung 25a: Tageslichtaufnahme *U. striiformis*Abbildung 25b: UV-Licht Aufnahme *U. striiformis*

Abbildung 25c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 25d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,02	4	5,6	blau	blau	blau	-----	
0,05	8	3,4	blau	-----	blau	orange	
0,14	22	4,5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,15	24	4	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,18	28	4	orange	-----	orange	orange	
0,19	30	3,4	violett	-----	violett	-----	
0,26	41	4	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,29	48	3	violett	-----	violett	-----	
0,31	49	4	orange	-----	orange	orange	
0,31	50	3	gelb	-----	gelb	-----	
0,33	53	4,5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,35	56	4	orange	-----	orange	orange	
0,36	57	3	gelb	hellblau	gelb	gelb	
0,38	62	3	gelb	-----	gelb	-----	
0,40	63	5,6	grüngelb	-----	grüngelb	grau	
0,43	68	6	gelb	-----	gelb	gelb	
0,43	69	5	rot	hellblau	rot	-----	
0,45	71	4	orange	rot	orange	-----	Pityriaanhydrid
0,45	71	6	grau	hellblau	grau	grau	

Tabelle 12: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Ustilago striiformis*

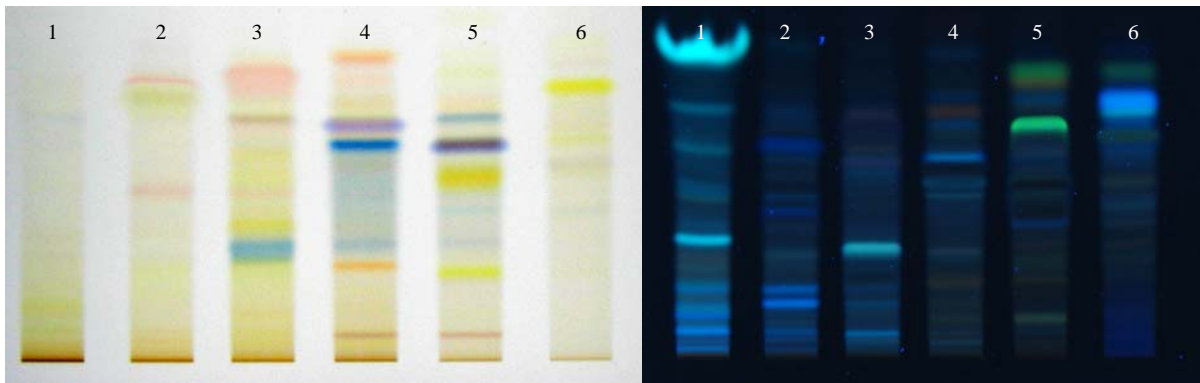
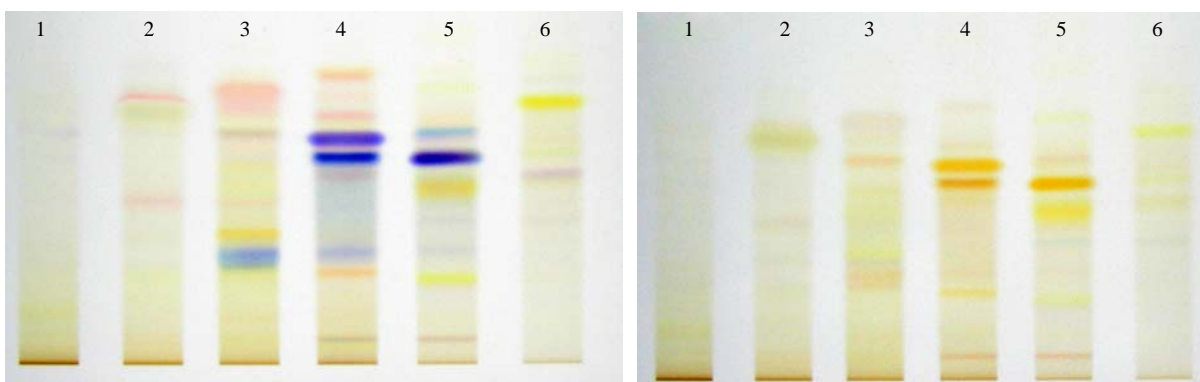
***Ustilago esculenta***Abbildung 26a: Tageslichtaufnahme *U. esculenta*Abbildung 26b: UV-Licht Aufnahme *U. esculenta*

Abbildung 26c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 26d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,04	7	4,5	violett	-----	violett	orange	
0,14	23	5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,15	24	4	orange	orange	orange	orange	Pityriarubin A
0,17	28	3,4,5	blau	-----	blau	-----	
0,21	29	3	orange	türkis	orange	-----	
0,26	42	2,3	rot	-----	rot	rot	
0,28	46	5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,33	54	4,5	blau	-----	blau	orange	
0,37	59	3	orange	-----	orange	orange	
0,38	59	4,5	blau	-----	blau	-----	
0,39	62	2,3,4	gelb	-----	gelb	-----	
0,42	68	6	gelb	-----	gelb	gelb	
0,43	70	1,2	rot	-----	rot	-----	
0,47	75	4	orange	orange	orange	-----	Pityriaanhydrid

Tabelle 13: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Ustilago esculenta*

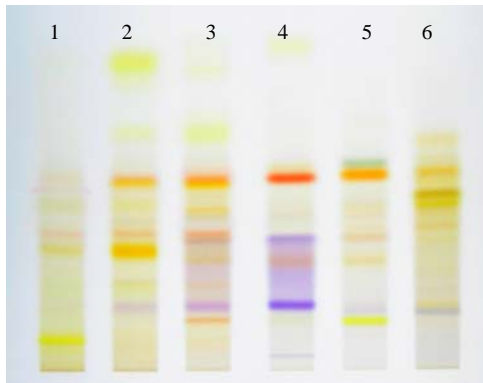
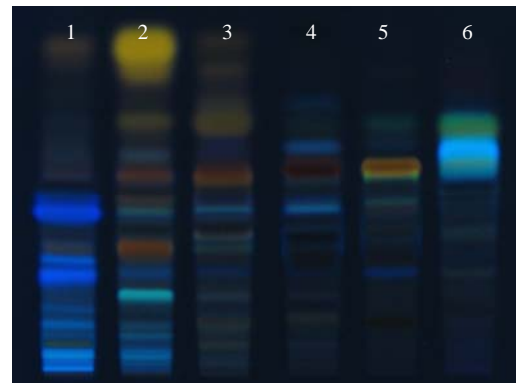
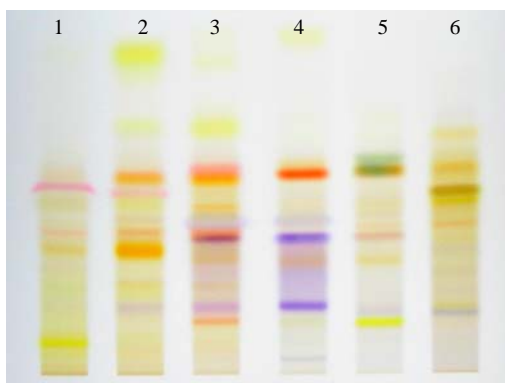
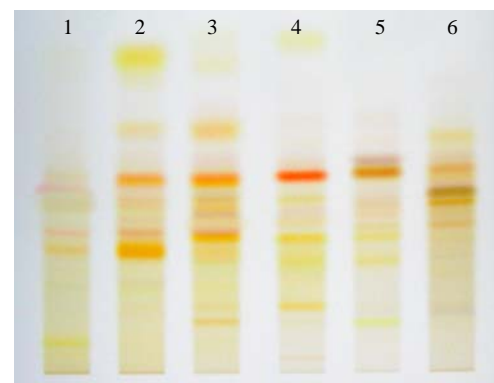
*Ustilago hypodites*Abbildung 27a: Tageslichtaufnahme *U. hypodites*Abbildung 27b: UV-Licht Aufnahme *U. hypodites*

Abbildung 27c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 27d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,03	6	4	blau	-----	blau	orange	
0,07	11	1	gelb	orange	gelb	gelb	
0,11	18	5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,11	18	3	orange	orange	orange	orange	Pityriarubin A
0,13	21	6	blau	-----	blau	-----	
0,14	23	2,3,4	violett	-----	violett	orange	
0,14	24	6	gelb	-----	gelb	-----	
0,19	30	2,3	orange	-----	orange	-----	
0,24	38	3,4,5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,26	42	1,2	orange	orange	orange	orange	
0,29	46	3,4	violett	-----	violett	orange	
0,29	47	3,4,5	orange	-----	orange	orange	
0,30	48	1,2,3	orange	-----	orange	orange	
0,31	51	6	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,33	53	2,3,4	-----	-----	blau	-----	
0,35	56	3	orange	-----	orange	orange	
0,36	58	6	gelb	-----	gelb	orange	
0,38	62	6	grüngelb	-----	grüngelb	braun	
0,39	63	1	rosa	-----	rosa	rosa	
0,40	65	2,3	orange	orange	orange	orange	
0,42	67	2,3,4	orange	rot	orange	orange	Pityriaanhydrid
0,43	68	5,6	orange	orange	orange	orange	
0,45	73	5	türkis	-----	türkis	violett	
0,51	83	3	gelb	orange	gelb	gelb	
0,67	107	2	gelb	orange	gelb	orange	
0,70	113	4	gelb	-----	gelb	gelb	

Tabelle 14: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Ustilago hypodites*

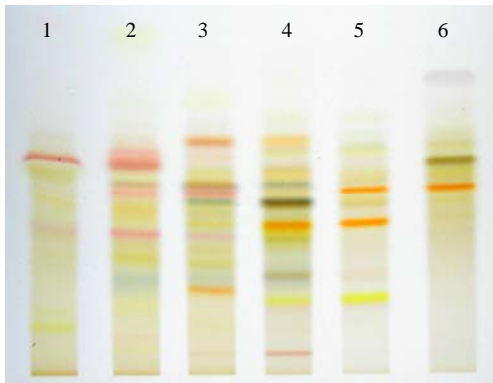
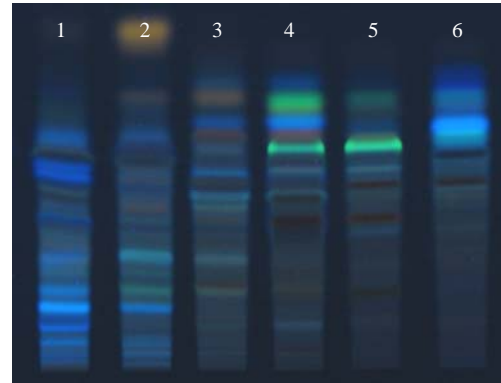
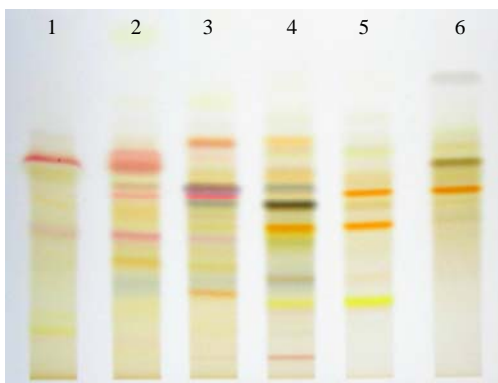
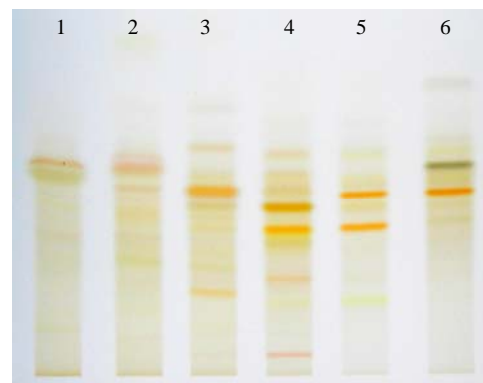
***Ustilago bullata* 146**Abbildung 28a: Tageslichtaufnahme *U. bullata* 146Abbildung 28b: UV-Licht Aufnahme *U. bullata* 146

Abbildung 28c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 28d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,04	7	4	violett	-----	violett	violett	
0,09	15	1	gelb	blau	gelb	-----	
0,16	25	4,5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,18	27	3	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,19	30	2,3,4	violett	-----	violett	-----	
0,20	32	4	orange	-----	orange	orange	
0,23	37	2,3	orange	türkis	orange	-----	
0,29	45	1,2,3	rot	-----	rot	-----	
0,31	49	4,5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,33	53	2	orange	orange	orange	orange	
0,35	55	3,4	blau	hellblau	blau	orange	
0,34	55	4	orange	-----	orange	orange	
0,37	59	2,3	rot	-----	rot	-----	
0,38	60	5,6	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,39	62	2,3	orange	-----	orange	orange	
0,39	62	4	blau	hellblau	blau	-----	
0,41	65	1,2,3	gelb	-----	gelb	-----	
0,41	65	4	orange	-----	orange	orange	
0,43	68	2	rot	-----	rot	orange	
0,44	70	1	rot	-----	rot	orange	
0,44	70	6	grüngelb	-----	grüngelb	grüngelb	
0,45	72	4,5	gelb	gelb	gelb	-----	
0,47	75	3	orange	rot	orange	orange	Pityriaanhydrid
0,47	76	4	orange	rot	orange	orange	
0,55	88	2	gelb	orange	gelb	gelb	
0,60	96	6	grau	blau	grau	grau	
0,68	109	3	gelb	orange	gelb	-----	

Tabelle 15: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Ustilago bullata* 146

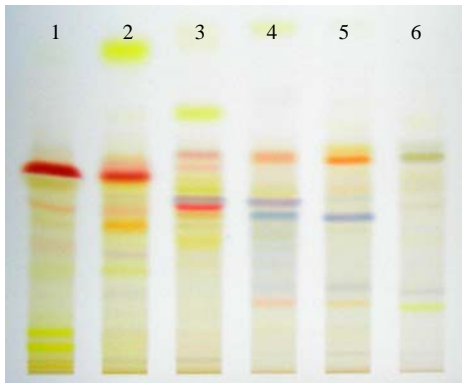
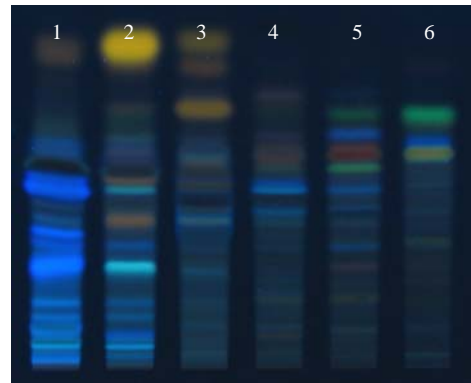
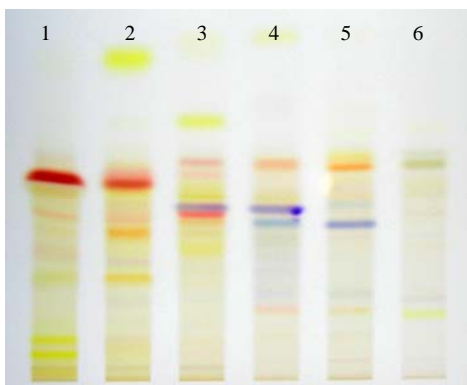
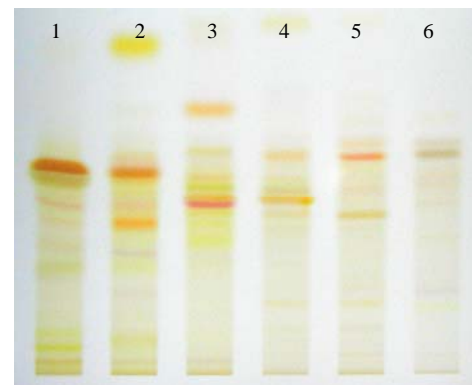
***Ustilago bullata* 558**Abbildung 29a: Tageslichtaufnahme *U. bullata* 558Abbildung 29b: UV-Licht Aufnahme *U. bullata* 558

Abbildung 29c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 29d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,03	5	1,2,3	violett	-----	violett	grau	
0,04	7	5	violett	-----	violett	-----	
0,06	10	1	gelb	blau	gelb	gelb	
0,09	15	1	gelb	blau	gelb	gelb	
0,14	23	6	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,15	25	4,5	orange	orange	orange	orange	Pityriarubin A
0,19	30	2,3,4,5	violett(leicht)	-----	violett(leicht)	-----	
0,22	35	2	orange	türkis	orange	-----	
0,26	41	2	violett	blau	violett	grau	
0,27	44	1	orange	blau	orange	orange	
0,28	45	3	orange	-----	orange	orange	
0,32	50	2	orange	orange	orange	orange	
0,34	54	4,5	blau	blau	blau	orange	
0,35	56	1,2	orange	-----	orange	orange	
0,36	57	3	rot	-----	orange	rot	
0,36	57	6	orange(leicht)	-----	Orange(leicht)	-----	Pityriarubin C
0,37	59	3,4	violett	-----	violett	orange	
0,40	63	1,2,3	gelb	-----	gelb	gelb	
0,43	68	1,2	rot	-----	rot	orange	
0,45	70	3	rosa	grau	rosa	-----	
0,46	73	4	orange	orange	orange	orange	
0,46	73	5	orange	rot	orange	orange	Pityriaanhydrid
0,47	75	3	rosa	-----	rosa	orange	
0,56	89	3	gelb	orange	gelb	orange	
0,69	110	2	gelb	orange	gelb	gelb	
0,74	116	4	gelb	-----	gelb	-----	

Tabelle 16: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Ustilago bullata* 558

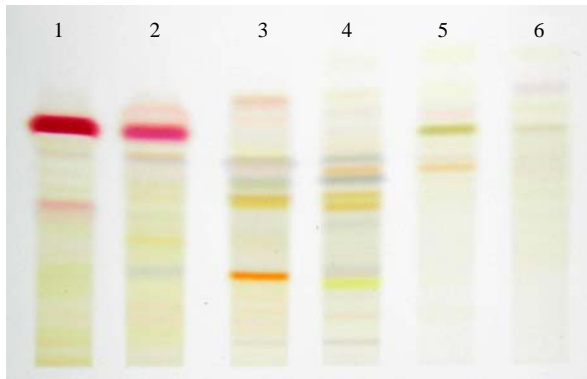
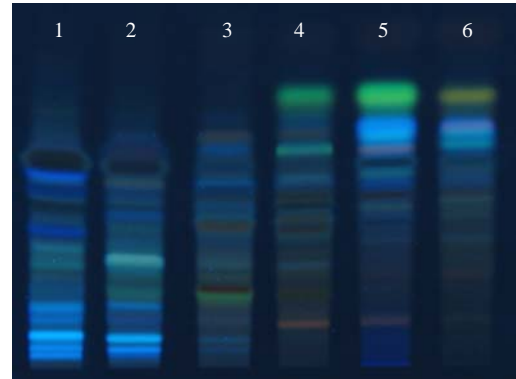
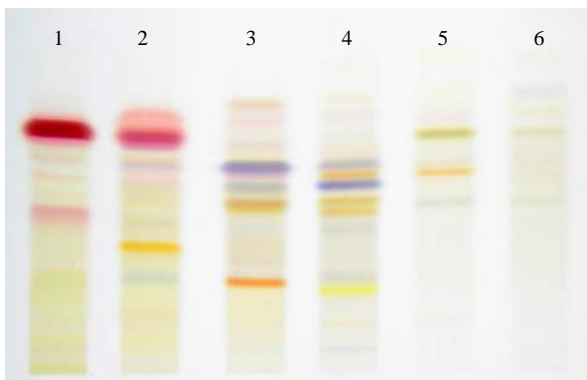
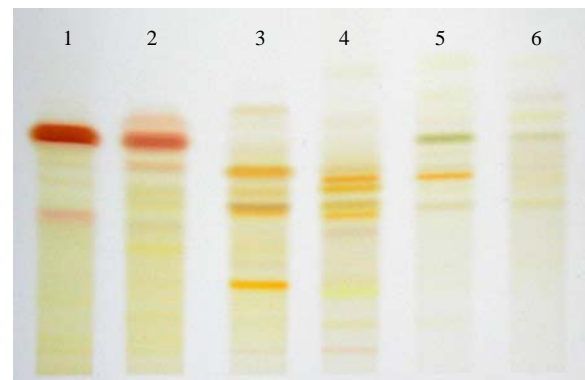
*Ustilago rabenhorstiana*Abbildung 30a: Tageslichtaufnahme *U. rabenhorstiana*Abbildung 30b: UV-Licht Aufnahme *U. rabenhorstiana*

Abbildung 30c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 30d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,04	7	3,4	blau	-----	blau	orange	
0,14	23	4	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,15	25	3	orange	orange	orange	orange	Pityriarubin A
0,16	26	2,3,4	blau	-----	blau	-----	
0,21	34	2	orange	türkis	orange	-----	
0,27	44	4	orange	orange	orange	orange	Pityriarubin B
0,28	45	1	rosa	blau	rosa	rosa	
0,28	45	3	orange	orange	orange	orange	
0,29	47	4	orange	orange	orange	orange	
0,32	50	3,4	blau	-----	blau	orange	
0,33	53	2,3	rosa	-----	rosa	-----	
0,33	54	4,5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,35	56	3,4	blau	-----	blau	orange	
0,36	58	2,3	gelb	türkis	gelb	-----	
0,40	63	2	rot	-----	rot	orange	
0,40	65	5	grüngelb	-----	grüngelb	grau	
0,41	65	1	rot	-----	rot	orange	
0,45	72	3	orange	orange	orange	orange	Pityriaanhydrid

Tabelle 17: Detaillierte Bandendarstellung von *Ustilago rabenhorstiana*



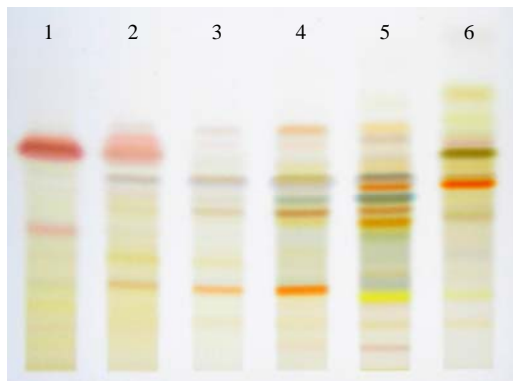
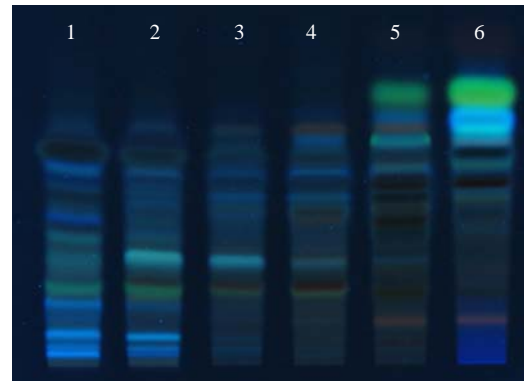
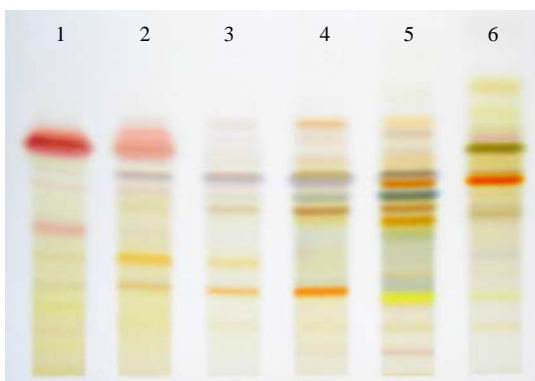
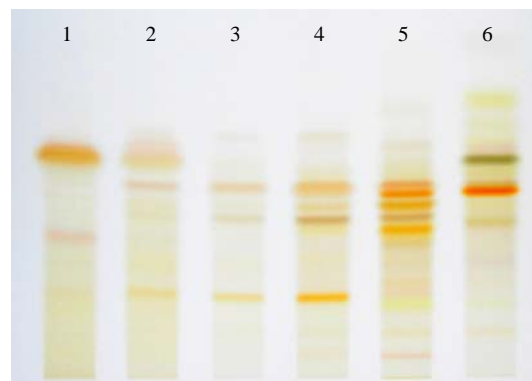
***Ustilago cynodontis***Abbildung 31a: Tageslichtaufnahme *U. cynodontis*Abbildung 31b: Tageslichtaufnahme *U. cynodontis*

Abbildung 31c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 31d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,05	7	5	violett	-----	violett	orange	
0,14	23	5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,15	25	2,3,4	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,16	26	5	violett	-----	violett	-----	
0,18	30	5	orange	-----	orange	-----	
0,21	34	2,3	orange	türkis	orange	-----	
0,26	43	1	rot	-----	rot	orange	
0,28	45	5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,30	48	4,5	orange	-----	braun	braun	
0,32	52	4,5	blau	-----	blau	orange	
0,36	56	5,6	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,37	57	4	orange	-----	orange	orange	
0,37	57	2,3,4,5	blau	-----	blau	orange	
0,39	61	4,5	orange	-----	orange	-----	
0,41	65	6	grüngelb	-----	grüngelb	grüngelb	
0,42	68	1,2	rot	-----	rot	orange	
0,43	68	6	rosa	rosa(leicht)	rosa	rosa	
0,46	72	4,5	orange	orange	orange	-----	Pityriaanhydrid
0,47	75	6	gelb	blau	gelb	-----	
0,52	84	6	orange	gelb	orange	orange	

Tabelle 18: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Ustilago cynodontis*

## *Pseudozyma fusiformata*

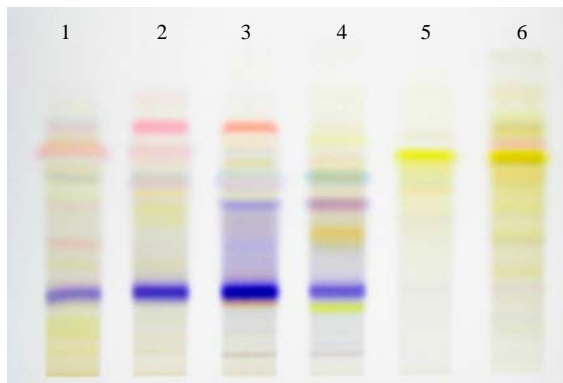
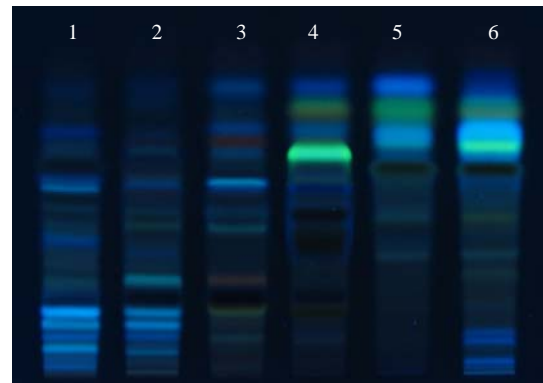
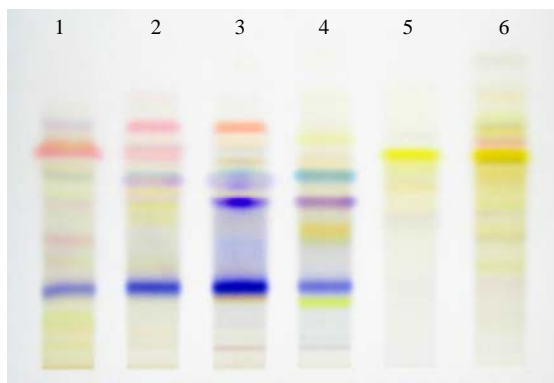
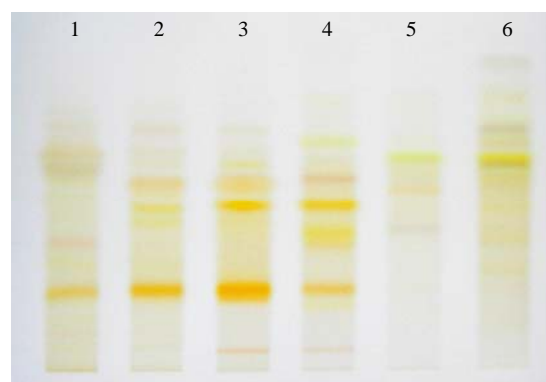
Abbildung 32a: Tageslichtaufnahme *P. fusiformata*Abbildung 32b: UV-Licht Aufnahme *P. fusiformata*

Abbildung 32c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 32d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,04	7	3,4	violett	-----	violett	orange	
0,05	9	4	blau	-----	blau	-----	
0,13	20	4	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,13	21	3	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,15	24	1,2,3,4	blau	-----	blau	orange	
0,24	38	1	rot	-----	rot	orange	
0,26	42	4	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,31	50	1	rot	-----	rot	-----	
0,31	50	3,4	blau	-----	blau	orange	
0,31	50	4	orange	-----	orange	orange	
0,34	54	5	orange(leicht)	-----	orange(leicht)	orange	Pityriarubin C
0,35	56	2,3	rosa	-----	rosa	orange	
0,37	58	2,3,4	blau	blau	violett	orange	
0,39	62	3	orange	-----	orange	orange	
0,40	64	5,6	gelb	-----	gelb	gelb	
0,41	65	2	rosa	-----	rosa	-----	
0,41	65	1	orange	-----	orange	-----	
0,42	67	6	rosa	gelb	rosa	-----	
0,44	69	4	gelb	gelb	gelb	gelb	
0,46	72	3	orange	rot	orange	-----	Pityriaanhydrid
0,46	72	6	gelb	blau	gelb	grau	
0,46	73	2	rosa	-----	rosa	orange	

Tabelle 19: Detaillierte Bandenbeschreibung von *P. fusiformata*

## *Sporisorium scitamineum*

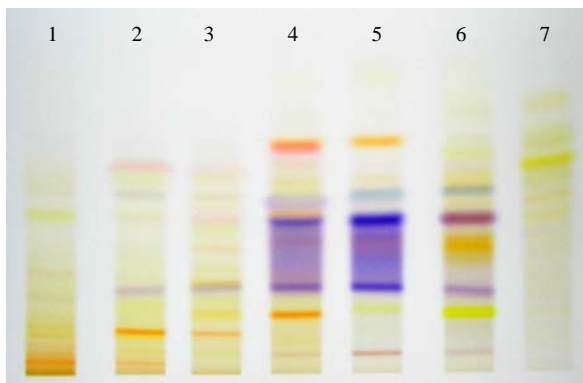
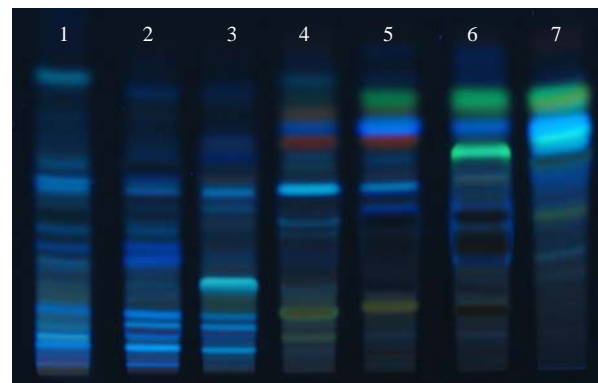
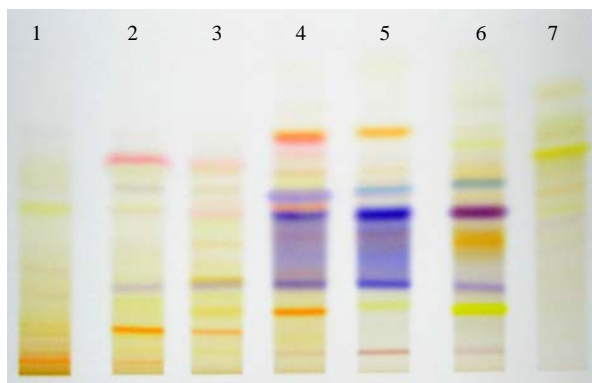
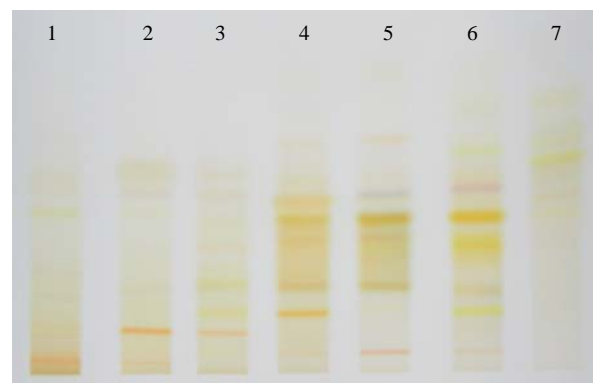
Abbildung 33a: Tageslichtaufnahme *S. scitamineum*Abbildung 33b: UV-Licht Aufnahme *S. scitamineum*

Abbildung 33c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 33d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,03	5	1,2	orange	-----	orange	orange	
0,05	7	4,5	violett	-----	violett	orange	
0,09	14	2,3	orange	-----	orange	orange	
0,13	20	4	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,13	20	6	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,17	26	2,3,4,5,6	blau	-----	blau	orange	
0,19	30	4	orange	-----	-----	-----	
0,26	41	4,5,6	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,30	49	4,5,6	blau	-----	blau	orange	
0,30	49	6	orange	-----	orange	orange	
0,32	50	1	gelb	-----	gelb	gelb	
0,32	50	4	orange	-----	orange	-----	
0,34	53	4	rosa	-----	rosa	orange	
0,35	54	7	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,36	57	4,5,6	blau	-----	blau	blau	
0,37	59	4	gelb	türkis	gelb	gelb	
0,41	65	2	rosa	-----	rosa	-----	
0,41	67	7	gelb	-----	gelb	gelb	
0,45	71	4	orange	rot	orange	-----	
0,45	73	5	orange	rot	orange	orange	Pityriaanhydrid

Tabelle 20: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Sporisorium scitamineum*

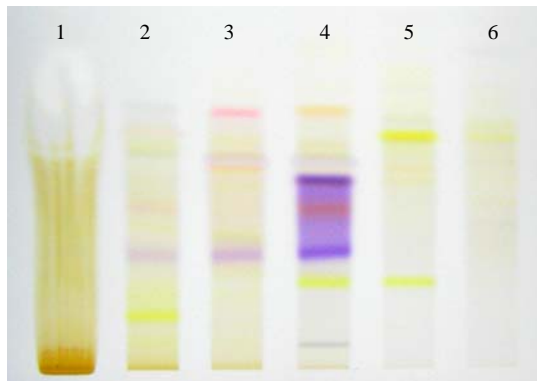
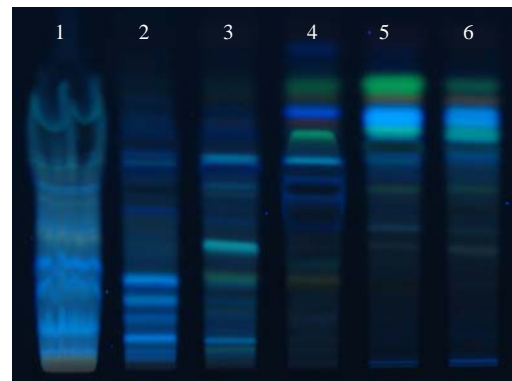
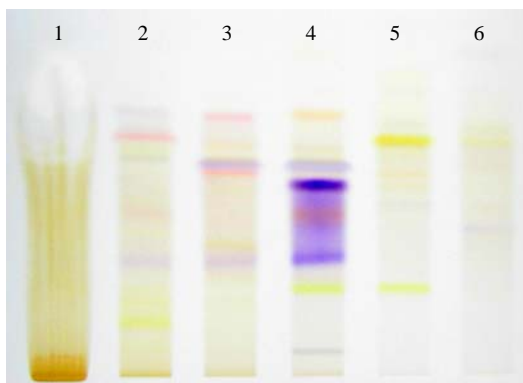
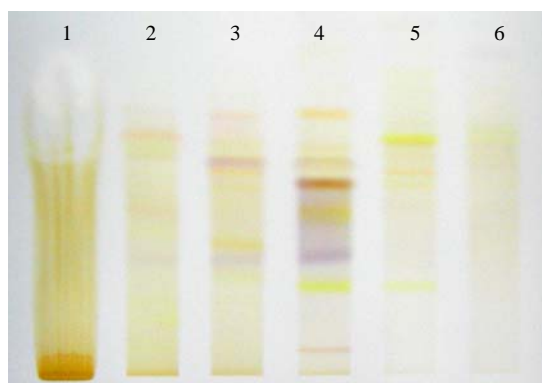
*Sporisorium reilianum*Abbildung 34a: Tageslichtaufnahme *S. reilianum*Abbildung 34b: UV-Licht Aufnahme *S. reilianum*

Abbildung 34c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 34d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,05	8	4	violett	-----	violett	orange	
0,10	17	2	gelb	-----	gelb	-----	
0,17	27	4,5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,19	32	3	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,22	35	2,3,4	violett	-----	violett	violett	
0,24	40	3	orange	-----	orange	orange	
0,31	49	4	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,31	50	2	orange	-----	orange	-----	
0,38	59	4	violett	-----	violett	orange	
0,38	60	3	orange	-----	orange	orange	
0,39	61	5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,39	62	3	rot	-----	orange	orange	
0,40	64	3,4	blau	-----	blau	grau	
0,45	71	5	gelb	-----	gelb	gelb	
0,46	73	2	rot	-----	rot	orange	
0,49	78	3	rot	-----	rot	rot	
0,49	79	4	orange	rot	orange	orange	Pityriaanhydrid

Tabelle 21: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Sporisorium reilianum*

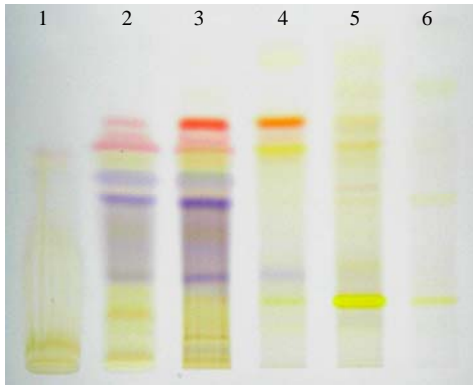
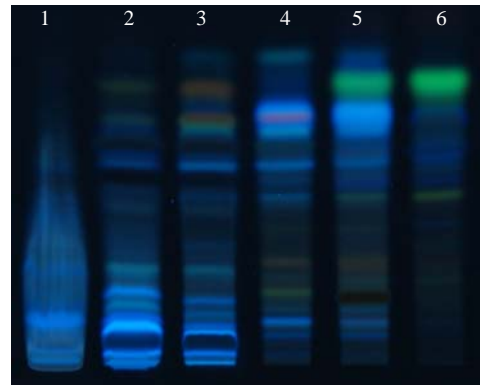
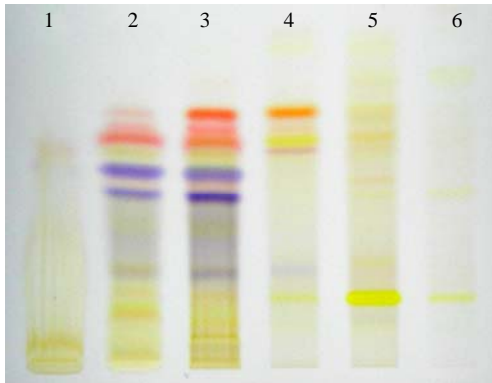
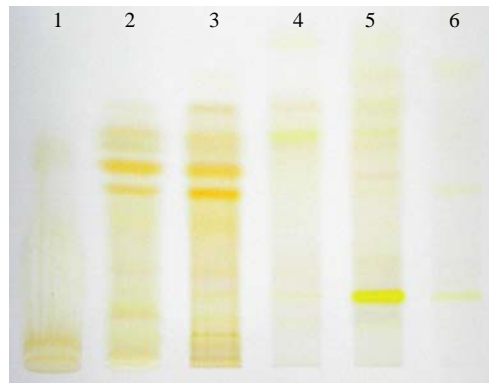
*Exobasidium vaccinii*Abbildung 35a: Tageslichtaufnahme *E. vaccinii*Abbildung 35b: UV-Licht Aufnahme *E. vaccinii*

Abbildung 35c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 35d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,12	19	2	orange	violett	orange	orange	
0,15	23	5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,16	24	2,3	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,20	31	2,3	violett	-----	violett	-----	
0,28	45	2,3	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,35	56	2,3	violett	-----	violett	orange	
0,35	56	5,6	orange	-----	orange	-----	
0,38	60	5	orange(leicht)	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,40	63	2,3	violett	-----	violett	orange	
0,43	70	2,3	gelb	hellblau	gelb	-----	
0,46	73	4	gelb	-----	gelb	-----	
0,48	75	2,3	rosa	-----	rosa	orange	
0,52	82	3	rot	orange	rot	-----	Pityriaanhydrid
0,52	82	4	orange	orange	orange	orange	
0,64	103	4	gelb	türkis	gelb	-----	

Tabelle 22: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Exobasidium vaccinii*

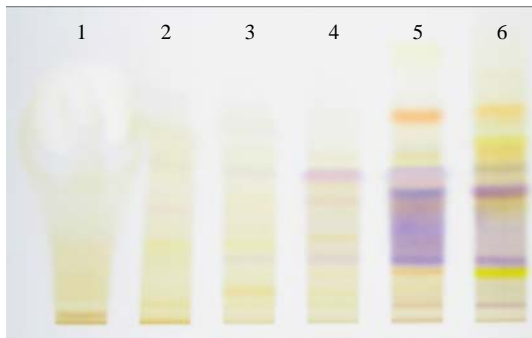
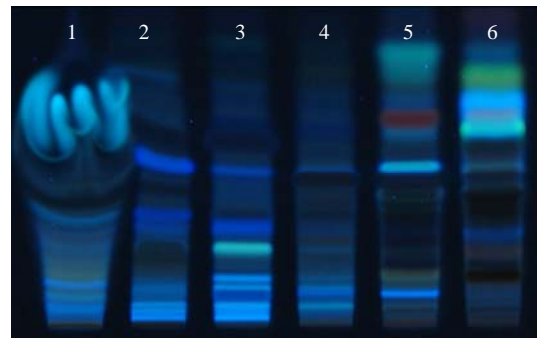
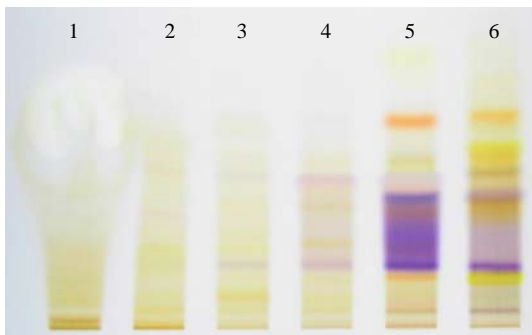
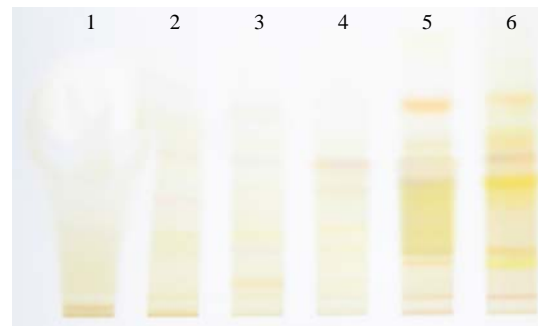
*Exobasidium japonicum*Abbildung 36a: Tageslichtaufnahme *E. japonicum*Abbildung 36b: UV-Licht Aufnahme *E. japonicum*

Abbildung 36c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 36d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,04	6	5,6	violett	-----	violett	orange	
0,07	11	3	orange	blau	orange	orange	
0,10	17	6	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,11	18	5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,17	21	3,4,5,6	violett	-----	violett	orange	
0,18	28	4,5	orange	-----	orange	-----	
0,24	38	4,5,6	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,27	44	5,6	violett	-----	violett	orange	
0,28	46	5	orange	-----	orange	-----	
0,31	48	4,5	violett	-----	violett	orange	
0,33	54	5,6	gelb	türkis	gelb	gelb	
0,38	61	6	gelb	-----	gelb	gelb	
0,43	69	5	orange	rot	orange	orange	Pityriaanhydrid
0,43	70	6	orange	orange	orange	orange	
0,55	90	5	gelb	türkis	gelb	-----	

Tabelle 23: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Exobasidium japonicum*

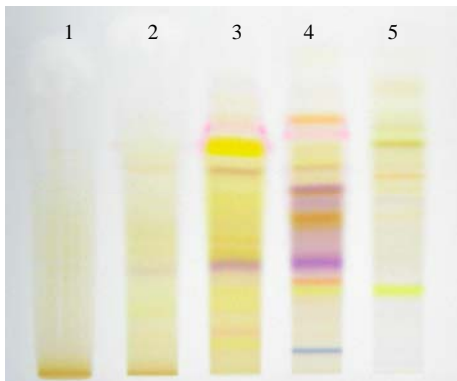
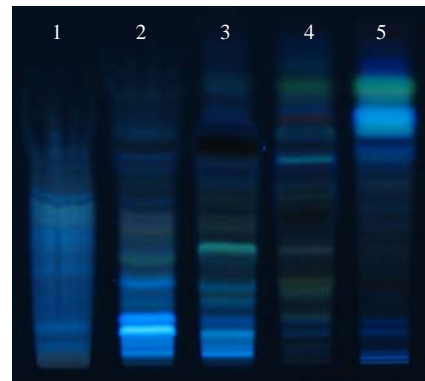
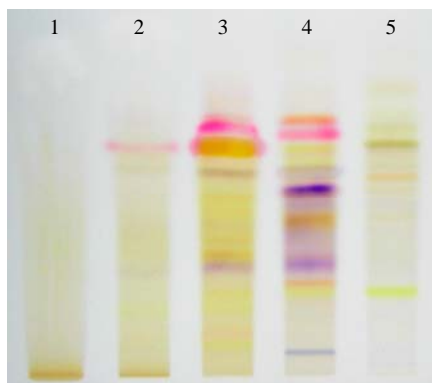
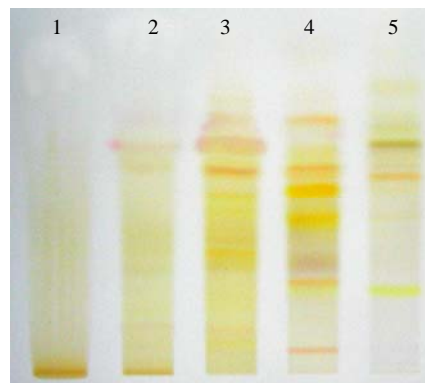
*Tilletiaria anomala*Abbildung 37a: Tageslichtaufnahme *T. anomala*Abbildung 37b: UV-Licht Aufnahme *T. anomala*

Abbildung 37c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 37d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Tageslicht	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,05	8	4	blau	-----	blau	orange	
0,08	14	3	orange	hellblau	orange	-----	
0,16	26	4,5	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,18	29	4	orange	orange	orange	orange	Pityriarubin A
0,22	35	2,3,4	violett	-----	violett	-----	
0,30	49	4	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,36	58	4	violett	-----	violett	orange	
0,39	61	5	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,40	63	3,4	orange	-----	orange/blau	orange	
0,44	70	3	gelb	-----	gelb	-----	
0,45	71	5	grüngelb	-----	grüngelb	grau	
0,47	75	3,4	rosa	-----	rosa	-----	
0,50	80	4	orange	rot	orange	orange	Pityriaanhydrid

Tabelle 24: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Tilletiaria anomala*

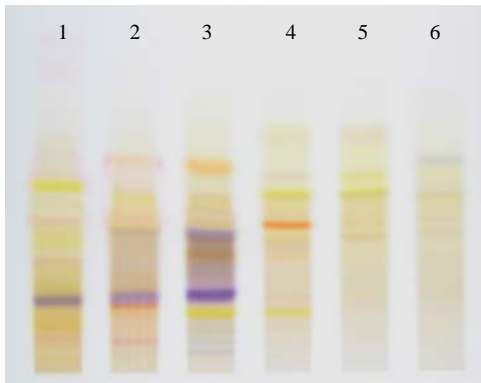
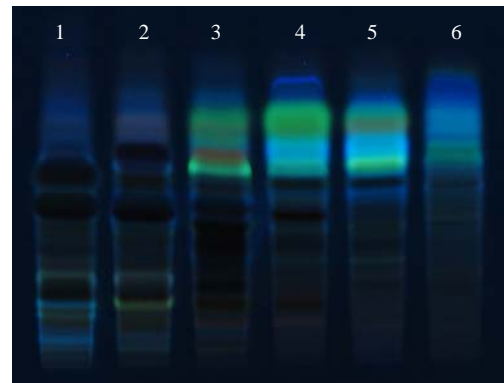
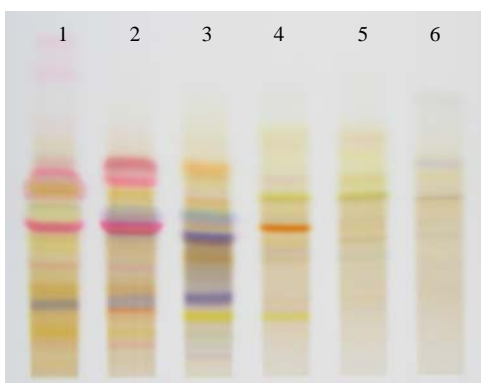
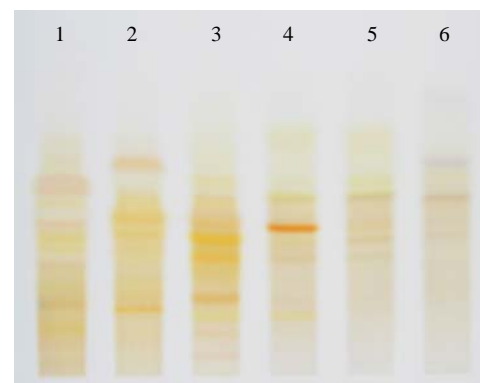
*Malassezia furfur*Abbildung 38a: Tageslichtaufnahme *M. furfur*Abbildung 38b: UV-Lichtaufnahme *M. furfur*

Abbildung 38c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 38d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV	HCl	NH <sub>3</sub>	Vermutung
0,05	7	3	blau	-----	blau	orange	
0,07	11	3	blau	-----	blau	orange	
0,07	11	1,2	rot	-----	rot	-----	
0,13	21	3,4	gelb	-----	gelb	gelb	Pityriacitrin
0,15	23	2	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin A
0,17	26	1,2,3	violett	-----	blau	orange	
0,25	38	1,2	rot	-----	rot	-----	
0,26	40	3	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin B
0,29	45	3	orange	-----	orange	orange	
0,30	48	3	violett	-----	violett	orange	
0,32	51	4	orange	-----	orange	orange	Pityriarubin C
0,32	52	1,2	rot	-----	rosa	-----	
0,34	55	2,3	rot	-----	blau	orange	
0,38	60	2,3	gelb	-----	orange	orange	
0,39	61	4,5	gelb	-----	gelb	gelb	
0,40	65	1	gelb	-----	orange	orange	
0,44	71	2	rosa	-----	rosa	orange	
0,44	71	3	orange	orange	orange	-----	Pityriaanhydrid

Tabelle 25: Detaillierte Bandenbeschreibung von *Malassezia furfur*



## *Sporisorium raphidii*

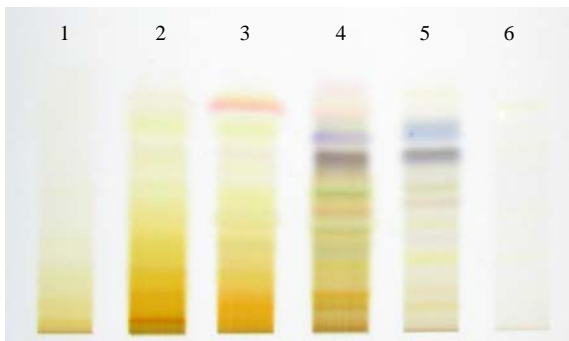
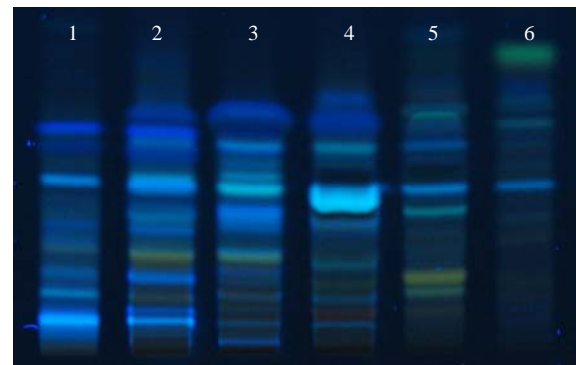
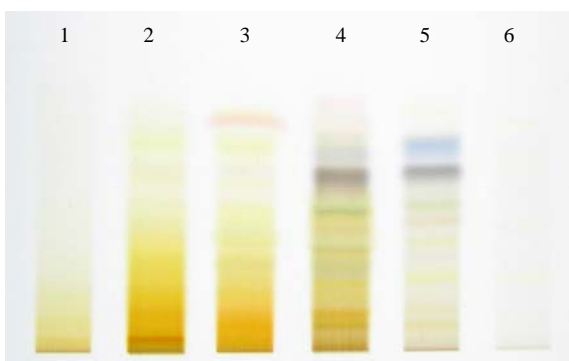
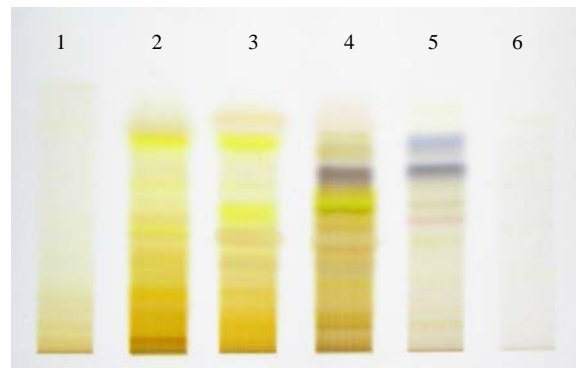
Abbildung 39a: Tageslichtaufnahme *S. raphidii*Abbildung 39b: UV-Licht Aufnahme *S. raphidii*

Abbildung 39c: Aufnahme nach Bedampfung mit HCl

Abbildung 39d: Aufnahme nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub>

Die Dünnschichtchromatogramme von *Sporisorium raphidii* unterscheiden sich stark von den anderen Brandpilzen. Unterschiedliche Banden können hier nur sehr schwer voneinander abgegrenzt werden. Die gelbe als Ptyriacitrin vermutete Bande in Fraktion fünf tritt hier nur sehr schwach auf. Auffällig ist der im UV-Licht zu sehende hohe Anteil fluoreszierender Banden.

Nach NH<sub>3</sub> Bedampfung kommen vier gelbe Banden in den LH-20 Fraktionen zwei, drei und vier deutlich zum Vorschein.

### 3.5 Analyse ausgewählter Banden

Durch vorangegangene Untersuchungen von *Malassezia furfur* sind bereits einige Banden und Verbindungen beschrieben und untersucht worden. Es wurde nun versucht, mehrere dieser Banden bei den hier untersuchten Brandpilzen nachzuweisen, um vorhandene Gemeinsamkeiten und Unterschiede festzustellen.

Außerdem sollte eine Methode entwickelt werden, mit der man Banden der untersuchten Brandpilze besser und einfacher miteinander vergleichen kann, da das Verfahren der Strukturanalyse sehr aufwendig ist.

#### 3.5.1 Pityriacitrin

Pityriacitrin ist ein Stoff der nach Auswertung der Chromatogramme vermutlich bei allen hier untersuchten Pilzspezies vorkommt. Sowohl bei *Ustilago maydis* als auch bei *Pseudozyma fusiformata* wurde die entsprechende Bande durch weiterführende Verfahren näher untersucht. Aufgrund der Laufhöhe und Farbe wurde bereits vermutet, dass es sich hier um Pityriacitrin handelt. Der Pilz musste zunächst in großen Mengen nachgezüchtet werden. Es wurde eine präparative Dünnschichtchromatographie durchgeführt, bei der nur eine Fraktion in großer Menge aufgetragen wurde. Bei beiden Pilzen wurde hierfür die Fraktion vier aufgetragen. Danach wurde die zu untersuchende Bande ausgekratzt und es erfolgte eine Aufreinigung der Bande mittels HPLC. Das HPLC Ergebnis zeigte den für Pityriacitrin typischen Elutionspeak bei 60,65 min.

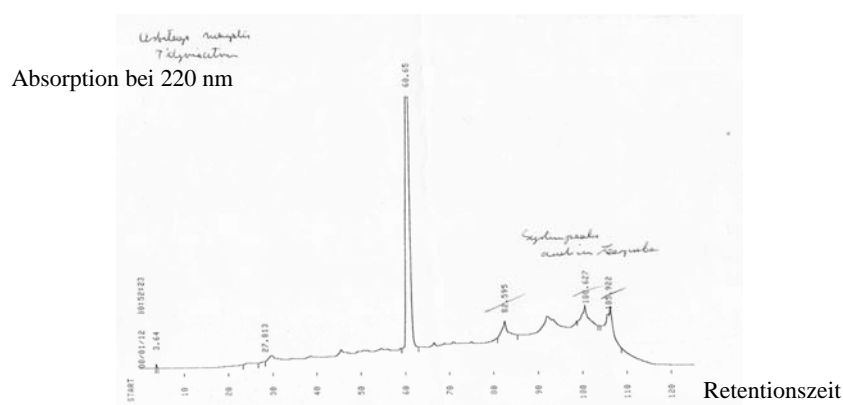


Abbildung 40: HPLC von Pityriacitrin ( von *Ustilago maydis* Fraktion 4)

Zur Strukturbestimmung und Bestätigung wurde die aufgereinigte Substanz zur weiteren Analytik zu Dr. Spittler nach München geschickt. Die Strukturbestimmung mittels NMR und Massenspektroskopie ergab, dass es sich bei der untersuchten

Substanz tatsächlich um das vermutete Pityriacitrin handelte. Es konnte somit zum ersten Mal eine Bildung von Pityriacitrin durch andere Brandpilze außer *Malassezia furfur* bewiesen werden.

Bei einem Vergleich der gelben, Pityriacitrin entsprechenden Banden aller hier untersuchten Brandpilze konnten sowohl Abweichungen in den Fraktionen als auch Unterschiede in der Laufhöhe festgestellt werden. Die Schwankungen in der Höhe der einzelnen Spezies sind auf z. T. nicht beeinflussbare unterschiedliche Bedingungen bei der Entwicklung der Kieselgelplatten zurückzuführen.

Je nach Pilzspezies nahmen die Banden in der absoluten Laufhöhe (mm) Werte zwischen 17 und 27 mm an. Der Rf-Wert unterlag einer Schwankung von 0,11 bis 0,17.

Die Pityriacitrin entsprechende Bande trat eher in den hinteren LH-20 Fraktionen auf, hauptsächlich in den LH-20 Fraktionen vier und fünf, selten in den Fraktionen drei und vier.

Ihre Farbe war stets gelb und im UV-Licht war keine Fluoreszenz zu erkennen. Nach Bedampfung mit HCl wirkte das Gelb noch deutlicher. Nach NH<sub>3</sub> Bedampfung kam es zu einer Abschwächung des Gelbtönen.

Da das Verfahren der HPLC und Strukturaufklärung sich in der Praxis als sehr aufwendig erwies, kam zum Nachweis des Pityriacitrins bei den verbliebenen Brandpilzen eine Cochromatographie zur Anwendung, welche einen indirekten Nachweis ermöglichte. Hierfür wurden die entsprechenden Fraktionen direkt nebeneinander auf einer Kieselgel-Platte aufgetragen und per Dünnschichtchromatographie untersucht. Dadurch ergab sich die Möglichkeit des direkten Vergleiches der Banden miteinander. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung.

## Pityriacitrin

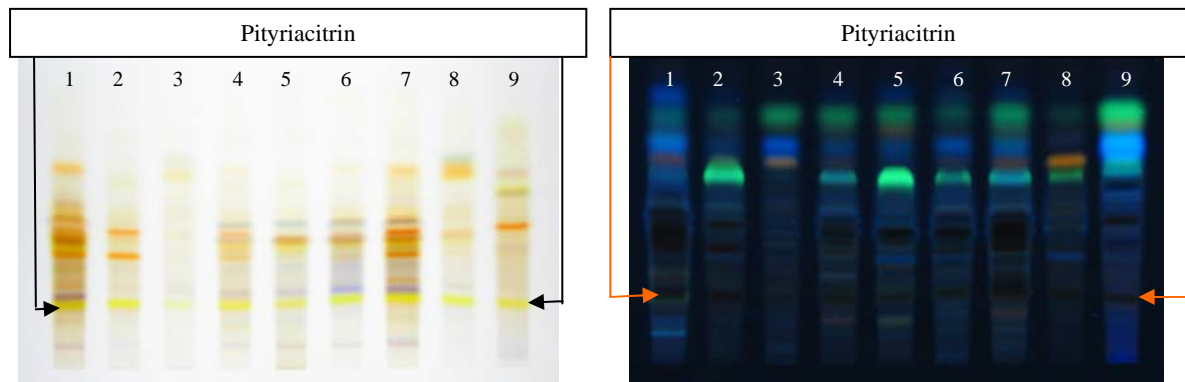


Abbildung 41a u. 41b: Tageslicht und UV-Lichtaufnahme von pityriacitrinhaltigen Fraktionen im Vergleich (Ustilago Spp.)

	Spezies	Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV
1	<i>Ustilago maydis</i>	0,14	23	4	gelb	-----
2	<i>Ustilago bullata</i> 146	0,14	23	5	gelb	-----
3	<i>Ustilago bullata</i> 558	0,14	23	6	gelb	-----
4	<i>U. rabenhorstiana</i>	0,14	23	4	gelb	-----
5	<i>Ustilago esculenta</i>	0,14	23	5	gelb	-----
6	<i>Ustilago vetiveriae</i>	0,15	25	4	gelb	-----
7	<i>Ustilago cynodontis</i>	0,15	25	5	gelb	-----
8	<i>Ustilago hypodites</i>	0,15	25	5	gelb	-----
9	<i>Ustilago striiformis</i>	0,14	24	5	gelb	-----

Tabelle 26: Übersicht der in Abb. 41a u. 41b dargestellten Spezies

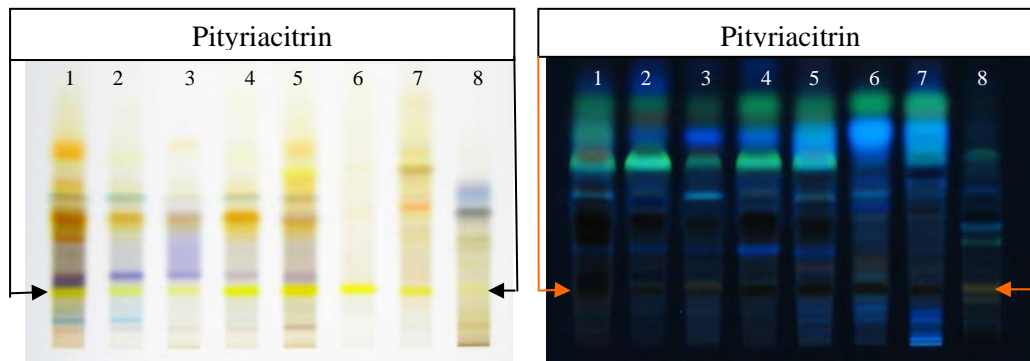


Abbildung 42a u. 42b: Tageslicht und UV-Licht Aufnahme von pityriacitrinhaltigen Fraktionen (Non Ustilago spp.)

	Spezies	Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV
1	<i>Malassezia furfur</i>	0,12	20	3	gelb	-----
2	<i>Pseudozyma fusiformata</i>	0,12	20	4	gelb	-----
3	<i>Sporisorium reilianum</i>	0,13	20	4	gelb	-----
4	<i>Sporisorium scitamineum</i>	0,12	20	6	gelb	-----
5	<i>Exobasidium japonicum</i>	0,12	20	6	gelb	-----
6	<i>Exobasidium vaccinii</i>	0,12	20	5	gelb	-----
7	<i>Tilletiaria anomala</i>	0,12	20	5	gelb	-----
8	<i>Sporisorium raphidii</i>	0,12	20	5	gelb	orange

Tabelle 27: Übersicht der in Abb. 42a u 42b dargestellten Spezies

Die zuvor aufgetretenen Schwankungen in der Laufhöhe von Pityriacitrin konnten eindrucksvoll minimiert werden. Anhand der Cochromatographie konnte gezeigt werden, dass es sich hier mit großer Sicherheit bei allen untersuchten Spezies um die gleiche Bande handelte.

Lediglich *Sporisorium raphidii*, der aufgrund seines Pigmentmusters unter den hier untersuchten Pilzen eine Sonderrolle einnahm, wich auf den ersten Blick ein wenig von den anderen Spezies ab. Die gelbe Bande war hier nur relativ schwach ausgeprägt und wurde im UV-Licht sehr wahrscheinlich von einer Fluoreszenz überlagert.

Das Pityriacitrin scheint somit ein Stoff zu sein, der immer dann auftritt, wenn Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolite gebildet werden. Im Gegensatz zu anderen Banden schwankt es nur wenig in seiner farblichen Intensität.

### 3.5.2 Pityriarubin

In vorangegangenen Untersuchungen der Hefe *Malassezia furfur* wurden bereits die Pityriarubine A, B und C beschrieben (vgl. Einleitung 1.3.2). Die entsprechenden Banden konnten auch bei den meisten hier untersuchten Brandpilzen durch gleiche Höhe bei der Cochromatographie gefunden werden. Jedoch wurden starke Unterschiede in ihrer farblichen Intensität beobachtet.

Ebenso wie Pityriacitrin wurden die Pityriarubin A, B und C entsprechenden Banden bei der Spezies *Ustilago maydis* durch weiterführende Verfahren näher untersucht. Nach präparativer Dünnschichtchromatographie wurde die Bande ausgekratzt und mittels HPLC aufgereinigt. Anschließend wurde in München die Strukturaufklärung durchgeführt. Das Auftreten von Pityriarubin B und C konnte bei dieser Untersuchung bewiesen werden. Das Pityriarubin A war aufgrund einer zu geringen Stoffmenge außerhalb des Nachweisbereiches.

Die Pityriarubine haben die folgenden optischen Eigenschaften: Ihre Farbe bei Tageslicht ist orange. Im UV-Licht erscheinen sie leicht orange oder farblos. Unter Bedampfung mit HCl wird das orange kräftiger und unter Bedampfung mit NH<sub>3</sub> bläst die Intensität ein wenig ab. Die Pityriarubine A, B und C unterscheiden sich in ihrer Laufhöhe.

Die **Pityriarubin A** entsprechende Bande trat bei 16 untersuchten Brandpilzen auf. In der Höhe nahm sie Werte von 18 bis 32 mm an. Die R<sub>f</sub>-Werte schwankten von 0,11 bis 0,19. Sie kam hauptsächlich in den LH-20 Fraktionen drei und vier vor. Im Vergleich zu Pityriacitrin erschien sie in der Regel eine Fraktion zuvor.

Um den optischen Nachweis von Pityriarubin A zu erbringen, wurden die entsprechenden LH-20 Fraktionen wie bereits bei Pityriacitrin nebeneinander aufgetragen. Zusätzlich lief neben den Banden zur Kontrolle noch ein Standard des entsprechenden Stoffes (Abbildung 43a u. 43b). Der optische Nachweis von Pityriarubin A wurde für die in Tabelle 28 dargestellten Spezies erbracht. Auch hier wurden die Laufhöhenunterschiede eindrucksvoll minimiert.

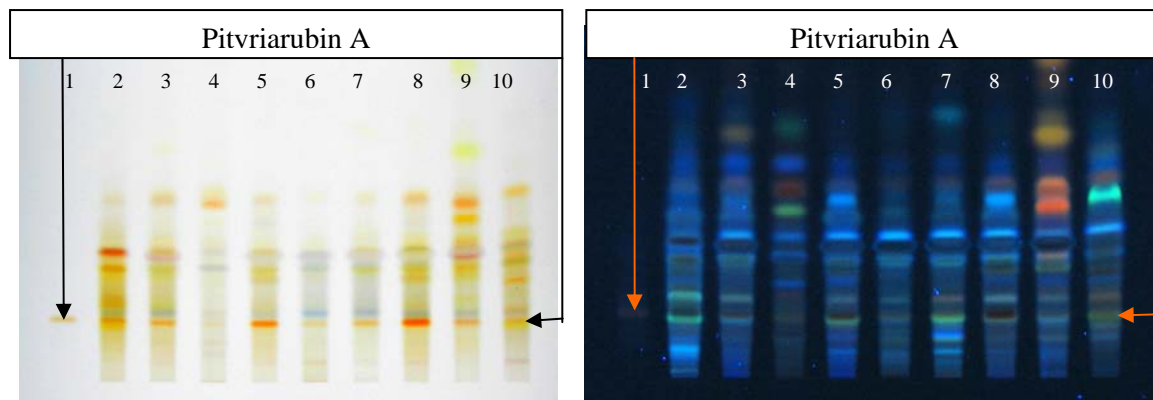


Abbildung 43a u. 43b: Tageslicht und UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin A haltigen Fraktionen im Vergleich

	Spezies	Rf-Wert	Höhe (mm)	LH-20 Fraktion	Farbe	UV
1	Standard Pityriarubin A	0,14	23	-----	orange	orange
2	<i>Ustilago maydis</i>	0,14	23	3	orange	orange
3	<i>Ustilago bullata 146</i>	0,14	22	3	orange	orange
4	<i>Ustilago bullata 558</i>	0,14	22	5	orange	orange
5	<i>Ustilago rabenhorstiana</i>	0,14	22	3	orange	orange
6	<i>Ustilago esculenta</i>	0,14	22	4	orange	orange
7	<i>Ustilago vetiveriae</i>	0,14	22	4	orange	orange
8	<i>Ustilago cynodontis</i>	0,14	22	4	orange	orange
9	<i>Ustilago hypodites</i>	0,14	22	3	orange	orange
10	<i>Ustilago striiformis</i>	0,14	22	4	orange	orange

Tabelle 28: Übersicht der in Abb. 43a u 43b dargestellten Spezies

Die **Pityriarubin B** entsprechende Bande konnte bei 15 Spezies beobachtet werden. In der Höhe nahm sie Werte zwischen 38 und 49 mm ein. Die Rf-Werte schwankten zwischen 0,24 und 0,31. Sie kam hauptsächlich in den LH-20 Fraktionen vier und fünf vor.

Auch hier wurden die entsprechenden Fraktionen nebeneinander aufgetragen und direkt miteinander verglichen (Abbildung 44a, 44b, 45a, 45b).

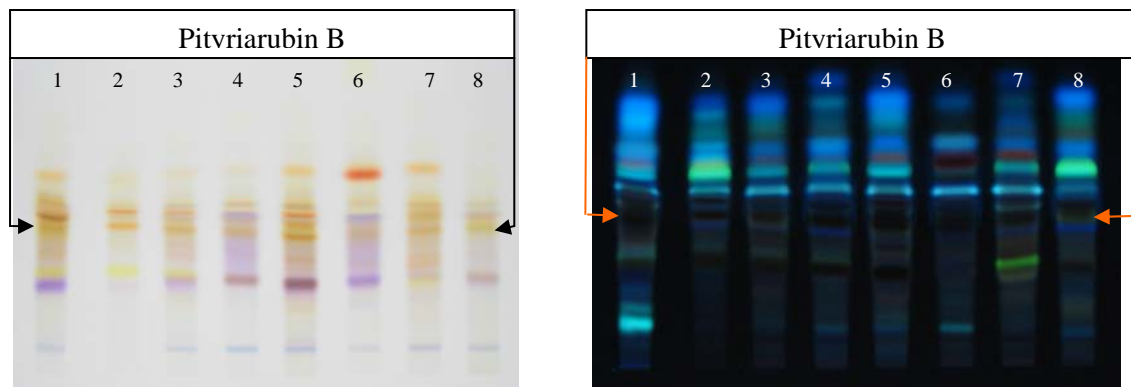


Abbildung 44a u. 44b: Tages und UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin B haltigen Fraktionen in einem Vergleich (*Ustilago* Spp.)

In Abbildung 44a und 44b wurden die folgenden Spezies nebeneinander aufgetragen:

1. *U. maydis*, 2. *U. bullata* 146, 3. *U. rabenhorstiana*, 4. *U. vetiveriae*, 5. *U. cynodontis*, 6. *U. hypodites*, 7. *U. striiformis*, 8. *U. esculenta*.

Die Laufhöhen der Banden waren hierbei leichten Schwankungen unterworfen.

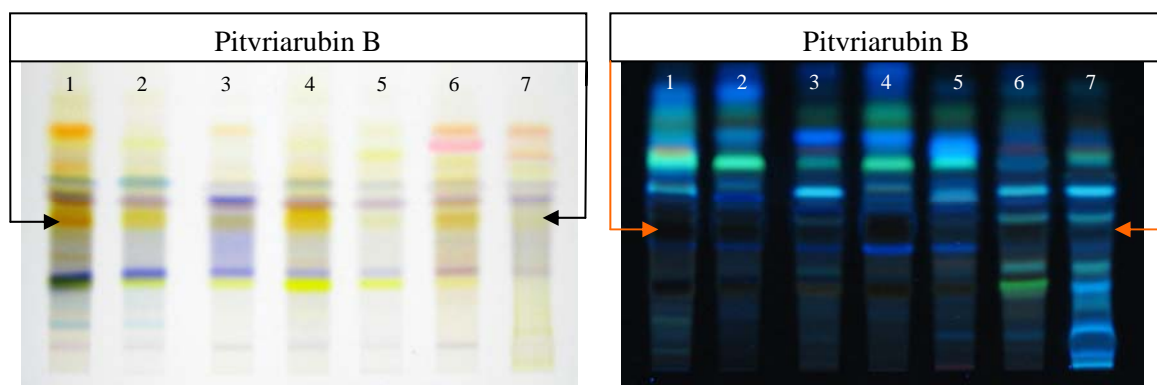


Abbildung 45a u. 45b: Tages und UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin B haltigen Fraktionen in einem Vergleich (Non *Ustilago* Spezies)

Abbildung 45a und 45b zeigt die folgenden Spezies in einem Vergleich: 1. *M. furfur*, 2. *P. fusiformata*, 3. *S. reilianum*, 4. *S. scitamineum*, 5. *E. japonicum*, 6. *T. anomala*, 7. *E. vaccinii*.

Bei *Exobasidium japonicum* und *Exobasidium vaccinii* ist die Pityriarubin B Bande nur sehr schwach ausgeprägt.

Die **Pityriarubin C** entsprechende Bande konnte bei 14 der hier untersuchten Spezies beobachtet werden und trat in den LH-20 Fraktionen vier bis sechs auf. Sie nahm in der Höhe Werte zwischen 50 und 61 mm an. Die Rf-Werte schwankten zwischen 0,31- 0,39. Bezüglich der farblichen Intensität der entsprechenden Bande, konnten abhängig von der Spezies starke Unterschiede festgestellt werden. Bei



einigen Pilzen war die Bande sehr stark ausgeprägt, bei anderen war sie nur im Ansatz zu erkennen. Es wurden die folgenden Spezies direkt nebeneinander aufgetragen:

Abbildung 46a und 46b: 1.Pityriarubin C Standard, 2.*U. cynodontis*,3.*U. striiformis*,4.*U. bullata* 146, 5.*U. vetiveriae*, 6.*U. hypodites*, 7.*U. maydis*, 8.*U. esculenta*.

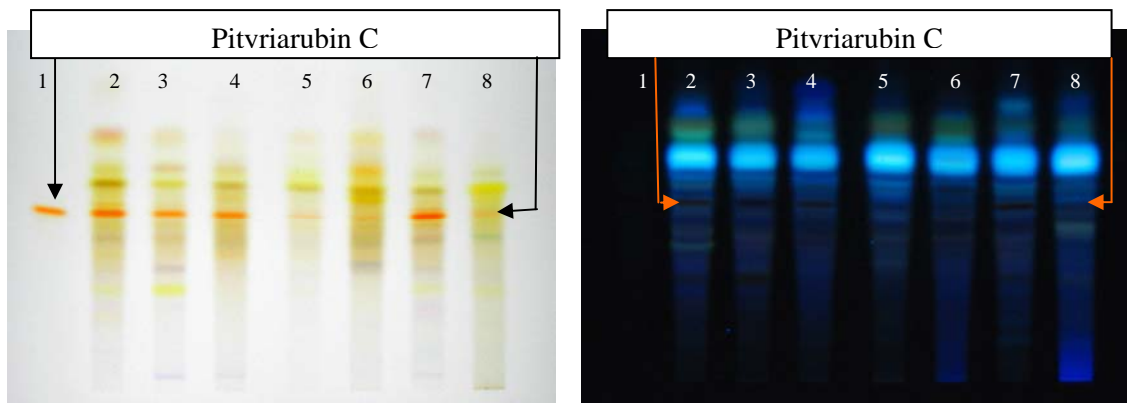


Abbildung 46a u. 46b: Tages und UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin C haltigen Fraktionen in einem Vergleich ( Ustilago Spezies)

Abbildung 47a und 47b: 1.Pityriarubin C Standard, 2.*M. furfur*, 3.*P. fusiformata*, 4.*S. reilianum*,5.*T. anomala*,6.*S. scitamineum*,7.*U. rabenhorstiana*,8.*E. vaccinii*.

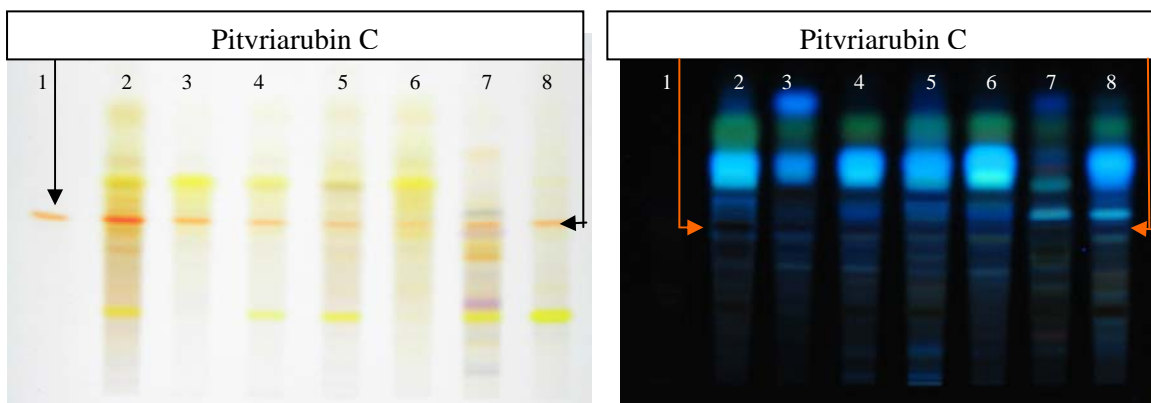


Abbildung 47a u. 47b: Tages und UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin C haltigen Fraktionen unterschiedlicher Spezies in einem Vergleich

### 3.5.3 Pityriaanhydrid

Das Pityriaanhydrid ist ein weiterer Stoff, der auch bereits bei *Malassezia furfur* beschrieben wurde. Seine Farbe bei Tageslicht ist orange. Unter UV-Licht nimmt es eine orange bis rötliche Farbe an. Nach Bedampfung mit HCl wirkt das Orange kräftiger. Nach Bedampfung mit NH<sub>3</sub> ist es optisch nur noch schwach zu erkennen bzw. verschwindet vollkommen. Die Pityriaanhydrid entsprechende Bande konnte bei 16 Pilzen beobachtet werden.

In der Höhe nahm sie Werte zwischen 67 mm und 82 mm an. Der Rf-Wert schwankte zwischen 0,42-0,52. Sie trat hauptsächlich in den LH-20 Fraktionen vier und fünf auf. Die entsprechende Bande der Spezies *Ustilago maydis* wurde zur Strukturaufklärung nach München eingeschickt. Der Nachweis von Pityriaanhydrid (vgl. Abbildung 19) konnte dabei bestätigt werden. Da es sich bei Pityriaanhydrid wahrscheinlich nur um ein Zwischenprodukt handelt und die Bande aufgrund ihrer Laufhöhe und Farbe gut abgrenzbar ist, ist in diesem Falle auf eine Cochromatographie verzichtet worden.

### 3.5.4 Strukturbestimmung weiterer Stoffe

Eine weitere Bande, die bei vielen Pilzen auftrat, imponierte durch ihre violette, manchmal auch blaue Farbe. Diese Bande konnte bei 15 Spezies beobachtet werden, jedoch schwankte sie ähnlich dem Pityriarubin C stark in ihrer farblichen Intensität. Meistens trat sie in mehreren Fraktionen gleichzeitig auf. Die Bande beginnt tief als unteres Violett und läuft nach oben, wo sie als oberes Violett endet. Als sehr markant erschien diese Bande bei *Pseudozyma fusiformata* (siehe Abbildung 48). Sie trat auf in den Fraktionen 1,2,3 und 4 begann bei einem Rf-Wert von 0,15 und endete bei einem Rf-Wert von 0.31.

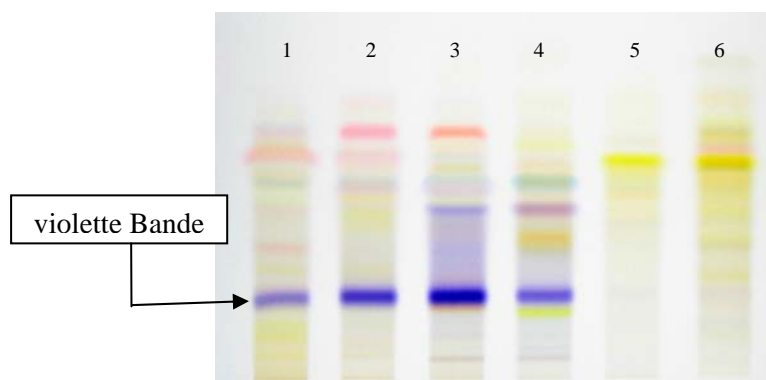


Abbildung 48: Darstellung der markanten violetten Bande

Diese Bande wurde ebenfalls zur Strukturanalyse nach München eingeschickt. Da es sich hier um eine sehr breit laufende Bande handelte, enthielt sie viele Verbindungen, die in geringen Konzentrationen vorkamen. Die Aufreinigung mittels HPLC gestaltete sich hier als recht problematisch. Folgende Verbindungen konnten durch die Strukturanalyse in München bestimmt werden: Malasseziaindol A, Indol-3-carbaldehyd und Indolmilchsäure. Der eigentliche blau-violette Farbstoff konnte bisher nicht aufgeklärt werden, da sich im NMR nur sehr breite Signale darstellten.

### 3.5.5 Versuch einer Datenanalyse

Die in 3.4.2 beschriebenen Dünnschichtchromatogramme der einzelnen Pilzspezies bieten eine Fülle von unübersichtlichen Daten und Informationen. Deshalb wurde der Versuch einer Datenanalyse unternommen, um die gewonnenen Informationen vergleichbar zu machen. Ziel war es, eine Datenbank anzulegen, in der Informationen über Bandenzusammensetzung aller untersuchten Pilzspezies gespeichert sind und miteinander verglichen werden können. Auf diese Weise könnten z.B. gemeinsame Banden und darüber hinaus Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Bandenmustern der Spezies gefunden und objektiviert werden. Voraussetzung dafür ist eine präzise Vorhersagbarkeit über den Ort, an dem eine Bande auftritt, wenn sie denn bei einem Pilz vorkommt. Dadurch könnten gleiche Banden auch als solche erkannt und gleichzeitig unterschiedliche Banden voneinander abgegrenzt werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen sollten die Grundlage für eine möglichst objektive Vergleichbarkeit der Pilzspezies miteinander schaffen.

Es wurde zunächst versucht, ein Raster zu erstellen, um die einzelnen Banden darin einzuordnen. Dieses Raster bestand aus gleichgroßen, tabellenartig angeordneten Kästchen mit einer klar definierten Kästchenhöhe. Anschließend wurde das Raster als Schablone auf die Dünnschichtchromatogramme gelegt und jedem Kästchen eine Zahl für Spalte (LH-20 Fraktion) und eine Zahl für Zeile, in der es vorkam zugeordnet. Die darin befindliche Bandenfarbe wurde ebenfalls durch eine ihr zugeordnete Zahl beschrieben. Somit konnten jedem Kästchen insgesamt drei Zahlen zugeordnet werden. Idealerweise müssten daher gleiche Banden durch drei gleiche Zahlen beschrieben werden. In der Praxis war diese Rasteranalyse jedoch mit Problemen verbunden. Die einzelnen Banden waren zu starken Schwankungen ausgesetzt.

Es war bereits bekannt, dass gleiche Banden in unterschiedlichen Fraktionen auftreten können, weshalb ihnen zum Teil auch unterschiedliche Zahlen in Bezug auf die Spalte (LH-20 Fraktion) zugeordnet wurden. Daher sollten bei gleichen Banden zumindest die Zahlen für Zeile und Farbe übereinstimmen.

Das größere Problem bestand jedoch darin, dass es neben Abweichungen in den Fraktionen auch zu Schwankungen in der Laufhöhe einzelner Banden kam. Dadurch wurden gleichen Banden zum Teil auch unterschiedliche Zahlen für die Zeile, in der sie vorkamen, zugeordnet.

Somit wurden gleiche Banden teilweise durch zwei unterschiedliche Zahlen beschrieben, so dass lediglich die Zahl für die Farbe übereinstimmte.

Um das Problem der Laufhöenschwankungen in den Griff zu bekommen, wurde versucht, die Kästchenhöhe der Raster zu verändern. Hierfür wurden Kästchen mit einer Höhe von 3 mm bis 10 mm verwendet. Jedoch musste zum Ausgleich der Laufhöenschwankungen einzelner Banden, die Kästchenhöhe so groß gewählt werden, dass in jedem Kästchen auch gleichzeitig mehrere Farben auftraten und diesem somit mehrere Zahlen für die Farbe zugeordnet wurden. Dadurch ist es nicht gelungen, alle gleichen Banden durch mindestens zwei von drei gleichen Zahlen zu beschreiben.

Durch die vorhandenen Laufhöenschwankungen der Banden auf den DC-Platten stellte sich dieses Verfahren zur Datenanalyse leider als ungeeignet heraus.

Aus diesem Grunde wurde zur Datenanalyse ein weiteres Verfahren erprobt. Zunächst war es notwendig, das Schwankungsausmaß einzelner Banden in der Höhe zu analysieren und eventuell zu reduzieren, um dadurch eine bessere Vorhersagbarkeit über das Auftreten dieser Banden treffen zu können. So kann eine Aussage darüber gemacht werden, wo eine bestimmte Bande auftreten muss, wenn diese bei einem Pilz vorkommt. Gleichzeitig bietet dieses Verfahren auch die Möglichkeit, Banden von einander abzugrenzen.

Es wurde zunächst das Schwankungsausmaß einzelner Banden in der Höhe statistisch erfasst. Dabei wurden von sieben unterschiedlichen Banden aller untersuchten Spezies sowohl die Rf-Werte als auch die absoluten Höhen (mm) addiert und anschließend für jede Bande Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Um das Schwankungsausmaß zu senken und damit verbunden die Genauigkeit einer Vorhersagbarkeit zu erhöhen, wurde als ein zusätzlicher Parameter die relative Höhe bestimmt. Bei der relativen Höhe wurden die Laufhöhen zweier Banden auf einer DC-Platte in Verhältnis zueinander gestellt. Es lag hier die Beobachtung zu Grunde, dass bei einer hohen Laufhöhe einer bestimmten Bande auf einer DC-Platte andere Banden ebenso eine entsprechend hohe Laufhöhe einnehmen. Das bedeutet, wenn z.B. die gelbe Pityriacitrin Bande in der Laufhöhe einen relativ hohen Wert einnimmt, die Laufhöhe von z.B. Pityriarubin auch entsprechend hoch ist.

Als Bezugspunkt für die relative Höhe wurde die gelbe Pityriacitrin-Bande verwendet, da sie bei allen Pilzen vorkam und bereits gut bekannt war. Somit wurde die relative Höhe wie folgt bestimmt: Höhe einer Bande ( z.B. Pityriarubin A ) / Pityriacitrin. Analog zu den absoluten Höhen wurden auch die relativen Höhen der untersuchten Banden addiert und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Dieser neue Parameter sollte das Schwankungsausmaß einzelner Banden reduzieren.

Für die Datenanalyse wurden zuerst die den Pityriarubinen A, B, C und Pityriaanhydrid entsprechenden Banden aller untersuchten Pilze verwendet. Die absoluten Höhen, Rf-Werte sowie relativen Höhen der entsprechenden Banden wurden addiert und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in Tabelle 29 zusammenfassend dargestellt. Eine ausführliche Darstellung ist dem Anhang zu entnehmen.

Banden	Pityriacitrin n = 16	PityriarubinA n = 16	PityriarubinB n = 15	PityriarubinC n = 14	Pityriaanhydrid n = 16
$\bar{X}$ absolut	21,75	23,5	43	55,29	73,06
S	2,98	3,86	4,04	4,08	4,25
$\bar{X}$ relativ 1	-----	1,08	2	2,53	3,40
S	-----	0,04	0,13	0,21	0,36
$\bar{X}$ RF	0,14	0,15	0,27	0,35	0,46
S	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03
$\bar{X}$ relativ 2	-----	1,08	2,01	2,53	3,42
S	-----	0,05	0,15	0,18	0,38

Tabelle 29: Datenanalyse bekannter Banden

$\bar{X}$  absolut: Mittelwert der absoluten Höhen (mm)

$\bar{X}$  relativ: Mittelwert der relativen Höhen bezogen auf mm (1) oder Rf-Wert (2)

$\bar{X}$  RF: Mittelwert der Rf-Werte

S: Standardabweichung

n: Stichprobenumfang

Aus dieser Tabelle heraus können folgende Aussagen getroffen werden:

Vergleicht man die absolute Höhe in mm gegenüber dem Rf-Wert, so gibt es in Bezug auf das Schwankungsausmaß nur minimale Unterschiede. Besonders deutlich wird dieses bei der Betrachtung der dazugehörigen relativen Höhen. Sowohl Mittelwert als auch Standardabweichung sind nahezu identisch. Wie erwartet können zur Beschreibung der Höhe beide Angaben gleichwertig genutzt werden.

Wird die Angabe in mm gewählt, so ist darauf zu achten, dass die Laufhöhen des Laufmittels bei allen DC-Platten gleich sind. Bei den für diese Arbeit verwendeten DC-Platten wurde die Laufhöhe des Laufmittels auf 17,5 cm normiert. Außerdem sollte die Größe der zur Höhenmessung verwendeten Bilder der Normalgröße der DC-Platten entsprechen.

Der Rf-Wert hingegen kann auch dann verwendet werden, wenn die Höhe des Laufmittels nicht auf einen bestimmten Wert normiert ist. Er ergibt sich aus dem Verhältnis der Laufhöhe einer bestimmten Bande zur mobilen Phase und nimmt immer Werte zwischen 0 und 1 an. Jedoch sind für die Errechnung der Rf-Werte mehrere Längenangaben erforderlich, was mit einem größeren Messaufwand und einer evtl. Ungenauigkeit verbunden ist. Da bei dieser Arbeit die Laufhöhen der DC-Platten auf 17,5 cm normiert waren, sind die relativen Höhen in Bezug auf die für ihre Berechnung verwendeten Höhenangaben in mm oder als Rf-Wert nahezu identisch.

Die Standardabweichungen der absoluten Höhe und der Rf-Werte sind relativ konstant. Mit Anstieg der durchschnittlichen Laufhöhe einer Bande ist lediglich eine leichte Zunahme der Standardabweichung zu erkennen.

Anders verhält es sich mit den Standardabweichungen der relativen Höhen. Mit Zunahme der Entfernung einer Bande von dem Bezugspunkt Pityriacitrin vergrößert sich auch die dazu gehörende Standardabweichung. Je weiter eine Bande von Pityriacitrin entfernt ist, umso größer ist die Schwankung um den dazugehörigen Mittelwert. Die Vorhersagbarkeit einer Bande ist somit genauer, wenn diese sich in der Nähe des Pityriacitrins befindet.

Durch den Mittelwert der Höhen einer Bande und der dazugehörigen Standardabweichung kann ein Schwankungsrahmen für die entsprechende Bande ermittelt werden. Es kann mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit angegeben werden, wo eine Bande anzutreffen ist, wenn sie bei der untersuchten Pilzspezies vorkommt. Der Parameter der relativen Höhe kann den Grad an Präzision für die

Vorhersagbarkeit einer Bande erhöhen. Dieses gilt vor allem für Pityriacitrin-nahe Banden. Liegt der Rf-Wert einer Bande oder dessen absolute Höhe außerhalb eines empirisch festgesetzten Schwankungsrahmens, so kann dennoch durch Angabe der relativen Höhe eine bestimmte Bande als solche identifiziert werden.

Die gleiche Untersuchung wurde für vier weitere, zum Teil noch wenig bekannte Banden durchgeführt. Da die Angabe der Laufhöhe als absolute Laufhöhe (mm) und der Rf-Wert gleichwertig genutzt werden konnten, wurde für die weitere Berechnung nur noch die absolute Laufhöhe (mm) verwendet. Der Rf-Wert fand dabei keine Berücksichtigung mehr. Es wurden vier Banden mit unterschiedlicher Laufhöhe ausgesucht, die bei fast allen Pilzen vorkamen. Hierbei handelte es sich um die Banden: hohes und tiefes Violett, hohes Gelb und tiefes Blau (siehe Abbildung 49). Das tiefe Blau ist eine Bande die sich unterhalb des Pityriacitrins befindet. Die entsprechenden Laufhöhen wurden addiert, um anschließend Mittelwert und Standardabweichung zu berechnen. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt Tabelle 30.

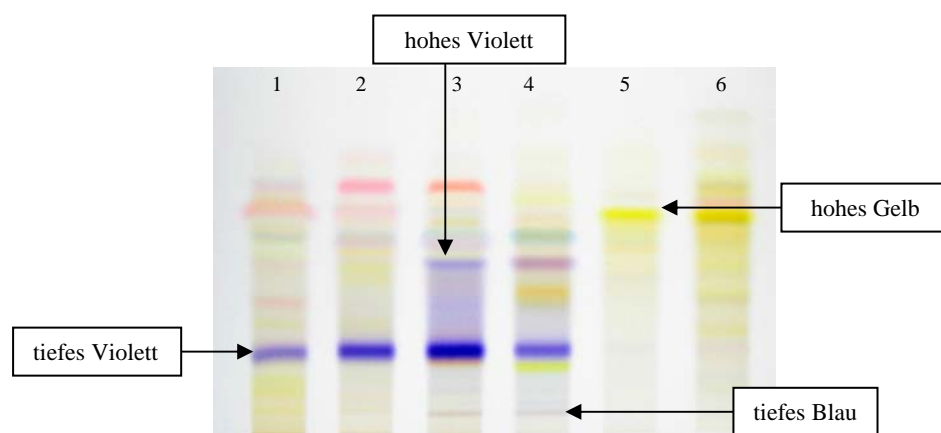


Abbildung 49: Für die Datenanalyse verwendete Banden (*Pseudozyma fusiformata* Fraktionen 1-6)

Banden	Violett tief n = 15	Violett hoch n = 15	Gelb hoch n=15	Blau tief n=15
$\bar{X}$ absolut	27,73	51,2	65,6	6,93
S	4,08	4,52	4,17	0,70
$\bar{X}$ relativ	1,27	2,36	3,02	0,32
S	0,09	0,17	0,29	0,03

Tabelle 30: Datenanalyse unbekannter Banden

$\bar{X}$  absolut: Mittelwert der absoluten Höhen (mm)

$\bar{X}$  relativ: Mittelwert der relativen Höhen bezogen auf mm

S: Standardabweichung

n: Stichprobenumfang

Das Ergebnis dieser statistischen Auswertung ähnelt stark dem Ergebnis der vorherigen. Auch hier ist die Standardabweichung von dem Mittelwert der absoluten Höhen relativ konstant. Die Standardabweichung der tiefen blauen Bande ist wesentlich kleiner, was sich mit der sehr niedrigen Laufhöhe dieser Bande erklären lässt.

Die Standardabweichung von dem Mittelwert der errechneten relativen Höhen steigt mit zunehmender Entfernung der entsprechenden Banden von Pityriacitrin an.

Aus beiden Untersuchungen können Regelmäßigkeiten in Bezug auf das Schwankungsausmaß der Laufhöhen von Banden beschrieben werden.

Banden oberhalb von Pityriacitrin haben eine ähnliche Standardabweichung, die ungefähr bei vier liegt. Die mm-Laufhöhen Schwankungen der Banden sind somit ziemlich konstant. Dieses ist auch bei anderen nicht näher untersuchten Banden zu erwarten.

Der neu eingeführte Parameter der relativen Höhe ist genauer, wenn die untersuchte Bande sich in der Nähe des Pityriacitrins befindet. Hier wird auch das Ausmaß der Schwankungen gegenüber der absoluten Höhe reduziert. Mit Zunahme der Entfernung einer Bande von Pityriacitrin nimmt auch das Schwankungsausmaß zu.

Befindet sich eine untersuchte Bande außerhalb des festgesetzten Schwankungsbereichs, so kann sie durch die Angabe der relativen Höhe beschrieben und eine evtl. Zuordnung getroffen werden.

Durch die beschriebenen Parameter kann eine relative Vorhersagbarkeit bezüglich der untersuchten Banden getroffen werden. Für die Laufhöhen der untersuchten Banden kann ein Rahmen gesetzt werden, in dem die Banden mit einer hohen Wahrscheinlichkeit anzutreffen sind, wenn diese bei der untersuchten Pilzspezies vorkommen.

Die durchgeführten Untersuchungen und deren Ergebnisse sollten nun anhand anderer Pilzspezies überprüft werden. Hierfür wurden Ergebnisse von vier Pilzen, die nicht Gegenstand dieser Dissertation waren, entliehen und das Pigmentprofil untersucht. Es wurde sowohl die Fraktion, als auch die absolute und relative Höhe der zu untersuchenden Banden bestimmt und mit den vorherigen Ergebnissen



verglichen. Durch die zuvor ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen (vgl. Tabelle 29) wurde ein Schwankungsrahmen gesetzt in dem das Auftreten entsprechender Banden erwartet wurde. Es wurden dabei die Banden: Pityriacitrin, Pityriarubin A, B, C und Pityriaanhydrid näher untersucht.

Die nachfolgende Tabelle zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung:

<b>Spezies</b> <b>Banden</b>		<b><i>Aureobasidium</i></b> <b><i>Spezies</i></b>	<b><i>Candida</i></b> <b><i>lambica</i></b>	<b><i>Candida</i></b> <b><i>blankii</i></b>	<b><i>Exophiala</i></b> <b><i>sarcinomuriformis</i></b>
<b>Pityriacitrin</b>	Fraktion	4	4	4	4
	Höhe absolut	24	27	22	26
<b>Pityriarubin A</b>	Fraktion	3	3	3	3
	Höhe absolut	27	28	23	27
	Höhe relativ	1,13	1,04	1,05	1,03
<b>Pityriarubin B</b>	Fraktion	4	3	5	4
	Höhe absolut	42	49	47	52
	Höhe relativ	1,75	2,04	2,14	2
<b>Pityriarubin C</b>	Fraktion	5	4,5	5	4
	Höhe absolut	54	58	60	67
	Höhe relativ	2,25	2,42	2,72	2,58
<b>Pityriaanhydrid</b>	Fraktion	3	3	5	-----
	Höhe absolut	70	74	81	-----
	Höhe relativ	2,92	3,08	3,68	-----

Tabelle 31: Untersuchung von Banden anderer Pilzspezies

Bezüglich des Auftretens der untersuchten Banden in den entsprechenden Fraktionen gab es keine Unterschiede zu den vorher untersuchten Spezies. Alle Banden erschienen gehäuft in den vermuteten Fraktionen (vgl. 3.5).

Die absoluten Höhen der untersuchten Banden befanden sich fast alle in dem durch Mittelwert  $\bar{X}$  und Standardabweichung  $s$  bzw.  $2s$  festgelegten Schwankungsrahmen. Lediglich *Exophiala* zeigte bei Pityriarubin B und C eine Abweichung in der Laufhöhe nach oben.

Die errechneten relativen Höhen befanden sich bei allen untersuchten Banden im vorgegebenen Schwankungsbereich. *Exophiala* zeigte in der relativen Höhe von Pityriarubin B und C keine Abweichung mehr nach oben und befand sich sogar stark in der Nähe der vorgegebenen Mittelwerte. Somit muss es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die entsprechenden Banden handeln.

Die hier untersuchten Banden befanden sich alle in dem erwarteten Bereich und konnten als solche identifiziert werden. Durch die Bestimmung eines Schwankungsrahmens kann eine gute Vorhersagbarkeit über das Auftreten einer Bande getroffen werden.

Sowohl der Parameter der absoluten als auch der Parameter der relativen Höhe können dafür herangezogen werden. Da der Parameter der relativen Höhe ein Verhältnis zweier Banden zueinander ausdrückt, ist er auch dann aussagekräftig, wenn die absolute Laufhöhe den Schwankungsrahmen überschreitet. Ebenso kann durch Angabe der relativen Höhe das Schwankungsausmaß gesenkt werden. Dieses gilt besonders dann, wenn sich die Bande in der Nähe des Pityriacitrins befindet.

Die hier durchgeführten Untersuchungen können eine Grundlage bilden, um gewonnene Daten in Zukunft in einer Datenbank festzuhalten, auszuwerten und objektiv miteinander zu vergleichen.

### **3.6 Einteilung der Pilze in Gruppen**

Anhand der Bandenmuster der untersuchten Pilzspezies können diese grob in vier Gruppen eingeteilt werden. Die meisten Banden treten recht häufig auf, sind jedoch in ihrer Intensität unterschiedlich stark ausgeprägt. Entscheidend für die hier vorgeschlagene Einteilung ist die optische Dominanz bestimmter Banden.

**Gruppe 1:**

Die Gruppe 1 zeichnet sich durch eine Dominanz der violetten Bande aus. Dieses Violett tritt in mehreren Fraktionen auf. Es beginnt oberhalb des Pityriacitrins und läuft nach oben bis knapp unterhalb von Pityriarubin C. Das Violett erscheint gelegentlich als Blau. Das Pityriarubin C ist bei diesen Pilzen nur sehr schwach ausgeprägt, teilweise ist es optisch kaum zu erkennen. In den letzten Fraktionen tritt eine recht klare hoch laufende gelbe Bande auf.

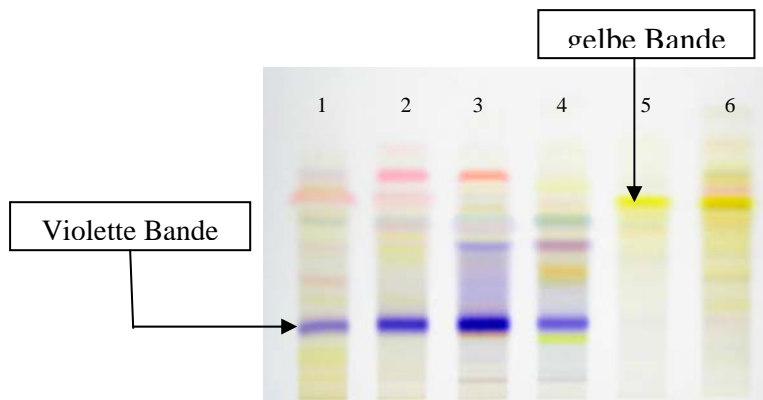


Abbildung 50: *Pseudozyma fusiformata* als Repräsentant der Gruppe 1

Dieser Gruppe gehören folgende Pilze an: *Pseudozyma fusiformata*, *Sporisorium reilianum*, *Sporisorium scitamineum*, *Exobasidium japonicum*, *Exobasidium vaccinii*, *Tilletiaria anomala*, *Ustilago esculenta* und *Ustilago vetiveriae*.

**Gruppe 2: (Ustilago Gruppe)**

Der Schwerpunkt der Gruppe 2 liegt in der Dominanz der orangenen Banden. Hierbei handelt es sich um die Pityriarubine. Die Pityriarubine A, B, C sind stark und deutlich ausgeprägt. Das Violett ist hier nur sehr schwach oder gar nicht zu erkennen. In der letzten Fraktion imponiert das hohe Gelb eher als Grüngelb.

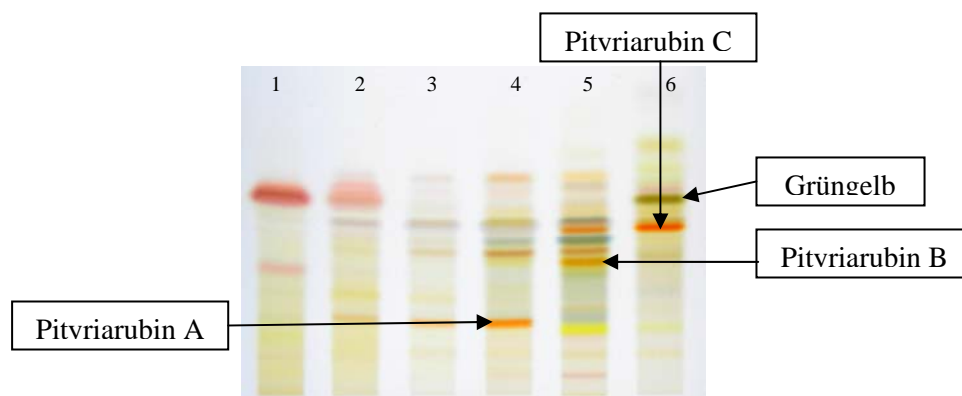


Abbildung 51: *Ustilago maydis* als Repräsentant der Gruppe 2

Dieser Gruppe gehören folgende Pilze an: *Ustilago bullata* 146, *Ustilago cynodontis*, *Ustilago maydis*, *Ustilago rabenhorstiana* und *Ustilago striiformis*.

**Gruppe 3: Mischgruppe**

*Malassezia furfur* könnte von seiner Erscheinung beiden Gruppen zugeordnet werden. Bei ihm sind sowohl das Violett als auch die Pityriarubine, insbesondere das Pityriarubin C stark ausgeprägt.

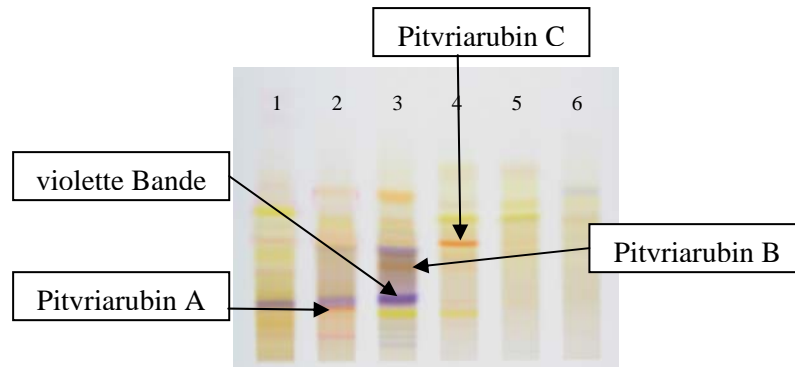


Abbildung 52: *Malassezia furfur*

**Gruppe 4:**

Diese Gruppe zeichnet sich aus durch eine Dominanz gelber und oranger Banden. Hier treten vor allem hochlaufende gelbe Banden auf. Ebenso treten orange Banden auf, die bei anderen Pilzen kaum zu finden sind. Die Pityriarubine sind eher schwach ausgeprägt.

Zu dieser Gruppe gehören *Ustilago bullata* 558 und *Ustilago hypodites*.

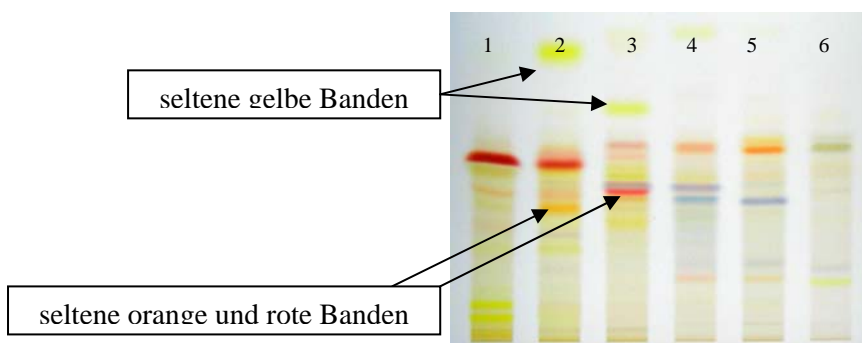


Abbildung 53: *Ustilago bullata* 558 als Repräsentant der Gruppe 4

*Sporisorium raphidii* kann durch sein optisches Erscheinungsbild keiner der genannten Gruppen zugeordnet werden und bildet eine Sondergruppe. Er kann durch sein Pigmentmuster deutlich von den anderen Pilzen abgegrenzt werden. Die Banden haben eine eher matte Farbe und gehen ineinander über. Die meisten bekannten Banden sind hier optisch nicht zu erkennen (vgl. 3.4.2 Abbildung 39).

## 4. Diskussion

Im Jahre 1998 konnten MAYSER ET AL. erstmalig nachweisen, dass die Aminosäure L-Tryptophan bei *Malassezia furfur* eine Pigmentbildung induziert. Die hierbei entstehenden Pigmente und Fluorochrome werden mit dem Erscheinungsbild der Pityriasis versicolor in Verbindung gebracht (MAYSER ET AL., 1998, 2002; KRÄMER ET AL., 2005).

Man ging bislang von der Vermutung aus, dass die Fähigkeit zur Bildung Tryptophan-abhängiger Pigmente eine Anpassung des Pilzes *Malassezia furfur* an das Hautmilieu des Menschen darstellt. *Malassezia furfur* ist für sein Wachstum auf langkettige Fettsäuren angewiesen und bevorzugt daher Talgdrüsen-reiche Hautregionen. Insbesondere dort ist er ein Bestandteil der menschlichen Hautflora. Die Haut des Menschen bietet aufgrund seiner zahlreichen Schweißdrüsen und der damit verbundenen Fähigkeit zur Schweißsekretion für diese Spezies ein hervorragendes Milieu. Es wird angenommen, dass die Haarlosigkeit und die Ausbreitung von ekkrinen Schweißdrüsen über die gesamte Körperoberfläche während der *Homo-erectus*-Phase entstanden. Vermutlich regulierten die ersten Primaten die Körpertemperatur über die Atmung. Der Mensch hat im Gegensatz zu anderen Primaten die größte Dichte an Schweißdrüsen und verfügt somit über ein sehr gutes Kühlungssystem. Das mit *Malassezia furfur* assoziierte Krankheitsbild der Pityriasis versicolor ist nur bei Menschen bekannt. Durch eine Hyperhidrose als Dispositionsfaktor kann es zu einem gesteigerten Pilzwachstum mit Krankheitssymptomen kommen (RASSNER, 2002). Nach exzessivem Schwitzen könnte es auf der menschlichen Haut zu einem Zustand kommen, in welchem sich der Pilz hauptsächlich von Tryptophan ernährt und Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolite produziert. Eine solche Art der Pigmentbildung ist mittlerweile auch von anderen humanpathogenen Pilzen bekannt (NIES, 2006).

Eine Zeitspanne der Hominisation von lediglich wenigen Millionen Jahren erscheint jedoch für eine Bildung Tryptophan-abhängiger Pigmente als Ausdruck einer Anpassung von *Malassezia furfur* an das Hautmilieu des Menschen als zu kurz, insbesondere da die Verbindungen teils sehr komplex sind. Wegen der phylogenetischen Klassifikation *Malassezia furfur*s als Brandpilz wurden zur Klärung dieses Sachverhaltes Brandpilze auf Pigmentbildung untersucht.

Anhand dieser Untersuchung konnte erstmals gezeigt werden, dass der Tryptophan-abhängige Stoffwechselweg nicht allein von humanpathogenen Pilzen durchgeführt wird, sondern auch unter den pflanzenpathogenen Pilzen weit verbreitet ist.

Es konnte der Nachweis einer Pigmentbildung bei Ustilaginomyceten der Ordnungen Ustilaginales, Malasseziales, Exobasidiales und Georgefischeriales erbracht werden. Unter den Brandpilzen scheint somit eine große Anzahl von Spezies in der Lage zu sein, bei Zugabe der Aminosäure Tryptophan als einzige Stickstoffquelle eine Reihe unterschiedlicher Sekundärmetabolite zu produzieren. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass es sich um einen sehr alten Stoffwechselweg handeln muss, der weit vor Besiedlung der Erde durch den Menschen entstanden ist.

NIES (2006) untersuchte in ihrer Arbeit die Bildung von Tryptophan-abhängigen Sekundärmetaboliten bei humanpathogenen Ascomyceten und Hymenomyceten, wobei letztere ebenso wie die Brandpilze zu den Basidomyceten gehören. Bei beiden konnte die Bildung vieler verschiedener Indolderivate wie z.B. Pityriacitrin nachgewiesen werden. Beide Gruppen, sowohl die Basidomyceten als auch die Ascomyceten sind phylogenetisch miteinander verwandt und werden gemeinsam als Dicaryomycota bezeichnet. Sie haben gemeinsame Vorläufer und werden den Eumycota zugeordnet (STRASBURGER ET AL., 2002). Es liegt hier die Vermutung nahe, dass bereits der gemeinsame Vorläufer zu Tryptophan-abhängiger Pigmentbildung in der Lage war. Jedoch ist über die Evolution der Brandpilze nur wenig bekannt. Sie ist eng verbunden mit der Evolution der entsprechenden Wirte. Es gibt nur wenig Funde von fossilen Brandpilzen. 1991 entdeckten CURRAH & STOCKEY bei der Untersuchung mineralisierter Agiospermen aus dem Eozän Massen von Pilzsporen anstelle von vermuteten Pollen in dessen Anthere. Sie deuteten diesen Fund als einen ca. 48 Millionen Jahre alten Brandpilz (CURRAH & STOCKEY, 1991). Der größte Teil gesammelter Erkenntnisse über die Evolution von Brandpilzen beruht auf Untersuchungen bekannter Arten und deren Wirte (PIEPENBRING, 2003).

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnten neben den pigmentbildenden Spezies jedoch auch Vertreter gefunden werden, die nicht zu einer Pigmentbildung auf Tryptophan-Agar angeregt werden konnten. Von den 27 untersuchten Brandpilzen waren 17 zur Pigmentbildung befähigt, bei 10 Spezies blieb die Pigmentbildung jedoch aus. Bei anderen Untersuchungen konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Unter den von NIES (2006) untersuchten

humanpathogenen Ascomyceten und den von WENZEL ET AL. (2005) untersuchten *Candida* Spezies konnte nur ein Teil der Pilze zur Pigmentbildung angeregt werden. Der Grund dafür lässt sich aus dem heutigen Wissensstand heraus nicht eindeutig klären. Ob diese Pilze die für die Pigmentbildung erforderlichen Gene besitzen, diese aber nicht aktivieren, könnte eindeutig nur durch eine Genanalyse gezeigt werden. Es wäre durchaus denkbar, dass die Pigmentbildung in-vivo durch einen noch unbekanntem Mechanismus getriggert wird.

In diesem Zusammenhang erschien jedoch als auffällig, dass es sogar innerhalb einer Spezies zu großen Unterschieden in Bezug auf Pigmentbildung kam. Von den hier untersuchten *Ustilago cynodontis* Stämmen war einer zur die Pigmentbildung befähigt, der andere konnte lediglich zu Wachstum auf Tryptophan Agar angeregt werden. Bei der Spezies *Exobasidium vaccinii* verhielt es sich ähnlich. Ein Stamm führte Pigmentbildung auf Tryptophan-Agar durch, bei einem anderen Stamm blieb sowohl Wachstum als auch Pigmentbildung aus.

Ähnlich überraschend fiel eine Untersuchung von MAYSER ET. AL. (2004) aus. Von den untersuchten *Malassezia pachydermatis* Stämmen bildeten lediglich 11% Pigment auf Tryptophan-Agar. Im Vergleich zu *Malassezia furfur* war die Pigmentbildung wesentlich langsamer und das Farbspektrum deutlich eingeschränkt. Daher wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit die Pigmentbildung innerhalb einer Spezies verbreitet ist und ob die dafür benötigten Gene noch vorhanden sind. Aussagen über phylogenetische Zusammenhänge in Bezug auf Pigmentbildung können daher nur schwer getroffen werden, da bei dieser Arbeit von den meisten Spezies nur ein Stamm untersucht wurde. Auch müsste für eine solche Untersuchung eine wesentlich größere Anzahl an Spezies auf Pigmentbildung getestet werden.

Ebenso können auch Unterschiede in Bezug auf Pigmentmuster der entstandenen Stoffe innerhalb einer Spezies auftreten. Diese Beobachtung konnte zum Beispiel bei *Ustilago bullata* gemacht werden. Beide Stämme konnten zu einer Pigmentbildung auf Tryptophan-Agar angeregt werden, zeigten jedoch große Unterschiede in Bezug auf die entstandenen Pigmentmuster und wurden daher unterschiedlichen Gruppen zugeordnet (vgl. Ergebnisse). Durch Untersuchungen mehrerer Stämme unterschiedlicher Pilzspezies könnten mögliche Variationen in den Pigmentmustern

analysiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass die entstandenen Pigmentmuster spezifisch nur für den jeweiligen Stamm sind.

Betrachtet man die Dünnschichtchromatogramme aller hier untersuchten Spezies und Stämme, so stellt man fest, dass aufgrund des Vorhandenseins bestimmter Banden und deren farblicher Intensität unterschiedliche, für den untersuchten Pilz spezifische Pigmentmuster entstanden sind, die es erlauben, die entsprechenden Pilze voneinander abzugrenzen. Die Pigmentmuster der Spezies *Ustilago maydis* und *Pseudozyma fusiformata* wurden mehrfach überprüft und erwiesen sich dabei als stabil.

Es wäre durchaus möglich, dass die hier beobachtete Spezifität eine Anpassung des Pilzes an seine Umgebung und den jeweiligen Wirt darstellt. Die gebildeten Stoffe könnten mit einer spezifischen Pilz-Wirt-Beziehung einhergehen. Diese Überlegung soll anhand des folgenden Beispiels verdeutlicht werden.

Die miteinander verwandten Spezies *Ustilago maydis* und *Sporisorium reilianum* haben beide *Zea mays* als Wirt. Sie zeichnen sich durch unterschiedliche Pathogenitätsmechanismen aus und haben andere Angriffspunkte. *Ustilago maydis* greift die oberirdischen Anteile der Maispflanze an und verursacht entsprechende Symptome, während *Sporisorium reilianum* als Angriffspunkt die Wurzel hat und zu einer systemischen Infektion der Pflanze führt (SCHIRAWSKI ET AL., 2005).

Beide Spezies konnten bei dieser Untersuchung zur Pigmentbildung angeregt werden, zeigten jedoch bei den dabei entstandenen Mustern große Unterschiede.

Dementsprechend wurden beide Spezies zwei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet (vgl. Ergebnisse).

Daher ist es notwendig, mehr über die Aufgaben der gebildeten Tryptophan-abhängigen Sekundärmetabolite zu erfahren und herauszufinden, wann unter natürlichen Bedingungen es zu einer Induktion der Tryptophan-abhängigen Pigmentbildung beim Pilz kommen könnte. Jeder Pilz, der zur Pigmentbildung befähigt ist, bildet eine Vielzahl unterschiedlicher sichtbarer Pigmente und Fluorochrome, jedoch sind viele Substanzen noch nicht isoliert und näher untersucht. Deshalb lässt sich über die Funktion bestimmter Metabolite bisher relativ wenig sagen. Viele Farbbanden, die in dieser Arbeit beschrieben wurden (vgl. Kapitel 3), können von mehreren Spezies gebildet werden. Es gibt nur wenige Banden, die nur bei einzelnen Pilzstämmen vorkommen. Aber es ist jedoch auffällig, dass die Banden sehr stark in ihrer Intensität schwanken können. Bei jedem Pilz sticht die Dominanz



bestimmter Banden hervor, was zur Ausprägung unterschiedlicher optischer Bandenmuster führt. Der Nachweis von einigen, bislang nur bei humanpathogenen Pilzen bekannten Substanzen unter den pflanzenpathogenen Brandpilzen lässt diese aber in einem anderen Kontext erscheinen.

Abhängig von der Pflanze ist Tryptophan in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden. Pflanzen sind in der Lage, Tryptophan auf verschiedenen Wegen in Indol-3-Essigsäure (IAA) umzuwandeln (TAIZ & ZEIGER, 2000). Bei IAA handelt es sich um ein Phytohormon, welches Wachstum und Entwicklung von Pflanzen steuert (THEIß & HÜGEL, 1996). Die IAA-Biosynthese bei Pflanzen erfolgt hauptsächlich in den Apikalmeristemen des Sprosses junger Blätter und reifender Früchte, aber auch in geringeren Maßen in reifen Blättern und Wurzelspitzen. Es wäre durchaus denkbar, dass es in Wachstumsphasen in bestimmten Regionen zu einem Anstieg der Tryptophankonzentration kommt, die der Pilz für sich zu nutzen vermag.

Darüber hinaus können auch Pflanzen Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolite produzieren, um sich vor Erregern zu schützen. TSUJI ET AL. fanden 1992 heraus, dass eine Infektion der Schotenkresse (*Arabidopsis thaliana*) durch *Pseudomonas syringae* die Bildung des Phytoalexins Camalexin induziert. Es wurde gezeigt, dass Camalexin in der Lage ist, das in-vitro Wachstum von Pilzen und Bakterien zu hemmen (TSUJI ET AL., 1992; GLAZEBROOK & AUSUBEL, 1994). Spätere Untersuchungen bestätigten die Annahme, dass Camalexin ein Sekundärmetabolit des Tryptophan-Stoffwechsels ist. Es entsteht aus Indol-3-acetaldoxim unter dem Einfluss von Cytochrome P450 (GLAWISCHNIG, 2006). Es wäre denkbar, dass der Pilz aus diesem Grunde das Tryptophan selbst aufbraucht, um Angriffen durch die Pflanze zuvor zu kommen und sich mit eigenen Tryptophan-abhängigen Sekundärmetaboliten zu wehren. Eine Untersuchung von KAGAN und HAMMERSCHMIDT (2002) zeigte, dass die Produktion von Camalexin und die Reaktion auf eine Infektion von *Arabidopsis thaliana* verursacht durch den Pilz *Alternaria brassicicola* stark variiert. Von 24 untersuchten *Arabidopsis* Pflanzengesellschaften produzierten nur vier auffindbare Mengen von Camalexin. Dieses führte zu der Annahme, dass das Camalexin in der pflanzlichen Abwehr vielleicht einen niedrigeren Stellenwert einnimmt als geglaubt. Die Rolle des Pilzes ist in diesem Zusammenhang jedoch noch unbekannt. Es wäre vorstellbar, dass der Pilz die Bildung von Camalexin durch eigene Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolite

hemmt. Daher könnte nun durch weiterführende Untersuchungen überprüft werden, inwiefern Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolite des Pilzes für diese Theorie verantwortlich sind.

Interessanterweise kann der Tryptophan-abhängige Stoffwechselweg der Pflanze auch durch einen Mangel an Aminosäuren induziert werden. Eine Untersuchung von ZHAO ET AL. (1998) zeigte, dass ein Mangel verschiedener Aminosäuren zu einer Induktion von Enzymen des Tryptophan-Stoffwechsels und einer Anreicherung von Camalexin führte. Außerdem wurden so genannte Stressenzyme induziert, welche aus pflanzlichen Stressreaktionen bekannt sind. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass es einen Zusammenhang zwischen Stress verursacht durch einen Aminosäure Mangel und einer Infektion gibt (ZHAO ET AL., 1998). Auch hier ist eine Parallele zum Tryptophan-abhängigen Stoffwechselweg von Brandpilzen zu erkennen. Eine Pigmentbildung konnte bislang nur auf einem Minimalagar mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle erkannt werden. Ein Mangel an Aminosäuren auf der einen und ein Überangebot von Tryptophan auf der anderen Seite könnte auf den Pilz als doppelter Stress wirken und damit ein Induktor für Pigmentbildung sein. Der hier dargestellte, mögliche Zusammenhang zwischen Pflanze und Pilz lässt die Bildung Tryptophan-abhängiger Pigmente bei Pilzen erstmals in einem sinnvollen und natürlichen Kontext erscheinen und könnte richtungweisend für weiterführende Untersuchungen sein.

Eine Stressreaktion ist unter anderem gekennzeichnet durch eine hohe Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies. Eine solche für die Pflanzen positive Reaktion zur Abtötung von Mikroorganismen stellt der oxidative Burst dar.

Um sich vor potentiellen Erregern zu schützen, hat die Pflanze eine Kaskade von multiplen Abwehrvorgängen entwickelt.

Laut SCHLÖSSER (2002) findet das Auslösen dieser Abwehrvorgänge sowohl bei kompatiblen als auch bei inkompatiblen Wirt-Pathogen Systemen statt. Bei ersteren kommt es zu einer weitgehenden Unterdrückung der Kaskade und zu einer damit verbundenen Besiedlung der Pflanze. Bei Letzteren laufen die Resistenzmechanismen ungehindert weiter und es kommt zu einer endgültigen Hemmung des Erregers.

Bereits auf der Oberfläche intakter Gewebe oder kurz nach Penetration des Gewebes kommt es zum oxidativen Ausbruch (oxidativer Burst). Dieser entsteht lokal begrenzt aufgrund einer Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Elicitoren. Elicitoren sind Substanzen, die den Beginn einer Kaskade von Reaktionen auslösen können.

Beim oxidativen Burst kommt es unter anderem zur Bildung eines Superoxidanions, von Wasserstoffperoxid und Hydroxyradikalen. Durch deren zellschädigende Wirkung können innerhalb von Minuten Zellen nekrotisiert und zerstört werden (vgl. SCHLÖSSER, 2002).

Der oxidative Burst ist eine Reaktion, die nicht nur aus der Pflanzenwelt bekannt, sondern auch in der Tierwelt verbreitet ist. Dabei kann es zum Beispiel in der Haut zu entsprechenden Entzündungsreaktionen kommen.

Betrachtet man nun das Krankheitsbild der Pityriasis versicolor, so fällt auf, dass trotz starker Erregerzahl auf der Haut und intraepitheliale Wachstum eine Immunantwort durch neutrophile Granulozyten äußerst gering ausfällt (WROBLEWSKI, 2005). Weiterführende Untersuchungen durch KRÄMER ET AL. (2005) zeigten, dass die durch *Malassezia furfur* gebildeten Pityriarubine in der Lage sind, den oxidativen Burst humaner Granulozyten zu hemmen. Dieses bietet eine mögliche Erklärung dafür, warum es bei der Pityriasis versicolor zu einer äußerst geringen Entzündungsreaktion kommt. Die Pityriarubine haben eine Strukturverwandtschaft mit Bisindolylmaleimiden. Diese gelten als Proteinkinase C Inhibitoren und sind ebenso in der Lage, den oxidativen Burst zu hemmen (IRLINGER ET AL., 2004).

Die Bildung von Pityriarubinen ist auch innerhalb der hier untersuchten Brandpilzspezies sehr weit verbreitet. Alle Spezies, die in der Lage waren, Pigment zu bilden, bildeten auch Pityriarubine aus. Lediglich bei *Sporisorium raphidii*, der unter den hier untersuchten Spezies eine Sonderrolle einnahm, konnte die Bildung von Pityriarubinen nicht eindeutig festgestellt werden.

Auffällig waren jedoch die starken Schwankungen in der optischen Intensität entsprechender Banden und damit verbunden in der Konzentration der Pityriarubine.

Da eine große Anzahl der Brandpilze Pityriarubin zu bilden vermag, scheint die in diesem Zusammenhang stehende Reaktion eine in der Natur weit verbreitete zu sein, wie sie auch der oxidative Burst darstellt. Es wäre durchaus möglich, dass die Pityriarubine auch den oxidativen Burst von Pflanzen hemmen und somit mögliche Kaskaden von Abwehrreaktionen unterdrücken. Aufschluss darüber müsste in weiterführenden Untersuchungen, insbesondere in-vivo Modellen erbracht werden.

Hierfür eignen sich die bisher bereits eingehend untersuchten Wechselwirkungen von *Ustilago maydis* einerseits und der Maispflanze andererseits in hervorragender Weise (KÄMPER ET AL., 2006).

Eine weitere Substanz, die zuerst bei der Hefe *Malassezia furfur* gefunden und zuvor in der Natur noch nicht beschrieben wurde, war das Pityriaanhydrid. Dieses hat eine Strukturverwandtschaft mit den Arcyriarubinen A-C, die die Fähigkeit haben, die Proteinkinase C zu inhibieren. Bei der Herstellung von Arcyriarubin stellt das Pityriaanhydrid eine Zwischenstufe dar, hat selbst aber keine inhibitorische Wirkung (IRLINGER, 2002). Die Arcyriarubine konnten jedoch bei den Brandpilzen bislang nicht gefunden werden. Auch das Pityriaanhydrid ist ebenso wie die Pityriarubine bei fast allen hier untersuchten pigmentbildenden Pilzen zu finden. Welche genaue Rolle es einnimmt, ist jedoch unklar. Wahrscheinlich stellt es lediglich ein Zwischenprodukt bei der Bildung anderer Substanzen dar.

Die Substanz Malasseziaindol A konnte bei dieser Untersuchung aus den beiden Spezies *Ustilago maydis* und *Pseudozyma fusiformata* isoliert werden. Es handelt sich hierbei um ein Indolalkaloid mit bisher unbekanntem Eigenschaften. Seine Struktur ähnelt stark den Alsterpaullonen (9-Nitropaullone) und weist vermutlich eine ähnliche Wirkungsweise auf. Bei den Paullonen handelt es sich um CDK (Cyclin-dependent Kinase)-Inhibitoren. Viele humane Neoplasien gehen mit einer Hyperaktivierung der CDKs einher. Die Alsterpaullone zählen zu den potentesten Paullonen und zeigen eine in-vitro antiproliferative Aktivität. Sie haben eine hohe CDK1/Cyclin B-inhibitorische Wirkung.

Alsterpaullone induzieren Apoptose durch Aktivierung der Caspase-9 infolge einer Störung des mitochondrialen Membranpotentials (LAHUSEN ET AL., 2003).

Malasseziaindol A konnte in einer anderen Untersuchung ebenso bei *Exophiala phaeomuriformis* gefunden werden (NIES, 2006). Welche Rolle es als Pathogenitätsfaktor beim Menschen spielt, ist bislang nicht geklärt. Möglicherweise kann auch diese Substanz von vielen Pilzen synthetisiert werden. Eine nähere Untersuchung der Eigenschaften dieses Stoffes könnte auf dem Gebiet der Onkologie von großem Interesse sein.

Bereits 1998 konnten MAYSER & PAPE experimentell nachweisen, dass die Bildung Tryptophan-abhängiger Sekundärmetabolite einen UV-Schutz für die Hefe *Malassezia furfur* bietet.

Später wurde das gelbe Indolderivat Pityriacitrin bei *Malassezia furfur* erstmals näher beschrieben und analysiert (MAYSER ET AL., 2002). Das Pityriacitrin bietet dem Organismus den Schutz vor UV-A, UV-B und UV-C Strahlung ( $\lambda_{\max}$  389, 315, 289, 212 nm) und könnte auch ein Grund dafür sein, warum es bei der Pityriasis versicolor trotz Hypopigmentierung der Haut durch Mangel an Melanin zu keiner erhöhten Lichtempfindlichkeit der entsprechenden Hautstellen kommt.

Es gibt in der Natur nur wenige UV-Schutz Systeme. Neben dem Melanin, das beim Menschen, aber auch bei einer Vielzahl von Säugern und sogar Pilzen eine Rolle spielt, sind es Flavonoide bei Pflanzen, Mycosporin-ähnliche Aminosäuren bei Mikroorganismen sowie das Scytonemin bei den entwicklungsgeschichtlich sehr alten Cyanobakterien. Das Scytonemin wird genauso wie Pityriacitrin aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert. In erster Linie hat es einen Absorptionsbereich von 325 bis 425 nm. Es konnte allerdings auch eine starke Absorption bei 250 nm festgestellt werden (PROTEAU ET AL., 1993).

MACHOWINSKI ET AL. untersuchten 2006 den Effekt von Pityriacitrin auf die Mikroflora der menschlichen Haut mit dem Fokus auf *Candida albicans* und Staphylokokken.

Es konnte hierbei gezeigt werden, dass Pityriacitrin einen Schutz für beide Mikroorganismen bietet, ohne dabei für die Bakterien toxisch zu wirken.

Die Bildung von Pityriacitrin konnte bei allen hier untersuchten pigmentbildenden Brandpilzen beobachtet werden.

Weitere Untersuchungen durch WENZEL ET AL. (2005) bei *Candida* Spezies zeigten, dass dieser UV-Schutz auch dort eine weite Verbreitung findet. Ebenso konnte der Nachweis von Pityriacitrin bei einer Reihe anderer humanpathogener Ascomycota gezeigt werden (NIES, 2006).

Pityriacitrin wurde bereits 1999 durch japanische Forscher bei dem Marine-Bakterium *Paracoccus* (strain F-1547) entdeckt, jedoch nicht näher untersucht. Man kann vermuten, dass es sich hier um einen in der Natur weit verbreiteten Lichtschutz handelt. Es stellt sich die Frage, welche Rolle dieser Lichtschutz heute in der Natur spielt, da dem Pilz mit Melanin ein wesentlich potenterer UV-Schutz zur Verfügung steht.

Pityriacitrin könnte aufgrund seiner Absorption im UV-C Bereich eine frühe Entstehung erfahren haben. Die ältesten Spuren von Lebensgemeinschaften auf der Erde gehen zurück auf das Proterozoikum, einen Zeitraum von drei bis einer Milliarde Jahre vor unserer Zeitrechnung. Es herrschte wohl ein wässriges Milieu mit vielen organischen, anorganischen Verbindungen und einem sehr geringen Sauerstoffgehalt. Die vor UV-Strahlung schützende Ozonschicht war in der damaligen Uratmosphäre praktisch noch nicht ausgebildet. Die Mikroorganismen jener Zeit waren somit einer starken UV-Strahlung ausgesetzt. Zu den lebenden Mikroorganismen gehörten zu Beginn einzellige bakterien- und blaualgenähnliche Prokaryoten, später kamen fädig - mehrzellige Vertreter hinzu und zuletzt ließen sich einzellige eukaryotische Algen, aquatische Pilze und Protozoen nachweisen (vgl. STRASBURGER ET AL. 2002).

Die Pilze haben sich laut STRASBURGER ET AL. (2002) aus einzelligen heterotrophen Eukaryota entwickelt. Man kann sie auf vier Entwicklungslinien zurückführen, aus denen die Acrasiobionta (zelluläre Schleimpilze), die Myxobionta (Schleimpilze), die Oomycota (Cellulosepilze) und die Mycobionta (Chitinpilze) entstanden. Zu den letzteren werden die Eumycota gerechnet, zu denen auch die Brandpilze gehören.

Zu Beginn des Cambriums (vor ca. 600 Mio. Jahren) stieg der Sauerstoffgehalt der Erdatmosphäre auf ca. 0,2%, was einem Prozent des heutigen Wertes entspricht.

Die Mikroorganismen entwickelten unterschiedliche Strategien, um der starken UV-Belastung entgegen zu wirken. Durch die Bindung an gallertige, eisenhaltige Silicate und Carbonate konnten sich frühere Organismen offenbar vor der starken UV-Einstrahlung schützen (STRASBURGER ET AL., 2002). Erst mit Anstieg des Sauerstoffgehaltes und der damit verbundenen Entstehung der Ozonschicht konnte die UV-C Strahlung gefiltert werden. Daher könnte Pityriacitrin aufgrund seiner Absorption unter anderem im UV-C Bereich in einer Zeit vor Entstehung der Ozonschicht entstanden sein und eine wichtige Rolle bei damaligen Mikroorganismen gespielt haben.

Viele Pilze sind in der Lage, mit Melanin und Pityriacitrin zwei potente Lichtfilter zu bilden. Melanin schützt den Organismus unspezifisch vor UV-Strahlen, jedoch mit ansteigender Effizienz bei niedrigeren Wellenlängen (COCKELL ET AL., 1999).

Es sind bislang kaum Pilzspezies beschrieben, die trotz Tryptophan-abhängiger Pigmentbildung kein Pityriacitrin produzieren. Diese Fähigkeit zur Bildung von Pityriacitrin könnte somit seit Millionen von Jahren im Genom vieler Pilze verankert

sein, jedoch ist unklar, welche Rolle es heutzutage spielt. Vielleicht ist es durch andere potente UV-Filter, wie z.B. Melanin, verdrängt worden und wird nur noch unter bestimmten Voraussetzungen von Pilzen und anderen Mikroorganismen gebildet. Eine solche Situation könnte vielleicht gegeben sein, wenn aufgrund einer Stresssituation der Gesamtstoffwechsel des Pilzes stark eingeschränkt ist und er Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolite produziert. Möglich wäre aber auch, dass Pityriacitrin in der Natur auch noch andere, bislang unbekannte Aufgaben hat. COCKELL ET AL. (1999) vermuten, dass Sonnenschutz-Systeme früher andere physiologische Rollen innehatten (z.B. chemische Botenstoffe, osmotische Regulatoren). Daher wäre auch bei Pityriacitrin eine weitere Funktion denkbar.

Ein Pilz, der sich aufgrund seiner Pathogenität und seines Wirtsspektrums stark von den anderen Brandpilzen unterscheidet, ist die Hefe *Malassezia furfur*. Ein pflanzenparasitäres Stadium von *Malassezia furfur* ist nicht bekannt, jedoch ist eine Isolation von der Haut unterschiedlicher Säugetiere gelungen. Für sein Wachstum bevorzugt er ein feuchtes, warmes Milieu und benötigt darüber hinaus langkettige Fettsäuren (GUEHO ET AL., 1998). Daher könnte er möglicherweise ursprünglich einen anderen Wirt, wie z.B. eine Ölpflanze gehabt haben, die im Laufe der Evolution ausgestorben ist.

Der Mensch bietet aufgrund seiner zahlreichen ekkrinen Schweißdrüsen und der Fähigkeit zum Schwitzen als Temperaturregulation auf seiner Haut ein gutes Nährmilieu. Er besitzt unter den Säugern die größte Dichte an Schweißdrüsen. Im Gegensatz zu anderen Primaten, die Schweißdrüsen hauptsächlich an Handflächen und Fußsohlen haben, sind diese beim Menschen auf dem ganzen Körper in unterschiedlicher Dichte verteilt. Ausscheidung von Stickstoffquellen und Salzen über den Schweiß sowie reichlich vorhandene Kohlestoffquellen in Form von Lipiden bieten für lipophile *Malassezia*-Hefen ein hervorragendes Milieu.

*Malassezia furfur* hebt sich durch die Anordnung der Banden und der damit verbundenen Pigmentmuster kaum von den anderen Brandpilzen ab. Die Bildung von Pigmenten auf Tryptophan-Agar erfolgt im Gegensatz zu vielen andern Brandpilzen jedoch sehr schnell und in großen Mengen. Diese hohe Aktivität bei der Bildung Tryptophan-abhängiger Sekundärmetabolite von *Malassezia furfur* trotz seinem wahrscheinlichen Übergang aus einem pflanzenadaptiertem Wirtsmilieu in ein humanes könnte darauf hinweisen, dass der Tryptophan-abhängige

Stoffwechselweg bei *Malassezia furfur* immer noch einen großen Stellenwert einnimmt.

Wann und wo *Malassezia furfur* sich aus der Gruppe der anderen Brandpilze gelöst hat und auf den Menschen als bedeutsamen Wirt übergegangen ist, lässt sich heute nicht mehr genau rekonstruieren, jedoch mag ihm seine Lipophilie einen entscheidenden Vorteil verschafft haben. Auch Pferde besitzen eine hohe Dichte an Schweißdrüsen, die hauptsächlich an Schulter, Hals, Unterbauch und Innenschenkel verteilt sind. CRESPO ET AL. (2002) untersuchten das Auftreten von *Malassezia* Spezies bei Pferden und anderen Haustieren. Diese wiesen einen hohen Anteil lipidbedürftiger *Malassezia* Spezies auf. Bei 60 Prozent der Pferde konnten *Malassezia* Spezies gefunden werden. Es wäre durchaus möglich, dass *Malassezia furfur* über andere Säugetiere, wie z.B. Pferde letztendlich auf den Menschen übergegangen sein könnte. Pferde mussten sich im Laufe der Evolution an die neu entstandene Steppenlandschaft anpassen. Ihre Evolution ist stark an die Entstehung von Steppen gekoppelt (FRANTZEN, 2006).

Auch andere Brandpilze haben die Fähigkeit zur Humanpathogenität, jedoch ist diese lediglich fakultativ und erfolgt hauptsächlich bei immundefizienten Menschen.

Die Menge von Infektionen bei Menschen verursacht durch Pilze hat in den letzten Jahren einen starken Anstieg erlebt. Durch einen Anstieg von immundefizienten Patienten kommt es auch zu einer Zunahme von Pilzinfektionen und damit verbunden zu einem Anstieg von Resistenzen. Auch streng pflanzenpathogene Spezies können immer öfter bei humanen Pilzkrankungen isoliert werden.

So isolierten im Jahre 2003 Forscher drei Spezies der pflanzenpathogenen Gattung *Pseudozyma* aus Patientenblut in Thailand. Zwei dieser Spezies waren bislang nicht bekannt. Als Besorgnis erregend zeigte sich eine Resistenz aller drei Pilze gegenüber 5-Fluocytosin (SUGITA ET AL., 2003).

Neben den bereits beschriebenen Stoffen bilden die hier untersuchten Pilze eine Menge anderer Substanzen, deren Struktur bislang noch unbekannt ist. Es gibt eine große Anzahl von sichtbaren Banden und Fluorochromen, die noch nicht näher bestimmt wurden. Die Dünnschichtchromatogramme der Pilzspezies zeigen eindrucksvoll die unterschiedlichen Pigmentprofile.



Mit dieser Arbeit wurde erstmals versucht, die Grundlage für eine möglichst objektive Vergleichbarkeit von Dünnschichtchromatogrammen unterschiedlicher Pilzspezies zu schaffen. Bei dem Versuch, die Dünnschichtchromatogramme miteinander zu vergleichen und eine Datenanalyse durchzuführen, ergaben sich verschiedenartige Schwierigkeiten. Für eine objektive Vergleichbarkeit von Banden bieten sich leider nur wenige Möglichkeiten.

Zunächst muss jede Bande durch ihre Merkmale beschrieben werden. Dabei wird ihr eine Farbe bei Tageslicht und unter UV-Licht zugeordnet. Außerdem tritt die Bande in einer bestimmten Fraktion auf und hat eine entsprechende Laufhöhe. Zusätzlich wird noch eine eventuelle pH-Abhängigkeit der Bande getestet.

Ein großes Problem besteht jedoch darin, dass jede Bande in ihrer Laufhöhe Schwankungen unterworfen ist. Diese Schwankungen werden verursacht durch z.B. kleinste Unterschiede in der Laufmittelzusammensetzung oder durch Schwankungen in der Außentemperatur. Damit dennoch ein objektiver Vergleich der Banden miteinander möglich ist, sollte das Ausmaß der Höhenschwankungen reduziert werden.

Man könnte dieses erreichen, indem man für alle Dünnschichtchromatogramme exakt die gleichen Bedingungen schafft, was sich in der Praxis jedoch als kaum durchführbar erweist. Um Banden direkt miteinander zu vergleichen, bietet sich jedoch die Möglichkeit, die entsprechenden Fraktionen, in denen sie vorkommen, nebeneinander aufzutragen und gegebenenfalls mit einem Standard des entsprechenden Stoffes parallel laufen zu lassen (vgl. Ergebnisse). Dadurch werden Schwankungen in der Laufhöhe minimiert und Banden direkt miteinander verglichen.

Möchte man jedoch viele verschiedene DC-Platten miteinander vergleichen, so ist dieses Verfahren leider nicht geeignet. Hierfür sollte eine Datenanalyse durchgeführt werden.

Es wurde zunächst versucht, die Daten durch eine Rasteranalyse objektiv miteinander vergleichbar zu machen. Durch die Problematik der Laufhöhenschwankungen einzelner Banden, konnte dieses Verfahren in der Praxis leider nicht angewendet werden (vgl. 3.5.3). Es ist nicht gelungen, alle vermutlich gleiche Banden der untersuchten Spezies einem in der Höhe entsprechenden gleichen Kästchen zuzuordnen. Die Größe der Laufhöhenschwankungen einzelner Banden ließ eine solche Rasteranalyse leider nicht zu.

Es war daher sinnvoll das Schwankungsausmaß einzelner Banden zu bestimmen und zu versuchen, es gegebenenfalls zu reduzieren. Deshalb wurden die Laufhöhen bestimmter Banden zunächst statistisch erfasst. Es wurden sowohl mehrere bekannte, als auch unbekannte Banden näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das Schwankungsausmaß der Banden relativ konstant war und stieg mit zunehmender Laufhöhe leicht an.

Mit dem Ziel, das Schwankungsausmaß zu reduzieren, wurde der Parameter der relativen Höhe eingeführt. Dabei wurde die Höhe der untersuchten Bande in Verhältnis zu der gelben Pityriacitrin-Bande gesetzt, da diese bei jedem Pilz mit relativ hoher Intensität vorhanden war. Dabei ging man von der Annahme aus, dass die Schwankungen der Banden in einem relativen Verhältnis zueinander stehen. Prinzipiell könnten für diese Untersuchung auch andere Banden als Bezugspunkt dienen. Mit dem Parameter der relativen Höhe konnte das Schwankungsausmaß erfolgreich gesenkt werden. Dieses gilt besonders für Pityriacitrin-nahe Banden.

Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit, eine relative Vorhersagbarkeit für eine bestimmte Bande an einer Stelle zu treffen und damit eine Grundlage, um einzelne Banden bzw. Bandenmuster unterschiedlicher Spezies objektiv miteinander zu vergleichen. Der Parameter der relativen Höhe kann dabei die Vorhersagbarkeit einer Bande präzisieren und vor allem auch bei Banden angewendet werden, die in der absoluten Höhe außerhalb des festgelegten Schwankungsrahmens liegen.

Dieses Verfahren wurde erfolgreich bei vier anderen Pilzspezies angewendet. Die dabei untersuchten Banden konnten als solche identifiziert werden.

Um auch die Vorhersagbarkeit seltener Banden zu präzisieren, ist es notwendig, den Stichprobenumfang zu vergrößern und gegebenenfalls in einer Datenbank festzuhalten. Eine Datenerhebung müsste für alle optisch sichtbaren Banden erfolgen, um so eine Aussage über bestimmte Pigmentmuster treffen zu können.

Alle bekannten Merkmale sollten dabei mit berücksichtigt werden. Neben der relativ konstanten farblichen Ausprägung sollten für alle Banden auch die Fraktionen ermittelt werden, in denen diese hauptsächlich vorkommen.

In Zukunft könnte die Analyse der Banden automatisch mit Hilfe von Farbscannern und den entsprechenden Programmen erfolgen. Das hier entwickelte Prinzip könnte

diesen Programmen als Grundlage dienen, um die Banden einordnen zu können und somit miteinander vergleichbar zu machen.

Die Strukturaufklärung einzelner Banden ist jedoch für weitere Untersuchungen unerlässlich. Sie bietet die einzige Möglichkeit, um neue Substanzen zu isolieren und deren Strukturen zu bestimmen.

Als Fazit ist festzuhalten, dass die Fähigkeit zu einer Tryptophan-abhängigen Pigmentbildung in der Natur offenbar weit verbreitet ist. Neben Pflanzen sind auch Pilze in der Lage, Tryptophan-abhängige Sekundärmetabolite zu produzieren. Vieles deutet darauf hin, dass auch Bakterien diese Fähigkeit besitzen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse könnten weiterführenden Untersuchungen neue Türen öffnen.

So könnte der bei *Malassezia furfur* neu entdeckte und unter Pilzen wohl weit verbreitete Stoffwechselweg neue Aspekte zur Pilzbekämpfung aufweisen und weitere Erkenntnisse über den Pathogenitätsmechanismus von Pilzen bringen.

Gelänge es z.B., die Bildung der Pityriarubine zu unterdrücken, so könnte evtl. in der Bekämpfung von Pilzen eine größere Angriffsfläche geboten werden. Außer einigen wenigen bekannten Substanzen wie z.B. den Pityriarubinen und dem Pityriacitrin bilden die Brandpilze eine Reihe weiterer Stoffe, die bis heute noch nicht genauer untersucht wurden. Die große Anzahl farbiger Banden und Fluorochrome spiegelt die Menge der noch zu entdeckenden Stoffe wieder. Um neue Erkenntnisse über die Pathogenität dieser Stoffe zu gewinnen, wären weitere Strukturaufklärungen und Analysen von Funktionen von großem Interesse.

Die bislang untersuchten Substanzen weisen eher hemmende Eigenschaften auf, was möglicherweise in der Krebstherapie von Nutzen sein könnte.

Zum Beispiel führt der bei *Malassezia furfur* entdeckte Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Agonist Malassezin zur Apoptose von Melanozyten und könnte möglicherweise die Hypopigmentierung der Haut bei der Pityriasis versicolor erklären (KRÄMER ET AL., 2005), sowie auch in der Bekämpfung von Melanomen eine Rolle spielen.

Ebenso könnte überprüft werden, in wie fern das den Alsterpaullone in der Struktur ähnliche Malasseziaindol A eine CDK (Cyclin-dependent Kinase)-inhibitorische Wirkung besitzt und somit in der Onkologie von Bedeutung wäre.

Darüber hinaus müsste versucht werden, die genetische Regulation dieses Stoffwechselwegs zu untersuchen und die dabei aktivierten Enzyme zu bestimmen. Dieses könnte z.B. anhand der Spezies *Ustilago maydis* durchgeführt werden, da das Genom im Gegensatz zu *Malassezia furfur* bereits entschlüsselt ist (KÄMPER ET AL., 2006). Eine hier mögliche Methode wäre die Suppression Subtractive Hybridization PCR (SSH PCR) Es handelt sich hierbei um ein cDNA Subtraktions Verfahren (DIATCHENKO ET AL., 1999). Die dabei aus pigmentpositiven und pigmentnegativen Kulturen eines Stammes gebildete RNA wird nach Aufreinigung in stabile komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt und in ein Subtraktionsverfahren eingesetzt, bei dem Sequenzen aus beiden Kulturen eliminiert werden, so dass allein Sequenzen aus der pigmentbildenden Kultur übrig bleiben. Diese werden anschließend *E. coli* transformiert, kloniert und ein PCR-Screening durchgeführt. Dieses Verfahren könnte helfen, die bei diesem Stoffwechselweg aktivierten Gene und Enzyme zu bestimmen.

Ein anderer Ansatzpunkt wäre der Versuch, bereits bekannte Substanzen in der Wirtspflanze nachzuweisen. Man könnte hierfür markiertes Tryptophan verwenden und überprüfen, ob der Pilz dieses für sich zu nutzen vermag und ob es dadurch zu einer Hemmung des Tryptophan-abhängigen Stoffwechselwegs der Pflanze kommt. Ferner könnte der Versuch unternommen werden, bereits bekannte Substanzen von der menschlichen Haut zu isolieren.

Abschließend können die eingangs gestellten Fragen bezüglich der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese bei Brandpilzen wie folgt beantwortet werden:

1. Von den hier untersuchten 27 Brandpilzen konnten außer *Malassezia furfur* noch 16 weitere zu einer Pigmentbildung auf Tryptophan-Agar angeregt werden.
2. Jeder Pilz, der zu einer Tryptophan-abhängigen Pigmentbildung befähigt ist, bildet eine Vielzahl unterschiedlicher sichtbarer Pigmente und Fluorochrome. Betrachtet man die Dünnschichtchromatogramme aller hier untersuchten Spezies und Stämme, so stellt man fest, dass aufgrund des Vorhandenseins bestimmter Banden und deren farblicher Intensität unterschiedliche, für den untersuchten Pilz spezifische Pigmentmuster entstanden sind.

3. Möchte man einzelne Banden verschiedener Pilze miteinander vergleichen so besteht die Möglichkeit, entsprechende Fraktionen auf einer DC-Platte nebeneinander aufzutragen und so direkt optisch miteinander zu vergleichen. Um jedoch die Pigmentmuster der einzelnen Pilze objektiv vergleichbar zu machen, wurde eine Datenanalyse durchgeführt. Dabei wurden Laufhöhenunterschiede gleicher Banden statistisch analysiert und durch den neu eingeführten Parameter der relativen Höhe reduziert. So kann eine Aussage über die wahrscheinliche Lokalisation bestimmter Banden getroffen werden. Das hier entwickelte Prinzip könnte einer automatischen Analyse von Pigmentmustern mit Farbscannern als Grundlage dienen.
4. Die Bildung Tryptophan-abhängiger Sekundärmetabolite durch die humanpathogene Hefe *Malassezia furfur* wird mit dem Krankheitsbild der Pityriasis versicolor in Verbindung gebracht. Viele der dabei beschriebenen Pigmente können aber auch durch pflanzenpathogene Brandpilze gebildet werden. So konnte die Bildung immunmodulatorischer Pityriarubine oder des UV-Schutzes Pityriacitrin auch bei den meisten hier untersuchten pflanzenpathogenen Brandpilzen gezeigt werden.
5. Die Fähigkeit zu einer Tryptophan-abhängigen Pigmentbildung an sich stellt somit keine Anpassung des Brandpilzes *Malassezia furfur* an das Hautmilieu des Menschen dar und muss lange vor der Hominisation entstanden sein. Im Gegensatz zu anderen Brandpilzen erfolgt die Bildung Tryptophan-abhängiger Sekundärmetabolite bei *Malassezia furfur* jedoch sehr schnell und in großen Mengen. Diese hohe Aktivität bei der Pigmentbildung durch *Malassezia furfur* trotz seines wahrscheinlichen Übergangs aus einem pflanzenadaptiertem Wirtsmilieu in ein humanes könnte darauf hinweisen, dass der Tryptophan-abhängige Stoffwechselweg bei *Malassezia furfur* immer noch einen großen funktionellen Stellenwert einnimmt.

## 5. Zusammenfassung

Im Jahre 1998 konnten MAYSER ET AL. erstmals nachweisen, dass die Aminosäure L-Tryptophan bei dem Brandpilz *Malassezia furfur* eine Pigmentbildung induziert. Die entstandenen Pigmente und Fluorochrome werden mit dem Krankheitsbild der Pityriasis versicolor in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zu *Malassezia furfur* sind Brandpilze obligate Pflanzenparasiten. Aufgrund der phylogenetischen Klassifikation von *Malassezia furfur* als Brandpilz wurden insgesamt 27 Brandpilze auf Pigmentbildung untersucht und miteinander verglichen. Zunächst wurden alle Spezies auf einem, um Glucose erweiterten Minimalagar mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle verimpft und sowohl Wachstum als auch Pigmentbildung beobachtet. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass außer *Malassezia furfur* auch andere Brandpilze in der Lage sind, Tryptophan-abhängige Pigmentbildung durchzuführen. Von den hier untersuchten 27 Brandpilzen konnten 17 Spezies zur Pigmentbildung auf Tryptophan-Agar angeregt werden. Alle als Pigment-positiv getesteten Spezies wurden nachgezüchtet und präparativ aufbereitet. Der gewonnene Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt und in Fraktionen unterteilt. Anschließend wurden die gewonnenen Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie näher untersucht. Die Dünnschichtchromatogramme der einzelnen Pilzspezies zeigten unterschiedliche, spezifische Pigmentmuster. Um die Dünnschichtchromatogramme miteinander zu vergleichen, wurde für alle Pilze ein Pigmentprofil erstellt, in dem die Banden durch Farbe bei Tages- und unter UV-Licht sowie Laufhöhe und Fraktion der Banden und mögliche pH-Abhängigkeit beschrieben wurden. Einige Banden wurden durch weiterführende Verfahren weiterverarbeitet, aufgereinigt und anschließend eine Strukturaufklärung durchgeführt. Bei der Strukturanalyse konnten die Stoffe Pityriacitrin bei *Ustilago maydis* und *Pseudozyma fusiformata*, Pityriarubin B, Pityriarubin C und Pityriaanhydrid bei *Ustilago maydis*, sowie Malasseziaindol A, Indolmilchsäure und Indol-3-carbaldehyd bei *Pseudozyma fusiformata* nachgewiesen werden.

Um einen indirekten Nachweis einzelner Stoffe zu erhalten, wurden Fraktionen mit entsprechenden Banden nebeneinander aufgetragen und so direkt optisch miteinander verglichen. Häufig auftretende Laufhöhenchwankungen einzelner Banden konnten dadurch minimiert werden. Ein indirekter Nachweis des Lichtschutzes Pityriacitrin konnte hiermit bei allen Spezies erfolgen. Die Pityriarubine A, B und C, die den oxidativen Burst von Granulozyten hemmen, konnten ebenso bei

nahezu allen Spezies gefunden werden. Um die gewonnenen Informationen über die Pigmentmuster der einzelnen Spezies miteinander zu vergleichen, wurde der Versuch einer Datenanalyse unternommen. Es sollte hierbei eine Grundlage geschaffen werden, um die große Menge gewonnener Informationen vergleichbar zu machen und eine relative Vorhersagbarkeit für das Auftreten bestimmter Banden zu treffen. Es wurde für acht Banden das Schwankungsausmaß der Laufhöhen beschrieben und durch den neu eingeführten Parameter der relativen Höhe reduziert. Anschließend wurde die relative Vorhersagbarkeit bestimmter Banden anhand weiterer Pilzspezies überprüft. Die untersuchten Banden befanden sich in dem für sie vorgesehenen Bereich und konnten somit als solche identifiziert werden. Dieses hier entwickelte Prinzip könnte einer in Zukunft automatisch mit Farbscannern durchgeführten Datenanalyse als Grundlage dienen.

## 5.1 Summary

In 1998 MAYSER ET AL. proved for the first time that the amino acid tryptophan induces pigmentogenesis in the yeast *Malassezia furfur*. The use of tryptophan as single nitrogen source induces formation of brown pigmentation which diffuses into the agar. Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* may have an impact on the clinical appearance of pityriasis versicolor. Phylogenetic placement of Ustilaginomycetes determines *Malassezia furfur* as a species of smut fungi. Unlike *Malassezia furfur*, smut fungi are parasites of plants, which rarely cause human disease. Since *Malassezia furfur* is phylogenetically connected with smut fungi, 27 species of smut fungi were explored and compared according to pigmentogenesis. First, all species were cultured on a minimal medium consisting of agar enriched with glucose in which tryptophan was the single nitrogen source. This research showed for the first time that not only human pathogens, but also plant pathogenic fungi are able to produce tryptophan-derived pigments. The 17 species that were tested pigment-positive were processed after 4 weeks of incubation. To obtain pure compounds from the pigment extract, the eluent was collected after column chromatography in six or seven series. The fractions were subsequently examined by thin layer chromatography, which revealed a specific pigment pattern. Both similarities and varieties were observed in structure, existence and intensity of colour of the bands. Bands and substances already known from *Malassezia furfur* were used as an orientation guide. For comparison of the individual thin layer

chromatograms, a pigment profile was established for each fungus, in which the bands were described by colour at daylight and under UV as well as height, fraction and pH dependence. Some bands were analysed by further methods, and finally specific substances were structurally determined. Pityriacitrin was isolated from *Ustilago maydis* and *Pseudozyma fusiformata*. Pityriarubin B, C and Pityriaanhydride were isolated from *Ustilago maydis* as well as Malassezia indole A, indole lactic acid and indole-3-carbaldehyde from *Pseudozyma fusiformata*.

To get an indirect evidence of specific substances, fractions with corresponding bands were compared directly on one thin layer chromatogram, whereby variability in height of the band could be reduced impressively. An indirect evidence of the ultraviolet-absorbing indole alkaloid Pityriacitrin was supplied for each species. Pityriarubin A, B and C, which inhibit respiratory burst in human neutrophils, were found in most of the species. Because of the specificity of the pigment pattern all species were subdivided into four groups.

In order to make the individual pigment patterns of the fungi comparable to one another, an attempt was made to establish a data analysis. At first, height variabilities among the bands were investigated and reduced by the new parameter of relative height. This allowed predictability of certain bands, which was later verified on four other species. All the bands were found in the allocated space. In the future this method could be used for data analysis automatically done by colour scanners.



## **6. Literaturverzeichnis**

**AGROSCOPE FAL RECKENHOLZ:** *Ustilago avenae*.

<http://www.art.admin.ch/themen/00587/00589/00790/index.html?lang=de>

Stand 01.05.2007

**AINSWORTH, G.C.** (1965): *Ustilago maydis* (Descriptions of Fungi and Bacteria). IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 8: 79

**BANDONI, R.J.; JOHRI, B.N.** (1972): Tilletiaria: a new genus in the Ustilaginales. Canadian Journal of Botany 50: 39-43

**BAUER, R.; OBERWINKLER, F.; VAMKY, K.** (1997): Ultrastructural Markers and Systematics in Smut fungi and allied taxa. Canadian Journal of Botany 75: 1273-1314.

**BEGEROW, D., BAUER, R., OBERWINKLER F.** (1997): Phylogenetic studies on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences of smut fungi and related taxa. Canadian Journal of Botany 75: 2045-2056

**BEGEROW, D., BAUER, R., BOEKHOUT T.** (2000): Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. Cambridge Journals, Mycological Research 104: 53-60

**BEGEROW, D., BAUER, R., OBERWINKLER, F.** (2002): The Exobasidiales: An evolutionary hypothesis. Mycological Progress 1: 187-199

**BOEKHOUT, T.** (1991): A revision of ballistoconidia-forming yeasts and fungi Studies in mycology 33:1-194

**BOEKHOUT, T., FELL, J.W., O'DONNELL, K.** (1995): Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the Ustilaginales and Tilletiales. Stud. Mycol. 38: 175-183.

**BOEKHOUT, T., FELL, J.W.** (1998): *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout and a comparison with the yeast state of *Ustilago maydis* (de Candolle) Corda. In C.P. Kurtzman, and J.W. Fell (eds.), *The Yeasts: a Taxonomic Study*. Elsevier Science Publish, Amsterdam, pp. 790-797.

**BÖHLING, N.** (2007): *Ustilago vaillantii*. <http://www.flora-x.de/rei8.html> Stand 30.03.07

**COCKELL, C.S., KNOWLAND, J.** (1999): Ultraviolet radiation screening compounds  
*Biol Rev Camb Philos Soc* 74:311-345

**CRESPO, M.J., ABARCA, M.L., CABANES, F.J.** (2002): Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 45: 333-337

**CURRAH, R.S., STOCKEY, R.A.** (1991): A fossil smut fungus from the anthers of an Eocene angiosperm. *Nature* 350: 698-699

**DARZAU** Hartbrandkrankheit der Gerste. <http://www.darzau.de> Stand 08.08.2006

**DIATCHENKO, L., LUKYANOV, S., LAU, Y.F, SIEBERT, P.D** (1999): Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303:349-380

**DRAGISIC, B., VARICAK, B.,** (1935): Vergleichende Untersuchungen über die toxische Wirkung des wässrigen Extrakts aus *Ustilago maidis* und der Mutterkornpräparate. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 179: 319-326

**EMGENBROICH, D.:** *Ustilago maydis*. <http://www.pilzbestimmung.de/> Stand: 01.05.2007

**EMGENBROICH, D.:** *Exobasidium japonicum*. <http://www.pilzbestimmung.de/> Stand: 01.05.2007

**EICHSTEDT, C.F.** (1846): Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Frorieps neue Notizen aus dem Gebiete der Natur und Heilkunde* 853: 270-271

**FRANTZEN, J.L.** (2006): Die Urpferde der Morgenröte. Ursprung und Evolution der Pferde. Spektrum Akademischer Verlag

**GLAWISCHNIG, E.** (2006): The role of cytochrome P450 enzymes in the biosynthesis of camalexin. *Biochemical Society Transactions* 34: 1206–1208

**GLAZEBROOK, J. & AUSUBEL, F.M.** (1994): Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8955-8959.

**GUILLOT, J., GUEHO, E.,** (1995): The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Anatomie van Leeuwenhoek* 67: 297-314

**GUEHO, E., MIDGLEY, G., GUILLOT, J.** (1996): The genus *Malassezia* with description of four new species. *Anatomie van Leeuwenhoek* 69: 337-335

**GUEHO, E., BOEKHOUT T., ASHBEE, H.R., GUILLOT, J., VAN BELKUM, A., FAERGEMANN, J.** (1998): The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Medical Mycology* 36: 220-229

**GUPTA, V.P.:** sugarcane smut.

<http://www.apsnet.org/online/Archive/2003/IW000024.asp> Stand 01.05.2007

**HORT, W., NILLES, M., MAYSER, P.** (2006): *Malassezia*-Hefen und ihre Bedeutung in der Dermatologie. *Der Hautarzt* Volume 57, Number 7

**ING, B.** (2001): *Exobasidium*. North West fungus group (NWFG) Newsletter (ISSN 1465-8054)

**IRLINGER, B.** (2002): Strukturaufklärung, Biosynthese und Synthese von Sekundärmetaboliten aus Kulturen von *Malassezia furfur*  
Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie

**IRLINGER, B., KRÄMER, H.J., MAYSER, P., STEGLICH, W.** (2004): Pityriarubins, biologically active bis(indolyl)spirans from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Angew Chem Int Ed* 43:1098-1098

**IRLINGER, B., BARTSCH, A., KRÄMER, H.J., MAYSER, P., STEGLICH, W.** (2005): New tryptophan metabolites from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur* *Helvetica Chimica Acta* 88:1472-1485

**KAGAN, I.A., HAMMERSCHMIDT, R.** (2002): Arabidopsis Ecotype Variability in Camalexin Production and Reaction to Infection by *Alternaria brassicicola* *Journal of Chemical Ecology*, Volume 28, Number 11: 2121-2140

**KÄMPER, J. ET AL.** (2006): Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444, 97-101

**KAUFMAN, C.H.** (1996): Head Smut Symptoms on Corn.  
<http://plantpathology.tamu.edu/Textlab/Grains/Corn/hs.html> Stand: 01.05.07

**KENDRICK, B.** (2001): The fifth Kingdom. Fungi as Food – Mycophagy chapter 18.  
<http://www.mycolog.com/chapter18.htm> Stand November 2002

**KRÄMER, H.J., KESSLER, D., STEGLICH, W., MAYSER, P.** (2003): Abstract  
*Arch Dermatol Res* 294, 492

**KRÄMER, H.J., KESSLER, D., HIPLER, U.C., IRLINGER, B., HORT, W., BÖDECKER, R.H., STEGLICH, W., MAYSER, P.**, (2005): Pityriarubins, Novel Highly Selective Inhibitors of Respiratory Burst from Cultures of the Yeast *Malassezia furfur*. Comparison with the Bisindolylmaleimide Arcyriarubin A. *ChemBioChem* 6: 2290 – 2297

**KUNZE, A.** (2006): *Exobasidium vaccinii* (Preiselbeernacktbasidie). Pilzverein Augsburg Königsbrunn e.V.  
<http://www.pilze-augsburg.de/galerie/displayimage.php?album=8&pos=3>  
Stand 01.05.07

**LAHUSEN, T., DE SIERVI, A., KUNICK, C., SENDEROWICZ, A.M.** (2003): Alsterpaullone, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis by activation of caspase-9 due to perturbation in mitochondrial membrane potential. *Molecular Carcinogenesis* 36: 183-194

**MAS, M.T., VERDÚ, A.M.C. GIRBAL, J.** (2006): New report of loose smut (*Ustilago syntherismae*) on *Digitaria sanguinalis* in Spain. *Plant Pathology* 55 (2): 298–298

**MACHOWINSKI, A., KRÄMER, H.J., HORT, W., MAYSER, P.** (2006): Pityriacitrin – a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycosis* 49: 366

**MAYERHOFER, E., DRAGISIC, B.**, (1938): Weiterer Bericht über kindliche Maisbrandvergiftungen (Ustilaginismus) *European Journal of Pediatrics* 59: 543-552

**MAYSER, P., WILLE, G., INKAMPE, A., THOMA, W., ARNOLD, N., MONSEES, T.** (1998): Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as single nitrogen source. *Mycoses* 41:265-271

**MAYSER, P., PAPE, B.** (1998): Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophane derivatives. *Anatomie van Leeuwenhoek* 73: 315-319

**MAYSER, P., SCHÄFER, U., KRÄMER, H.J., IRLINGER, B., STEGLICH, W.** (2002): Pityriacitrin – an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 294:131-134

**MAYSER, P., TÖWS, A., KRÄMER, H.-J., WEIß, R.** (2004): Further characterization of pigment-producing *Malassezia*-strains. *Mycoses* 47:34-39

**MORDUE, J. E. M., WALLER, J. M.** (1981): *Ustilago striiformis* (Descriptions of Fungi and Bacteria) *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria* 72: 717

**MORDUE, J. E. M., WALLER, J. M.** (1981): *Ustilago bullata*. (Descriptions of Fungi and Bacteria) IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 72: 718

**MORDUE, J.E.M.** (1984): *Ustilago vaillantii* (Descriptions of Fungi and Bacteria) IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 81: 810

**MORDUE, J.E.M.** (1984): *Ustilago hypodytes*. (Descriptions of Fungi and Bacteria) IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 81: 809

**MORDUE, J. E. M.** (1991): *Ustilago esculenta* (Descriptions of Fungi and Bacteria) IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 110: 1098

**MORDUE, J. E. M.** (1991): *Ustilago longissima* (Descriptions of Fungi and Bacteria) IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 110: 1099

**MORDUE, J. E. M.** (1995): *Ustilago syntherismae* (Descriptions of Fungi and Bacteria) IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 125: 1249

**Myco-Ual:** *Ustilago cynodontis*, el carbón de la grama  
<http://www.ual.es/GruposInv/myco-ual/galer14.htm> Stand: 01.05.2007

**NIES, S. M.** (2006): Tryptophan-abhängige Synthese von indolhaltigen Pigmenten bei verschiedenen humanpathogenen Asco- und Basidiomyceten. Dissertation, Fachbereich: Medizin, Giessen

**PIEPENBRING, M., STOLL, M., OBERWINKLER, F.** (2002): The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea*, and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). Mycological Progress 1: 71-80

**PIEPENBRING M.**, (2003): Smut Fungi (Ustilaginomycetes P.P. and Microbotryales, Basidiomycota)

**PROTEAU, P. J., GERWICK, W. H., GARCIA-PICHEL, F., CASTENHOLZ, R.** (1993): The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) 49: 825-829

**PUNITHALINGAM, E., WATERSTON, J. M.** (1970): *Ustilago avenae* (Descriptions of Fungi and Bacteria) IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 28: 279

**RASSNER, G.** (2002): Dermatologie Lehrbuch und Atlas 7. Auflage

**SCHLÖSSER, E.** (1997): Allgemeine Phytopathologie 2. Auflage

**SCHIRAWSKI, J., HEINZE, B., WAGENKNECHT, M., KAHMANN, R.** (2005): Mating Type Loci of *Sporisorium reilianum*: Novel Pattern with Three *a* and Multiple *b* Specificities Eukaryotic Cells 4: 1317–1327

**SCHRIER, R.W.** (2006): The Schrier Atlas of Diseases of the Kidney.  
<http://cnserver0.nkf.med.ualberta.ca/cn/Schrier/Default5.htm> Stand 8.05.2007

**SUGITA, T., TAKASHIMA, M., POONWAN, N., MEKHA, N., MALAITHAO, K., HUNGMUTHASAWAT, B., PRASARN, S., LUANGSOOK, P., KUDO, T.** (2003): The first isolation of Ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patients' blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. Microbiol. Immunol. 47: 183-190.

**SCHOLZ, H., SCHOLZ, I.** (1988): Die Brandpilze Deutschlands (Ustilaginales).

**STRASBURGER E., NOLL F., SCHENCK H., SCHIMPER A.F.W.,**  
neubearbeitet von **SITTE P., WEILER E.W., KADEREIT J.W., BRESINSKY A., KÖRNER C.,**  
(2002): Strasburger Lehrbuch der Botanik 35. Auflage: 571-884

**TAJINI, A.:** stripe smut.

<http://www.nilgs.affrc.go.jp/db/diseases/contents/de16.htm#Stripe%20smut>

Stand 01.05.07

**TAIZ, L., ZEIGER, E.** (2000): Physiologie der Pflanzen. Spektrum Akad. Verl., S. 773

**THEIB, H., HÜGEL, B.** (1996): Experimente zur Entwicklungsbiologie der Pflanzen - Phytohormone; Quelle & Meyer, Wiesbaden

- TRINDADE, R.C., RESENDE, M.A., SILVA, C.M., ROSA, C.A.** (2002): Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *System. Appl. Microbiol.* 25: 294-300
- TSUJI, J., JACKSON, E.P., GAGE, D.A., HAMMERSCHMIDT, R., SOMERVILLE, S.C.** (1992): Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae* *Plant Physiol.* 98: 1304–1309
- VANKY, K.** (1994): European smut fungi. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- VÁNKY, K & R. G. SHIVAS** (1998): *Sporisorium anthracoideisporum*. *Mycotaxon* 68: 335; <http://www.phytopathology.net/SmutBase/> Stand 8.05.2007
- VANKY, K.** (2002): Illustrated genera of smut fungi. Second edition. The American phytopathological society, St.Pauli, Minnesota, USA.
- WALLER, J. M., MORDUE, J. E. M.** (1983): *Ustilago hordei* (Descriptions of Fungi and Bacteria) *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria* 75: 749
- WENZEL, M., HAASE, G., MAYSER, P., KRÄMER, H.J., SPITELLER, P.** (2005): Tryptophan-abhängige Pigmentbildung bei *C.glabrata* Vortrag bei 39. Wissenschaftl. Tagung der DMYKG e.V., Leipzig
- WILLE, G** (2000): Synthese und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Schleimpilzen und lipophilen Hefen. [www.Dissertation.de](http://www.Dissertation.de) Verlag im Internet, Berlin Stand 8.05.2007
- WROBLEWSKI, N., BÄR, S., MAYSER, P.** (2005): Missing granulocytic infiltrate in Pityriasis versicolor – indication of specific anti-inflammatory activity of the pathogen *Mycoses* 48 (Suppl.1): 66-71
- ZHAO, J., WILLIAMS, C., LAST, R.L.** (1998): Induction of Arabidopsis Tryptophan Pathway Enzymes and Camalexin by Amino Acid Starvation, Oxidative Stress, and an Abiotic Elicitor. *Plant Cell*, Vol. 10: 359-370



## **7. Liste verwendeter Abkürzungen**

cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DC	Dünnschichtchromatographie
E	Exobasidium
Glc	Glucose
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	indole-3- acetic acid = Indol-3-Essigsäure
M	Malassezia
MPI	Max-Planck-Institut
NMR	nuclear magnetic resonance= Kernresonanzspektroskopie
o.D.	ohne Datum
P	Pseudozyma
PCR	Polymerase Chain Reaction
S	Sporisorium
Spp	Spezies
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
T	Tilletiaria
Trp	Tryptophan
U	Ustilago

## **8. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Phylogenie von Ustilaginomyceten (BEGEROW ET AL., 2000)	3
Abbildung 2:	Pityriasis versicolor (Schrier, 2006)	4
Abbildung 3:	Maisbrand (EMGENBROICH, O. D.)	5
Abbildung 4:	<i>Ustilago cynodontis</i> (Myco-Ual, O. D.)	6
Abbildung 5:	<i>Ustilago striiformis</i> (TAJINI, O. D.)	7
Abbildung 6:	<i>Ustilago syntherismae</i> auf <i>Digitaria sanguinalis</i> (MAS ET AL., 2006)	7
Abbildung 7:	<i>Ustilago esculenta</i> (KENDRICK, 2001)	8
Abbildung 8:	<i>Ustilago hordei</i> (DARAZAU, 2006)	8
Abbildung 9:	<i>Ustilago avenae</i> (AGROSCOPE FAL RECKENHOLZ, O. D.)	9
Abbildung 10:	<i>Ustilago vaillantii</i> (BÖHLING, 2007)	9
Abbildung 11:	<i>Sporisorium scitamineum</i> (GUPTA, O. D.)	11
Abbildung 12:	<i>Sporisorium reilianum</i> (KAUFMAN, 1996)	11
Abbildung 13:	<i>Exobasidium vaccinii</i> (KUNZE, 2006)	12
Abbildung 14:	<i>Exobasidium japonicum</i> (EMGENBROICH, O. D.)	13
Abbildung 15:	Pityriacitrin	14
Abbildung 16:	Pityriarubin A	15
Abbildung 17:	Pityriarubin B	15
Abbildung 18:	Pityriarubin C	15
Abbildung 19:	Pityriaanhydrid	16
Abbildung 20:	Pityrialacton	16
Abbildung 21:	Malassezin	17
Abbildung 22:	Pigmentbildung auf Tryptophan-Agar	29
Abbildung 23a:	Tageslichtaufnahme <i>U. maydis</i>	35
Abbildung 23b:	UV-Licht Aufnahme <i>U. maydis</i>	35
Abbildung 23c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	35
Abbildung 23d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	35
Abbildung 24a:	Tageslichtaufnahme <i>U. vetiveriae</i>	36
Abbildung 24b:	UV-Licht Aufnahme <i>U. vetiveriae</i>	36
Abbildung 24c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	36

Abbildung 24d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	37
Abbildung 25a:	Tageslichtaufnahme <i>U. striiformis</i>	37
Abbildung 25b:	UV-Licht Aufnahme <i>U. striiformis</i>	37
Abbildung 25c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	37
Abbildung 25d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	37
Abbildung 26a:	Tageslichtaufnahme <i>U. esculenta</i>	38
Abbildung 26b:	UV-Licht Aufnahme <i>U. esculenta</i>	38
Abbildung 26c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	38
Abbildung 26d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	38
Abbildung 27a:	Tageslichtaufnahme <i>U. hypodites</i>	39
Abbildung 27b:	UV-Licht Aufnahme <i>U. hypodites</i>	39
Abbildung 27c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	39
Abbildung 27d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	39
Abbildung 28a:	Tageslichtaufnahme <i>U. bullata</i> 146	40
Abbildung 28b:	UV-Licht Aufnahme <i>U. bullata</i> 146	40
Abbildung 28c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	40
Abbildung 28d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	40
Abbildung 29a:	Tageslichtaufnahme <i>U. bullata</i> 558	41
Abbildung 29b:	UV-Licht Aufnahme <i>U. bullata</i> 558	41
Abbildung 29c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	41
Abbildung 29d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	41
Abbildung 30a:	Tageslichtaufnahme <i>U. rabenhorstiana</i>	42
Abbildung 30b:	UV-Licht Aufnahme <i>U. rabenhorstiana</i>	42
Abbildung 30c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	42
Abbildung 30d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	42
Abbildung 31a:	Tageslichtaufnahme <i>U. cynodontis</i>	43
Abbildung 31b:	Tageslichtaufnahme <i>U. cynodontis</i>	43
Abbildung 31c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	43
Abbildung 31d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	43
Abbildung 32a:	Tageslichtaufnahme <i>P. fusiformata</i>	44
Abbildung 32b:	UV-Licht Aufnahme <i>P. fusiformata</i>	44

Abbildung 32c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	44
Abbildung 32d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	44
Abbildung 33a:	Tageslichtaufnahme <i>S. scitamineum</i>	45
Abbildung 33b:	UV-Licht Aufnahme <i>S. scitamineum</i>	45
Abbildung 33c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	45
Abbildung 33d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	45
Abbildung 34a:	Tageslichtaufnahme <i>S. reilianum</i>	46
Abbildung 34b:	UV-Licht Aufnahme <i>S. reilianum</i>	46
Abbildung 34c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	46
Abbildung 34d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	46
Abbildung 35a:	Tageslichtaufnahme <i>E. vaccinii</i>	47
Abbildung 35b:	UV-Licht Aufnahme <i>E. vaccinii</i>	47
Abbildung 35c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	47
Abbildung 35d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	47
Abbildung 36a:	Tageslichtaufnahme <i>E. japonicum</i>	48
Abbildung 36b:	UV-Licht Aufnahme <i>E. japonicum</i>	48
Abbildung 36c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	48
Abbildung 36d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	48
Abbildung 37a:	Tageslichtaufnahme <i>T. anomala</i>	49
Abbildung 37b:	UV-Licht Aufnahme <i>T. anomala</i>	49
Abbildung 37c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	49
Abbildung 37d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	49
Abbildung 38a:	Tageslichtaufnahme <i>M. furfur</i>	50
Abbildung 38b:	UV-Lichtaufnahme <i>M. furfur</i>	50
Abbildung 38c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	50
Abbildung 38d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	50
Abbildung 39a:	Tageslichtaufnahme <i>S. raphidii</i>	51
Abbildung 39b:	UV-Licht Aufnahme <i>S. raphidii</i>	51
Abbildung 39c:	Aufnahme nach Bedampfung mit HCl	51
Abbildung 39d:	Aufnahme nach Bedampfung mit NH <sub>3</sub>	51
Abbildung 40:	HPLC von Pityriacitrin	52

Abbildung 41a:	Tageslicht Aufnahme von Pityriacitrin Banden im Vergleich	54
Abbildung 41b:	UV-Licht Aufnahme von Pityriacitrin Banden im Vergleich	54
Abbildung 42a:	Tageslicht Aufnahme von Pityriacitrin Banden (Ustilago spp.)	55
Abbildung 42b:	UV-Licht Aufnahme von Pityriacitrin Banden (Non Ustilago spp.)	55
Abbildung 43a:	Tageslicht Aufnahme von Pityriarubin A Banden im Vergleich	57
Abbildung 43b:	UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin A Banden im Vergleich	57
Abbildung 44a:	Tageslicht Aufnahme von Pityriarubin B Banden in einem Vergleich ( Ustilago Spezies)	58
Abbildung 44b:	UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin B Banden in einem Vergleich (Ustilago Spezies)	58
Abbildung 45a:	Tages Aufnahme von Pityriarubin B Banden in einem Vergleich (Non Ustilago Spezies)	58
Abbildung 45b:	UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin B Banden in einem Vergleich (Non Ustilago Spezies)	58
Abbildung 46a:	Tageslicht Aufnahme von Pityriarubin C Banden in einem Vergleich (Ustilago Spezies)	59
Abbildung 46b:	UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin C Banden in einem Vergleich (Ustilago Spezies)	59
Abbildung 47a:	Tageslicht Aufnahme von Pityriarubin C Banden unterschiedlicher Spezies in einem Vergleich	59
Abbildung 47b:	UV-Licht Aufnahme von Pityriarubin C Banden unterschiedlicher Spezies in einem Vergleich	59
Abbildung 48:	Darstellung der markanten violetten Bande	60
Abbildung 49:	Für die Datenanalyse verwendete Banden	65
Abbildung 50:	<i>Pseudozyma fusiformata</i> als Repräsentant der Gruppe 1	69
Abbildung 51:	<i>Ustilago maydis</i> als Repräsentant der Gruppe 2	69
Abbildung 52:	<i>Malassezia furfur</i>	70
Abbildung 53:	<i>Ustilago bullata</i> 558 als Repräsentant der Gruppe 4	70

## **9. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Übersicht untersuchter Spezies der Ordnung Ustilaginales	19
Tabelle 2:	Untersuchte Spezies der Ordnung Exobasidiales	20
Tabelle 3:	Untersuchte Spezies der Ordnung Georgefischeriales	20
Tabelle 4:	Einstellung des Linomaten bei der Dünnschichtchromatographie	24

Tabelle 5:	Einstellung des Wincats Programms beim Fotografieren der Dünnschichtplatten.	24
Tabelle 6:	Auflistung bekannter Banden	25
Tabelle 7:	Einstellung des Linomaten zur präparativen Trennung der Fraktionen	26
Tabelle 8:	Pigment-positiv getestete Spezies	30
Tabelle 9:	Pigment-negativ getestete Spezies	31
Tabelle 10:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Ustilago maydis</i>	35
Tabelle 11:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Ustilago vetiveriae</i>	36
Tabelle 12:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Ustilago striiformis</i>	37
Tabelle 13:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Ustilago esculenta</i>	38
Tabelle 14:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Ustilago hypodites</i>	39
Tabelle 15:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Ustilago bullata</i> 146	40
Tabelle 16:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Ustilago bullata</i> 558	41
Tabelle 17:	Detaillierte Bandendarstellung von <i>Ustilago rabenhorstiana</i>	42
Tabelle 18:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Ustilago cynodontis</i>	43
Tabelle 19:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>P. fusiformata</i>	44
Tabelle 20:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Sporisorium scitamineum</i>	45
Tabelle 21:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Sporisorium reilianum</i>	46
Tabelle 22:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Exobasidium vaccinii</i>	47
Tabelle 23:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Exobasidium japonicum</i>	48
Tabelle 24:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Tilletiaria anomala</i>	49
Tabelle 25:	Detaillierte Bandenbeschreibung von <i>Malassezia furfur</i>	50
Tabelle 26:	Übersicht der in Abb. 41a u. 41b dargestellten Spezies	54
Tabelle 27:	Übersicht der in Abb. 42a u 42b dargestellten Spezies	55
Tabelle 28:	Übersicht der in Abb. 43a u 43b dargestellten Spezies	57
Tabelle 29:	Datenanalyse bekannter Banden	63
Tabelle 30:	Datenanalyse unbekannter Banden	65
Tabelle 31:	Untersuchung von Banden anderer Pilzspezies	67

## 10. Anhang

### 10.1 Für die Datenanalyse verwendete Dünnschichtchromatogramme anderer Spezies



*Exophiala sarcinomuriformis*



*Aureobasidium spp.*



*Candida lambica*



*Candida blankii*



**10.2 Beispiel eines für die Rasteranalyse verwendeten Rasters  
(Kästchenhöhe von 0,5 cm)**


### 10.3 Rohdatenlisting für Datenanalyse

Pilz	Pityriacitrin		Pityriarubin A			Pityriarubin B			Pityriarubin C			Pityriaanhydrid		
	Fraktion	Höhe mm	Fraktion	Höhe mm	Höhe rel	Fraktion	Höhe mm	Höhe rel	Fraktion	Höhe mm	Höhe rel	Fraktion	Höhe mm	Höhe rel
<i>U. striformis</i>	4,5	22	4	24	1,09	4	41	1,86	4,5	53	2,41	4	71	3,23
<i>U. rabenhorst</i>	4	23	3	25	1,09	4	44	1,91	4,5	54	2,35	3	72	3,13
<i>U. bullata</i> 558	6	23	4,5	25	1,09				6	57	2,48	5	73	3,17
<i>U. maydis</i>	4	20	3	22	1,1	4	40	2	4,5	50	2,5	4	68	3,4
<i>U. bullata</i> 146	4,5	25	3	27	1,08	4,5	49	1,96	5,6	60	2,4	3	75	3
<i>U. hypodites</i>	5	18	3	19	1,06	3,4	38	2,11	6	51	2,83	2,3,4	67	3,72
<i>U. esculenta</i>	5	23	4	24	1,04	5	46	2				4	75	3,26
<i>U. cynodontis</i>	5	23	3,4	25	1,09	5	45	1,96	5,6	56	2,43	4,5	72	3,13
<i>P. fusiformata</i>	4	20	3	21	1,05	4	42	2,1	5	54	2,7	3	72	3,6
<i>M. furfur</i>	3,4	21	2	23	1,1	3	40	1,9	4	51	2,43	3	71	3,38
<i>S. scitamineum</i>	6	20	4	20	1	4,5,6	41	2,05	7	54	2,7	5	73	3,65
<i>U. vetiveriae</i>	5	17	4	18	1,06	4,5	38	2,24	6	51	3	4	70	4,12

<i>E. japonicum</i>	6	17	5	18	1,06	5,6	38	2,24				5	69	4,06
<i>E. vaccinii</i>	5	23	2,3	24	1,04	2,3	45	1,96	5	61	2,65	3	82	3,56
<i>T. anomala</i>	4,5	26	4	29	1,12	4	49	1,88	5	61	2,34	4	80	3,08
<i>S. reilianum</i>	4,5	27	3	32	1,19	4	49	1,81	5	61	2,26	4	79	2,92
Mittelwert		21,75		23,5	1,07875		43	1,998666 67		55,285 7143	2,534285 71		73,06 25	3,40062 5
Standardabweichung		2,97769 486		3,86436 713	0,04209 117		4,03555 625	0,128944 43		4,0842 7701	0,211030 96		4,25	0,35822 653

Spezies	Pityriacitrin Rf-Wert	Pityriarubin A Rf-Wert	Pityriarubin A rel. Rf-Wert	Pityriarubin B Rf-Wert	Pityriarubin C rel. Rf-Wert	Pityriarubin C Rf-Wert	Pityriarubin C rel. Rf-Wert	Pityriaanhydrid Rf-Wert	Pityriaanhydrid rel. Rf-Wert
<i>U. striiformis</i>	0,14	0,15	1,071	0,26	1,857	0,33	2,357	0,45	3,214
<i>U. rabenhorstiana</i>	0,14	0,15	1,071	0,27	1,929	0,33	2,357	0,45	3,214
<i>U. bullata 558</i>	0,14	0,15	1,071			0,36	2,571	0,46	3,286
<i>U. maydis</i>	0,13	0,14	1,077	0,25	1,923	0,32	2,462	0,43	3,308
<i>U. bullata 146</i>	0,16	0,18	1,125	0,31	1,936	0,38	2,375	0,47	2,936
<i>U. hypodites</i>	0,11	0,11	1	0,24	2,182	0,31	2,818	0,42	3,818
<i>U. esculenta</i>	0,14	0,15	1,071	0,28	2			0,47	3,357
<i>U. cynodontis</i>	0,14	0,15	1,071	0,28	2	0,36	2,571	0,46	3,286
<i>P. fusiformata</i>	0,13	0,13	1	0,26	2	0,34	2,615	0,46	3,538
<i>M. furfur</i>	0,13	0,15	1,154	0,26	2	0,32	2,462	0,44	3,385
<i>S. scitamineum</i>	0,13	0,13	1	0,26	2	0,35	2,69	0,45	3,462
<i>U. vetiveriae</i>	0,11	0,12	1,09	0,24	2,181	0,32	2,909	0,45	4,09
<i>E. japonicum</i>	0,1	0,11	1,1	0,24	2,4			0,43	4,3
<i>E. vaccinii</i>	0,15	0,16	1,07	0,28	1,87	0,38	2,53	0,52	3,46

<i>T. anomala</i>	0,16	0,18	1,125	0,3	1,875	0,39	2,438	0,5	3,125
<i>S. reilianum</i>	0,17	0,19	1,118	0,31	1,824	0,39	2,294	0,49	2,882
Mittelwert	0,13625	0,146875	1,075875	0,26933333	1,99846667	0,34857143	2,53207143	0,459375	3,4163125
Standardabweichung	0,01892969	0,02358495	0,04539585	0,02374467	0,15233087	0,02824539	0,17974403	0,02644964	0,37841965

Spezies	Pityriacitrin		tiefes Violett			hohes Violett			tiefes Blau			hohes Gelb		
	Fraktion	Höhe mm	Fraktion	Höhe mm	Höhe rel.	Fraktion	Höhe mm	Höhe rel.	Fraktion	Höhe mm	Höhe rel.	Fraktion	Höhe mm	Höhe rel.
<i>U. striformis</i>	4,5	22	3,4	30	1,37	3	48	2,18	4,5	8	0,37	6	63	2,86
<i>U. rabenhorst</i>	4	23	2,3,4	26	1,13	3,4	50	2,17	3,4	7	0,3	5	65	2,83
<i>U. bullata 558</i>	6	23	2,3,4,5	30	1,3	4,5	54	2,34	5	7	0,3			
<i>U. maydis</i>	4	20							4	6	0,3	5,6	60	3
<i>U. bullata 146</i>	4,5	25	2,3,4	30	1,2	3,4	55	2,2	4	7	0,28	6	70	2,8
<i>U. hypodites</i>	5	18	2,3,4	23	1,28	3,4	46	2,56	4	6	0,33	6	62	3,44
<i>U. esculenta</i>	5	23	3,4,5	28	1,22	4,5	54	2,35	4,5	7	0,3	6	68	2,96

<i>U. cynodontis</i>	5	23	5	26	1,13	4,5	52	2,26	5	7	0,3	6	65	2,83
<i>P. fusiformata</i>	4	20	1,2,3,4	24	1,2	3,4	50	2,5	3,4	7	0,35	5,6	64	3,2
<i>M. furfur</i>	3,4	21	1,2,3	26	1,24	3	48	2,29	3	7	0,33	4,5	61	2,9
<i>S. scitamineum</i>	6	20	2,3,4,5,6	26	1,3	4,5,6	49	2,45	4,5	7	0,35	7	67	3,35
<i>U. vetiveriae</i>	5	17	2,3,4,5	25	1,47	4,5	46	2,71	4,5	6	0,35	6	63	3,7
<i>E. japonicum</i>	6	17	3,4,5,6	21	1,24	5,6	44	2,59	5,6	6	0,35	6	61	2,9
<i>E. Vaccinii</i>	5	23	2,3	31	1,35	2,3	55	2,39				4	73	3,17
<i>T. anomala</i>	4,5	26	2,3,4	35	1,35	4	58	2,23	4	8	0,31	5	71	2,73
<i>S. reilianum</i>	4,5	27	2,3,4	35	1,3	4	59	2,19	4	8	0,3	5	71	2,63
Mittelwert		21,75		27,7333333	1,272		51,2	2,36066667		6,93333333	0,32133333		65,6	3,02
Standard abweichung		2,97769486		4,07898213	0,09213344		4,52295731	0,16888147		0,70373155	0,02722044		4,17133072	0,29493341

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Peter Karl Mayer

Geburtsdatum: 07.05.1976

Geburtsort: Zabrze / Polen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: verheiratet

## Schulbildung:

Aug. 1982 – Juni 1986 **Albert Schweitzer Grundschule in Siegen**

Aug. 1986 – Juli 1992 **Realschule Am Schießberg in Siegen**

Aug. 1992 – Juli 1995 **Friedrich Flick Gymnasium in Kreuztal**  
Abitur

## Zivildienst

Sept. 1995 – Okt. 1996 Rehabilitationseinrichtung für psychisch  
Kranke in Siegen

## Studium / Ausbildung:

Okt. 1996 – Juli 1997 **Universität Münster**  
Studium klassische Sinologie

Okt. 1997 – Juli 1998 **Universität Heidelberg**  
Studium moderne Sinologie

Sept. 1998 – Juli 1999 **National Sun Yat-sen University Taiwan**  
Studium moderne Sinologie

Sept. 1999 – Juli 2000 **Shanghai University of Traditional Chinese  
Medicine**

Okt. 2000 – Okt. 2006 **JLU Giessen**  
Studium Traditionelle Chinesische Medizin  
Studium der Humanmedizin

Giessen, den 24.07.2007

## **Danksagung**

Hiermit danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für die stets gute Zusammenarbeit.

Allen voran möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Mayser für die Anregung zur Durchführung dieser Arbeit, seine ständige Ermutigung und Motivation sowie für seine kontinuierliche und großzügige Unterstützung danken.

Herrn Dr. H.-J. Krämer, der mit seiner Kompetenz und Geduld diese Dissertation hervorragend betreute. Sein Einsatz und Engagement trug wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Ebenso möchte ich ganz herzlich Frau Förste danken, die bei der Durchführung von Laborarbeiten stets eine große Unterstützung war, sowie allen Mitdoktoranden, insbesondere Philipp und Maja für die tolle Arbeitsatmosphäre und gegenseitige Unterstützung.

Herrn Dr. Peter Spittler und Dipl.-Chem. Bernhard Kindler (TU München) für die Analyse der aufgereinigten Substanzen.

Herrn Prof. Dr. Begerow (Ruhr Universität Bochum, Fakultät für Biologie), der für diese Untersuchung Pilze aus seiner Sammlung zur Verfügung gestellt und sequenziert hat.

Dem Max-Planck-Institut Marburg, Abteilung für terrestrische Mikrobiologie (Direktorin Prof. Kahmann) möchte für die Bereitstellung und Sequenzierung von Pilzen danken.

Herrn Dr. R.H. Bödecker (JLU-Giessen, Arbeitsgruppe Statistik) für die Anregungen bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützte und mir sehr viel Verständnis und Geduld entgegengebracht hat sowie meinen Eltern und Schwiegereltern für die Motivation und Unterstützung.