

**Überprüfung der Tyrosinasehemmung von extrahierten
Metaboliten des Tryptophanstoffwechsels von *Malassezia furfur* in
vivo an humaner Epidermis mittels der Dopa-Reaktion von Bloch**

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

vorgelegt von Marlene Trinkaus
aus Bad Hersfeld

Giessen 2010

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH
Standort Giessen

Direktor:
Prof. Dr. med. Matthias Goebeler

Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Mayser
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Geyer
Tag der Disputation: 04.02.2011

Liste verwendeter Abkürzungen:

CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, NL
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
<i>M.</i>	<i>Malassezia</i>
TEA	Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure (10:5:3, verwendet als Laufmittel bei DC)
Trp	Tryptophan
z.B.	zum Beispiel
bzw.	beziehungsweise

Folgende Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Abstracts (Poster bzw. Vorträge):

- 1) Thoma, W., Trinkaus, M., Mayser, P.: Identifikation eines Tyrosinase-Inhibitors im Stoffwechsel von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 43: 264, 2000 (Poster).
- 2) Thoma, W., Trinkaus, M., Mayser, P.: Tyrosinaseinhibition durch Stoffwechselprodukte von *M. furfur*. *Z. Haut Geschlechtskr.* 75: 473, 2000 (Poster).

GLIEDERUNG

1. EINLEITUNG	7
1.1. Malassezia-Hefen.....	7
1.1.1. <i>Malassezia</i>-Spezies und ihre Differenzierung	7
1.1.2. Morphologie	9
1.1.3. Kultur	11
1.1.4. Epidemiologie	12
1.1.5. <i>Malassezia</i>-assoziierte Erkrankungen und Virulenzfaktoren der Hefe.	14
1.1.6. Bildung von Pigmenten durch <i>Malassezia</i>-Hefen.....	16
1.2. Pityriasis versicolor	21
1.2.1. Krankheitsbild	21
1.2.2. Diagnostik	23
1.2.3. Epidemiologie, Prädispositionsfaktoren und Pathogenese.....	25
1.2.4. Thesen zur Erklärung der Hyper- und Depigmentierung	28
1.2.5. Therapie	33
1.3. Biologie des Pigmentsystems.....	34
1.3.1. Die Pigmentzellen der Haut.....	34
1.3.2. Biosyntheseweg der Melanogenese	37
1.4. Die Bedeutung der Dopa-Reaktion	40
2. HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG	43
3. METHODIK UND MATERIAL	46
3.1 Anzucht und Kultur der <i>Malassezia</i>-Hefen	46
3.2 Gewinnung des Rohextrakts	48
3.3 Säulenchromatographie.....	48
3.4 Dünnschichtchromatographie.....	50

3.5. Aufreinigung	52
3.6. Einfluß der Metabolite auf Pilz-Tyrosinase (<i>in vitro</i>-Enzymversuch).....	52
Überprüfen der Säulenfraktionen sowie der Dünnschichtbanden auf Hemmwirkung	
3.7. Untersuchungen an humaner Epidemis.....	55
3.7.1. Dopa-Reaktion	55
3.7.2. Standardisierung der Konzentrationen der Pilzkulturextrakte	58
3.7.3. Optimierung der Dopa-Konzentrationen.....	60
3.7.4. Einfluß des Lösungsmittels DMSO auf die Dopa-Reaktion	61
3.7.5. Kompetitive Reaktion mit extern zugesetzter Tyrosinase.....	61
3.8. Weitere histologische Aufarbeitung der Epidermisproben.....	62
3.8.1. Auswaschen und Entwässern	62
3.8.2. Paraffineinbettung	63
3.8.3. Ausgießen der Präparate	64
3.8.4. Schneiden am Mikrotom.....	65
3.8.5. Aufziehen der Schnitte und Vorbereitung zur Färbung	66
3.8.6. Färben der Schnitte.....	67
3.8.7. Einschließen von wasserfreien Präparaten.....	69
3.9. Statistische Methoden	70
3.9.1. Datenerfassung	70
3.9.2. Statistische Auswertung.....	70
4. ERGEBNISSE	73
4.1. Aufarbeitung des Rohextraktes	73
4.1.1. Säulenchromatographie.....	73
4.1.2. Dünnschichtchromatographie.....	75
4.2. Untersuchung der Tyrosinasehemmung <i>in vitro</i>	84
4.3. Hautversuche	91
4.3.1. Allgemeines	91

4.3.2. Vergleichbarkeit der Schnitte	91
4.3.3. Optimum der L-Dopa-Konzentration für die Dopa-Reaktion von Bloch an Hautproben	92
4.3.4. Untersuchung des Einflusses des Lösungsmittels DMSO auf die Untersuchungsergebnisse der Hautversuche.....	95
4.3.5. Versuche zur Hemmwirkung der aus Pilzkulturen extrahierten Stoffe an Hautproben mittels der Dopa-Reaktion von Bloch.....	96
4.3.6. Untersuchung der Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung der Tyrosinase in den Melanozyten durch Zugabe von externer Tyrosinase	119
4.4 Melanozytenanzahl in Abhängigkeit vom Alter	137
4.5. Melanozytenanzahl in Abhängigkeit von der Lokalisation.....	139
4.6. Melanozytenzahl in Abhängigkeit zum Geschlecht	139
DISKUSSION	140
ZUSAMMENFASSUNG.....	150
LITERATURVERZEICHNIS	153

1. EINLEITUNG

1.1. *Malassezia*-Hefen

1.1.1. *Malassezia*-Spezies und ihre Differenzierung

Malassezia furfur ist schon 1846 von Eichstedt erstmals beschrieben worden und wurde von Robin (1853) *Mikrosporon furfur* genannt. Daraufhin folgten eine ganze Reihe weiterer Arbeiten über dieses Thema. So beschrieb Malassez (1874) „hefeähnliche Zellen in Kopfschuppen“, die er als „Sporen“ bezeichnete. Bizzozero sprach (1884) von Hefen ähnlich den „Sporen von Malassez“, die er aus menschlichen epidermalen Schuppen („Mikrophyten der normalen Oberhaut“) isolieren konnte. Es existierten in der Vergangenheit durch Beobachtungen der Morphologie isolierter Hefen -hauptsächlich wegen der Unkenntnis der obligatorischen Lipidabhängigkeit- eine Vielzahl von Namen und Differenzierungen (Rivolta, 1873; Castellani, 1908; Dold, 1910; Castellani und Chalmers, 1913; Panja, 1927; Benedek, 1930; Vuillemin, 1931). So wurde z.B. aufgrund der Hyphen- und Hefenform zwei verschiedene Gattungen des gleichen Mikroorganismus differenziert. Aufgrund fehlender Möglichkeiten, den Organismus zu kultivieren, konnte nicht erkannt werden, daß beide Merkmale von einem Mikroorganismus produziert werden. Baillon (1889) erkannte die Gattung *Malassezia* und beschrieb die Spezies *Malassezia furfur* als Ursache der Erkrankung Pityriasis versicolor, in welcher Hefen und Hyphen beobachtet wurden. Sabouraud (1904) führte eine detaillierte Studie über die „Sporen von Malassez“ durch. Er fand heraus, daß die Hefezellen variabel seien einschließlich kugelig, ovaler und elongierter Formen und schlug die binomiale *Pityrosporum malassezi* (= die Spore der Schuppe von Malassez) vor. Castellani und Chalmers kombinierten diese Namen (1913) aufgrund des mikromorphologischen Bildes des Erregers zu *Pityrosporum ovale*. Gordon isolierte 1951 (a) lipophile Hefen aus epidermalen Schuppen, die er *Pityrosporum orbiculare* nannte.

Es existierten also in den 50er Jahren als Folge einer langen historischen Entwicklung drei zur menschlichen Haut gehörende Spezies:

- 1.) *Malassezia furfur* (Robin, 1853) als nicht kultivierbarer Erreger der Pityriasis versicolor.
- 2.) *Pityrosporum ovale* (Castellani und Chalmers, 1913) als Bestandteil der kutanen Mikroflora von fraglich pathogener Bedeutung.

3.) *Pityrosporum orbiculare* (Gordon, 1951 [b]) als Bestandteil der residenten Hautflora mit einer möglichen Beziehung zu dem Erreger der Pityriasis versicolor und mit einer Sonderstellung, da nicht obligat lipidabhängig.

Neben morphologischen Unterschieden zeigten die Formen *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* auch unterschiedliche Kultivierungsanforderungen (Marples, 1965; Meinhof und Braun-Falco, 1967; Allen et al., 1976; Alteras und Eliazar, 1979) und elektronenmikroskopische Unterschiede in Zahl und Volumen der Mitochondrien (Keddie, 1974). Auf der anderen Seite wurden viele Gemeinsamkeiten festgestellt. Beide sind lipophile Hefen, haben gleiche Isolierungsbedingungen (Shifrine und Marr, 1963; Wilde und Stewart, 1968; Nazzaro-Porro et al., 1976) und pflanzen sich asexuell fort bei unipolarer Vermehrung durch Sprossung. Hier ist ein kennzeichnendes Merkmal die wiederholte monopolare oder sympodiale Sprossung unter Ausbildung einer Collarette (Kette) (Yarrow und Ahearn, 1984; Simmons und Guého, 1990). In Seren von Individuen, von denen *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* isoliert werden konnten, wurden hohe Antikörpertiter gegen beide Formen gefunden. Sie besitzen eine enge immunologische Verwandtschaft. Beide sind resistent gegen 1,4 bis 3,5 mmol/l Cycloheximid. Solche Ähnlichkeiten veranlaßte Slooff (1970) und andere Autoren zu der noch heute gültigen Annahme, daß die beiden Hefeformen als eine Spezies (*Malassezia furfur* der Gattung *Malassezia*) angesehen werden können.

Noch 1984 wurde die Gattung *Malassezia* in zwei Spezies eingeteilt: *M. furfur*, von der angenommen wurde, daß sie pathologisch für den Menschen ist und *M. pachydermatis*, welche bei fehlender Lipidabhängigkeit einfacher zu kultivieren war und welcher eine Pathogenität bei Tieren zugesprochen wurde (Yarrow und Ahearn, 1984). Eine dritte Spezies, *M. sympodialis*, wurde aufgrund von genomischen Unterschieden 1990 differenziert (Simmons und Guého, 1990).

1996 wurden sieben verschiedene Spezies der Gattung *Malassezia* unterschieden, deren Differenzierung aufgrund morphologischer, physiologischer und molekularbiologischer Kriterien erfolgte und nicht aufgrund einer Assoziation zu verschiedenen Krankheitsbildern (Guého et al., 1996). Seither wurden sieben weitere Spezies differenziert, die sich hauptsächlich auf molekulargenetische Daten beziehen (Charakterisierung der ribosomalen DNA, d.h. der DNA, die die Gene für ribosomale RNA enthalten). Die Einteilung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Spezies-Einteilung von Hefen der Gattung *Malassezia*

Spezies	Erstbeschreiber	Nummer des Referenzstammes
<i>M. furfur</i>	Baillon 1889	CBS 1878 ^{NT} CBS 7019 ^{NT}
<i>M. pachydermatis</i>	Dodge 1935	CBS 1879 ^{NT}
<i>M. sympodialis</i>	Simmons et Gueho 1990	CBS 7222 ^T
<i>M. globosa</i>	Guého et al., 1996	CBS 7966 ^T
<i>M. obtusa</i>	Guého et al., 1996	CBS 7876 ^T
<i>M. restricta</i>	Guého et al., 1996	CBS 7877 ^T
<i>M. slooffiae</i>	Guého et al., 1996	CBS 7956 ^T
<i>M. dermatis</i> *	Sugita et al. 2002	
<i>M. equi</i> *	Nell et al. 2002	
<i>M. japonica</i> *	Sugita et al. 2003	
<i>M. yamatoensis</i> *	Sugita et al. 2004	
<i>M. nana</i> *	Hirai et al. 2004	
<i>M. caprae</i> *	Cabañes et al., 2007	
<i>M. equina</i> *	Cabañes et al., 2007	

* basieren hauptsächlich auf genetischen Daten

Bei *Malassezia*-Spezies handelt es sich um ubiquitär verbreitete obligat lipidabhängige Hefen mit instabiler Morphologie, die sowohl als Bestandteil der physiologischen Mikroflora der menschlichen Haut und der Haut vieler Warmblüter vorkommen als auch unter bestimmten Bedingungen als Erreger unterschiedlicher Hauterkrankungen.

1.1.2. Morphologie

Die *Malassezia*-Hefen zeigen morphologisch eine große Variation. So finden sich runde (2,5-5,5µm im Durchmesser), ovale (1,5-2,5µm x 2,0-4,0µm) oder zylindrische (2,5 x 10-25µm) Sproßzellen (Guého et al., 1996). Sie zeigen eine lichtmikroskopisch sichtbare monopolare oder sympodiale Knospung mit Formation einer Kette (Simmons und Gueho, 1990). In verschiedenen Untersuchungen wurde ein Übergang von der runden zur ovalen Form in der Subkultur beobachtet (Gordon, 1951 [a]; Slooff, 1970; Salkin und Gordon, 1977), was zu der Äußerung führte, daß die beiden Formen „Entwicklungsstufen im komplexen

Entwicklungskreislauf einer Spezies sind“ (Guého et al., 1996). Es wurden aber auch *in vitro* stabile Varianten beobachtet (Roberts, 1969 [c]; Midgley, 1989). Faergemann erkannte 1997, daß unter dem Einfluß prädisponierender Faktoren die ovale von der rundzelligen Blastosporenform in die Myzelform übergeht. Diese Arbeiten veranlaßten die Autoren, durch Genanalysen abgesichert, die Formen als identisch anzusehen. Cunningham et al. konnten 1990 drei morphologisch unterschiedliche Formen von *Malassezia furfur* nach Zelloberflächenantigenen unterteilen, welche er Serovar A, B und C nannte. Dabei galt Serovar A als weniger anspruchsvoll, verbreitete sich besser über Brust und Rücken. Serovar B und C hatten hingegen keine Vorlieben. Kein Serovar war mit einer Erkrankung besonders assoziiert. Die Mikromorphologie erwies sich als sehr instabil, war beispielsweise stark abhängig vom verwendeten Medium. Auch heute ist also keine ausreichende Taxonomie zu erhalten. Auch immunologische und molekularbiologische Methoden (Guého et al., 1996) zeigten hohe Varianz der Mikromorphologie. Auch Guého konnte also die genaue Beziehung von *Malassezia furfur* zu *Pityrosporum orbiculare* und *Pityrosporum ovale* nicht klären.

Wichtig für weitere immunologische Untersuchungen war der Aufbau der Zellhülle (Simmons und Ahearn, 1987; Mittag, 1995). Sie zeigt in allen Spezies eine einheitliche Struktur. Es handelt sich hierbei um eine 0,12µm dicke, mehrschichtige Zellhülle mit spiraligem Aufbau (Swift und Dunbar, 1965; Keddie, 1967; Breathnach et al., 1975; Guillot und Guého, 1995) bestehend aus der Außenlamelle, der mehrschichtig multilamellös untergliederten Wand und der Plasmamembran. Charakteristisch ist ein zur Oberfläche vertikales, schon lichtmikroskopisch erkennbares (Slooff, 1970) Streifenmuster in den inneren Wandabschnitten, welches einer spiraligen Struktur entspricht. Die Konstruktion der gesamten Zellhülle mit dem hohen Lipidanteil von 15% (Thompson und Colvin, 1970) ist vermutlich für die hohe Resistenz gegenüber äußerer Einflüsse verantwortlich, so beispielsweise für die hohe mechanische Stabilität und die Osmoresistenz (Brotherton 1967 [a]). Zudem erweisen sich die Lipide als wichtiger Pathogenitätsfaktor des Pilzes. So scheint die Lipidschicht *Malassezia* vor Phagozytose zu schützen und reguliert die entzündliche Immunantwort herunter (Kesavan et al., 2000). Zudem wird die Adhäsion an Wirtszellen von der Hydrophobizität der lipidreichen Zellwand vermittelt.

Die Pilzzellen sind mikroskopisch schon im Nativpräparat von gesunder Haut zu erkennen. Durch Zusatz von 20-30% NaOH und Tinte verbessert sich die Aussage der Mikroskopie, da die Zellen die Tinte sofort aufnehmen und sich blau gegen den klaren Hintergrund abheben (Cohen, 1954).

Die Teleomorphe der *Malassezia*-Hefen ist nicht bekannt. Aufgrund oben genannter Charakteristika wie des multilamellären Aufbaus der Zellhülle, der Fähigkeit Harnstoff abzubauen (Simmons und Ahearn, 1987) und einer positiven Diazoniumblau-Reaktion (Slooff, 1970; Hagler und Ahearn, 1981) zählt der Erreger zu den Basidiomyceten innerhalb der Familie der *Filobasidiaceae* (Yarrow und Ahearn, 1984). Genetische Studien konnten diese taxonomische Einordnung bestätigen (Guillot und Guého, 1995).

1.1.3. Kultur

Erst 1951 gelang es Gordon, die *Malassezia*-Spezies aus Hautschuppen von Patienten mit Pityriasis versicolor und aus Schuppen von gesunder Haut zu züchten (Gordon, 1951 [b]). Für die Anzucht war die Kenntnis der Lipidbedürftigkeit des Erregers von großer Bedeutung, die bereits 1933 von Ota und Huang erkannt wurde. Die Kulturbedingungen sind nicht für alle Spezies identisch, insbesondere *M. globosa*, *M. restricta* und *M. obtusa* gelten schwer anzüchtbar (Hort et al., 2006). Um die lipophile Hefe zu isolieren, benötigt man gesättigte Fettsäuren mit >12 Kohlenstoffatomen (Shifrine und Marr, 1963; Wilde und Steward, 1968; Nazzaro-Porro et al., 1976), indem man z.B. Olivenöl zum Kulturmedium hinzufügt. Längerkettige Fettsäuren können aus mittelkettigen synthetisiert werden, eine Umwandlung von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren ist möglich (Nazzaro-Porro et al., 1976). Mit Ausnahme von *M. pachydermatis* benötigen alle *Malassezia*-Spezies diese langkettigen Fettsäuren (Mayser et al., 1998 [a]). Die Hefe kann also aus Schuppenmaterial oder Abstrichen auf lipidhaltigen Medien wie z.B. Sabouraud-Dextrose-Agar oder Spezialnährböden wie z.B. Leeming-Notman-Agar (Leeming und Notman, 1987) oder Dixon-Agar, welcher als Lipidquelle Glycerolmonooleat enthält (Van Abbe, 1964), gezüchtet werden. Auf letzterem bilden sich cremefarbene, gelbliche Kolonien mit fruchtig-hefigem Geruch (Van Abbe, 1964; Labows et al., 1975). Dieser Geruch wurde später der ätherischen Substanz Gamma-Decalactone zugeschrieben (Labows et al., 1979). Das Wachstumsoptimum liegt bei einer Temperatur von 32-37°C und für einem pH-Wert von 5,5-6,5. Cycloheximid mit einer Konzentration von 1,4 bis 3,5 mmol/l muss hinzugefügt werden, um Kontaminationen der Kultur zu verhindern. Als Referenzstämme gelten heute CBS 1878 (ATCC 14521) als neotype Kultur ovoider Zellen, die von einer Pityriasis capitis isoliert wurden und CBS 7019 als neotype Kultur von *M. furfur*.

Das Hyphenstadium ist schwer in der Kultur zu induzieren, wurde jedoch auch in primären Kulturen beobachtet (Gordon, 1951 [a]; Guého et al., 1996). Dorn und Roehnert (1977) waren

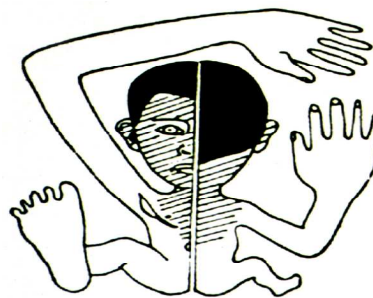
erfolgreich, indem sie zum Kulturmedium Glycin hinzufügten. Nazzaro-Porro et al. (1977) nutzten ein Medium, was aus Cholesterin und Cholesterinestern bestand. Faergemann und Bernander (1981) induzierten Hyphenwachstum unter ansteigendem Kohlendioxidpartialdruck und beobachteten filamentöses Wachstum von *Pityrosporum ovale* auf menschlichem Stratum corneum *in vitro*. Die meisten Hyphen wurden von *Pityrosporum ovale* ATCC 44341 und ATCC 44031 produziert, beide heute klassifiziert als *M. sympodialis* (Saadat-zadeh et al., 2001). Bei *M. globosa*, welche als krankheitserregendes Agens für die Erkrankung Pityriasis versicolor vermutet wurde (Crespo-Erichaga et al., 2000), konnte bisher kein Myzelwachstum *in vitro* induziert werden. Zusammenfassend ist über das Hyphenstadium noch wenig bekannt. Da sie zu 100 % in Läsionen von Pityriasis versicolor und zu 42% in der nicht-betroffenen Haut Erkrankter am Stamm und zu 50 % am Kopf beobachtet wurden, wird ihnen, wie schon 1846 von Eichstedt vermutet, eine entscheidene Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zugesprochen. In 6-7% wurden sie jedoch auch auf gesunder Haut beobachtet (McGinley et al., 1975).

1.1.4. Epidemiologie

Die Lipidabhängigkeit erklärt, warum *Malassezia*-Hefen mit Vorliebe auf Hautregionen lokalisiert sind, die reich an Talgdrüsen sind (Marples, 1965). Auf gesunder Haut findet der Erreger sich am häufigsten auf seborrhoischen Arealen der Körperoberfläche wie Kapillitium, Gesicht sowie vorderem und hinterem oberem Stamm (Roberts, 1969 [c]; Salkin und Gordon, 1977; Faergemann, 1985) (Abb 1). Die Extremitäten sind mit Ausnahme der Ellenbeugen geringer besiedelt (Faergemann et al., 1983) und an Händen und Füßen ist er nur äußerst selten zu finden (Leeming et al., 1989). Kultiviert werden kann der Erreger aber von fast allen Körperstellen (Gordon, 1951 [b]; Faergemann et al., 1983). Die Erreger konzentrieren sich besonders in den Öffnungen der Talgdrüsenfollikel. Ein weiterer Einflußfaktor ist die Feuchtigkeit der Hautoberfläche beispielsweise durch übermäßiges Schwitzen (wie z.B. bei vegetativer Dystonie, Hyperthyreose und Tuberkulose). Die Besiedelung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen, sie ist aber von Mensch zu Mensch stark variabel (Whitlock, 1953; Roberts, 1969 [a]; Noble und Midgley, 1978; Noble, 1981). Die Besiedelungsdichte der Haut variiert mit dem Alter, was ebenfalls mit der jeweiligen Lipidzusammensetzung der Haut erklärt wird. Bei Neugeborenen findet sich die Hefe nicht, es sei denn, es handelte sich um Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht <1000g und langer Hospitalisation auf der Intensivstation, wobei die Besiedelungsdichte bei Therapie mit

Antibiotika und parenteraler Ernährung mit Fettemulsionen noch ansteigt (Ahtonen et al., 1990). Abraham et al. konnten 1987 bei Kindern beiderlei Geschlechts im Alter von fünf Jahren erste positive Kulturen feststellen. Andere Autoren wie Karaoui et al. (1980), Burke (1961), Roberts (1969 [a]) und Wilson und Plunkett (1965) unterstützten diese Aussage. Die Begründung sahen die meisten Autoren darin, daß Kinder andere Oberflächenlipide und eine geringere Schweißsekretion aufweisen als Erwachsene. Ein großer Anstieg der Kolonisation findet sich im Alter von 10-12 (Mädchen) bzw. 15-18 Jahren (Jungen) (Sugita et al., 2009), da es mit der Pubertät zu einer zunehmenden Aktivität der Talgdrüsen kommt. Die höchste Keimzahl findet sich in der zweiten und dritten Lebensdekade bei maximaler Talgdrüsenaktivität, im Alter nimmt die Besiedlungsdichte bei beiden Geschlechtern mit Rückgang der Gesamtmenge von Hautlipiden dann wieder ab (Faergemann und Meinhof, 1988; Sugita et al., 2009).

M. furfur ist also ein Saprophyt auf der normalen oder seborrhoischen Haut des Menschen, der unter bestimmten Bedingungen, die bisher nur marginal erforscht sind, zum Parasiten wird.



**Malassezia
spp.**

Abb. 1: Verteilung der Malassezia-Hefen auf der Hautoberfläche: Schwarz: sehr dichte Besiedlung, Schraffur: dichte Besiedlung (Aus: Fritsch, Dermatologie, 1998)

Seit der Reklassifikation der *Malassezia*-Spezies wurden Untersuchungen hinsichtlich ihrer Häufigkeit und Verteilung auf der Haut durchgeführt, welche aufgrund der Entnahme an unterschiedlichen Körperstellen, unterschiedlichen Methoden von Kultivierung und Differenzierung sowie Unterschieden in ethnischen Gruppen und geographischen Gebieten,

keine einheitlichen Ergebnisse zeigten. *M. sympodialis*, *M. globosa* und *M. restricta* wurden meist auf gesunder Haut isoliert. Sie scheinen auch die am häufigsten isolierten Spezies zu sein (Sugita et al., 2001; Sandström et al., 2005; Sugita et al., 2009). *M. furfur* konnte in einer Studie bei Kindern in Tagesstätten in Venezuela gehäuft in gesunder Haut unterernährter Kinder gefunden werden, bei normal ernährten Kindern fand sich die Hefe hauptsächlich bei Mädchen (González-Morán et al., 2009). *M. pachydermatis* wurde hauptsächlich bei Tieren gefunden, in der menschlichen Haut konnte diese Spezies meist nur als Teil der transienten Flora beobachtet werden (Midgley, 1989; Chen und Hill, 2005).

1.1.5. *Malassezia*-assoziierte Erkrankungen und Virulenzfaktoren der Hefe

Malassezia-Hefen sind fakultativ pathogen und können als Opportunisten unter bestimmten Umständen verschiedene Hautkrankheiten verursachen oder mit ihnen assoziiert sein, darunter das seborrhoische Ekzem (McGinley et al., 1975; Bergbrant und Faergemann, 1989; Sugita et al., 2009), die Kopfschuppen (Pityriasis simplex capillitii) (Hay et al., 1992; Hort et al., 2006) und die *Malassezia*-Folliculitis (Faergemann und Meinhof, 1988; Gupta et al., 2004; Akaza et al., 2009). Auch eine *Malassezia*-Blepharitis wurde beschrieben (Parunovic und Halde, 1967; Tóth et al., 1996; Derbel et al., 2005). In letzter Zeit rücken *Malassezia*-Hefen als Triggerfaktor der Neurodermitis im Kopf-Hals-Bereich immer mehr in den Blickpunkt (Clemmensen und Hjort, 1983; Chen und Hill, 2005; Sugita et al., 2004; Amaya et al., 2007; Tajima et al., 2008; Ishibashi et al., 2009). Auch eine Assoziation zwischen *Malassezia*-Spezies und Psoriasis wurden diskutiert (Amaya et al., 2007). Zunehmend treten systemische Infektionen durch *Malassezia* bei unreifen Säuglingen und immunsupprimierten Patienten auf. Die häufigste Erkrankung ist jedoch die Pityriasis versicolor. Bei dieser sowie bei der *Malassezia*-Folliculitis ist die Rolle von *Malassezia*-Hefen als Auslöser der Erkrankung gesichert, bei den anderen Erkrankungen wird sie teilweise noch kontrovers diskutiert (Hort et al., 2006).

Auch bezüglich der oben genannten Erkrankungen gab es in letzter Zeit viele Studien, inwiefern diese mit den einzelnen *Malassezia*-Spezies korrelieren.

So fanden Akaza et al. in der *Malassezia*-Follikulitis als dominante Spezies *M. globosa*, *M. sympodialis* sowie *M. restricta* (Akaza et al., 2009). Rhie (2009) fand bei immunsupprimierten Patienten mit *Malassezia*-Follikulitis vor allem *M. furfur* und *M. pachydermatis*. In einer Untersuchung von Blömer (2005) waren bei Kopfschuppen die am

häufigsten isolierten Spezies *M. globosa* und *M. sympodialis*. Kalinowska-Pudjak et al. fanden 2006 eine Assoziation von *M. furfur* zu Kopfschuppen.

Bei Patienten mit seborrhoischer Dermatitis isolierten Tajima et al. 2008 überwiegend *M. globosa* und *M. restricta*, Hedayati et al. (2010) konnten bei Patienten mit dieser Erkrankung *M. globosa* am häufigsten in Läsionen im Kopfbereich und *M. furfur* am häufigsten in Läsionen im Stammbereich isolieren.

Bei der atopischen Dermatitis scheint *M. globosa* die IgE-Produktion zu induzieren (Ishibashi et al., 2009).

Mit der Psoriasis scheinen *M. restricta*, *M. globosa* und *M. sympodialis* assoziiert zu sein (Amaya et al., 2007).

Crespo-Erchiga et al. fanden 2000, daß *M. globosa* mit 97 % die dominierende Spezies bei der Pityriasis versicolor war. Diese Dominanz konnte von vielen Autoren bestätigt werden (Nakabayashi et al., 2000; Romano et al., 2005; Kalinowska-Pudjak et al., 2006; Gaitanis et al., 2006; Prohic und Ozegovic, 2007; Rasi et al., 2009; Karakaş et al., 2009). Kalinowska-Pudjak et al. (2006), Rasi et al. (2009) und Karakaş et al. (2009) konnten von Patienten mit Pityriasis versicolor am zweithäufigsten *M. furfur* isolieren. In einer Studie von Erkrankten in Indonesien konnte *M. furfur* sogar als dominante Spezies isoliert werden (Krisanty et al., 2009), auch in den Tropen scheint *M. furfur* predominant zu sein (Crespo-Erchiga et al., 2008). Sehr selten fanden sich auch weitere *Malassezia*-Spezies wie *M. sympodialis* (Crespo Erchiga et al., 2000; Romano et al., 2005), *M. pachydermatis*, *M. restricta*, *M. slooffiae* (Rasi et al., 2009) und *M. obtusa* (Prohic und Ozegovic, 2007).

Auch hier zeigen sich, wie bei der Verteilung der einzelnen Spezies auf gesunder Haut, aus oben genannten Gründen keine einheitlichen Ergebnisse.

Alle bei oben genannten Hauterkrankungen vorkommenden Spezies kommen ebenfalls auf gesunder Haut vor, so daß herauszufinden bleibt, unter welchen Bedingungen die jeweiligen Erkrankungen ausgelöst werden.

Bisher sind verschiedene Virulenzfaktoren, die für die Pathogenität von *Malassezia* verantwortlich sind, bekannt, unter anderem die Adhärenz der *Malassezia*-Zellen an das Stratum corneum, sichtbar an der *in vitro* induzierten Ausbildung von hyphenartigen Pilzelementen (Thoma und Mayser, 2004; Nenoff et al., 2007). Darüber hinaus sind verschiedene Enzyme als Virulenzfaktoren beschrieben, unter anderem Phospholipasen, Lipasen, Aspartylproteasen und saure Sphingomyelinasen (Xu et al., 2007; Juntachai et al., 2009). Verschiedene *Malassezia*-Spezies besitzen die Eigenschaft, reaktive Sauerstoffspezies

zu bilden (Reinl et al., 2000; Später et al., 2009). Dies sind freie Radikale, die eine toxische Wirkung auf Gewebe haben können und einen weiteren Virulenzfaktor der Hefe darstellen könnten. Sie könnten bei der mit braun-roten Effloreszenzen einhergehenden Pityriasis versicolor (rubra) zur Entstehung der Entzündungsreaktion beitragen, spielen jedoch bei der Pityriasis versicolor alba, bei der eine Entzündungsreaktion trotz hoher Pilzlast fehlt (Später et al., 2009), keine Rolle.

M. furfur und andere *Malassezia*-Spezies zeigen unter Verstoffwechslung von Tryptophan eine Pigmentbildung. Diese Pigmentbestandteile zeigen neben UV-Filtereffekten bestimmte pharmakologische Eigenschaften wie die Hemmung des „respiratory burst“ in humanen neutrophilen Granulozyten (Krämer et al., 2005 [a]) und die Induktion von Apoptosen bei humanen Melanozyten (Krämer et al., 2005 [b]). Sie kommen als Pathogenitätsfaktoren in Frage. Im Folgenden werden die nachgewiesenen Substanzen und ihre Relevanz als Pathogenitätsfaktor näher beleuchtet.

1.1.6. Bildung von Pigmenten durch *Malassezia*-Hefen

Untersuchungen von Mayser et al. 1998 (b) zum Aminosäure- und Stickstoffstoffwechsel der *Malassezia*-Hefen erbrachten einen Stoffwechselweg, bei dem auf einem Minimalmedium bestehend aus einer Lipidquelle und Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle (unabhängig von seiner optischen Aktivität) ein rötlich-braunes Pigment gebildet wird, welches im UV-Licht gelb-grün fluoresziert. Diese Syntheseleistung scheint für die Spezies *M. furfur* spezifisch zu sein und ist durch Gabe anderer Aminosäuren unterdrückbar. Einige Stämme von *M. pachydermatis* zeigten nach längerer Inkubationsperiode ebenfalls Pigmentproduktion, jedoch in einer geringeren Konzentration und einem reduzierten Farbspektrum (Mayser et al., 2004; Hossain et al., 2007). Ein gemeinsamer genetischer Hintergrund von *M. pachydermatis*-Pigmentbildnern und *M. furfur* wird aufgrund von biochemisch-physiologischen Ähnlichkeiten vermutet (Aizawa et al., 2001; Mayser et al., 2004; Hossain et al., 2007), konnte jedoch nicht sicher nachgewiesen werden.

Das Pigment diffundiert innerhalb von zwei Wochen in den Minimalagar, und durch chemische Verfahren kann ein Rohextrakt gewonnen werden, das chromatographisch weiter aufgetrennt werden kann. Diese Auftrennung zeigt eine Vielzahl von durch *M. furfur* gebildeten farbigen Pigmenten und Fluorochromen. Zu Struktur und Funktionen dieser Pigmente wurden in letzter Zeit weitere Untersuchungen durchgeführt, um der Pathogenese verschiedenfarbiger Hautläsionen von Pityriasis versicolor sowie dem Phänomen der

Fluoreszenz auf die Spur zu kommen. Es wurden auch eine Vielzahl von Metaboliten isoliert, welche pharmakologische Eigenschaften haben, welche die klinische Charakteristik von Pityriasis versicolor und Pityriasis versicolor alba erklären könnten.

Folgende Substrate, welche als Erklärung für die Pathogenese der Pityriasis versicolor hilfreich sein könnten, wurden bereits charakterisiert:

a.) *Pityriacitrin* (C₂₀H₁₃N₃O)

Es handelt sich um eine gelbes Indolderivat, welche als potenter UV-Filter (UVA-, UVB- und UVC-Strahlung) mit ausgedehnter Absorption (λ_{\max} 389, 315, 289, 212 nm) wirkt. Diese UV-Protektivität wurde in vielen Hefemodellen sowie beim Menschen nachgewiesen (Mayser und Pape, 1998; Mayser et al., 2002; Machowinski et al., 2006), von Gamblicher et al. (2007) in einer quantifizierenden Studie jedoch nur als „alles in allem sehr schwach“ beschrieben.

Die von *M. furfur* produzierte Verbindung könnte dennoch mitverantwortlich sein für die UV-schützende Wirkung in depigmentierten Läsionen der Pityriasis versicolor alba trotz Fehlen des Melanins. Die typische Farbe könnte auch erklären, warum die Depigmentationsareale in der Pityriasis versicolor alba nicht nur weiß erscheint, sondern z.T. leicht gelblich (Thoma et al., 2005; De Almeida und Mayser, 2006).

b.) *Pityrialactone* (C₂₀H₁₂N₂O₃)

Hierbei handelt es sich um eine fluoreszierende, bisher unbekannte Bisindol-Verbindung, welche sowohl Eigenschaften als „Radikalfänger“ als auch als UV-Protektor zeigt (Stapelkamp et al., 2002, Mayser et al., 2003 [a]). Die Substanz zeigt blaue Fluoreszenz in einer lipophilen Umgebung und gelbe Fluoreszenz im wässrigen Milieu. Dieses könnte die in der Literatur beschriebene vielfarbige Fluoreszenz der Pityriasis versicolor-Läsionen erklären, abhängig davon, ob die Substanz in Schweiß oder epidermalen Lipiden aufgelöst ist (Mayser et al., 2003 [b]).

c.) *Pityriaanhydrid* (C₂₀H₁₂N₂O₃)

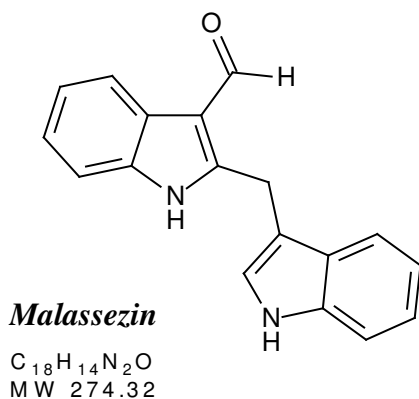
Pityriaanhydrid imponiert rot-orange und ist ein Strukturisomer von Pityrialacton. Pityriaanhydrid wurde bisher nicht als Naturstoff beschrieben, tritt aber als Zwischenstufe bei der Synthese von einer Gruppe von Proteinkinase C-Inhibitoren, den Bis(indolyl)maleimiden, auf (Stapelkamp et al., 2002).

d.) *Pityriarubin A* ($C_{32}H_{21}N_4O_4$), *B* ($C_{32}H_{20}N_4O_4$) und *C* ($C_{32}H_{20}N_3O_5$)

Es handelt sich um eine backsteinrote Verbindung der neuen Substanzklasse der Bisindolyl Cyclo-Pentendione (Irlinger et al., 2004). Die isolierten Pityriarubine A, B und C hemmen den oxidativen „burst“ von aktivierten Granulozyten (Krämer et al., 2005 [a]). Dies könnte das Fehlen eines Granulozyteninfiltrates in Pityriasis versicolor trotz hohem Pilzbefall (Wroblewski et al., 2005) erklären und könnten dabei helfen, daß die Hefe der Immunantwort entkommt. Krämer et al. zeigten 2005 (a), daß Pityriarubine eine Inhibition der durch A23187 (Calciumionophor) induzierten Ausschüttung der Leukotriene LTB_4 , sowie 6-trans-12-epi- LTB_4 zeigten. Diese Aktivitäten zeigen eine enge Beziehung von Pityriarubin zu den Bisindolylmaleimiden, welche kürzlich als Proteinkinasehemmer ins Gespräch kamen.

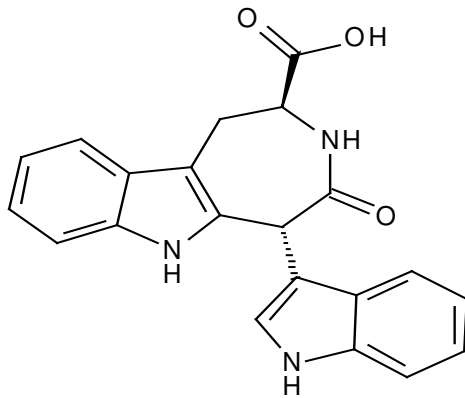
e.) *Malassezin* ($C_{18}H_{14}N_2O$)

Hierbei handelt es sich um eine farblose Substanz, welche das Merkmal eines Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor-Agonisten (AHR-Rezeptor-Agonist) zeigt und Cytochrom P_{450} in Kulturen von Rattenhepatozyten induziert (Wille et al., 2001; Thoma et al., 2001). Agonisten dieses Rezeptors werden als mögliche therapeutische Mittel in der Krebstherapie diskutiert. Der Einfluss von *Malassezin* auf Melanom-Zellen wird derzeit weiter untersucht. *Malassezin* bedingt dosisabhängig eine Induktion von Apoptose in kultivierten menschlichen Melanozyten. Diese könnte die Melanozytenschäden in Läsionen von Pityriasis versicolor alba erklären und ist möglicherweise eine der Strategien von *M. furfur*, dem Haut-Immunsystem auszuweichen. Der Wechsel in der Cytoskelettstruktur könnte zur Beeinträchtigung des Melanosomentransportes führen (Krämer et al., 2005 [b]). Sowohl die Apoptose-Induktion als auch die Cytoskelett-Veränderungen könnten mit der Depigmentation in Pityriasis versicolor alba zusammenhängen. Zudem könnte *Malassezin* bei Interaktion mit dem AHR-Rezeptor Veränderungen in der Differenzierung und im Wachstumsverhalten der Keratinozyten induzieren, welche für die charakteristische Schuppung in Pityriasis versicolor verantwortlich sind.



f.) *Malassezia Indol A*

Diese Verbindung zeigt dosisabhängig eine Hemmung der Tyrosinase, einem Schlüsselenzym der Melaninsynthese, was ebenfalls eine Erklärung für die Depigmentation in Pityriasis versicolor alba sein könnte (Dahms et al., 2002).

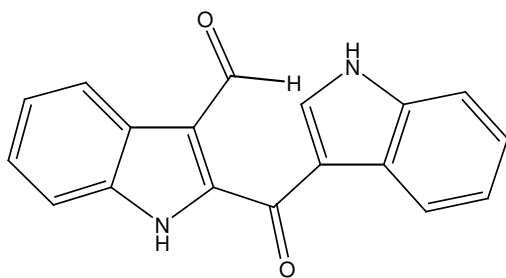


Malassezia Indol A

$C_{21}H_{17}N_3O_3$
MW 359.38

g.) *Keto-Malassezin*

Dieses Malassezin-Derivat kombiniert die Merkmale eines AHR-Rezeptor-Agonisten mit solchen eines Tyrosinasehemmers (Krämer et al., 2004).



Keto-Malassezin

$C_{21}H_{17}N_3O_3$
MW 359.38

h.) Eine Vielzahl bisher unbekannter Pigmentkomponenten als Erklärung für die Pigmentation in Läsionen von Pityriasis versicolor.

Irlinger et al. (2005) charakterisierten noch viele weitere Metaboliten, welche bisher keine spezifischen Effekte zeigten. Das bisher komplizierteste und strukturell interessanteste Indolalkaloid aus den Kulturen von *M. furfur* ist *Malasseziacitrin*.

Inzwischen konnten auch Gene identifiziert werden, die die Pigmentproduktion in *Malassezia-Zellen* steuern, so daß auch eine erste molekulare Einsicht in die Pigmentproduktion von *M. furfur* möglich ist (Hort et al., 2009).

Mittlerweile ist bekannt, daß es eine Reihe weiterer Gattungen und Spezies humanpathogener Pilze gibt, die gleichermaßen wie *M. furfur* Tryptophan zu pigmentierten Indolderivaten umformen können, wie zum Beispiel *Geotrichum capitatum* und *Schizophyllum commune* (Nies, 2006), *Exophiala dermatitidis* (Juncu, 2007) oder *Candida glabrata* (Mayser et al., 2007).

Zuther et al. (2008) konnten anhand von *Ustilago maydis* zeigen, daß die Biosynthese von Tryptophanderivaten von einer Tryptophan-Aminotransferase (TAM1) katalysiert wird, die Tryptophan in Indolpyruvat umwandelt. Sie beweisen weiterhin, dass sich diese Indolpigmente spontan aus Indolpyruvat und Tryptophan bilden, ganz ohne Zutun weiterer Enzyme.

1.2. Pityriasis versicolor

1.2.1. Krankheitsbild

Die Pityriasis versicolor, hervorgerufen durch *M. furfur* gehört zu den häufigsten oberflächlichen Dermatomykosen mit weltweiter Verbreitung (Hay et al., 1992). Die Erkrankung wurde im Jahr 1801 von Willan erstmals beschrieben und 1846 von Eichstedt als erregerbedingt erkannt. Es finden sich als Primärläsion scharf pigmentierte sowie umschriebene, rundliche, teilweise konfluierende Makula, papillär oder numulär. Diese Flecken weisen unterschiedliche Färbung („versicolor“) auf, reichend von schwarz, braun zu milchkaffeefarben, hellbraun, gelblich und hell- oder dunkelrosa (erythematös) (Ruete, 1928; Chetty et al., 1979). Oft treten alle Farbtöne gemeinsam auf, wodurch die Haut scheckig erscheint. Die Läsionen weisen durch Störung der regulären Desquamation durch Adhärenz der Hefezellen an angrenzende Hornzellen und durch Veränderung im intercornealen Raum aufgrund von Ablagerung des amorphen Materials eine feinlamelläre, kleieförmige (pityriasiform), hobelspanartige Schuppung auf („Hobelspanphänomen“) (Schmidt, 1997). Die Läsionen befinden sich bevorzugt in den talgdrüsenreichen Arealen des Körperstammes. Neben der hyperpigmentierten Pityriasis versicolor existiert auch eine seltenere Pityriasis versicolor alba (Balus et al., 1982; Hay et al., 1992), welche mit depigmentierten Läsionen einhergeht (Abb. 2 und 3), welche besonders auf gebräunter Haut deutlich hervortreten, aber auch an bedeckten Körperstellen vorhanden sind. Die Pityriasis versicolor alba entwickelt sich meistens aus der hyperpigmentierten Form, selten auch spontan unter UV-Exposition (Adamson, 1949; Lockshin, 1973; Moynahan, 1976; Lutz, 1892). Die hellen Flecken können 6-12 Monate bestehen bleiben, verschwinden dann aber spontan. Für die unbehandelte Pityriasis versicolor ist ein chronischer Verlauf charakteristisch, die Neigung zu Rezidiven liegt aber auch bei korrekt durchgeführter Therapie bei 30-50% (Degreef, 1978). Interessant ist, daß die Läsionen der Pityriasis versicolor alba im Gegensatz zu anderen depigmentierenden Erkrankungen wie z.B. Vitiligo weniger sensitiv auf UV-Licht sind, d.h. hier nach UV-Exposition kein Erythem / Sonnenbrand auftritt (Ruete, 1933; Kistiakovsky, 1927; Wertheim, 1928).

Was die Prognose angeht, ist die Krankheit immer gutartig und übt auf den Gesamtorganismus nie einen nachteiligen Einfluß aus. Nur in wenigen Fällen besteht Juckreiz oder Brennen (Borelli et al., 1991; Hay und Moore, 1996). Der Leidensdruck, der die

Patienten zum Arzt führt, ist meist bedingt durch das unästhetisch scheckige Aussehen der Hautveränderungen (Chetty et al., 1979).

Abbildung 2: Pityriasis versicolor: hyperpigmentierte Form



Abbildung 3: Pityriasis versicolor alba



1.2.2. Diagnostik

Die Diagnose der Pityriasis versicolor wird meist aufgrund der typischen Hauterscheinungen, ihrer Lokalisation und dem typischen Verlauf der Erkrankung gestellt. Das Woodlicht ist ein weiteres diagnostisches Mittel. Dabei sendet eine Ultraviolettlampe (Quarzlampe) ihre Strahlen durch den Wood-Filter (hoher Anteil an Nickeloxysalzen), welche die Kurzwellenstrahlen herausfiltert und nur Langwellenstrahlen (ca. 366nm) hindurchläßt. In diesem langwelligen UV-Licht zeigen sowohl die hyper- als auch die depigmentierten Areale eine gelb-grüne Fluoreszenz (Roberts, 1969 [b]; Hay und Moore, 1996) (Abb.4), welche es erlaubt das Gesamtausmaß der Erkrankung zu beurteilen (Hay und Moore, 1996) und Depigmentierungen anderer Ursache differentialdiagnostisch auszuschließen. Es gibt jedoch nur wenige Daten, welche eine Fluoreszenz in depigmentierten Arealen zeigt. Lockshin beschrieb dies 1973, jedoch war nach Eradikation des Pilzes keine Fluoreszenz mehr nachweisbar. Ein weiteres diagnostisches Zeichen ist das „Hobelspanphänomen“, welches die leichte Abstreifbarkeit der kleieförmigen Schuppung mit Fingernagel oder Holzspatel beschreibt (Besnier und Balzer, 1882). Diese Schuppung ist jedoch eher charakteristisch für hyperpigmentierte Läsionen der Pityriasis versicolor und entwickelt sich häufig nicht in depigmentierten Arealen der Pityriasis versicolor alba, was Probleme in der Differentialdiagnose mit anderen depigmentierenden Erkrankungen, vor allem der Vitiligo (Lockshin, 1973), macht. In älterer Literatur wird eine zeitbedingte Abhängigkeit der Anwesenheit von Schuppung beschrieben: markante Schuppung in frühen depigmentierten Arealen, gefolgt von kompletter Regression während eines Intermediärstadiums, in welcher die Schuppung übergangsweise nur noch in der Randregion vorhanden ist (Pardo-Castello, 1932).

Letztlich geklärt wird die Diagnose durch den mikroskopischen Nachweis des Erregers aus Schuppenmaterial der Läsionen im NaOH-Nativpräparat (Hantschke, 1971). Hier kann das Vorhandensein von runden (bis 8µm), manchmal knospenden Sporen festgestellt werden, welche in Massen oder in Gruppen agglutiniert (10-30 Einzelsporen) sind. Ferner finden sich im Gegensatz zum Nativpräparat von normaler Haut Mycelfäden (2,5-5 x 25µm) (Pseudomycel), die gewöhnlich kurz, gewunden, fragmentiert, und in seltenen Fällen verzweigt sind (McGinley et al., 1970) (Abb. 5). Das Nebeneinander von Sproßzellhaufen und leicht gekrümmten Hyphen ist für die Erkrankung charakteristisch („Spaghetti und Fleischklößchen“) (Abb. 5). Durch die oberflächliche Lokalisation der *Malassezia*-Hefen kann der Erregernachweis auch durch Tesafilmabriß mit anschließend sofortiger Färbung

(Methylenblau 1%) erfolgen (Guého et al., 1996). Die Anlage einer Kultur ist nicht sinnvoll, da der Keim zur residenten Hautflora gehört und die Induktion des Hyphenstadiums in der Regel nicht gelingt (Dorn und Roehnert, 1977; Nazzarro-Porro und Passi, 1978). In der hyperpigmentierten Form läßt sich der Erreger zuverlässig nachweisen, während in depigmentierten Arealen der Pityriasis versicolor alba eine vergleichbar geringere Erregeranzahl beobachtet wurde (Galadari et al., 1992) bzw. kein Erreger nachweisbar sein kann (Lockshin, 1973; El-Gothamy und Abdel-Fattah, 1975). In älterer Literatur wurden Beobachtungen gemacht, daß in frühen Läsionen der Pityriasis versicolor alba eine hohe Anzahl von Hefezellen und Hyphen gefunden wurde, gefolgt von Reduktion und letztendlich erregerfreien depigmentierten Arealen (Lutz, 1892; Wertheim, 1928). Diese Beobachtungen zeigen, daß die Depigmentation mit ihrer langen Persistenz die Präsenz von *Malassezia*-Hefen überdauern kann. Sie könnten auch die Non-response der Pityriasis versicolor alba auf Antimykotika erklären.

Differentialdiagnostisch ist bei der hyperpigmentierten Form vor allem das seborrhoische Ekzem, das Erythrasma, einige Dermatophytosen und postinflammatorische Hyperpigmentierungen in Erwägung zu ziehen. Die Pityriasis versicolor alba kann verwechselt werden mit leukodermischen Zuständen nach Entzündungen oder Dermatosen wie Vitiligo und Piebaldismus (Balus, 1982).

Abbildung 4: Fluoreszenz im Wood-Licht

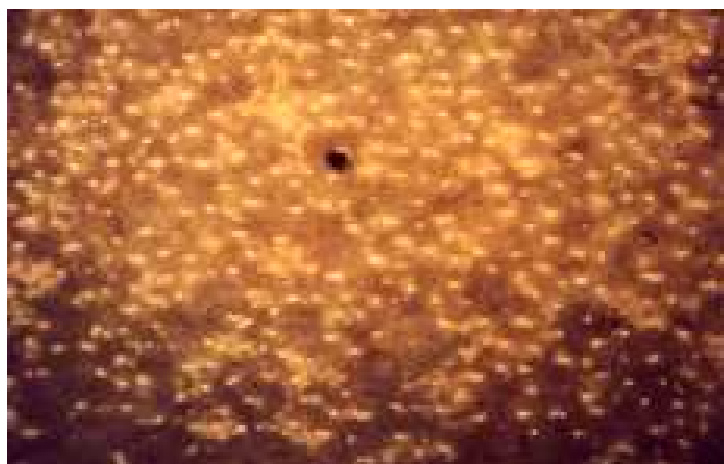
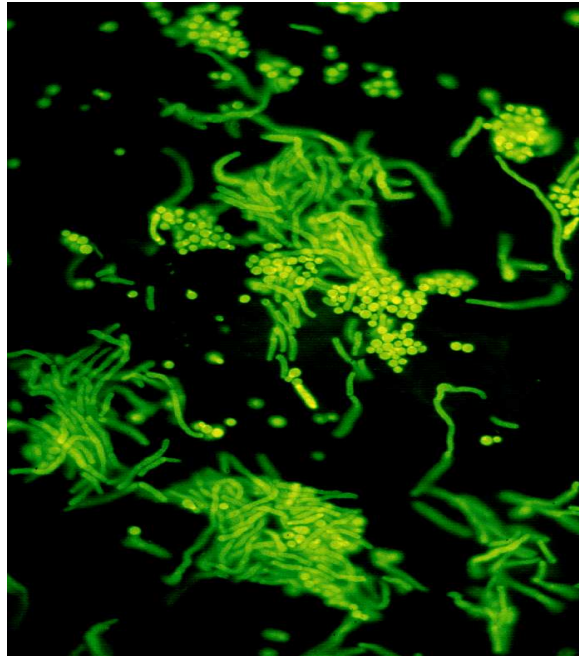


Abbildung 5: Diagnostik der Pityriasis versicolor: im Nativpräparat finden sich Sproßzellen und Hyphen



1.2.3. Epidemiologie, Prädispositionsfaktoren und Pathogenese

Die Pityriasis versicolor ist eine oberflächliche Dermatomykose, vor allem an oberem Rumpf (Schweißrinne), Hals und Oberarmen (Faergemann, 1992) vorkommend. Weniger häufig befällt die Krankheit das Gesicht, die behaarte Haut, die unteren Gliedmaßen, die Ohren, die Körperfalten, die Schamgegend und die Genitalien. Insgesamt können überall auf der Haut Läsionen auftreten außer an den Handflächen und Fußsohlen.

Bekannt ist, daß oben genannte begünstigende Faktoren für das Vorkommen der *Malassezia*-Hefen auch die Erkrankung der Pityriasis versicolor fördern.

Aufgrund der prädisponierenden Faktoren ist diese Erkrankung besonders bei der Bevölkerung von Ländern mit warmem Klima und hoher Luftfeuchtigkeit während des ganzen Jahres (tropischer und subtropischer Raum) stark verbreitet. Besonders hoch ist die Inzidenz in Brasilien (Londero, 1964), Somalia (Vanbreuseghem, 1968), Neu-Guinea (Mac Lennon und O`Keeffe, 1966) und Mexico (Gordon, 1951 [b]; Gonzales-Ochoa, 1956). In Ländern des Mittelmeerraumes (Spanien, Portugal, Italien) und in Asien liegt die Morbidität

etwa in der Mitte (Moynahan, 1976), während der Sommermonate ist sie deutlich höher. In den gemäßigten Klimazonen ist die Morbidität weniger hoch. Statistiken ergaben, daß in Mittel- und Nordeuropa die Pityriasis versicolor nur ca. 0,5-1% aller Dermatosen darstellt (Achten et al, 1979) und besonders im Frühjahr und in den Sommermonaten (Mai-September) auftritt.

Die genannten klimatischen Faktoren beeinflussen offensichtlich die Transpiration, die Melanogenese und die kutane Keratinisierung. Dadurch werden metabolische Reaktionen hervorgerufen, die dazu führen können, daß *Pityrosporum* vom Saprophyten zum Krankheitserreger wird. Auch erhöhte Schweißneigung (Hay et al., 1998; Gupta et al., 2002; Gupta et al., 2003), anlagebedingt und durch bestimmte Erkrankungen wie Hyperthyreose, Tuberkulose oder Malignome (Ruete, 1928; Razack und Tambiah, 1977) sowie Tragen okklusiver Kleidung (Hay und Moore, 1996), die ein feuchtwarmes Klima auf der Hautoberfläche verursacht (Ruete, 1933), fördert die Pityriasis versicolor. Das Auftreten von Fällen einer Pityriasis versicolor ausschließlich oberhalb der denervierten Segmente bei Patienten mit Rückenmarkstraumen (Reed et al., 1961) unterstützt die Bedeutung des Schwitzens als Prädispositionsfaktor. Auch das Berufs- und Freizeitverhalten ist für das Auftreten der Erkrankung von Bedeutung (Stefanovic und Medicijan, 1976; Götz, 1980).

Die Pathogenität des Erregers ist ebenfalls erhöht bei hormonellen Veränderungen wie z.B. Morbus Cushing bzw. Steroidtherapie (Boardman und Malkinson, 1962), wobei unklar ist, ob dieses Phänomen durch die immunsuppressiven Eigenschaften des Kortikoids oder Veränderungen der Schweißkomposition zuzuschreiben ist. Die Rolle von Kontrazeptiva und Schwangerschaft ist umstritten (Roberts, 1969 [b]; Chetty et al., 1979; Hay and Moore, 1996). Als weitere Prädispositionsfaktoren wurden Vitamindefizit, Unterernährung (Burke, 1961), Diabetes mellitus (Boardman und Malkinson, 1962; Burke 1961) bestimmte schwächende konsumierende chronische Erkrankungen wie Tuberkulose, chronische Diarrhoe (Ruete, 1933), Anwendung lipidhaltiger Externa oder Immundefizienz (Burke, 1961; Chetty et al., 1979) beschrieben. Auch eine genetische Prädisposition wurde beobachtet (Burke 1961; Hay und Moore, 1996).

Die Ökologie des Erregers ist unbekannt, d.h. es gibt keine genauen Auskünfte über Herkunft und Verbreitung. Laugier (1971) vermutete eine „Primär-Inokulation“ auf direktem Wege durch Übertragung von Kranken oder kontaminierte Gegenstände wie Unterwäsche, Sportkleidung, Toilettengegenstände oder Bettwäsche. In der praktischen Erfahrung zeigen sich aber nur extrem selten Ansteckungen (Vanbreuseghem, 1978). Die Geschlechter sind mit einem Erkrankungsgipfel im jugendlichen und frühen Erwachsenenalter etwa gleich häufig

betroffen (El-Hefnawi et al., 1971), verbunden mit Veränderungen des Hautmilieus. Nach dem 60. Lebensjahr ist die Inzidenz deutlich verringert. Selten findet sich die Erkrankung bei unter 10jährigen, da die Veränderung der Hautlipide in der Pubertät pathogenetisch bedeutsam ist.

Verschiedene Untersuchungen zur Hautoberflächenlipid- und Aminosäurezusammensetzung konnten einen Unterschied zwischen gesunder und erkrankter Haut feststellen (Boardman und Malkinson, 1962; Caprilli et al., 1973), erlauben jedoch keine sichere Aussage über verändertes Hautmilieu als eigentliche Ursache der Erkrankung (Burke, 1962).

Verschiedene Untersuchungen beschäftigten sich (wie schon in Kapitel 1.1.5. näher erläutert) in letzter Zeit mit dem Thema, ob eine individuelle Spezies der 12 bekannten *Malassezia*-Spezies für die Pityriasis versicolor verantwortlich ist. Es wurden auf erkrankten Hautpartien vor allem die Spezies *M. globosa* isoliert, was die kugelige Form der Zellen in Läsionen von Pityriasis versicolor erklären könnte (Crespo Erchiga et al., 2000; Crespo Erchiga und Florencio, 2006). Aber auch die Spezies *M. furfur* weist im Folgenden beschriebene Eigenschaften auf, welche mit der Pathogenese der Erkrankung vereinbar wären, obwohl sie bisher seltener als *M. globosa* in Läsionen der Pityriasis versicolor isoliert werden konnte.

Die Pathogenese der Pityriasis versicolor ist also bis heute nicht eindeutig geklärt. Viele Autoren gehen davon aus, daß sich im Falle einer Erkrankung bei bestimmten Prädispositionsfaktoren ein Übergang von der Hefephase in die Myzelphase mit Eindringen der Pilzelemente in die oberen Anteile der Hornschicht vollzieht (McGinley et al., 1970; Faergemann, 1979). Unter experimentellen Kulturbedingungen konnte, wie oben erwähnt, gezeigt werden, daß unter hoher Feuchtigkeit, hohen Temperaturen und hohem Kohlendioxidpartialdruck das Hyphenstadium erzielt werden kann. Dies war allerdings in Folgeuntersuchungen nur inkonstant nachvollziehbar.

Die Vermutung, daß die Tryptophan-abhängige Bildung von Pigmenten durch *Malassezia*-Spezies pathogenetisch bedeutsam ist, wurde mittlerweile in zahlreichen Arbeiten geäußert und in Kapitel 1.1.6. schon näher erörtert. Barchmann et al. (2009) zeigten, daß nur unter Zugabe von Tryptophan eine solche Pigmentbildung nachweisbar war. Wurde eine andere Aminosäure hinzugefügt, wie zum Beispiel Glycin, zeigte sich keine Pigmentbildung, jedoch eine exponentielle Zunahme der Biomasse. Fügte man beide Aminosäuren (Tryptophan und Glycin) hinzu, kam es zu einer präferentiellen Verstoffwechselung von Glycin und anschließend erst zur Pigmentsynthese, die aufgrund der größeren Biomasse rascher ablief als bei alleiniger Zugabe von Tryptophan. So könnte es bei Hyperhidrose zunächst zur Ausbildung eines Biofilms mit bevorzugtem Verbrauch einzelner Stickstoffquellen wie

Glycin kommen und nach deren Verbrauch zu einem Umschalten auf tryptophanabhängige Pigmentsynthese mit pathophysiologisch bedeutsamen Wirkungen.

Zudem ist auch das Zustandekommen der hyper- und hypopigmentierten Läsionen sowie das Fluoreszenzverhalten im Wood-Licht noch nicht vollständig geklärt. Modelle zur Erklärung dieser Fragen sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.2.4. Thesen zur Erklärung der Hyper- und Depigmentation

Die Genese der Hyperpigmentierung ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Zur genaueren Beleuchtung wurde die Histologie der Läsionen betrachtet. Man erkannte diffus über die Oberfläche der oberen 2/3 der epidermalen Hornschicht und in den Follikelostien verteilte Gruppen von unbeweglichen Hefezellen und Hyphen intra- und extrazellulär in unterschiedlicher Anzahl (Götz, 1962; Hay and Moore, 1996). Nur sporadisch fanden sich diese auch in tieferen Arealen der Hornschicht (Tosti et al., 1972). Die Populationsdichte betrug 10 mycel/mm² in den Läsionen (Schmidt und Bradfield, 1996).

Die histologische Untersuchung erbringt in den Läsionen den Nachweis eines entzündlichen Infiltrates in der Dermis-Oberschicht mit perivaskulärer Ansammlung von Zellen, vor allem Mastzellen und Lymphozyten (El-Gothamy und Abdel-Fattah, 1975) . Es findet sich eine Akkumulation von Makrophagen, die aktiv Melanin phagozytieren und somit eine schwankende Menge intra- und extrazellulären Melanins. Lange wurde diese entzündliche Reaktion für die Hyperpigmentierung (Galadari et al., 1992) [z.T. auch für die Depigmentierung (Rook et al., 1969)] sowie auch für die Rötung verantwortlich gemacht, jedoch steht dieser These entgegen, daß sie häufig nicht oder nur sehr gering ausgeprägt gefunden werden kann (Ruete, 1933; El-Hefnawi et al., 1972; Charles et al., 1973; Ackermann, 1997), was das breite Farbspektrum der Erkrankung nicht ausreichend erklärt. Zudem zeigten neuere Untersuchungen eine nur sehr geringfügige humorale und zelluläre Abwehrreaktion in histologischen Schnitten befallener Areale (Nenoff et al., 2001). Wroblewski et al. konnten 2005 histologisch trotz hohem Pilzbefall gar keine Entzündungsreaktion nachweisen und richtete das Augenmerk vor allem auf das Fehlen von neutrophilen Granulozyten, welche normalerweise bei Pilzinfektionen beobachtet werden.

Weiterhin zeigte sich vor allem in der Epidermis hyperpigmentierter Läsionen in zwei Dritteln der Hornschicht eine leichte Hyperorthokeratose (Allen et al., 1976; Karaoui et al., 1981; Galadari et al., 1992), die ebenfalls zur Erklärung der Hyperpigmentierungen herangezogen wurde. Hier besteht keine Kohäsion der Zellen mehr und es findet sich eine

inkonstante Akanthose mit leichter Spongiose, verbunden mit einem erhöhten Auf- und Abbau von Hornzellen, was mit der Schuppung der Läsionen einhergeht (Hay und Moore, 1996).

Galadari et al. vermuteten eine Hyperpigmentation aufgrund von hoher Pilzzahl bzw. deren Fähigkeit, Melanin zu synthetisieren (Galadari et al., 1992). Messungen konnten diese Hypothesen nicht bestätigen.

Ein weiterer Erklärungsversuch ist die Beobachtung von Anhäufungen von Melanosomen mit vergrößertem Volumen und reichlichem Melaningehalt in den Melanozyten und Keratinozyten in den hyperpigmentierten Läsionen (Allen et al., 1976; Hay und Moore, 1996). Die Melanosomen zeigten eine veränderte Verteilung in der Epidermis (Allen et al., 1976). Was die Verteilung des Melanins betrifft, ergeben Spezialfärbungen keine besonderen Hinweise. Andere Autoren konnten diese Beobachtungen widerlegen und fanden in pigmentierter und nicht pigmentierter Haut eine vergleichbare Anzahl von Melanozyten und Melanosomen (Konrad und Wolff, 1973; Galadari et al., 1992). Zudem befinden sich in Vitiligoherden aufgrund autoimmunologischer Vorgänge keine Melanozyten mehr. Dennoch sorgt *M. furfur* auch hier für eine Hyperpigmentierungen, was ebenfalls dagegen spricht, daß die Hyperpigmentierung durch Veränderung melanozytärer Strukturen erklärbar ist.

Alle diese Thesen zur sehr variablen Hyperpigmentierung der Pityriasis versicolor-Läsionen sind bis heute umstritten. So können diese Überlegungen nicht die charakteristische Fluoreszenz der Hautveränderungen im Wood-Licht erklären, die als Diagnostikum genutzt wird. Außerdem fehlt eine Erklärung für die beschriebene Farbvielfalt der erkrankten Hautareale. Schon Dotz et al. (1985) stellten die These auf, daß die rot-braunen bis beigen Hyperpigmentationen nicht durch das Pigment Melanin entstehen. Mayser et al. vermuteten 1998 (a + b) einen Zusammenhang der Hyperpigmentation bei Pityriasis versicolor und von *M. furfur* gebildetem bräunlichen Pigment bei Zugabe von Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle. In weiteren Studien konnten Indolderivate aus diesem Pigment isoliert werden, welche aufgrund von bestimmten Eigenschaften für die Hyperpigmentation mit beschriebener Farbvielfalt sowie die Fluoreszenz verantwortlich sein könnten (siehe Kapitel 1.1.6.).

Die Pathogenese der Depigmentation ist ebenfalls noch nicht sicher geklärt. In hypopigmentierten Arealen der Pityriasis versicolor alba ist das oben beschriebene umstrittene Entzündungsinfiltrat deutlich geringer ausgeprägt. Es zeigen sich lediglich einige zerstreute Lymphozyten perivaskulär bei fehlenden neutrophilen Granulozyten (Galadari et

al., 1992). Histologisch finden sich Schädigungen der melanozytären Zellen. Bei diesen ist zumeist die Zahl der Melanosomen reduziert, sie enthalten wenig Melanin und weisen verschiedene strukturelle Veränderungen auf. Es zeigt sich eine Vakuolisierung und Schwellung isolierter Mitochondrien (Galadari et al., 1992). Stellenweise werden Melanozyten beobachtet, die in die Dermis Hernien bilden. Manche lösen sich sogar von der Basalzellschicht ab und tauchen in die Dermis ein. Gleichzeitig finden sich einige normale Melanozyten. Die melanozytären Veränderungen sind diskret und die Läsionen reversibel. Dies entspricht den klinischen Beobachtungen, wonach die Hypochromie nach 6 bis 12 Monaten spontan verschwindet. Charles et al. (1973) und El-Gothamy und Abdel-Fattah (1975) beobachteten histologisch in den depigmentierten Arealen eine ähnliche Anzahl von Melanozyten wie auf normaler Haut. Weitere Studien (Karaoui et al., 1981; Galadari et al., 1992; Fistarol und Itin, 2009) bestätigten dies. Die Anzahl der Melanosomen in den Keratinozyten der Stachelzellschicht ist im Vergleich mit normaler Haut signifikant geringer (3,5 versus 21,3) (Galadari et al., 1992). Es zeigt sich eine Akkumulation der Melanosomen in den Dendriten der Melanozyten als Zeichen eines gestörten Transfers der Melanosomen zu den Keratinozyten (Charles et al., 1973; Karaoui et al., 1981; Galadari et al., 1992). Die Dopa-Reaktion von depigmentierten Läsionen ist überwiegend positiv, teilweise jedoch gestört (Lewis und Hopper, 1936; Chatterji, 1972; El-Gothamy und Abdel-Fattah, 1975). Ruete ist der einzige Autor, der eine komplett negative Dopa-Reaktion in den depigmentierten Arealen beschreibt, was aber nur in einem Hautbeispiel gezeigt wurde (Ruete, 1933). Lichtmikroskopisch finden sich jedoch in depigmentierten Arealen der Pityriasis versicolor alba eine geringere Pigmentdichte in den Melanozyten in der Dopa-Reaktion und Fontana-Masson-Färbung verglichen mit normaler Haut desselben Individuums (El-Gothamy und Abdel-Fattah, 1975; Allen 1976).

Zur Depigmentierung der Haut bei Pityriasis versicolor wurden in der Vergangenheit viele unterschiedliche Vorschläge gemacht. Einige Autoren schlugen eine physikalische Filterung von UV-Licht durch den Pilz selbst bzw. die entstandene Schuppung vor (Lutz, 1892; Kistiakovsky, 1927; Lewis und Hopper, 1936). Diese These wurde gestützt durch die Beobachtung, daß die depigmentierten Areale aus hyperpigmentierten Läsionen unter UV-Strahlung hervorgehen (Kistiakovsky, 1927; Wertheim, 1928). Da sich die depigmentierten Läsionen aber nicht nur an sonnenexponierten Körperarealen zeigen, sondern auch häufig an bedeckten Stellen wie z.B. der Genitalregion (Blumenthal, 1971; Nia und Smith, 1979) sowie an schwarzer Haut (Lewis, 1935; Jelliffe und Jacobson, 1954) ist diese These nicht haltbar. Gegen eine rein physikalische Abdeckung der Haut gegenüber UV-Licht spricht auch der

histologische Nachweis einer gestörten Dopa-Reaktion in befallenen Hautarealen (Ruete, 1933; El-Gothamy und Abdel-Fattah, 1975).

Andere Autoren vermuteten ein Versagen des Transfers der Melaningranula durch ansteigende Keratinisation (Szabo, 1967; Bears, 1968), Verlust der Melaningranula durch Verdünnung des Stratum corneums (Faergemann et al., 1983) oder abnorme Verteilung des Melanins in Keratinozyten (Charles et al., 1973). Diese histologischen Beobachtungen konnten aber nicht bei allen depigmentierten Hautarealen gefunden werden, so daß sich keine dieser Vermutungen erhärten läßt.

Als weitere Hypothese für die Ursache der Depigmentierung wurde eine chemische (toxisch / enzyminhibitorisch) Hemmung der Pigmentbildung vorgeschlagen. Castellani und Chalmers (1913) schlugen eine postinflammatorische Hypopigmentierung in Analogie zu dem der syphilitischen Roseola folgenden Leukoderm vor. Dieses ist jedoch aufgrund der fehlenden Entzündung (Wroblewski et al., 2005) nicht akzeptabel. Barney (1932) vermutete eine Zerstörung beziehungsweise „Lähmung“ der Pigmentzellen („destroyed or paralysed pigment forming cells“), da selbst mit Einsatz von Bergamotte-Öl unter UV-Bestrahlung keine Repigmentierung der weißen Herde innerhalb von drei bis sechs Wochen erzielt werden konnte (Pardo-Castello, 1932).

Hinweise auf toxische Ursachen zeigen teilweise schon oben beschriebene ultrastrukturelle Untersuchungen zur Mikromorphologie der depigmentierten Areale. Elektronenmikroskopisch findet sich eine selektiv toxische Schädigung der Melanozyten in Form von Zellschwellung und Vakuolisierung der Mitochondrien (Breathnach et al., 1975), Hervortreten des Zytoskeletts und Einstellung der Melaninproduktion bis zur Zellschrumpfung von Melanozyten (Galadari et al., 1992; Breathnach et al., 1984), Verminderung der vergleichsweise kleinen Melanosomen in betroffenen Hautarealen (Galadari et al., 1992) und fehlendes Laden der Melanozyten sowie ihrer Dendriten mit Melanin (Breathnach et al., 1975). Diese Beobachtungen sprechen sowohl für eine toxische Schädigung der Melanozyten als auch für eine Störung der Melanogenese.

Letztere wurde schon 1933 von Ruete vermutet, jedoch konnte in Folgeuntersuchungen kein verantwortliches Agens für die Hemmung der Melanogenese aus Schuppen von Pityriasis-Herden isoliert werden (Lewis und Hopper, 1936).

Jung beschrieb eine Hemmung der Dopa-Tyrosinase-Reaktion durch Ether-Extrakte aus Schuppen befallener Hautareale (Jung und Bohnert, 1976). Auch El-Gothamy und Abdel-Fattah (1975) stellten die Hypothese einer Störung der Melaninbildung, insbesondere des Tyrosinmetabolismus, auf. Sie stellten ein Schuppenextrakt her, welches *in vitro* die

Tyrosinase, das Schlüsselenzym der Melanogenese, um 30% hemmen konnte. In Repigmentationsstudien zeigten sie die Reversibilität dieser Hemmung. In ihren Untersuchungen mit Hilfe der Dopa-Reaktion erkannten sie eine verringerte Dichte von Melaninpigment in Melanozyten. Allen et al. (1976) fanden wie El-Gothamy und Abdel-Fattah (1975) in der Dopa-Reaktion betroffener Areale die gleiche Anzahl von Melanozyten wie in gesunder Haut, aber die Farbe der Melanozyten in Depigmentationsarealen war weniger dunkel und tief, sie enthielten deutlich weniger Melanosomen und der Transfer zu Keratinozyten war verringert, so daß es zu einer Reduktion von epidermalem Melanin kam. Nazzaro-Porro und Passi zeigten 1978, daß *Pityrosporum*-Spezies *in vitro* Substanzen produzieren können, die die Aktivität der Tyrosinase hemmen. Sie konnten Dicarbonsäuren entdecken, vor allem Azelainsäure, eine C9-Dicarbonsäure ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_7\text{-COOH}$), die sie für die Enzymhemmung (kompetitive Tyrosinasehemmung) verantwortlich machten. Folgeuntersuchungen zeigten allerdings, daß diese Fettsäuren in ihren angenommenen *in vivo*-Konzentrationen gesunde Melanozyten weder *in vivo* noch *in vitro* beeinflussen konnten (Breathnach et al., 1984; Robins et al., 1987). Außerdem wird Azelainsäure in Kultur nicht freigesetzt, erreicht also die betroffenen pigmentbildenden Zellen nicht. Nazzaro-Porro et al. (1986) fanden im Vergleich zu gesunder Haut in erkrankten Arealen eine erhöhte Konzentration von Lipidperoxidasen. De Luca et al. vermuteten einen toxischen Effekt von Dicarboxylsäuren und Lipoperoxiden auf die Melanozyten bzw. die Melanogenese (De Luca et al., 1996). Die Dicarbonsäure sowie Lipoperoxide werden jedoch auch von *Malassezia*-Hefen der residenten Hautflora auf gesunder Haut produziert ohne daß Zeichen von Depigmentation zu erkennen sind.

Es liegt also die Vermutung nahe, daß die Hefen eine oder mehrere die Pigmentierung der Haut beeinflussende Substanzen produzieren, deren Identität noch nicht vollständig geklärt ist. Einige dieser mittlerweile charakterisierten Verbindungen werden in Kapitel 1.1.6. näher beschrieben. So könnte das Malassezin durch Apoptose-Induktion und Cytoskelettveränderungen zu einer Beeinträchtigung des Melanosomentransportes und zur Depigmentation führen (Krämer et al., 2005 [b]), das Malassezin Indole A sowie das Keto-Malassezin zeigen als Erklärung für die Depigmentation Tyrosinase-inhibitorische Eigenschaften (Dahms et al., 2002).

1.2.5. Therapie

Die Erkrankung ist insgesamt gut behandelbar, neigt aber zu stark rezidivierendem Verlauf. Zu den Allgemeinmaßnahmen zählen: Häufiges Baden / Duschen unter Verwendung von Syndets, Vermeidung von Kleidung mit Okklusiv-effekt (keine Kunstfasern) und Ausschalten von Prädispositionsfaktoren, z.B. Urlaube in feuchten und warmen Klimaten.

Zunächst kann eine topische Therapie in Erwägung gezogen werden. Sie ist kostengünstig und ermöglicht durch eine Intervallanwendung auch eine gute Rezidivprophylaxe. Es sollte immer der gesamte Körper behandelt werden, so daß sich vor allem wirkstoffhaltige Shampoos oder Lösungen eignen. Als Substanzen können Antimykotika aus der Gruppe der Azole, das Ciclopiroxolamin und das Terbinafin, daneben auch Eigenrezepturen wie Propylenglykol (zweimal täglich für zwei Wochen) oder 2-3%iger Salizylspiritus verwendet werden (Hort et al., 2006).

Mayser und Rieche (2009) zeigten eine neue Möglichkeit der topischen Therapie zur Beseitigung der Hyperpigmentation bei Pityriasis versicolor auf. Da an der tryptophanabhängigen Synthese von Indolpigmenten durch *Malassezia*-Hefen die Transaminase 1 (TAM 1) beteiligt ist (siehe Kapitel 1.1.6.), behandelten Mayser und Rieche mit Cycloserin, einem TAM 1-Hemmer und konnten nach einer Applikation von Cycloserin (0,2 mol/l) für fünf Tage bei drei Patienten mit hyperpigmentierter Pityriasis versicolor nach 3-5 Tagen eine komplette Heilung erzielen. Damit konnte ein neues therapeutisches Prinzip für die Therapie und Prophylaxe der Pityriasis versicolor aufgezeigt werden, was die pathogenetische Bedeutsamkeit der tryptophanabhängigen Pigmentproduktion des Erregers für die Erkrankung unterstreicht.

Da die großflächige und wiederholt erforderliche topische Anwendung häufig zu Complianceproblemen führt, sollte in diesen Fällen sowie bei ausgedehnten Herden und häufigen Rezidiven eine systemische Therapie erfolgen. Hier stehen die Azole Ketoconazol [200 mg/Tag über zehn Tage oder 400 mg/Tag einmal im Monat (Jones, 1987; Kose et al., 2002)], Itraconazol [200 mg/Tag über sieben Tage oder zweimal 200 mg im Monat (Delescluse, 1990, Shumer et al., 1999) oder 400 mg Einzeldosis (Wahab et al., 2010)], Fluconazol [50 mg/Tag über 14 Tage oder zweimal 200 mg im Monat (Faergemann, 1992)] oder Pramiconazol [200 mg/Tag für zwei bis drei Tage (Faergemann et al., 2009)] zur Verfügung. Terbinafin ist im Gegensatz zur lokalen Anwendung systemisch nicht wirksam, da es mit dem ekkrinen Schweiß nicht ausgeschieden wird (Bischoff, 2000; Hort et al., 2006).

Die konsequente Therapie der Pityriasis versicolor sollte eingeteilt werden in die Behandlung der aktuellen Episode und Prophylaxe von Rezidiven.

Die Pilzelimination erfolgt sehr viel früher als die Beseitigung der Hypopigmentation. Letztere ist schwer zu behandeln und trotz Therapie häufig lang persistierend (Wertheim, 1928). Jung und Bohnert beschrieben 1976 eine Repigmentation während UV-Therapie innerhalb von 3 Wochen nach Beseitigung des Erregers. Eine 1975 durchgeführte therapeutische Studie zeigte keinen Effekt durch eine weitere UV-Therapie oder einer Kombinationstherapie mit UV-Licht und photosensiblen Agens (Meladinine) gegen alleinige antimykotische Behandlung (El-Gothamy und Abdel-Fattah, 1975). Auch in neueren Studien zeigt sich, daß es schwierig ist, durch UV-Bestrahlung eine Repigmentation zu erreichen. Die UV-Therapie sollte auf jeden Fall erst nach kompletter Beseitigung des Pilzes erfolgen.

Um diese kosmetisch häufig sehr störende Pigmentstörung schnell und wirksam zu beseitigen, wurde der Vorgang der Depigmentation gründlich untersucht. Hierzu soll auch diese Arbeit beitragen.

1.3. Biologie des Pigmentsystems

1.3.1. Die Pigmentzellen der Haut

Die Pigmentzellen der Haut, die Melanozyten, entstehen aus den Melanoblasten, die sich aus dem Neuralrohr differenzieren. Über 20 Billionen Pigmentzellen sind über die menschliche Oberfläche verteilt (Rosdahl und Rosman, 1983). Die Melanozyten formen ein Netzwerk aus dendritischen Zellen in der Basalschicht der Epidermis an der Grenze (= Basalmembran) zur Dermis. Sie korrespondieren mit den Keratinozyten (= Oberhautzellen) als „epidermale melanozytäre Einheiten“ (Fitzpatrick et al., 1971). Dabei steht ein Melanozyt in Verbindung mit ca. 36 Keratinozyten. Als sekretorische Drüsen bilden die Melanozyten im glatten endoplasmatischen Retikulum membrangebundene Organellen mit organisierter Matrix und einer speziestypischen Feinstruktur, die Melanosomen. Das glatte endoplasmatische Retikulum ist verbunden mit dem rauhen endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi Apparat, in welchen L-Dopa und das Enzym Tyrosinase gebildet werden und dann zu den Prämelanosomen transferriert werden über tubuläre Kanäle oder schmale Vesikel (Mishima, 1978). Mit zunehmender Reifung wachsen die Melaningranula in Anzahl und Größe und zeigen stärkere Positivität auf die Dopa-Reaktion. Die Melanosomen enthalten das Enzym

Tyrosinase und repräsentieren den Ort der Melanogenese. Sie werden mitsamt Melaningranula mit Hilfe von Mikrotubuli durch die Dendriten der Melanozyten den umgebenen Keratinozyten durch Phagozytose zugeteilt (Wu und Hammer, 2000). Diese transportieren das Melanin zur Hautoberfläche und bauen es schließlich ab. Dabei weiß man, dass bei diesem Prozeß das Zusammenspiel zwischen beiden Zellarten von entscheidender Bedeutung ist. Untersuchungen an Epidermisrekonstruktionen zeigten, daß eine niedrig dosierte UV-Bestrahlung von Melanozyten in Co-Kultur mit Keratinozyten zu einem Anstieg der Melaninsynthese führt, während die UV-Bestrahlung von Melanozyten-Monokulturen auch mit hohen Dosen keinen melanogenen Effekt aufweist (Duval et al., 2001).

Melanozyten sind meist bipolare Zellen mit zwei Auswüchsen und kürzeren oder längeren sowie mehr oder weniger verzweigten Dendriten.

Unsere Hautfarbe korreliert mit Sitz, Anzahl und Grad der Melanisierung und Speicherfähigkeit dieser Melanosomen sowie mit der Melanozytenanzahl. Diese Eigenschaften sind unter anderem genetisch verankert. Die Melanozytendichte variiert innerhalb und zwischen verschiedenen Personen abhängig von verschiedenen Einflußfaktoren:

So verringert sich die Melanozytendichte mit zunehmendem Alter um ca. 10-20% pro Dekade. Auch die Entwicklung grauen Haares hängt mit diesem Melanozytenschwund zusammen (Ortonne, 1990).

Die Melanozytendichte ist in allen Rassen weitgehend konstant und wächst bei melanogenetischen Stimuli wie zum Beispiel UV-Strahlung nur gering an (Schallreuter, 1990). Unterschiede in der Hautfarbe sind hier eher begründet durch unterschiedliche Anzahl, Sitz, Form und Verteilung der Melanosomen (Bleehen, 1977). Diese sind bei dunklerer Haut und durch melanogenetische Stimuli sehr viel zahlreicher vorhanden als bei heller, außerdem stärker melaniert und besitzen einen größeren Durchmesser. Diese großen Melanosomen sind einzeln verpackt, während kleinere bei Personen mit heller Haut in Gruppen zu zwei oder mehr zusammengefaßt sind (Bleehen, 1977).

In verschiedenen anatomischen Regionen des Körpers variiert die Anzahl der epidermalen Melanineinheiten beträchtlich, wohingegen die Anzahl der Keratinozyten um einen Melanozyten konstant ist. Viele Autoren machen das ortsspezifische Auftreten von malignen Melanomen für dieses Phänomen verantwortlich. Auch die Morphologie der Melanozyten ist an verschiedenen anatomischen Regionen unterschiedlich. So haben die Pigmentzellen in der Region von Abdomen, Brust und Extremitäten zwei polare Verzweigungen, aus denen weitere

Dendriten erwachsen, wohingegen die Zellen in Gesicht und Genitale ein eher sternförmiges Bild zeigen. In den einzelnen Arealen sind die Melanozyten uniform.

Mit zunehmender Anzahl der Naevi steigt auch die Melanozytendichte an (Schallreuter, 1999).

Das Geschlecht hat keinen Einfluß auf die Melanozytendichte, obwohl verschiedene Autoren beschrieben, daß weibliche Haut insgesamt heller ist als männliche (Bleehen, 1977). Auch Bräunungsfähigkeit der Haut, Augen- und Haarfarbe, Sommersprossen und zurückliegende Sonnenbrände sowie chronische Sonnenexposition scheinen nicht mit der Melanozytendichte zu korrelieren.

Die Melanogenese und die Anzahl melanozytärer Zellen sind außerdem noch von weiteren äußeren Einflüssen wie Hormonen, Prostaglandinen, Zytokinen und Stoffwechselprodukten abhängig. So antworten Melanozyten z.B. auf α -MSH (Alpha-melanozytenstimulierendes Hormon) oder ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) mit gesteigerter Proliferation und Melanogenese (Sawyer et al., 1983; De Luca et al., 1993). Auch Insulin (Bregman et al., 1985) und Glukokortikoide (Bregman et al., 1983) spielen eine Rolle, wobei die Bedeutung dieser Hormone in der Regulierung des pigmentbildenden Systems noch nicht ganz geklärt ist. Nordlund et al. zeigten 1986, daß es nach Applikation von Prostaglandinen in Mäuseepidermis zu einem erheblichen Anstieg von Dopa-positiven Melanozyten kam. Da Prostaglandine, Abbauprodukte der Cyclooxygenase im Arachidonsäurestoffwechsel, als Antwort auf eine Entzündungsreaktion durch epidermale Zellen synthetisiert werden, ist ihre Beteiligung an postinflammatorischer Hyperpigmentierung naheliegend. Weitere Faktoren und Zytokine beeinflussen die Proliferation [z.B. Basic Fibroblast Growth Factor = bFGF (Halaban et al., 1988)], Migration [z.B. Tumor Necrosis Factor α = TNF- α (Swope et al., 1991)], Tyrosinase-Aktivität [z.B. Interleukin1 α = IL-1 α , Interleukin6 = IL-6, TNF- α (Swope et al., 1991)], Melaninproduktion [LeukotrienB₄ = LT-B₄ (Morelli et al., 1992)] sowie Dendritenformation [Nerve Growth Factor = NGF (Yaar et al, 1991)] von Melanozyten.

Zusammenfassend ist die Pigmentation ein dynamischer Prozeß, beginnend mit dem Transport von Melaninvorstufen zu Melanozyten und Melanisierung dieser Vorstufen in Melanosomen bis hin zur Bewegung der Melanosomen in den Melanozytendendriten und Transfer zu Keratinozyten mit Pigmentation der Haut, welcher zahlreichen Einflüssen unterliegt.

1.3.2. Biosyntheseweg der Melanogenese

Die Biosynthese von Melanin erfolgt durch eine komplexe Serie enzymatischer und chemischer Reaktionen. Da bei der Melanogenese die Produktion hoch reaktiver Melaninzwischenprodukte eine mögliche Bedrohung für die Zelle darstellen, findet die Melaninsynthese nicht im Cytoplasma statt, sondern in erwähnten membrangebundenen Organellen, den Melanosomen, die vor den toxischen Intermediaten innerhalb der Zelle schützen.

Der Entdeckung von Görnitz (1923) folgend, daß man im Pigmentsystem dunkle, unlösliche Pigmente von alkalilöslichen in den roten Federn eines Vogels differenzieren kann, kamen zahlreiche Autoren im Laufe der Jahre zu der Erkenntnis, daß in Säugetiermelanozyten zwei Haupttypen von Melanin gebildet werden:

Das gelb-rote *Phäomelanin* mit hohem Schwefelgehalt und guter Löslichkeit in alkalischer Lösung (NaOH) und geringem Molekulargewicht (Ito, 1993) wird in sphärischen, variabel melanisierten Melanosomen gebildet (Inazu, 1993), das schwarz-braune schlecht lösliche *Eumelanin* mit höherem Molekulargewicht in ellipsoid-lamellären filamentösen, voll melanisierten Melanosomen (Pavel, 1993). Beide Melanosomenarten coexistieren in einem Melanozyten und Eu- und Phäomelanogenese können durch verschiedene physiologische und pathologische Bedingungen ineinander umgewandelt werden.

Das Hauptsubstrat beider Wege ist L-Tyrosin. Diese aromatische Aminosäure erhält die Zelle zum einen durch direkte Aufnahme über erleichterte Diffusion einem konzentrationsabhängigen Gradienten folgend (Schallreuter, 1999), durch einen Austauschtransporter (Leucin-System) zwischen extra- und intrazellulären Aminosäuren, zum anderen durch Hydroxylierung von Phenylalanin. Katalysiert wird diese letztere Reaktion durch die Phenylalaninhydroxylase (PAH) mit Hilfe des Cofaktors L-Erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (6 BH_4), der in Melanozyten und Keratinozyten gebildet wird, Sauerstoff und Calcium (Schallreuter et al., 1998; Schallreuter, 1999). Phenylalanin wird im Gegensatz zu Tyrosin aktiv in den Melanozyten aufgenommen über das kalziumabhängige L-Phenylalanin / Ca^{2+} ATPase – Antiportersystem. In den frühen Schritten der Modellreaktion, ausgearbeitet von Raper (1927) und Mason (1948) („Raper-Mason-Schema“) wird L-Tyrosin (Monophenol) hydroxyliert zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa = O-Diphenol, benötigt auch diesen als Cofaktor), welches oxidiert wird zu Dopachinon (O-Chinon). Diese beiden Reaktionen werden katalysiert durch das Kupferenzym Tyrosinase, ebenfalls mit Hilfe des Cofaktors 6 BH_4 (Schallreuter, 1999). Dabei kann die Tyrosinase Dopa schneller oxidieren als

Tyrosin. Von Dopachinon an divergieren die Wege von Eu- und Phäomelanogenese. Dopachinon ist ein hoch reaktives Molekül, das einer schnellen intramolekularen Cyclisierung zu LeukoDopachrom unterliegt, welches schnell zu Dopachrom oxidiert wird. Einige Autoren vermuten in dieser Oxidation einen dritten Regulationsschritt der kupferabhängigen Tyrosinase mit Hilfe des Cofaktors L-Dopa (Körner und Pawelek, 1982). Dopachrom ist relativ stabil und reagiert langsam und reibungslos mit Verlust von CO₂ zu farblosem 5,6-Dihydroxyindol (DHI), oder in geringerer Anzahl unter der Regulatorkontrolle eines tyrosinaseabhängigen Glykoproteins mit hohem Molekulargewicht, der Dopachrom-Tautomerase (TRP-2 = Tyrosinase-related protein 2) zu 5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure (DHICA), welches ein melanogenetisches Zwischenprodukt ist, das eine Carboxylgruppe enthält, die spontan verlorengehen kann unter Bildung von DHI (Hearing, 1999). Auch eine Akkumulation bestimmter Metallionen wie Kupfer, Zink und Eisen im melaninabhängigen Gewebe führt zu letzterer Art des Rearrangements von Dopachrom (DHICA > DHI). DHI und DHICA werden über Indol-5,6-Chinon mit Hilfe von Sauerstoff zu purpurrotem Melanochrom (Melanotropin), beschleunigt durch Indol-Umwandlungsfaktor, einem tyrosinaseabhängigem Protein (TRP-1) mit DHICA-Oxidase- und Polymerisations-Aktivität, und gehemmt durch Indol-Blockungsfaktor (Hearing, 1982), und weiter zu Eumelanin polymerisiert durch oxidative Kopplung an Position 2, 4 und 7 (DHI) bzw. linear verbunden an Position 4 und 7 (DHICA). Eumelanin aus DHICA ist braun, schlecht löslich und besitzt ein mittleres Molekulargewicht, wohingegen das aus DHI schwarz ist, komplett unlöslich und ein höheres Molekulargewicht hat (Hearing, 1999). Die beiden Strukturtypen unterscheiden sich auch in ihren Möglichkeiten photoprotektiv (DHI > DHICA) bzw. cytotoxisch (DHI > DHICA) zu wirken (Prota, 1993; Jimbow et al., 1995; Schmitz et al., 1995). Es werden also variable Formen von Eumelanin in menschlicher Haut gefunden, meist eine Mischung aus 2-Chinon- / Chinoidpolymeren (Indol-Chinon-Ringstrukturen), je nach äußeren und inneren Einflußfaktoren (Prota, 1996) mit unterschiedlichen Konsequenzen für die Melanozyten der Haut.

Die Biosynthese von Phäomelanin und Trichochrom involviert die Addition einer –SH-Gruppe von Cystein auf Dopachinon, um in einer schnellen nicht enzymatischen Reaktion CysteinylDopa (2-CysDopa oder 5-CysDopa) zu bilden. Mit Glutathion wird Dopachinon zu farblosem GlutathionylDopa, welches enzymatisch konvertiert wird zu CysteinylDopa. Phäomelanin wird dann über Benzothiazinderivate durch Oxidation von CysteinylDopa gebildet, katalysiert durch Peroxidase. Während Eumelanin verantwortlich für die phänotypische Erscheinung der Haut ist, variiert die Biosynthese von Phäomelanin

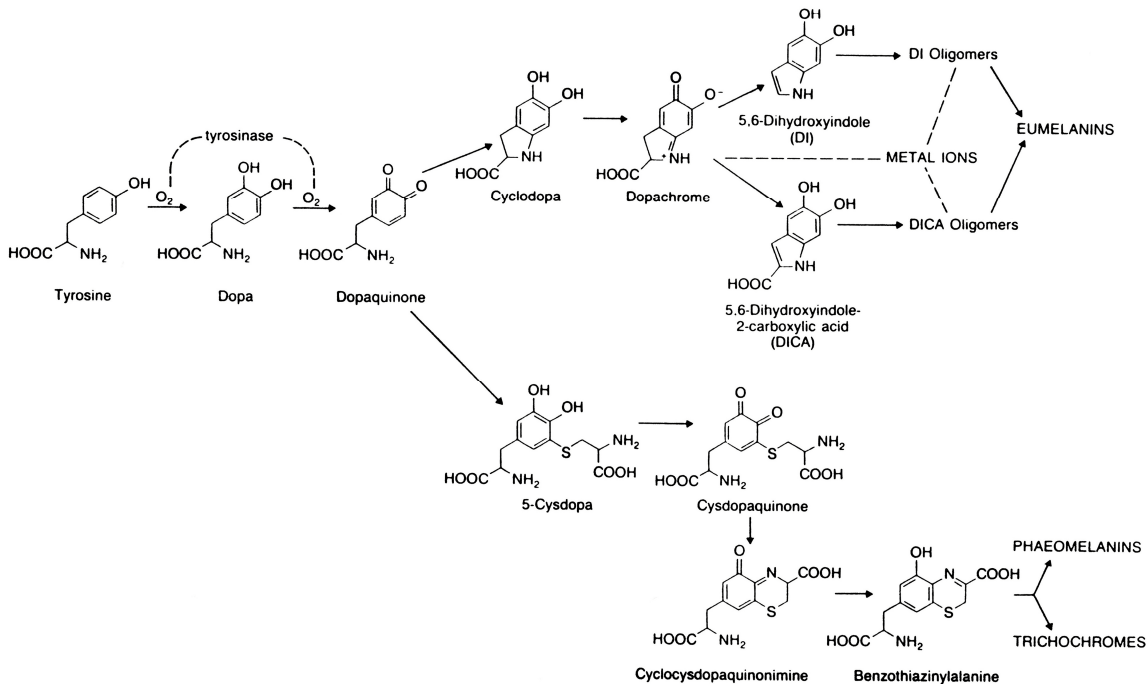
beträchtlich. Die Vorläufer von Phäomelanin wie Glutathion und Cystein spielen eine wichtige Rolle als Antioxidantien und sind wichtige Konjugatoren der elektrophilen Gruppen verschiedener Moleküle. Mit dieser Eigenschaft können sie die potentiell toxischen Chinoid-Produkte (freie Radikale) entgiften, die aus dem melanogenetischen Kompartiment entkommen. Die Phäomelanogenese entsteht also durch Nutzung von intrazellulären toxischen Chinonen und kann so betrachtet werden als protektiver Mechanismus der Melanozyten. Die Phäomelanin-Konzentration zeigt im Gegensatz zur Eumelanin-Konzentration keinen Bezug zum Hauttypen, bei Personen mit geringer Speicherkapazität für Melanin (Hauttyp 1) herrscht Phäomelanogenese vor (Pavel, 1993). Einmal voll melanisiert verlieren die Melanosomen ihre Tyrosinaseaktivität (Schallreuter et al., 1998), d.h. die Tyrosinase wird während der Dopa-Tyrosinase-Reaktion inaktiviert, wobei die Reduktionsrate proportional zur Reaktionszeit ist.

Das Pigment Melanin ist im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet. So ist es auch ein gut studierter pathogenetischer Mechanismus bei Pilzen (Langfelder et al., 2003), wie z.B. auch bei der *Malassezia*-Spezies. Letztere sind in der Lage auf einem Agar mit L-Dopa als Substrat auf einem Tyrosin-unabhängigen Weg Melanin zu bilden. Hierbei zeigt *M. dermatis* ein Maximum, *M. furfur* ein Minimum an Melaninproduktion (Gaitanis et al., 2005). Die Fähigkeit des Pilzes, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen, ist auf Melanin oder melaninartige Produkte zurückzuführen (Langfelder et al., 2003).

Bei vielen Tieren dient Melanin neben dem Schutz vor UV-Strahlung auch zur Tarnung. Die Verteilung von Melanin ist beim Menschen je nach geographischer Region, in der diese leben, unterschiedlich. In den Tropen kommt es häufiger vor als in nördlichen Regionen (Bleehen, 1977). Der Pigmentationseffekt ist aber nicht immer von Vorteil. Schwarze absorbieren 30% mehr Hitze der Sonne und schwitzen aus diesem Grund mehr, wohingegen blasse Haut den Vorteil hat, daß die Hitze durch Bestrahlung geringer ist. Außerdem wirkt das Melaninpigment der Synthese von Vitamin D entgegen, wodurch schwarze Kinder ein größeres Rachitisrisiko besitzen als weiße. Einige Autoren sprechen jedoch auch abgesehen vom UV-Schutz von einem Vorteil des Melanins in den Tropen. So wurde die Hypothese aufgestellt, daß es z.B. eine größere Überlebenschance bei Malaria, multiplen Parasiten, Tropenkrankheiten und Mangelernährung bietet (Wassermann, 1970) .

Abbildung 6: Melanogenese (nach Prota, 1988)

- 1.) Hydroxylierung der Ausgangssubstanz Tyrosin zu Dopa
- 2.) Oxidation von Dopa zu Dopachinon



1.4. Die Bedeutung der Dopa-Reaktion

Die Dopa-Reaktion wurde erstmals beschrieben durch Bloch und Ryhiner im Jahre 1917 und wurde beträchtlich verbessert durch Laidlaw und Blackberg (1932). Ursprünglich wurde sie zur Demonstration von Melanozyten angewandt, die durch ihre hohe Sichtbarkeit, einfache Identifikation und Bildung spezifischer Produkte für diese Reaktion geeignet sind. Die Dopa-Reaktion ist abhängig von einer aktiven Tyrosinase, welche, wie oben beschrieben, das Schlüsselenzym für die Entstehung des osmiophilen Melanins ist. Dieses unlösliche Pigment lagert sich in der Zelle ab und macht diese somit lichtmikroskopisch sichtbar (Mishima, 1978; Stanka, 1979). Die Reaktion ist spezifisch für Melanozyten, allerdings können Leukozyten fälschlicherweise ebenfalls geschwärzt werden, da sie nichtspezifische Oxidasen (Polyphenoloxidase) enthalten. Diese Färbung erscheint meist granulär statt solide. Eine

unspezifische Autooxidation des hinzugegebenen L-Dopas kann ausgeschlossen werden, da das Reaktionsprodukt streng strukturgebunden ist.

Im Laufe der Jahre wurden mehrere Variationen der Reaktion entwickelt. So erlaubte die Technik für Elektronenmikroskopie neben der Nachweisbarkeit der Tyrosinaseaktivität auch eine genaue Lokalisation des Enzyms innerhalb der Zelle (McCurdy, 1969), die wiederum wertvolle Hinweise zu Synthese und Differenzierung der Tyrosinase lieferte und Mishima (1978) den intrazellulären Weg der Melanogenese nachvollziehen ließ. Der Nachweis von Dopa-Oxidase ist vor allem zur Identifizierung von unpigmentierten Melanomzellen wichtig (Laidlaw und Blackberg 1932). Die Dopa- Reaktion wurde außerdem genutzt, um Anzahl, Morphologie und Biochemie der Pigmentzellen bei verschiedenen Erkrankungen wie malignen Melanomen (Hunter, 1978) oder Vitiligo (Gilhar, 1989) näher zu betrachten, sowie als schnelle, reliable und kostengünstige Methode für die pränatale Diagnose von Erkrankungen wie tyrosinasenegativem Albinismus (Gershoni-Baruch et al., 1991). Die Dopa-Reaktion kann auch helfen, die Genese von dermalen Tumoren, wie z.B. Basaliomen näher zu beleuchten (Deppe et al., 1976).

Durch Nutzen der Dopa-Reaktion im Zusammenhang mit der „skin-splitting“-Technik von Billingham und Medawar (1951), wo Epidermis und Dermis enzymatisch voneinander getrennt wurden, wurde eine bessere Erreichbarkeit der Melanozyten durch das Substrat L-Dopa gewährleistet. Diese Trennung war auch durch Säuren und Basen oder neutrale Salze wie z.B. Natriumbromid über Schwellung von Kollagen und Gelatin möglich (Felsher, 1946; Matolby, 1955).

Weitere Autoren, wie auch diese Arbeit, nutzten die Dopa-Reaktion zum Testen von chemischen Verbindungen auf die Tyrosinaseaktivität. So untersuchten Schroeder (1934) sowie Grüneberg und Schade (1934) die Wirkung von Vitamin C auf die Dopa-Reaktion. Duijin untersuchte 1953 die Wirkung von Substanzen auf die Dopa-Reaktion in den Melanozyten der Haarfollikel von Kaninchen. Iijima und Watanabe (1957) untersuchten einige chemische Verbindungen wie z.B. Hydrochinon auf menschliche Melanozyten und beobachteten, ab welcher Konzentration keine Dopa-positiven Melanozyten mehr nachweisbar waren. Obwohl sich die Dopa-Reaktion in diesen Untersuchungen als geeignet erwies, existieren keine neueren Studien, die die Tyrosinasehemmung auf diesem Wege beleuchten.

Es wird die Melanogenese *in vivo* („semi-in-vivo-Reaktion“) in Anwesenheit von einer Testsubstanz beobachtet. Die Reaktion gilt als Screening-Test für die Suche antipigmentierender Verbindungen. Dieser einfach durchzuführende Test liefert

reproduzierbare Ergebnisse, wenn auch keine ganz genau quantitativen Daten. Mit der Dopa-Reaktion können also Melanozyten durch ihre Aktivität entdeckt werden, wobei lichtmikroskopisch keine Unterscheidung zwischen einer Minderung der Melanozytenanzahl und einem Verlust der Dopa-Oxidase-Aktivität möglich ist.

Die Dopa-Reaktion wurde schon in der Vergangenheit genutzt, um mehr über die Pathogenese der Pityriasis versicolor zu erfahren. So wurden depigmentierte Krankheitsareale mit dieser Methode näher betrachtet. Zwar konnte nur Ruete (1933) hier eine komplett negative Dopa-Reaktion finden, und das auch nur in einem Hautbeispiel, jedoch fanden El-Gothamy und Abdel-Fattah (1975) eine verringerte Dichte von Melaninpigment in Melanozyten in erkrankter Haut verglichen mit gesunder Haut desselben Individuums. Chatterji (1972) fand wie El-Gothamy und Abdel-Fattah (1975) in der Dopa-Reaktion betroffener Areale die gleiche Anzahl von Melanozyten wie in gesunder Haut, aber die Farbe der Melanozyten in Depigmentationsarealen war weniger dunkel und tief, sie enthielten deutlich weniger Melanosomen und der Transfer zu Keratinozyten war verringert, so daß es zu einer Reduktion von epidermalem Melanin kam.

Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung der Melanozyten mittels der Dopa-Reaktion



2. HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG

Die Pityriasis versicolor ist eine durch *Malassezia-Hefen* bedingte Erkrankung, die eine charakteristische, bisher ungeklärte Farbvarianz ihrer Läsionen zeigt. Es finden sich umschriebene oder konfluierende meist braun/ockerfarbene, aber auch rötlich-erythematöse, gelbliche bis hin zu schwarzen Maculae mit einer feinen kleieförmigen Schuppung in den seborrhoischen Körperarealen, die im Wood-Licht grün-gelblich fluoreszieren und insbesondere bei Belichtung in eine langanhaltende Depigmentierung übergehen können (Pityriasis versicolor alba).

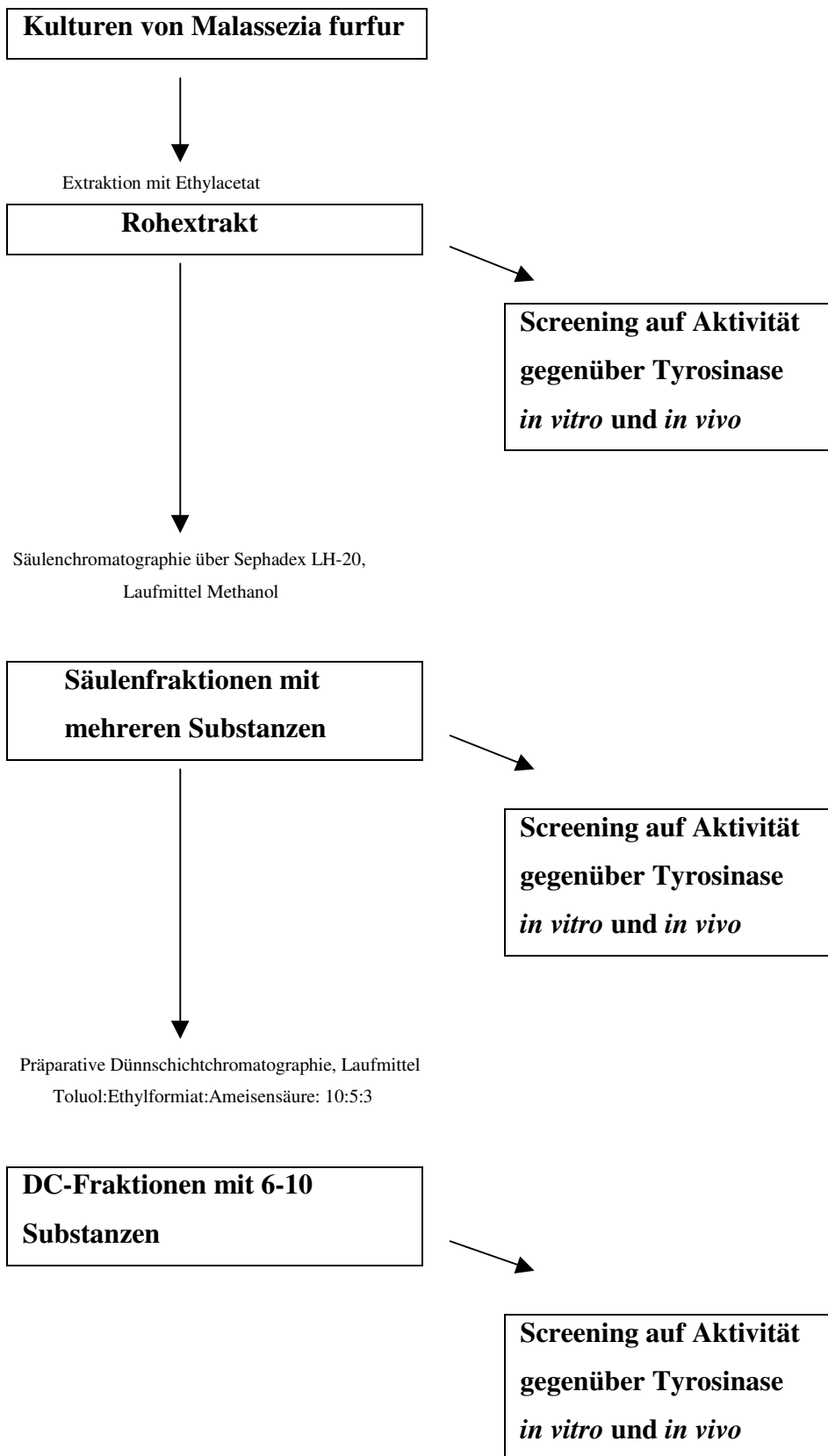
Die systematische Reduktion eines neuen Mediums, welches alle für die parenterale Ernährung des Menschen essentiellen Komponenten enthält, zeigten, daß für das Wachstum von *M. furfur* eine Lipidquelle und eine Aminostickstoffquelle ausreichen. Wird als Aminostickstoffquelle Tryptophan verwendet, so wird in *M. furfur* ein bisher unbekannter Stoffwechselweg induziert, der in der Synthese von Pigmenten und Fluorochromen resultiert. Die folgende Arbeit möchte die Bedeutung dieses neuen Stoffwechselweges für die Pathogenese der Pityriasis versicolor alba diskutieren, die durch eine langandauernde Hypopigmentierung gekennzeichnet ist. Zu diesem Zweck wird ein Rohextrakt sowie durch Säulenchromatographie und Dünnschichtchromatographie daraus aufgereinigte Pigmente auf die Hemmung der Tyrosinase, des Schlüsselenzyms der Melanogenese, überprüft. Diese Arbeit verwendet zu diesem Zweck die sogenannte Dopa-Reaktion, die von zahlreichen Autoren beschrieben und modifiziert wurde. Sie soll dazu beitragen, die Struktur eines möglichen durch *Malassezia furfur* gebildeten Tyrosinasehemmers aufzuklären.

Im Detail sollen in dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Läßt sich mit dem Rohextrakt aus *M. furfur*, welcher mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle angezchtet wurde, eine Hemmwirkung auf die Tyrosinasereaktion *in vitro* nachweisen?
2. Läßt sich diese Hemmwirkung gegebenenfalls einzelnen Banden/Verbindungen, welche mittels Auftrennung des Rohextraktes durch Säulen- und Dünnschichtchromatographie gewonnen wurden, zuordnen?

3. Wie stark ist die Hemmwirkung im Vergleich zu dem bekannten Tyrosinaseinhibitor 5-OH Indol?
4. Läßt sich eine Hemmwirkung auch an *ex-vivo* gewonnenen humanen Melanozyten nachweisen und ist das verwendete Modell, die oben beschriebene Dopa-Reaktion, hierfür geeignet?
5. Lassen sich aus dem Modell weitere Korrelationen ableiten, z.B. die Zahl der Melanozyten mit Alter, Geschlecht und Körperregion?

Die Vorgehensweise zur Beantwortung der Fragestellung wird in folgendem Schema noch einmal zusammengefaßt:



3. METHODIK UND MATERIAL

3.1. Anzucht und Kultur der *Malassezia*-Hefen

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

Für die Dauerkultur des CBS 1878 T wurde modifizierter (m) Dixon- Agar (Gueho et al., 1996, Guillot et al., 1997) eingesetzt, der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

3,6% Malzextrakt	(Malzextrakt-Bouillon, Merck, Darmstadt, FRG)
0,6% Pepton	(Pepton aus Casein, Merck)
2,0% Ochsen-galle	(Ox- Bile, dessicated, Fa Difco, Detroit, USA)
1,0% Tween	(Tween 40 Atlas, Sigma, St. Louis, USA)
0,4% Olivenöl	(aus Klinikumsapotheke, kaltsterilisiert)
1,2% Agar	(Agar Agar reinst, Merck)

Zur Verhinderung der bakteriellen Kontamination wurden folgende Antibiotika hinzugefügt:

0,04% Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Steinheim, FRG)

0,005% Chloramphenicol (Merck, Darmstadt, FRG)

Chloramphenicol (Verwendung einer Stammlösung: 6,25 mg auf 1 ml Aqua dest., sterilfiltriert abgefüllt und bei -20°C gelagert) und Cycloheximid werden aufgrund ihrer Temperaturempfindlichkeit dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C hinzugefügt.

Für die Herstellung von 250 ml Nährboden werden

9 g Malzextrakt,

1,5 g Pepton,

5 g Ochsen-galle,

5g Agar,

0,1 g Cycloheximid

und 2 ml Cycloheximid-Stammlösung

eingewogen und mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt.

Nach dem Autoklavieren bei 1 bar über 30 min (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin, FRG) und abkühlen auf etwa 50°C wurden 2,5 ml Tween 40 sowie 1,0 ml Olivenöl hinzugegeben.

Pro Kulturplatte werden jeweils 10 ml des flüssigen mDixon-Agars unter einer Uniflow Biohazard Laminar Flow Sicherheitsarbeitsbank (Gerätetyp UVUB1200, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried, FRG) in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegossen.

Nach Erkalten des Agars wurde die wäßrige Pilzsuspension (in 0,9% steriler Kochsalzlösung) mittels eines sterilen Tupfers gleichmäßig auf das Medium aufgetragen und in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 32°C bebrütet. In wöchentlichen Abständen werden die Kulturen auf frisch zubereiteten Agar weiterverimpft.

Die Pigmentbildung des CBS 1878 erfolgte auf P-Agar, einem transparenten Minimalagar ohne spontane Braunfärbung, der um Vitamine, Spurenelemente, Elektrolyte und Kohlenhydrate reduziert wurde und nur noch aus einer Lipidquelle und der Stickstoffquelle der Aminosäure Tryptophan besteht und folgende weitere Bestandteile enthält:

20 g Agar reinst	(Merck)
0,5 g Cycloheximid	(Sigma, Aldrich, Steinheim, FRG)
0,05 g Chloramphenicol	(Merck, Darmstadt, FRG)
30 ml Tween 80	(Tween 80, Sigma)
970 ml Aqua dest.	

Nach Sterilisation und Abkühlen wurde L-Tryptophan (Min 98%, Sigma Ultra) in einer Konzentration von 0,3% hinzugegeben und das Medium für die Pigmentproduktion wie oben beschrieben in Petrischalen ausgegossen.

Die Zugabe von Cycloheximid und Chloramphenicol war für die Pigmentbildung nicht notwendig, erlaubte jedoch eine Verminderung des Kontaminationsrisikos.

3.2. Gewinnung des Rohextraktes

Zur Gewinnung des Rohextraktes (des Pigments) wurden jeweils ca. 20 Kulturplatten P-Agar mit 6 Tage auf mDixon-Agar gewachsenen Kulturen von CBS 1878 T beimpft. Diese wurden ca. 14 Tage bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit ist der vorher transparente Nährboden durch das Pigment dunkelbraun verfärbt. Der Inhalt der Platten, sowohl der bräunlich pigmentierte Agar als auch die Pilzzellen wurden daraufhin mittels Pürierstab (Quelle, Fürth, FRG) homogenisiert und über 24 Stunden in Ethylacetat (Merck) zwecks Pigmentextraktion ausgezogen, das Extrakt über Glaswolle filtriert, mit Aqua dest. aufgegossen und ausgeschüttelt. Über einen Scheidetrichter kann man drei Phasen voneinander trennen: eine obere Ethylacetat-Phase mit dem braun-rötlichen Pigment, in der Mitte eine schaumige Phase mit –trotz Filtration noch vorhandenen- Tween- und Agarresten und eine untere Wasserphase. Die mittlere Phase fehlte bisweilen. Diese Vorreinigung des Rohextraktes ermöglicht eine deutlichere Bandentrennung über die anschließend durchgeführte Säulenchromatographie. Die obere Ethylacetat-Phase wird im Rotationsverdampfer (Typ VVI, Heidolph-Elektro KG, Kehlheim) getrocknet und anschließend in 96%igem Ethanol (Merck) aufgenommen.

Das nach Abrotieren in Ethanol aufgenommene Pigment wird lichtgeschützt bei –20°C bis zur Trennung über Säulenchromatographie gelagert.

3.3. Säulenchromatographie

Das gewonnene Rohextrakt wurde über die Säulenchromatographie aufgetrennt. Die Trennung erfolgte dabei nach der Gelpermeations- oder Ausschlußchromatographie. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem infolge der Wanderung von Molekülen durch ein Gel aufgrund eines Siebeffekts eine Verteilung nach der Molekülgröße erfolgt. Die stationäre Phase besteht aus einem Gel, das Poren bestimmter Größe aufweist. Diese sind verantwortlich für den Siebeffekt des Gels: Moleküle, deren größter Durchmesser kleiner als die Porenöffnung ist, können in das Porenvolumen hineindiffundieren und werden so lange nicht weitertransportiert, wie sie sich im Innern befinden. Größeren Molekülen hingegen, die nicht in die Poren passen, steht ein relativ kleineres Verteilungsvolumen zur Verfügung; in der Folge werden sie schneller durch die Säule bewegt und so von den niedermolekularen Substanzen getrennt.

Verwendet wurde folgende Säule: NS29 mit Fritte, Durchmesser 30 mm, Por. 1, PTFE-Küken NS 14/2,5 mm spitz ausgezogen, Nutzlänge ca. 525 mm; Fa Pfeuffer, Hannover, FRG.

Da es sich bei den extrahierten Pigmenten um lipophile Substanzen handelte, wurde für die stationäre Phase das lipophile Sephadex LH-20 (Porengröße 25 – 100 μ , Sigma) als hydroxyproliertes Derivat des Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Es wird für die Gelpermeationschromatographie, die Normalphasenverteilungs- und Adsorptionschromatographie von z.B. Lipiden, Steroiden, Fettsäuren, Hormonen und Vitaminen verwendet (Henke, 1995). Sephadex besteht aus dem stark vernetzten hochpolymeren Kohlenhydrat Dextran, das durch Hydroxyprolierung lipophile Eigenschaften aufweist und somit in organischen Solventien, in diesem Fall Methanol, quellbar ist.

Nach fünfständiger Quellung in Methanol wurde die Säule nach der Einschlammtechnik mit dem Gel gefüllt.

Nach Auftragen des Rohextraktes (2 ml in Ethanol, entspricht etwa 10 Agar-Platten) wurde eine Fleisch-Birne (Schott Duran, 1000 ml) aufgesetzt, mit Methanol gefüllt und Druck über einen Gummiball aufgebaut. Die Laufzeit der Säule betrug etwa 130 Minuten bei einem Fluß von ca. 19 ml/min und einem Elutionsvolumen von 2500 ml.

Die Trennung erfolgte unter Verwendung von UV-Licht (Desaga-GmbH, Heidelberg, Type 131200) der Wellenlänge 256 nm. Nur im UV-Licht war eine deutliche Bandenzeichnung zu erkennen, während sich im sichtbaren Licht eine homogene Braunfärbung der Säule zeigte.

Das Rohextrakt wurde in bis zu 20 Fraktionen (später 15) über die Säule getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden in getrennten Glasgefäßen aufgefangen, mittels Rotationsverdampfer getrocknet, und in Ethanol gelöst in 5 ml-Probenröhrchen (Autosamplerröhrchen mit Teflon-Dichtung, Neolab, Heidelberg, FRG) überführt.

Obwohl nach den einzelnen Säulenläufen die Säulen mit jeweils ca. 2000 ml Methanol gespült wurden, um eventuell noch auf der Säule verbliebene Substanzen zu entfernen, war eine regelmäßige Regeneration des Sephadex-Gels notwendig um verminderte Trenneigenschaften des Gels zu reduzieren. Dazu wurden zwei Verfahren durchgeführt:

- 1.) Sephadex LH-20 wird mit 0,2N NaOH versetzt über 12 Stunden unter gelegentlichem Schwenken (die Verwendung eines Magnetrührers muß vermieden werden, um die Oberflächenstruktur des Gels nicht zu beschädigen) inkubiert. Im Anschluß wird die Natronlauge über eine Nutsche abgesaugt und das Sephadex mit Aqua dest. gewaschen, bis wieder ein neutraler ph-Wert erreicht ist.

2.) Das Sephadex-Gel verbleibt auf der Säule. Auf die Geloberfläche wird ca. 1 ml 2N HCl pipettiert, das mit frischem Methanol durch die Säule gespült wird. Die Spülung mit Methanol wird bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes (pH 7) fortgesetzt.

3.4. Dünnschichtchromatographie

Die durch die Gelpermeabilitätschromatographie über die Säule aus dem Rohextrakt gewonnenen Fraktionen konnten über die Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennt werden. Dazu wurden jeweils 10 µl der Säulenfraktionen (in Ethanol gelöst) mittels Linomat IV (Camag, Muttenz, Switzerland) und einer 100 µl Hamilton Spritze (Linomat-Syringe, Camag) punktförmig auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, 20x20, Merck) aufgetragen.

Einstellung des Linomaten für die analytische Dünnschichtchromatographie:

Plattenbreite	200 mm
Bandenbreite	10 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	8 sec/µl
Startposition horizontal	10 mm
Startposition vertikal	20 mm
Abstand zwischen Banden	7 mm
Aufzutragendes Volumen	20 µl
Druck Hauptventil	>100 bar
Druck Reduzierventil	4-5 bar

Einstellung des Linomaten zur präparativen Trennung der Fraktionen:

Plattenbreite	200 mm
Bandenbreite	180 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	4 sec/ μ l
Startposition horizontal	10 mm
Startposition vertikal	20 mm
Abstand zwischen Banden	0 mm
Aufzutragendes Volumen	300 μ l
Druck Hauptventil	>100 bar
Druck Reduzierventil	4-5 bar

Die Dünnschichtplatten wurden mit einem Laufmittel folgender Zusammensetzung entwickelt (Laufkammern: Desaga, Heidelberg, Filterpapier: 20x20 cm, Camag, Muttenz, Schweiz): Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 (Dauer ca. 35 min).

Nach der Entwicklung und Trocknen der Platten war die Bandenzusammensetzung der Säulenfraktion zu erkennen. Die Rf-Werte (Quotient aus der Entfernung einer Substanz vom Startpunkt und Laufmittelstrecke) der Banden wurden sowohl im sichtbaren als auch im UV-Licht berechnet und so war es möglich, die (nicht immer gegebene) Konstanz der säulenchromatographischen Trennung anhand des Bandenmusters der jeweiligen Fraktion zu überprüfen.

Die Platten wurden im sichtbaren Licht mit einer Olympus OM-2 Kamera mit autodynamischer Lichtmessung fotografiert. Bei Aufnahmen im UV-Licht wurden mehrere UV-Filter (käufliche „Skylight“-Filter) vorgeschaltet, um Spektralverschiebungen durch hohe UV-Belichtung und damit eine Farbverfälschung zu vermeiden.

3.5. Aufreinigung der Dünnschichtbanden

Einzelne Banden der über präparative Dünnschichtchromatographie aufgereinigten Fraktionen wurden für weitere Versuche verwendet.

Nach Trocknung der Platten unter dem Abzug wurden die gewünschten Banden mit Bleistift markiert und mit dem Einmalskalpell ausgekratzt. Das erhaltene Kieselgel wurde sorgfältig mit einem Glasstab zermahlen und in 100 ml fassenden Erlenmeyerkolben mit Ethylacetat extrahiert. Nach Zugabe von destilliertem Wasser bildete sich ein Zweiphasensystem aus, welches in der oberen Phase Ethylacetat und die gewünschte Substanz, in der unteren Phase Wasser-Kieselgel enthält. Die obere Ethylacetatphase wurde mit einer Glaspipette abgenommen und mit wasserfreiem Natriumsulfat (Na_2SO_4 ; Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz) versetzt. Indem es noch vorhandenes freies Wasser aus der Ethylacetatphase als Kristallwasser bindet ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, Ausscheidung von Natriumsulfat aus wässrigen Lösungen als Dekahydrat = Glaubersalz), wird auch verbleibendes Kieselgel, welches nur in der Wasserphase löslich ist, ausgefällt. Die jeweilige Probe wird zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Rotana RP, 5 min bei 40000 Umdrehungen/min), die Ethylacetatphase in Glasröhrchen (neoLab Autosampler Vials, 4 ml, Heidelberg, FRG) über Stickstoff bei 40°C in einem Techne DRI-Block DB 3 (Heizblock Thermo Dux, Heidelberg) getrocknet und bei -20°C gelagert.

Die so erhaltenen Fraktionen wurden erneut in die im folgendem beschriebene Tyrosinasereaktion gegeben.

3.6 Einfluß der Metabolite auf Pilz-Tyrosinase (*in vitro*-Enzymversuch)

Überprüfung der Säulenfraktionen sowie der Dünnschichtbanden auf Hemmwirkung

In der Annahme, die Depigmentierungen bei Pityriasis versicolor seien bedingt durch eine Hemmung des Enzyms Tyrosinase im Melanogeneseweg, wurden die isolierten Pigmente in Anlehnung an die Arbeiten von Jung und Bohnert (1976) und Mayser et al. (1998 [b]) *in vitro* auf eine Hemmung überprüft. Dabei wurde jede Säulenfraktion sowie jede Dünnschichtbande hinsichtlich einer möglichen Hemmwirkung auf die Tyrosinasereaktion untersucht. Durch die Wahl von L- Dopa als Substrat wird dabei nur die Oxidation von Dopa zu Dopachinon berücksichtigt.

Die jeweiligen Fraktionen wurden in 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma) gelöst und in folgenden Reaktionsansatz eingebracht (abgewandelt nach Jung und Bohnert, 1976):

Dopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)	2,5 mg in 2 ml 0,05M Phosphatpuffer (pH 7,0)
Tyrosinase aus Pilzen (EC 1.14.18.1 ; Sigma)	150 U in 320 µl Phosphatpuffer
Phosphatpuffer (0,05M; pH 7,0)	1,4ml
Konzentration des Dopa in Mol/l (Molekulargewicht 197,2)	$2,94 \times 10^{-3}$ Mol/l

Die jeweiligen Testsubstanzen waren in 100 µl DMSO gut löslich. Stoffe, die eine Ausflockung oder Trübung des Reaktionsansatzes bedingten, konnten nicht auf Hemmwirkung getestet werden.

Die Messung erfolgte bei 20°C in 3 ml - Makro-Einmalküvetten (Müller, ratiolab, Dreieich, FRG) in einem Beckmann DU-68-Spektralphotometer bei 475 nm. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum des gebildeten Dopachinons, die Absorptionzunahme dient im Testsystem als Meßgröße für die Reaktionsgeschwindigkeit. Zunächst wurde der Leerwert jeder einzelnen Probe nach Zugabe der in 100 µl DMSO gelösten Fraktion bestimmt, anschließend im Vergleich mit dem unten genannten Vergleichs-Leerwert auf Null geeicht und dann die Tyrosinase hinzugegeben und die Extinktionszunahme bei 475 nm gemessen. Die Meßwerte wurden in 30sekündigen Abständen über 10 Minuten bestimmt. Längere Inkubationszeiten erwiesen sich als nicht sinnvoll, da sich das gebildete Dopachinon spontan in grauschwärzliche Melaninvorstufen umwandelt und sich damit die Extinktion bei 475 nm wieder reduziert. Der Leerwert für die Eichung bestand aus 3,72 ml Phosphatpuffer + 100 µl DMSO. Die Hemmwirkung wurde verglichen mit dem Reaktionsablauf ohne Zugabe der Testfraktion. Hierbei zeigte es sich, daß DMSO keinen Einfluß auf die Tyrosinasereaktion hatte. Bei längeren Versuchsreihen wurde immer wieder eine Positivkontrolle durchgeführt, um die Abnahme der Aktivität des Enzyms zu erfassen.

Herstellung eines 0,05M Phosphat-Puffers (nach Sørensen):

a.) Natriumdihydrogencarbonat: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

$$\text{MG} = 138,0$$

$$0,2 \text{ M} = 27,6 \text{ g/l}$$

$\Rightarrow 2,76 \text{ g auf } 100 \text{ ml Aqua dest.}$	39 ml
---	-----------------

b.) Dinatriumhydrogencarbonat: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$

$$\text{MG} = 178,05$$

$$0,2 \text{ M} = 35,61 \text{ g/l}$$

$\Rightarrow 3,561 \text{ g auf } 100 \text{ ml Aqua dest.}$	61 ml
--	-----------------

Für einen Phosphatpuffer mit $\text{pH} = 7,0$ bei 18°C und einer Molarität von 0,2 werden 39 ml von a.) und 61 ml von b.) zusammengegeben. Nach Zugabe von 100ml Aqua dest. erhält man 200 ml eines 0,1M Puffers. Dieser wird mit Aqua dest. 1:1 verdünnt. Man erhält 400 ml eines 0,05M Phosphat-Puffers.

Herstellung der L-Dopa-Lösung:

0,5 mg Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin) wurden in 0,4ml des 0,05M Phosphatpuffers gelöst.

Herstellung der Tyrosinase-Aufschwemmung:

Tyrosinase (aus Pilzen; E.C. 1.14.18.1) wird von Sigma als Trockensubstanz geliefert mit einer Konzentration von 3000 U/mg. 0,3 mg Tyrosinase wurden in 2ml Phosphatpuffer gelöst, 320 ml entsprechen den gewünschten 150U pro Reaktionsansatz.

Die die Enzymaktivität *in vitro* am stärksten hemmende Säulenfraktion wurde für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen an humaner Epidermis verwendet, als Kontrolle diente eine nicht hemmende Fraktion. Weiterhin wurde die hemmende Säulenfraktion wie oben beschrieben dünnenschichtchromatographisch weiter aufgetrennt. Die einzelnen Dünnenschichtbanden wurden nach Aufreinigung ebenfalls auf Hemmung der Enzymaktivität von Pilz-Tyrosinase *in vitro* überprüft. Auch hier wurde die am stärksten hemmende Bande sowie zur Kontrolle eine nicht hemmende Bande in den Untersuchungen an humaner Epidermis (*in vivo*-Enzymhemmung) überprüft. Zum Vergleich wurde der bekannte Tyrosinasehemmer 5-Hydroxyindol nach Überprüfung *in vitro* in die Untersuchungen an humaner Epidermis einbezogen.

3.7. Untersuchungen an humaner Epidermis

Obwohl der Melanozyt komplexer enzymatisch ausgestattet ist, dient die im folgenden beschriebene „Dopa-Reaktion“ als Modell für die *in vivo*-Melaninsynthese. Demzufolge wird in dieser Arbeit untersucht, inwiefern die Melaninsynthese und somit die Tyrosinase der Melanozyten durch die im Stoffwechsel von *Malassezia furfur* gebildeten Metabolite gehemmt wird.

3.7.1. Dopa-Reaktion

Verwendet wurden Hautproben, welche bei Operationen der Hautklinik übrigblieben, z.B. die beiden Spindeln rechts und links eines entfernten Naevus mit vorher eingeholtem Einverständnis der Patienten (Richtlinien der Ethikkommission AZ 80/98). Zusätzlich wurden Alter, Geschlecht und Entnahmestelle registriert. Das gewonnene Hautstück wurde sofort nach der Operation mit einem Skalpell in zwei gleiche Teile zerlegt, Fettreste der Dermis wurden soweit wie möglich entfernt. Die beiden Hautproben wurden zunächst in ca. 20 ml einer 2N Natriumbromidlösung (NaBr/ FW 102,9/ SIGMA) in 50 ml fassende PP-Röhrchen (Cellstar, Greiner Labortechnik) eingebracht. Diese Röhrchen wurden in ein Schüttelwasserbad (GFL ® 1092) bei 37°C und einer Schwenkgeschwindigkeit von 50/min gestellt. Die Inkubationszeit betrug 45-60 Minuten. Daraufhin ließ sich mittels zweier Pinzetten die Epidermis von der Dermis ablösen. War dies nicht der Fall (wie z.B. bei Haut aus der Genitalregion oder behaarter Kopfhaut), wurde die Inkubation in Natriumbromid

beliebig verlängert, bis die Lösung erfolgte. Die Dermis wurde verworfen, die abgelöste Epidermis in folgenden Ansätzen (angelehnt an die Konzentrationen der Tyrosinasereaktion im Photometer) bei gleicher Temperatur und Schwenkgeschwindigkeit in 1,8 ml fassende Plastikröhrchen (Cryo Tubes, Nunc) inkubiert (abgemessen mit Eppendorf-Pipetten):

A.) Kontrolle

- 1 mg L-Dopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin/ $C_9H_{11}NO_4$ / FW 197,2/ SIGMA)
- 900 μ l Phosphatpuffer (pH=7,3)
- 100 μ l Dimethylsulfoxid (C_2H_6SO / FW 78,13/ SIGMA)

B.) 1mg L-Dopa in 900 μ l Phosphatpuffer gelöst +

- a.) Rohextrakt in 100 μ l Dimethylsulfoxid gelöst (Art 1)
- b.) Photometrisch am stärksten hemmende Säulenfraktion in 100 μ l Dimethylsulfoxid gelöst (Art 2)
- c.) Photometrisch am stärksten hemmende Dünnschichtbande in 100 μ l Dimethylsulfoxid gelöst (Art 3)
- d.) 5-Hydroxyindol (C_8H_7NO / FW 133,1/ SIGMA) in 100 μ l Dimethylsulfoxid gelöst (Art 4)
- e.) Photometrisch nicht hemmende Säulenfraktion in 100 μ l Dimethylsulfoxid gelöst (Art 5)
- f.) Photometrisch nicht hemmende Dünnschichtbande in 100 μ l Dimethylsulfoxid gelöst (Art 6)

Herstellung des Phosphatpuffers (pH 7,3):

1 Tablette (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) wird gelöst in 100 μ l Aqua dest. und für 10 Minuten bei 115°C autoklaviert.

Der Phosphatpuffer ist im Vergleich zu anderen Puffern im Vorteil, da er die Lösung adäquat bei stabilem pH abpuffert, L-Dopa gut löst und eine optimale Umgebung für die Oxidation von L-Dopa bietet (Gilhar, 1989).

Herstellung einer 2N Natriumbromidlösung:

205,8 g Natriumbromid (Sigma) gelöst in 1 Liter Phosphatpuffer.

Die L-Dopa enthaltenden Lösungen wurden vor jedem Versuch frisch angesetzt und während der Versuchsdauer in lichtgeschützter Umgebung aufbewahrt, um Autooxidation des Dopas zu vermeiden. Phosphatpuffer und Natriumbromidlösung können bei 4°C gelagert werden.

Der pH-Wert der Lösungen sollte konstant bei 7,4 liegen, dem pH-Optimum der Dopa-Reaktion, da sowohl ein saurer als auch ein alkalischer pH-Wert die Tyrosinaseaktivität verändern kann (Fuller, 2001). Dies wird gemessen mit pH-Indikatorstäbchen (Neutralit® Universalindikator, pH 0-14, Merck) sowohl nach Ansetzen der Lösung als auch stündlich nach jedem Lösungswechsel, da bei längerer Inkubation die Gefahr der pH-Veränderung besteht. War der pH-Wert nicht im neutralen Bereich, wurde mit Phosphatpuffer verdünnt und entsprechend L-Dopa und Dimethylsulfoxid hinzugefügt, bis der Wert erreicht war.

Die Inkubationslösung wurde stündlich ersetzt, die gesamte Inkubationszeit betrug vier bis fünf Stunden. Die „Austauschlösungen“ wurden während des Versuches ebenfalls bei 37°C gelagert, um große den Versuch belastende Temperaturunterschiede zu vermeiden. Nach dieser Zeit nahm die Epidermis der Kontrolle makroskopisch eine leicht rauchgraue Färbung an. Zusätzlich kann die Epidermis (von der Kontrolle A.) als Ganzes unter dem Mikroskop angeschaut werden, ob braun angefärbte Melanozyten zu erkennen sind.

War dies der Fall, wurden die Epidermisproben kurz in Leitungswasser gespült und dann in Formaldehyd (4%ig, gepuffert, pH 7,35/ 1 Liter enthält 108 g Formaldehydlösung 37%ig) in braunen mit Gewindekappen verschlossenen 4 ml fassenden Autosampler vials (Neolab Migge Laborbedarf) über Nacht fixiert. Das dunkle Gefäß dient der Vorbeugung der Oxidation des Formalins zu Ameisensäure durch Licht. Dem Formalin wurde außerdem etwas Methylalkohol zugesetzt, um die Polymerisation des Formaldehyds zu verhindern. Die Pufferung des Formaldehyds ist essentiell, da nicht gepuffertes Formaldehyd die Färbung der Zellen schon nach 30 Minuten ablassen läßt (Kiernan, 2000). Der Zusatz von Kalkstücken verringerte unerwünschte pH-Senkung.

3.7.2. Standardisierung der Konzentrationen der Pilzkulturextrakte

Die Konzentrationen der Metabolite, d.h. des Rohextraktes, sowie der Metabolite aus oben beschriebener Säulen-sowie der Dünnschichtchromatographie wurden durch die Extinktionen im Photometer geschätzt, wobei durch Verdünnung der Metabolite die Extinktion auf $\leq 1,4$ gehalten wurde. Diese Extinktion erwies sich für die Versuche als praktikabel. Dieses Festhalten der Extinktionen gilt natürlich nur als grober Anhaltspunkt und dient dazu, Verdünnungsreihe n mit möglichst gleichem Gehalt an Stoffen zu und so eine Abhängigkeit zwischen Menge des Hemmstoffes und Stärke der Tyrosinasehemmung zu erkennen. Bei 5-Hydroxyindol wurden verschiedene Konzentrationen von 0,0025 g/l (0,33 mol/l) bis 3,65 g/l (485,8 mol/l) angewendet.

Tabelle 2 : Verdünnung der Extrakte bzw. Fraktionen

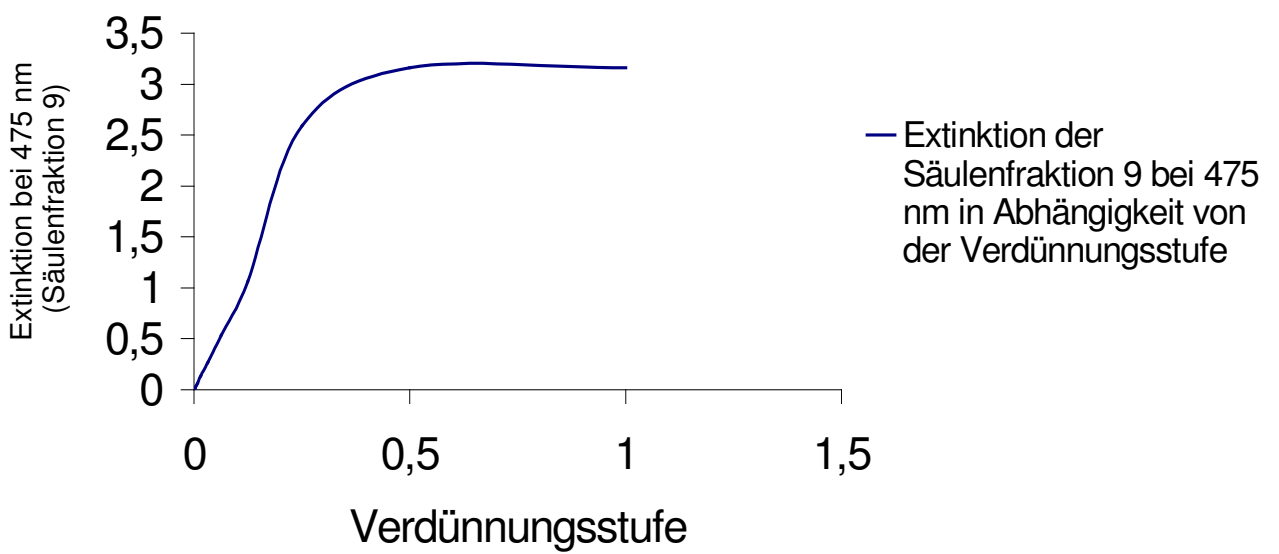
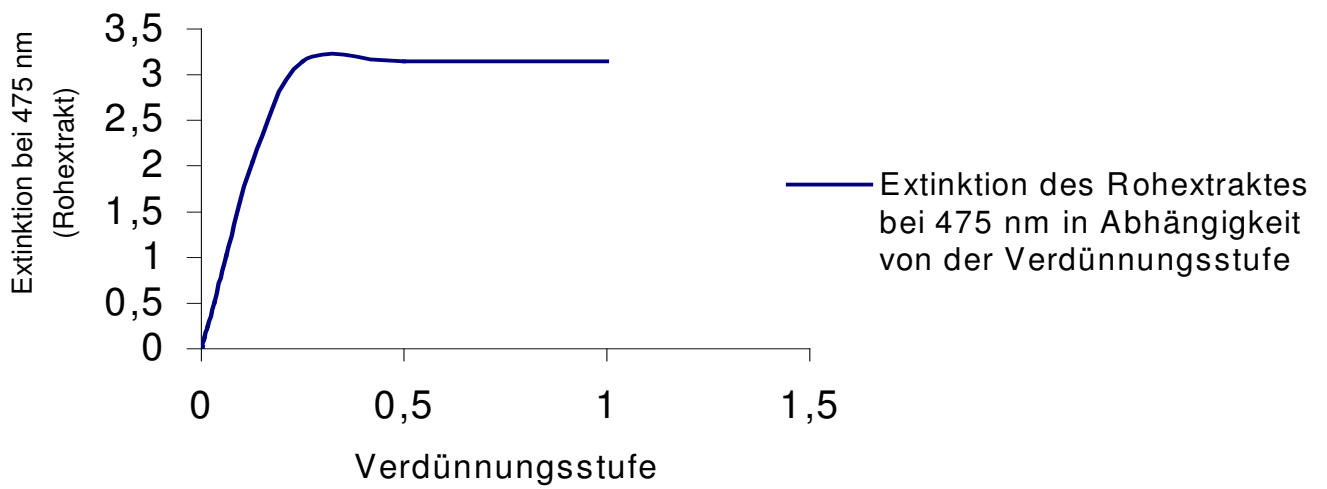
Verdünnung	E (Roh)	E (Säule)	E (oug)
1	3,145	3,161	3,124
0,5	3,145	3,161	3,124
0,25	3,145	2,592	2,688
0,125	2,049	1,063	1,344
0,0625	1,022	0,532	0,671
0,03125	0,512	0,266	0,335
0,015625	0,253	0,135	0,165
0,0078125	0,124	0,06	0,084
0,00390625	0,06	0,035	0,041
0,001953125	0,031	0,016	0,02
0,000976563	0,016	0,008	0,012
0,000488281	0,008	0,004	0,006
0,000244141	0,003	0,002	0,003
0,00012207	0,001	0,001	0,001
0,000061035	0	0	0

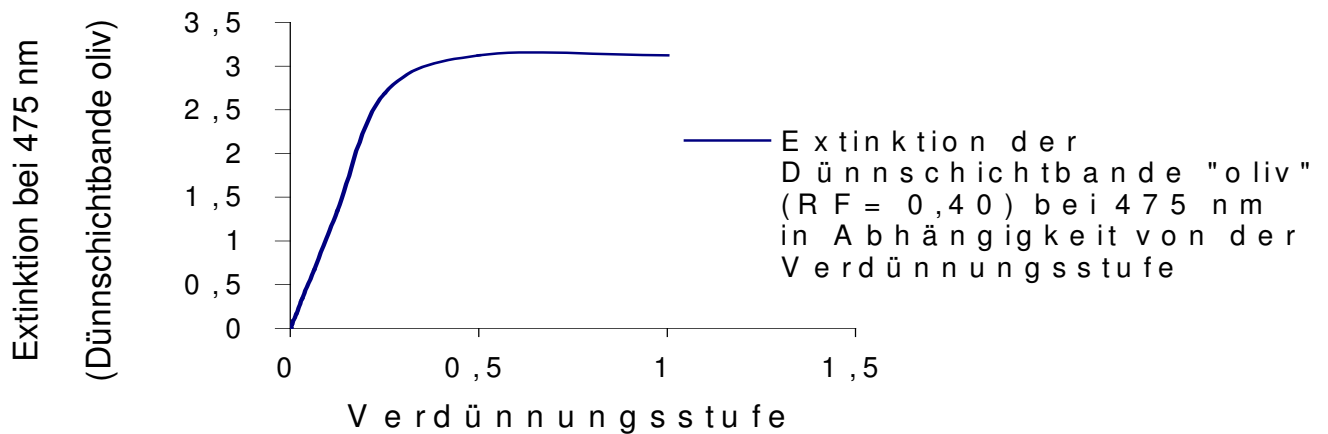
E (Roh) = Extinktion des Rohextraktes

E (Säule) = Extinktion der hemmenden Säulenfraktion

E (oug) = Extinktion der hemmenden Dünnschichtfraktion

Diagramme 1-3 : Abhängigkeit der Extinktion (bei 475 nm) von der Verdünnungsstufe der Extrakte





3.7.3. Optimierung der Dopa-Konzentrationen

Um herauszufinden, ob die Konzentration von 1 g/l L-Dopa, welche sich an die Tyrosinaseversuche am Photometer anlehnt, für die Hautversuche ausreichend ist, wurde folgender Versuch vorangestellt:

- A.) 4 mg L-Dopa in 900 µl Phosphatpuffer gelöst + 100 µl Dimethylsulfoxid
- B.) 3 mg L-Dopa in 900 µl Phosphatpuffer gelöst + 100 µl Dimethylsulfoxid
- C.) 2 mg L-Dopa in 900 µl Phosphatpuffer gelöst + 100 µl Dimethylsulfoxid
- D.) 1 mg L-Dopa in 900 µl Phosphatpuffer gelöst + 100 µl Dimethylsulfoxid
- E.) 0,5 mg L-Dopa in 900 µl Phosphatpuffer gelöst + 100 µl Dimethylsulfoxid

Dazu wurde eine große Hautprobe einer Versuchsperson in fünf gleich große Abschnitte eingeteilt. Der Versuch wurde zur Absicherung des Ergebnisses zweimal durchgeführt. Ein häufigeres Durchführen war aufgrund der Größe der benötigten Hautproben schwierig, da diese bei den oben genannten Bedingungen nach Operationen nicht so häufig anfielen.

3.7.4. Einfluß des Lösungsmittels DMSO auf die Dopa-Reaktion

Um den Einfluß der chemischen Verbindung Dimethylsulfoxid auf die Tyrosinaseaktivität sowie ihre toxische Wirkung auf Melanozyten auszuschließen, wurde die Dopa-Reaktion vor Beginn der eigentlichen Hautversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz durchgeführt:

- A.) 1 mg L-Dopa in 975 µl Phosphatpuffer + 25 µl Dimethylsulfoxid
- B.) 1 mg L-Dopa in 950 µl Phosphatpuffer + 50 µl Dimethylsulfoxid
- C.) 1 mg L-Dopa in 900 µl Phosphatpuffer + 100 µl Dimethylsulfoxid
- D.) 1 mg L-Dopa in 800 µl Phosphatpuffer + 200 µl Dimethylsulfoxid
- E.) 1 mg L-Dopa in 700 µl Phosphatpuffer + 300 µl Dimethylsulfoxid
- F.) 1 mg L-Dopa in 600 µl Phosphatpuffer + 400 µl Dimethylsulfoxid

In allen folgenden Versuchen wurde mit 100 µl Dimethylsulfoxid gearbeitet. Diese Konzentration reichte in jedem Fall aus, um jeglichen Hemmstoff zu lösen.

3.7.5. Kompetitive Reaktion mit extern zugesetzter Tyrosinase

Durch diese Versuche sollte festgestellt werden, ob die Hemmung der Tyrosinase *in vivo* durch gleichzeitige Hinzugabe von Pilztyrosinase teilweise verhindert bzw. austitriert werden kann (Kompetition der Pilztyrosinase und der Tyrosinase im Melanozyten um den Hemmstoff). Dazu wurde folgender Versuchsansatz genutzt:

- A.) 1 mg L-Dopa in 900 µl Phosphatpuffer gelöst + 100 µl Dimethylsulfoxid (Kontrolle)
- B.) 1 mg L-Dopa in 900 µl Phosphatpuffer gelöst + Hemmstoff in 100 µl Dimethylsulfoxid
- C.) 1 mg L-Dopa in 800 µl Phosphatpuffer gelöst + Hemmstoff in 100 µl Dimethylsulfoxid + 100 µl Tyrosinase (150 U in 320 µl Phosphatpuffer)

Die Tyrosinaselösung wurde bei jedem Lösungswechsel erneut hinzugegeben, also insgesamt viermal. Alle anderen Bedingungen wurden wie oben beschrieben beibehalten. Die Menge der Tyrosinase wurde zufällig gewählt (etwas weniger als die Hälfte der im Photometerversuch verwendeten Menge) und erwies sich bei Betrachtung der Ergebnisse für die Versuche als ausreichend.

3.8. Weitere histologische Aufarbeitung der Epidermisproben

3.8.1. Auswaschen und Entwässern

Nach der Fixierung wurden die Proben zunächst in fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Dazu brachte man sie in Kapseln aus perforiertem Stahlblech ein, die nach Beschicken mit einem Schnappdeckel, der ebenfalls Perforation aufweist, geschlossen wurden. Die Kapseln wurden in Plastikkassetten (Bayer Diagnostics, AUST, Miles) gelegt, die mit gegittertem Boden und Deckel versehen waren. Vorder- und Seitenwände des Bodenanteils der Kassette waren aufgeraut, so daß sie bequem mit Bleistift beschriftet werden konnten. Diese Bodenteile wurden nach Abbrechen des Deckels auch gleich als Rahmen zum Ausgiessen der eingebetteten Blöcke benutzt, so daß weiteres Beschriften oder Umsortieren der Präparate entfiel. Das Waschen der Präparate sollte genauso lang wie das Fixieren, also etwa zwölf Stunden, dauern. Dies war durch die Formalinfixierung auch beschleunigbar, indem man in niedrigprozentigem Alkohol anstatt in Wasser auswusch. Der Zusatz von einigen Tropfen Ammoniak zur Spülflüssigkeit beschleunigte das Auswaschen des Formols.

Da die Präparate in Paraffin, welches nicht mit Wasser mischbar ist, eingebettet werden sollten, mußten sie entwässert werden. Um dabei Zerreißen und Schrumpfungen zu vermeiden, wurde die Entwässerung stufenweise vorgenommen, indem man allmählich von schwachprozentigem zu stärkerprozentigem Alkohol übertrug. Dazu wurde die Alkoholreihe angewandt:

Die Präparate wurden schrittweise in 50-, 80- und 96%igen Alkohol, je ca. zwölf Minuten, gegeben, bevor man sie in absolutem Alkohol gänzlich entwässerte. Die Einwirkdauer der höherprozentigen Alkohole sollte länger andauern, als es bei den niedrigeren Alkoholkonzentrationen der Fall ist. Die Präparate blieben ständig in den oben beschriebenen Behältern. Die einzelnen Alkoholverdünnungen sollten öfter gewechselt werden, da sie durch eingeschlepptes Fixierungsmittel, Wasser und aus den Geweben gelöstes Fett zunehmend verunreinigt werden.

3.8.2. Paraffineinbettung

Nach der Entwässerung der Präparate erfolgte die Entfernung des Alkohols dadurch, daß das Präparat durch ein Intermedium geführt wurde. Dieses Intermedium wäre optimal mit Wasser mischbar und somit in der Lage Wasserreste, die bis in die letzte Alkoholportion verschleppt wurden, entfernen zu können, damit diese Reste keine Schrumpfungen im Paraffinblock verursachen, die zu schlechter Schneidbarkeit führen. In diesem Fall wurde aber einfachheitshalber das klassische Xylol verwendet, das sich mit Ethanol und Paraffin mischt, die Ergebnisse waren zufriedenstellend. Xylol drang rasch in das Gewebe ein. Die durchtränkten Gewebe wurden aufgehellt, so daß man das Fortschreiten der Durchtränkung erkennen konnte. Durch die starke Flüchtigkeit dünstete Xylol kontinuierlich vom Xylol-Paraffin-Gemisch ab und konzentrierte es. Aus dem absoluten Alkohol kamen die Präparate für ca. 15-20 Minuten in Xylol. Diese Zeit sollte nicht überschritten werden, da die Gewebe sonst unnötig hart und spröde werden. Das Xylol sollte rein sein, das heißt farblos und vollkommen frei von Wasser und Alkohol.

Vom Intermedium wurden die Präparate für 30-60 Minuten in eine mit Paraffin gesättigte Lösung von Xylol gebracht, die im Wärmeschrank bei 35 bis 40°C in Vorrat gehalten wurde. Die Präparate sollten gut durchtränkt sein, damit später bei Verdunsten des Xylols aus dem heißen Paraffin keine paraffinfreien Areale zurückbleiben. Zu langes Verweilen härtet die Präparate nur unnötig und macht sie schwer schneidbar.

Nach dem Durchtränken mit Xylol-Paraffin übertrug man die Präparate für ca. eine Stunde in geschmolzenes reines Paraffin bei 56°C. Die erste Portion Paraffin wurde durch das austretende Xylol verunreinigt. Es folgten ein oder zwei weitere Portionen von reinem Paraffin. Waren die Präparate gut entwässert und alkoholfrei, schadete auch längeres Verweilen in Paraffin nicht.

Oben genannte Schritte vom Auswaschen der Fixierung bis zum Durchtränken mit Paraffin fanden im Einbettautomaten (Tissue Tec VIP, Miles scientific) statt.

Dabei bediente man sich dem Tauchprinzip, bei dem sich die Präparatekassetten in einem Korb befinden, der vom Automaten auf- und abbewegt wird, während er in einen Behälter mit den verschiedenen Medien taucht. Nach der gewünschten Zeit hebt die Maschine den Korb gänzlich aus dem Behälter und befördert ihn zum nächsten. Hier waren 14 Kammern im Kreis angeordnet. Der Automat war mit einem Uhrwerk ausgestattet; auf einer Programmierscheibe ließen sich die gewünschten Transportzeiten einstellen. Die Paraffinbäder wurden durch Thermostaten und eine elektrische Heizung auf 60°C gehalten.

Das Einbettungsschema sah wie folgt aus:

Paraffin-Schnelleinbettung mit Vakuumeinbettautomat (Autotechnican Mono LTD, Ireland) (bei bereits fixierten Präparaten):

(Tauchprinzip)

1. Formalin	
2. 50% Ethanol	5 Minuten
3. 80% Ethanol	12 Minuten
4. 80% Ethanol	12 Minuten
5. 80% Ethanol	12 Minuten
6. 96% Ethanol	12 Minuten
7. 96% Ethanol	12 Minuten
8. 100% Ethanol	12 Minuten
9. 100% Ethanol	15 Minuten
10. Xylol	15 Minuten
11. Paraffin (Histo-comp®, Vogel)	15 Minuten
12. Paraffin (Histo-comp®, Vogel)	15 Minuten
13. Paraffin (Histo-comp®, Vogel)	15 Minuten
14. Paraffin (Histo-comp®, Vogel)	20 Minuten

2 Stunden 30 Minuten

Eine Verkürzung der Einbettzeiten sowie eine Verbesserung der Durchdringung erreichte man durch Erwärmen aller verwendeten Flüssigkeiten und Anwendung von Unterdruck. Dadurch wurde die rasche und restlose Beseitigung flüchtiger Medien bei der Paraffindurchtränkung bewirkt.

3.8.3. Ausgießen der Präparate

Waren die Präparate mit Paraffin durchtränkt, wurden sie in Formen aus Stahlblech eingegossen, die dem Paraffinblock die Form eines sehr flachen Prismenstumpfes verliehen. Die Fläche der abgeschnittenen Prismenspitze entsprach der späteren Anschnittfläche.

Der Spannrahmen für die Mikrotomhalterung wurde auf die Ausgießform (in einer dafür vorgesehenen Rille) gesetzt. Als Spannrahmen diente der Boden der schon beschrifteten Plastikkassette, in der das Präparat den Einbettautomaten passiert hatte. Als Teil der Kassette umgab er ein Gitter, das beim Ausgießen in den Paraffinblock eingeschlossen wurde und so für die Befestigung des Rahmens am Paraffinblocks sorgte. Es wurde eine geeignete

Ausgußform gewählt und etwas flüssiges Paraffin in die tiefste Aussparung, die spätere Anschnittfläche, gegeben. Dann wurde das Präparat hochkant eingelegt und justiert. Anschließend preßte man den Boden der Kassette, der nun als Spannrahmchen diente, fest in die Rillen der Form und füllte es bis zur Oberkante mit Paraffin, welches aus einem gewärmten Auslaßhahn kam. Die gefüllte Form wurde auf eine gekühlte Metallplatte (Para-Freezer Med Lass) gestellt, so daß das Paraffin von unten von der Anschnittfläche her erkalten konnte. Sobald sich an der Oberfläche des erkalteten Paraffins eine Haut gebildet hatte, wurde die Form in Eiswasser gebracht. Das Aushärten des Paraffins dauerte etwa 15 Minuten. Das zum Ausgießen verwendete Paraffin sollte etwas stärker (2-4°C) erhitzt sein, als dies zum Infiltrieren der Präparate nötig ist, damit es bei Berührung mit kühleren Objekten nicht zu rasch erstarrt.

Der Paraffinspender (Tissue Tek®) hält 2-5 Liter Paraffin flüssig bereit. Die Temperatur ist über Thermostat zu regeln.

3.8.4. Schneiden am Mikrotom

Zum Schneiden der Proben wurde ein Schlittenmikrotom (MEDM Germany, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) mit Messer- und Objektschlitten verwandt. Bei diesem lag die Schnittebene waagrecht (Messerschlitten). Durch eine Mikrometerschraube ließ sich der Objektschlitten auf einer schrägen Schiene verschieben und so der Messerebene in feinst abgestuften Schritten nähern (Einstellung der Schnittdicke).

Beim Schneiden wurde der Messerschlitten mit der Hand am seitlich angebrachten Griff gleichmäßig die Schlittenbahn entlang gezogen und die Messerschneide so zum Arbeitenden hin waagrecht über die Anschnittfläche geführt. War der Schnitt abgetrennt, wurde der Messerschlitten wieder bis zum Anschlag zurückgeschoben. Beim Anschlagen sorgte eine Mechanik dafür, daß der Objektschlitten um den gewählten Betrag die schiefe Ebene der unteren Schiene vorgeschoben wurde, das Präparat also in der gewünschten Schnittdicke zum Messer gehoben wurde. So erhielt man mehrere Schnitte von identischer Dicke, die in diesem Fall von der Mitte nach lateral angeordnet waren (M1-M4 / O1-O4).

Zuerst näherte man das Präparat durch Drehen am entsprechenden Handrad dem Messer so weit, daß seine Oberfläche möglichst genau in Messerhöhe gelegen war. Dann zog man im ersten Versuch das Messer vorsichtig über das Objekt, wobei man so lange justierte, bis das Messer eben in die oberflächlichste Schicht des Blockes einschneidete. Nun zog man den Messerschlitten gleichmäßig und nicht zu schnell zu sich heran. Die andere Hand führte einen

30-35°C erwärmt. Dabei dehnten sich die Schnitte glatt aus. Hatten sich die Schnitte geglättet, ließ man durch leichtes Kippen der Objektträger Wasser ablaufen und stellte sie hochkant zum Trocknen auf. Dazu wurden die Schnitte in einen Trockenschrank (memmert-Brurschrank) bei 42-45°C aufbewahrt, wo sie einige Stunden, aber auch über Tage bleiben konnten.

Nach völligem Trocknen kamen die Paraffinschnitte zum Herauslösen des Paraffins für etwa zwei bis drei Minuten in Xylol. Danach führte man sie durch die Alkoholreihe (absoluter Alkohol, 96%-, 80%-, und 60%iger Alkohol) in Aqua dest. In jeder dieser Flüssigkeiten sollten die Schnitte ein bis zwei Minuten bleiben (= Mindestzeiten, die beliebig überschritten werden durften).

Die Hälfte der Präparate wurde nicht extra gefärbt, da die Braunfärbung der Melanozyten auch so zu erkennen war. Diese Präparate wurden direkt nach dem Entfernen des Paraffins in Xylol eingedeckt.

3.8.6. Färben der Schnitte

Die Duplikate der Präparate wurden gefärbt. Diese Färbung diente dazu, die zahlreichen Strukturen, die sich in ungefärbtem Zustand durch ihr unterschiedliches Lichtbrechungsvermögen nicht oder nur undeutlich unterscheiden lassen, scharf hervorzuheben und mühelos voneinander zu trennen. Zwar waren die Melanozyten auch ohne Färbung erkenn- und zählbar, jedoch konnten mit Färbung die die braunen Zellen umgebenden Strukturen mikroskopisch besser dargestellt und fotografiert werden. Beim späteren Zählen wurden sowohl die ungefärbten als auch die gefärbten Schnitte je zur Hälfte berücksichtigt.

Bei der Färbung handelte es sich um eine Schnittfärbung, bei der der Farbstoff, der in Lösung angeboten wird, an definierte Gewebestrukturen bindete. Es wurde eine progressive Färbemethode angewandt, bei der die Schnitte so lange in der Färbelösung verweilten, bis sie genügend gefärbt waren. Dabei konnte man das Fortschreiten der Färbung von Zeit zu Zeit kontrollieren und nach Wunsch fortsetzen. Die Färbezeit wurde entscheidend von der Konzentration der Farbstofflösung und der Färbetemperatur bestimmt. Hämalaune sind Komplexverbindungen von Metallionen, die als Doppelsulfate (Alaune) eingesetzt werden.

Hämalaun als positiv geladener Farbstoff ist geeignet ganz allgemein Basophilie einer Struktur anzuzeigen. Die selektive Kernfärbung, die man bei Hämalaunfärbungen fast ausschließlich wünscht, wird durch die Azidität der Farbstofflösung und durch einen gewissen Überschuß an Alaun erreicht. Die Hämalaunlösung nach Hansen wird meist wegen ihrer Stabilität bevorzugt. Da sie nur wenig Alaun enthält, färben sich neben Kernen auch andere

Strukturen zart in graublauem Ton mit, so daß man unter Umständen auf eine Gegenfärbung verzichten kann.

Herstellen einer Hämalaunlösung nach Hansen:

- A. 1g Hämatoxylin in 10ml Ethanol (100%) lösen, 24 Stunden warten
- B. 20g Kalialaun in 200ml warmem Aqua dest. lösen, abkühlen lassen und filtrieren
- C. 1g Kaliumpermanganat in 16ml Aqua dest. lösen
- D. Hämatoxylin- und Kalialaunlösung mischen
- E. Unter ständigem Rühren langsam 3ml der Kaliumpermanganatlösung zerfließen lassen
- F. Unter ständigem Rühren bis zum Sieden erhitzen, 30-60 Sekunden unter Rühren auf Siedetemperatur halten
- G. Rasch abkühlen
- H. In eine gut verschließbare Flasche filtrieren

Die Färbelösung konnte, um die Selektivität der Kernfärbung und die Haltbarkeit zu steigern, mit Hilfe von Eisessig (2ml auf 100ml Färbelösung) angesäuert werden. Die Färbung erfolgte in Glasgefäßen. Um große Mengen von Objektträgern gleichmäßig und zügig zu färben, waren aus Metall gefertigte Färbegestelle (Nitrosta-Blech und -Draht) vorhanden, die 20 Rillenpaare aufwiesen, in die dann jeweils die Objektträger gestellt wurden. Solche Farbeinsätze wurden zusammen mit eckigen Glasgefäßen (Färbewannen) verwendet, die an ihren Oberkanten scharf abgeschliffen und mit einem Stahlblechdeckel verschlossen waren. Die Gestelle ermöglichten es, für alle Objektträger identische Färbezeiten einzuhalten.

Die Färbedauer von 5-10 Minuten erwies sich als am günstigsten. Geringere Zeiten ergaben zu schwache Kontraste, zu lange Färbezeiten überdeckten die Braunfärbung der Melanozyten. Natürlich schwankten diese Zeitangaben mit Alter und Konzentration der Farbstofflösung. Es war auch möglich den Stand der Färbung zeitweise zu kontrollieren, indem man den Objektträger aus der Färbelösung nahm, in Aqua dest. und Leitungswasser spülte und unter dem Mikroskop betrachtete. Je nach Ergebnis konnte die Färbung unterbrochen oder fortgesetzt werden. Dabei war zu beachten, daß erst in Leitungswasser die blaue Farbe des Hämalauns hervortritt. Um diesen Effekt ohne Zeitverzögerung zu erzielen, nahm man warmes Leitungswasser zum Bläuen.

Nach der Färbung wurde der Schnitt in Aqua dest. oder 0,1%iger Salzsäure (HCl) abgespült, bis keine Farbstoffwolken mehr abgingen. Danach wurde etwa 5 Minuten in Leitungswasser gebläut. War die Farbe beim Spülen in Aqua dest. noch rostbraun, so wurde sie in Leitungswasser blau. Dabei änderte sich mit dem pH-Wert (der pH der Färbelösung war stets im sauren Bereich) nicht nur die Farbe, sondern auch die Löslichkeit des Hämalauns, das im neutralen und alkalischen Milieu nur schlecht wasserlöslich ist. So bedeutete Bläuen der Schnitte auch gleichzeitig Fixierung der Färbung. Die Farbe und Löslichkeit des Hämalauns schlug dabei etwa bei $\text{pH} = 3$ um.

Um das Bläuen zu beschleunigen, konnte zum Spülen warmes Wasser verwendet werden, oder man bediente sich schwacher alkalischer Lösungen wie 0,1%ige Ammoniak- oder Natriumbikarbonatlösung.

Die Hämalaunfärbung führte in erster Linie zur kontrastreichen Darstellung der Zellkerne in blauem oder violetterem Farbton. Daneben färbten sich auch Ergastoplasma und saure Grundsubstanz blau.

3.8.7. Einschließen von wasserfreien Präparaten

Zur Entwässerung nach dem Färben kamen die Schnitte zunächst in die aufsteigende Alkoholreihe (70-, 96-, 99%iger Alkohol, je 5 Minuten). Dabei mußte darauf geachtet werden, daß man nur kurz abschwemmt, damit die Farbe nicht aus dem Präparat gezogen wurde. Zum Entfernen des Alkohols wurden die Schnitte daraufhin für ca. 10 Minuten in Xylol eingebracht. Zum Einschließen der entwässerten und entspriteten Präparate verwendete man Einschlußmittel auf Kunstharzbasis (Polystrol), die als flüchtiges Lösungsmittel Xylol und einen Weichmacher enthielten. Das Eukitt ist fertig zu kaufen.

Beim Eindecken wurde der Objektträger mit dem Schnitt aus dem Xylol genommen, man ließ die Flüssigkeit ablaufen und legte das Präparat waagrecht auf eine Filterpapierunterlage. Dann wurde das Präparat mit einem Tropfen Eukitt bedeckt, den man mit einem Glasstäbchen aufbrachte. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde das Deckglas (Menzel-Gläser, 24x26mm #1) aufgelegt. Die Menge des Eukitts war so zu bemessen, daß der Raum zwischen Deckglas und Objektträger gerade ausgefüllt war; sie war also abhängig von der Größe des Deckglases. Im Laufe der Zeit verdunstete das Lösungsmittel des Eukitts und das Deckglas war fest auf den Objektträger gekittet. Sollte das Eukitt dabei den Raum unter dem Deckglas nicht mehr vollständig ausfüllen, setzte man an den Rand des Deckglases einen weiteren Tropfen, der dann kapillär in die Lücke gezogen wurde. Um Unebenheiten des Schnittes

auszugleichen und das Einschlußmittel möglichst dünn und gleichmäßig zu verteilen, belastete man das Deckglas nach dem Einschließen mit einem kleinen Gewicht von etwa 15-20g. Das Erhärten des Eukitts konnte man durch Einlegen der eingedeckten Präparate in den Wärmeschrank bei 37°C (Memmert-Brutschrank) beschleunigen.

3.9. Statistische Methoden

3.9.1. Datenerfassung

Die Hautschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Olympus Mikroskop, Japan) angeschaut. Da das entstandene Melanin osmiophil und damit unter unseren Präparationsbedingungen unlöslich ist, erkennt man entlang der Basalmembran braun bis schwarz angefärbte Zellen. Diese wurden durch ein Okular mit Meßlatte pro mm Basalmembran gezählt. Pro Hautprobe wurden von vier Schnitten jeweils 7,5mm, also insgesamt 30mm (Maximum begrenzt durch die Größe der Schnitte) gezählt. Zusätzlich wurden die Schnitte photographisch mit einer Olympus C-351-D-4 Kamera festgehalten.

Daß diese vier Schnitte eine nahezu gleiche Verteilung angefärbter Zellen aufweisen, wurde mit der *Friedmanns Ranganalyse* überprüft. Untersucht wird eine Stichprobengruppe von 129 Versuchen (= Hautproben) unter vier Bedingungen (siehe Kapitel 3.8.4.), d. h. vier unterschiedliche Lokalisationen von einer Hautprobe. Diese Untersuchung erfolgt sowohl für die Hautproben ohne als auch für die mit Behandlung durch den Hemmstoff. Die Nullhypothese wird wie folgt formuliert: Die verschiedenen Bedingungen nehmen keinen Einfluß auf die Verteilung der betroffenen Meßwerte, d. h. sämtliche Schnitte entstammen einer gemeinsamen Grundgesamtheit. Das Signifikanzniveau wurde bei einem zweiseitigen p von $> 0,0001$ festgesetzt.

3.9.2. Statistische Auswertung

Die Frage, ob sich die Proben mit und ohne Hemmstoff in der Anzahl der braun angefärbten Melanozyten signifikant voneinander unterscheiden, wird mit dem *Wilcoxon-Test für Paardifferenzen für zwei verbundene Stichproben* geprüft. Die Nullhypothese H_0 ist hierbei die Behauptung, die Proben mit und ohne Hemmstoff würden sich in der Anzahl der braun angefärbten Melanozyten nicht voneinander unterscheiden. Sie wird verworfen wenn der

kritische Wert von $p = 0,7$ unterschritten wird. Wir erhalten sechs p-Werte, für jede Art = Hemmversuch (1-6) (siehe Kapitel 4.3.5.) einen. In einem Säulendiagramm für jede Art werden die Unterschiede dargestellt. Zudem wird in einem Diagramm die Anzahl der braun angefärbten Melanozyten mit Hemmstoff (X-Achse) und die Anzahl ohne Hemmstoff gegeneinander aufgetragen, wobei die unterschiedlichen Arten durch unterschiedliche Symbole voneinander zu unterscheiden sind.

Da die Extinktionen bei 475 nm, welche als grobe Orientierung für die Konzentration des Hemmstoffes erhoben wurden, nicht bei allen Versuchen identisch waren, wird mit dem *Spearman'schen Rang-Korrelationskoeffizienten* die Abhängigkeit zwischen Hemmstoffmenge und Zelldifferenz der braun gefärbten Zellen (also „Hemmstärke“) untersucht. Die Nullhypothese (H_0) lautet: Zwischen den Extinktionen der Hemmstofflösung und den Zelldifferenzen (Mit/Ohne) besteht ein Zusammenhang. Ist der errechnete Wert (r_s) für den Korrelationskoeffizienten nahe 1, besteht eine gute Korrelation. Die Ergebnisse werden durch ein XY-Diagramm dargestellt, wobei die Extinktion bei 475 nm (X-Achse) gegen die Differenz $AZ_{mit}/AZ_{ohne} =$ „Hemmstärke“ (Y-Achse) aufgetragen wird.

Die jeweiligen Arten 2 und 5 (Säule positiv und negativ) sowie 3 und 6 (Dünnschichtbande positiv und negativ) (siehe Kapitel 4.3.5.) werden durch den *U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney* miteinander verglichen. Die Nullhypothese lautet $H_0: \mu_1 = \mu_2$ (dementsprechend $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$), d.h. die Gruppen unterscheiden sich in ihren Unterschieden der angefärbten Zellzahl nicht voneinander. Ist $p = 0,5$, wird die Nullhypothese angenommen, ist $p \neq 0,5$ wird sie verworfen, d.h. es bestünde ein Unterschied im Hemmeffekt beider Arten (je nach Vorzeichen zugunsten der einen oder anderen Art).

Um zu überprüfen, ob die Hemmung der Tyrosinase durch die Stoffprobe durch Hinzugabe des Enzyms ganz oder teilweise rückgängig zu machen ist, wird die *ANOVA Varianzanalyse nach Friedman* genutzt. Die Nullhypothese (H_0) lautet : Die zu vergleichenden Werte entstammen einer Grundgesamtheit. Sie kann bei einem Signifikanzniveau von $p > 0,0001$ verworfen werden, d. h. in diesem Fall ist die Hemmung rückgängig zu machen. Die Ergebnisse werden in einem Säulendiagramm dargestellt (Anzahl_ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten pro mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion ohne Hemmstoff / Anzahl_mit = Anzahl angefärbter Melanozyten pro mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion mit Hemmstoff / Anzahl_rück = Anzahl angefärbter Melanozyten pro mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion mit Hemmstoff und gleichzeitiger Zugabe von externer Tyrosinase).

Mit dem Spearman-Korrelationskoeffizient wird überprüft, ob die schlechtere Hemmung durch Zugabe von externer Tyrosinase mit zunehmender Hemmstoffkonzentration geringer ausgeprägt war. Zur Darstellung der Ergebnisse wird die Extinktion bzw. bei 5-Hydroxyindol die molare Konzentration (X-Achse) der Differenz AZ_Mit/AZ_Rück (Y-Achse) gegenübergestellt.

Die häufig getroffene Aussage, daß die Melanozyten mit zunehmendem Alter an Anzahl abnehmen, wird hier durch *Multiple Regression (Lineare Regression)* überprüft. Die Werte der unabhängigen X-Variable (Alter der Probanden) sind hier exakt vorgegeben, die Y-Werte (Anzahl der Melanozyten nach Dopa-Reaktion ohne Hemmstoff) sind zufällig bedingt (Regression 1. Art). Einer beobachteten Punktwolke wird eine Regressionsgleichung angepaßt und eine mögliche Veränderung der Zellzahl wird pro Lebensjahr angegeben.

Daß die Lokalisation der Hautprobe eine unterschiedliche Anzahl an Melanozyten enthält, soll ebenfalls überprüft werden. Dazu werden die Lokalisationen in sieben verschiedene Gruppen eingeteilt (nach Rosdahl und Rosman, 1983) :

Tabelle 3 : Gruppeneinteilung zu Hautlokalisationen:

Gruppe	Lokalisation
1	Kopf
2	Schulter und Rücken
3	Oberarm
4	Unterarm
5	Brust und Abdomen
6	Bein
7	Genitalbereich

Um mögliche Unterschiede der Melanozytenzahl an diesen sieben verschiedenen Lokalisationen zu erkennen wird die *Covarianzanalyse (Mehrfachklassifikation)* angewandt.

Da die Zellzahl zusätzlich vom Lebensalter abhängt, werden hier altersbereinigte Mittelwerte errechnet. Das Signifikanzniveau wird bei einem zweiseitigen p von < 0,05 festgelegt.

Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Gruppen werden die Ergebnisse in einem Säulendiagramm dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Aufarbeitung des Rohextraktes

4.1.1. Säulenchromatographie

Der, wie in 3.2. beschrieben, gewonnene Rohextrakt wurde zur weiteren Bestimmung seiner Bestandteile zunächst über Säulenchromatographie (Sephadex LH 20 Gelpermeationschromatographie) aufgetrennt. Dabei wandern große Moleküle relativ schnell über die Säule, während die kleineren Moleküle in den Poren des Gels hängenbleiben und später eluiert werden. Es zeigte sich im sichtbaren Licht eine homogene Braunfärbung der Säule ohne Fraktionierungskriterien. Im UV-Licht (bei 254 und 366 nm) konnten jedoch zahlreiche Banden durch farbige Fluoreszenz voneinander abgegrenzt werden (Abbildung 8). Zunächst wurde sehr kleinschrittig fraktioniert. Dabei wurden bis zu 20 Fraktionen gewonnen (Abbildung 9 und 10). Für die spätere Aufarbeitung der Säulenfraktionen erwies sich eine gröbere Vorfraktionierung in 15 Fraktionen als ausreichend (Tabelle 4 und 5), da im „Vorlauf“ keine konstante sinnvolle Trennung möglich war.

Abbildung 8 : Fraktionen der Säulenchromatographie im UV-Licht



Tabelle 4: Trennschema zur Aufbereitung des Rohextraktes über Sephadex LH 20 nach Aufgabe von 2 ml in Ethanol gelöstem Rohextrakt (entspricht ca. 10 Agarplatten, siehe Kapitel 3.2.)

<i>Fraktion</i>	<i>Farbe im UV-Licht</i>	<i>Volumen in ml</i>
Vorlauf	Keine sinnvolle Trennung möglich	130 ml
	Farbloser, nicht fluoreszierender Vorlauf	
Fraktion 1	Fluoreszierendes Orange (im Gefäß olivgrüne Fluoreszenz)	100 ml
Fraktion 2	Braun (im Gefäß gelblich)	50 ml
Fraktion 3	Blau/Farblos (ganz zart fluoreszierendes Gelb)	60 ml
Fraktion 4	Beige (im Gefäß leicht gelbliche Fluoreszenz)	100 ml
Fraktion 5	Braun	60 ml
Fraktion 6	Fluoreszierendes Goldgelb	150 ml
Fraktion 7	Zwischenfraktion	50 ml
Fraktion 8	Fluoreszierendes Hellgelb/-grün	150 ml
Fraktion 9	Helles Braun	250 ml
Fraktion 10	Orange	220 ml
Fraktion 11	Braun	180 ml
Fraktion 12	Gelb	110 ml
Fraktion 13	Ganz helles Gelb	140 ml
Fraktion 14	Lila	310 ml
Fraktion 15	Ganz helles Gelb	230 ml

Es wurden 15 Einzelfraktionen mit einem Gesamtvolumen von ca. 2300ml gewonnen.

Bei einigen Säulen waren Fraktion 6 und Fraktion 8 vertauscht, aber trotzdem gut als solche zu erkennen. Die Zwischenfraktion (Fraktion 7) war nicht immer vorhanden.

Bei der Überprüfung einer Hemmwirkung auf das Enzym Tyrosinase im Photometer erwiesen sich vor allem die Fraktion 9 als bedeutsam, die daraufhin für die Hautversuche genutzt und weiter aufbereitet wurde.

4.1.2. Dünnschichtchromatographie

Die durch Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen wurden über präparative Dünnschichtchromatographie weiter aufgearbeitet, durch die eine Vielzahl von Pigmenten als Bestandteile des Rohextraktes nachgewiesen werden konnten.

Über eine Probepatte wurden die einzelnen Fraktionen durch Rf-Werte sowie sichtbares und UV-Licht charakterisiert (siehe Tabelle 5). Die im Photometersversuch hemmenden Säulenfraktionen werden hier durch Kursivdruck hervorgehoben. Die Abbildungen 9, 10 und 11 geben die Dünnschichtchromatographie des Rohextraktes im sichtbaren Licht sowie im UV-Licht wieder, das zuvor über der Säule getrennt wurde.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Säulenfraktionen (1-15, siehe Tabelle 4) nach Dünnschichtchromatographie

Fraktion:	Rf- Wert:	Farben im sichtbaren Licht:	Farben im UV-Licht:
		Fraktionen zeigen eine braun-gelbe Schleifspur (keine Trennung)	
1. Fraktion	0,061		Ganz dick beige / Blau
(orange)	0,12		Beige / Blau
	0,14		Dicker Gelb - Orange
	0,18		Dicker Rosa
	0,21		Gelb
	0,25		Bräunlich
	0,28		Blau
	0,31		Dick fluoreszierendes Blau
	0,32		Helles Orange / Rosa
	0,34		Hellblau
	0,35		Grau
	0,36		Fluoreszierendes Blau-Grün
2. Fraktion	0,048		Blau
(braun)	0,085		Dick Beige
	0,12		Gelb

	0,13		Grau
	0,14		Orange
	0,16		Leuchtend fluoreszierendes Blau
	0,21		Blau
	0,26		Bräunlich
	0,28		Grau
	0,31		Fluoreszierendes Grünblau
	0,33		Dunkles Orange
3. Fraktion	0,030		Blau
(bläulich)	0,073		Schwach leuchtend Blau
	0,098	Schwach Rosa	Leuchtend fluoreszierendes Gelb
	0,15	Blaß Gelb	Grau / Hellblau
	0,20	Rosa	Grau / Hellblau
	0,22		Fluoreszierendes Gelb
	0,24		Braun
	0,27	Rosa	Schwach Orange
	0,29	Stark Rosa	Stark Lila
	0,33		Grau / Blau
	0,37	Bräunlich	Rosa
	0,41	Gelb	Rosa
	0,43		Gelb
	0,46		Fluoreszierendes Gelb
	0,67	Blasses Rosa	Fluoreszierendes Orange
	0,82		Fluoreszierendes Hellgelb
4. Fraktion	0,060		Fluoreszierendes Blau
(beige)	0,091	Rosa	
	0,13	Gelb	Fluoreszierendes Blau
	0,18	Rosa	Gelb
	0,20		Orange - Gelb
	0,27	Rosa	Grau
	0,32	Orange	Orange
	0,38	Rosa	Gelb
	0,39	Oliv-Braun	

	0,40	Gelb	Gelb
	0,42	Dunkelrosa (dick)	
5. Fraktion	0,03	Hellrosa	Fluoreszierendes Gelb
(braun)	0,061		Grau (schwach)
	0,11	Hellrosa	
	0,16	Gelb	Dunkelgelb / Orange
	0,18	Blau / Braun	
	0,21		Fluoreszierendes Gelb (dunkel)
	0,24	Helles Orange / Gelb	Orange (schwach)
	0,27	Grau-Gelb	Grau
	0,28	Rosa	Lila
	0,30 – 0,34	Gelb- / Beige- / Brauntöne (wechselnd)	
	0,35	Pink	
	0,36	Grau / Lila	Grau
	0,41	Gelb (schwach)	Gelb
	0,44	Rosa / Gelb (schwach)	Fluoreszierendes Grün / Gelb
	0,46		Lila
	0,48		Rosa
	0,82		Fluoreszierendes Hellgelb
	0,03	Hellrosa (ganz schwach)	Fluoreszierendes Gelb
6. Fraktion	0,08	Rosa (ganz schwach)	Fluoreszierendes Gelb / Lila
(goldgelb)	0,16		Gelb (schwach)
	0,18	Gelb (stark)	Fluoreszierendes Gelb
	0,20	Rosa / Bräunlich	
	0,22	Gelb (schwach)	Beige-Grau
	0,27	Rosa	
	0,32	Gelb (schwach)	Rosa / Braun
	0,36	Blau-Grau (kräftig)	Blau
	0,37	Gelb	
	0,39	Rosa	Rosa
	0,41	Hellgelb	
	0,44	Orange-Gelb (kräftig)	Orange

	0,66		Fluoreszierendes Orange
	0,82		Fluoreszierendes Hellgelb
7. Fraktion			
(Zwifra)			
8. Fraktion	0,06		Grau
(hellgelb)	0,08	Rosa	Fluoreszierendes Hellblau
	0,10	Hellrosa / Bräunlich	
	0,15		Fluoreszierendes Gelb
	0,17	Gelb	Dunkelgelb
	0,19	Blau	Fluoreszierendes Gelb
	0,20		Lila
	0,24	Orange (hell)	Orange
	0,27	Grau-Gelb	Grau
	0,28	Rosa	Lila
	0,32	Gelb (deutlich)	Gelb / Rötlich
	0,33	Beige-Gelb	Braun
	0,34	Hellgelb	Gelb
	0,35	Rosa	Lila
	0,36	Grau / Lila	
	0,37	Gelb	
	0,39	Lila (dick), Olivgrün	Rosa / Blau
	0,41	Gelb	
	0,44	Rosa	Fluoreszierendes Grün
	0,66		Lila
	0,67		Rosa (schwach)
	0,82		Fluoreszierendes Hellgelb
9. Fraktion			
(braun)			
Bande 1	0,042	Lila	Lila
Bande 2	0,10	Schwach Rosa	
Bande 3	0,12	Lila	Grau
Bande 4	0,14	Kräftig Orange (Curry 3)	Kräftig Orange

Bande 5	0,18	Blau/Rosa	Rosa
Bande 6	0,21	Blau (gebogen)	Blau-Grün
Bande 7	0,22	Orange (falsches Curry)	Gelb/Rosa
Bande 8	0,24	Grau/Lila	Orange/Rosa
Bande 9	0,26	Grau	Hellgrau
Bande 10	0,27	Orange (Curry)	Orange
Bande 11	0,29	Rosa	Rosa/Braun
Bande 12	0,31		Gelb
Bande 13	0,33	Blau-Grün	Stark Grau
Bande 14	0,35	Rosa	Grau
Bande 15	0,37	Schwach Gelb/Rosa	
Bande 16	0,40	<i>OLIV (0,37-0,40)</i>	
Bande 17	0,41	Gelb (leuchtend)	Gelb (leuchtend) / Bläulich
Bande 18	0,42	Braun/Grau (o.u.o.)	Braun/Grau
Bande 19	0,43	Helles Gelb	
Bande 20	0,44	Oliv-Grau	Rosa/Grau
Bande 21	0,46		Rosa-Orange
Bande 22	0,64	Rosa (blaß)	Lila
Bande 23	0,68	Gelb (blaß)	Fluoreszierendes Rosa (dick)
Bande 24	0,75		Fluoreszierendes Gelb
Bande 25	0,82		Fluoreszierendes Hellgelb
10. Fraktion	0,042		Rosa / Gelb
(orange)	0,10	Helles Gelb	
	0,15	Gelb (leuchtend)	
	0,17		Orange / Gelb (dunkel)
	0,18	Oliv / Lila	
	0,21	Hellrosa	Bläulich
	0,23		Rosa
	0,24	Gelb (hell)	
	0,29	Braun	Oliv-Grün (leicht fluoreszierend)
	0,30	Orange (leuchtend)	
	0,33	Oliv-Grün (OLIV?)	Oliv / Braun
	0,35	Grau	Lila

	0,38	Gelb / Olivgrün	Gelb
	0,40	Orange	Gelb
	0,43	Gelb	Gelb
	0,48		Lila
11. Fraktion	0,13	Orange (dünn)	
(braun)	0,16	Gelb (schwach)	
	0,25	Grau / Lila	
	0,28	Grau	
	0,37	Orange (leuchtend)	Orange / Rot (leuchtend)
	0,40	Grau / Oliv (nur noch schwach)	Grau / Rosa
	0,41		Gelb
	0,42	Grau	Bläulich
	0,44	Grau (stark)	Grau (stark)
	0,46	Hellgelb	Stark fluoreszierendes Grün
	0,48	Grau	Lila
	0,51	Dunkelgelb	
	0,57	<i>Hellgelb</i>	Stark fluoreszierendes Gelb
	0,61	<i>Rosa</i>	
12. Fraktion	0,16	<i>Bräunlich</i>	Gelblich
(gelb)	0,26	<i>Gelb</i>	
	0,34		Gelb (schwach)
	0,37	<i>Leuchtend Orange (nicht immer)</i>	Gelb / Rosa (schwach)
	0,38		Grau (schwach)
	0,40		Gelb (schwach)
	0,44	<i>Grau (dick)</i>	Grau (dick)
	0,46		Gelb
	0,48		Bläulich
	0,57	<i>Hellgelb</i>	Fluoreszierendes Blau-Grün (stark)
	0,64	<i>Hellgelb</i>	Fluoreszierendes Sonnengelb
13. Fraktion	0,16	<i>Gelb (schmutzig)</i>	

(gelb)	0,33	<i>Grau-Braun</i>	Leicht fluoreszierendes Gelb
	0,36	<i>Bläulich</i>	Rot
	0,40	<i>Orange (hell)</i>	Gelb
	0,46		Fluoreszierendes Gelb
	0,53	<i>Grau</i>	
14. Fraktion (lila) 15. Fraktion (gelb)		<i>Diese Fraktionen zeigen im normalen Licht eine beigefarbene Bande.</i>	Diese Fraktionen zeigen im UV-Licht wechselnde ganz schwach fluoreszierende Gelbtöne.

Für die ersten Hautversuche wurde das „gelb“ ($R_f = 0,17$) aus Fraktion 8 genutzt (stärkste Hemmwirkung auf die Tyrosinase im photometrischen Test), für alle weiteren Versuche das „oliv“ ($R_f = 0,40$) aus Fraktion 9. Da es sich bei jeder Bande um ein Stoffgemisch handelt, können schon minimale Veränderungen der Trennbedingungen zu Verschiebungen führen, die diesen Wechsel in der stärksten Hemmung ausmachen. Im Verlauf zeigte sich jedoch das „oliv“ ($R_f=0,40$) aus Fraktion 9 jeweils als die *in vitro* am stärksten hemmende Bande.

Abbildung 9: Pigmentspektrum im sichtbaren Licht (Analytische DC-Trennung der zu Beginn gewonnenen 20 Säulenfraktionen)

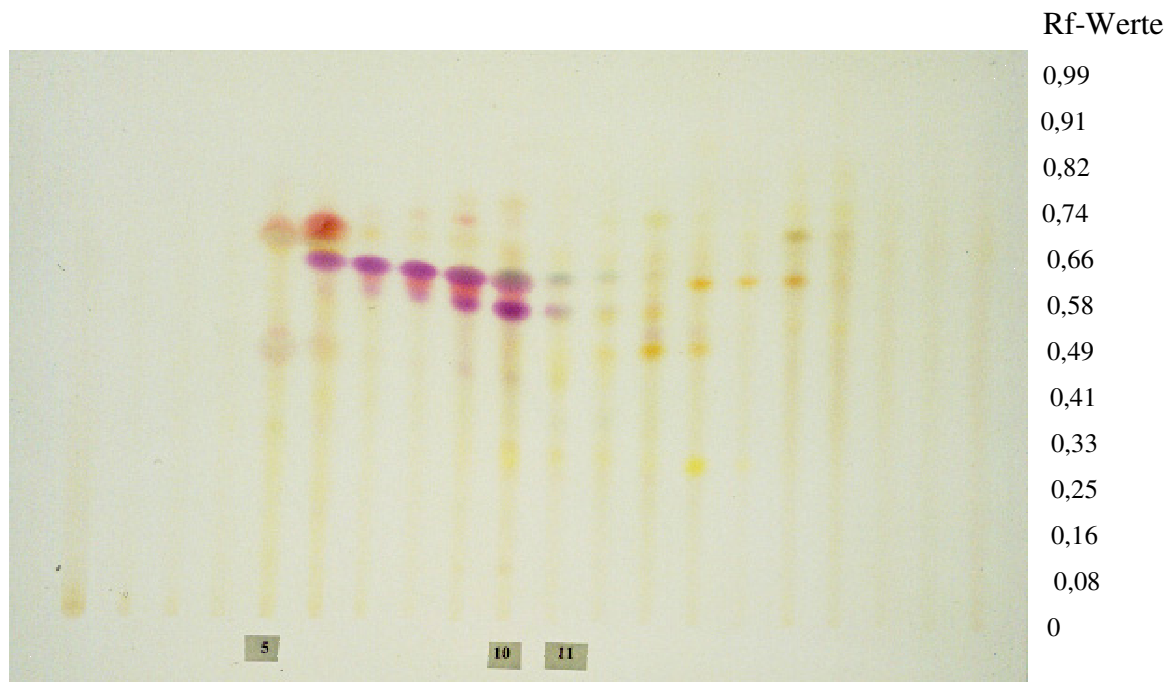


Abbildung 10: Fluorochrome im UV-Licht (DC-Trennung der zu Beginn gewonnenen 20 Säulenfraktionen) bei 254 bzw. 366 nm

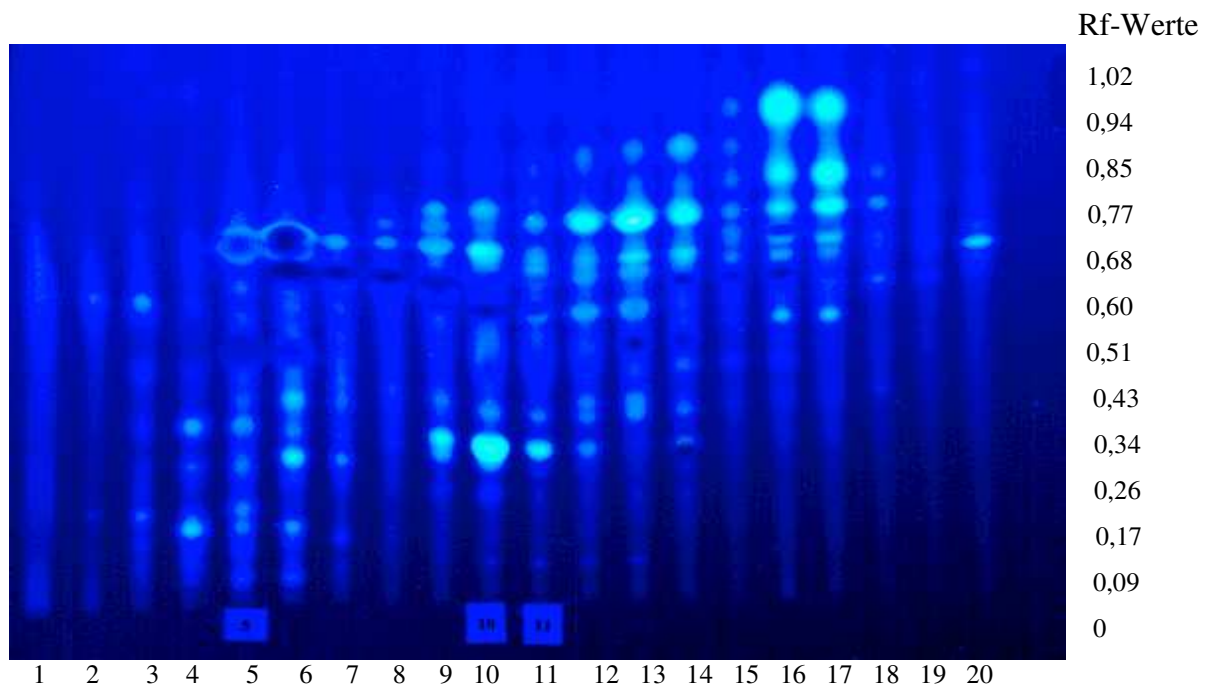
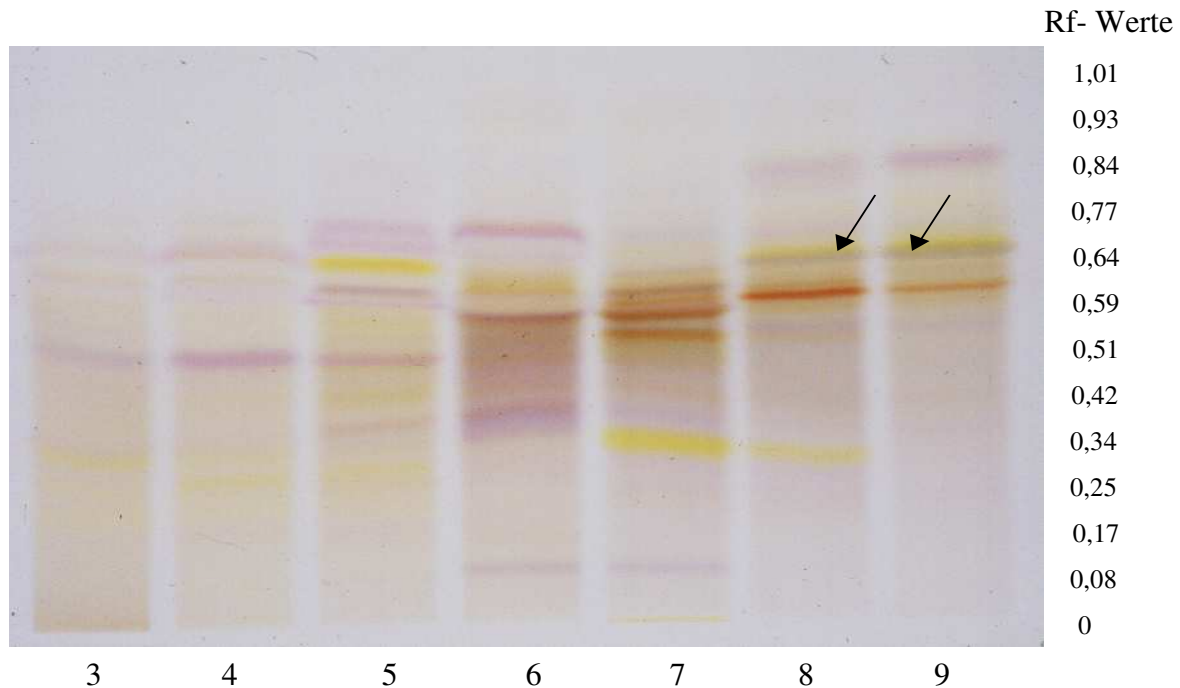


Abbildung 11: Beispiel für dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Säulenfraktionen aus dem Rohextrakt von *M. furfur* (Analytische Dünnschichtchromatographie)

Säulenfraktion 3-9 (aus den 15 Säulenfraktionen aus Tabelle 5)



Anmerkung:

Die sich hier darstellenden Dünnschichtbanden wurden einige Zeit nach der Durchführung meiner Versuche von Kollegen, die sich ebenfalls mit dem Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur* beschäftigten, fotografiert. Es zeigen sich Ähnlichkeiten in der Farbzusammenstellung. So fand sich die Dünnschichtbande „oliv“ immer unter einem leuchtenden „gelb“, was die Vermutung nahelegt, daß es sich um die mit Pfeilen gekennzeichnete Bande handelt. Die Rf-Werte sind jedoch in dieser Abbildung deutlich höher als in den Banden meiner Versuche. In meinen Versuchen befand sich die Dünnschichtbande „oliv“ sehr konstant bei einem Rf-Wert von 0,37-0,40. Zu erklären wäre dies mit einer Änderung der Zusammensetzung der Metabolite aus dem Tryptophanstoffwechsel von *M. furfur* im Laufe der Zeit oder mit variierenden Chromatographiebedingungen.

4.2. Untersuchung der Tyrosinasehemmung *in vitro*

Eine mögliche Hemmung der Melanogenese durch Substanzen aus dem Rohextrakt, die die bei der Pityriasis versicolor alba auftretenden Depigmentierungen erklären könnte, wurde zunächst durch die Tyrosinasereaktion im Photometer untersucht (siehe Kapitel 3.6), bevor mit den hemmenden Substanzen die Untersuchungen an humaner Epidermis durchgeführt wurden. Das Enzym Tyrosinase ist das Schlüsselenzym der Melanogenese, welches die ersten beiden Schritte der oben beschriebenen Pigmentsynthese katalysiert (siehe Abbildung 6). Im Photometer wird die katalytische Hemmung durch die Substanzen der Malassezia-Hefen auf den zweiten Schritt, die Oxidation von Dopa zu Dopachinon untersucht.

Das Rohextrakt selbst konnte nicht direkt im unter 3.6. beschriebenen Assay auf Tyrosinasehemmung untersucht werden, da es zwar eine gute Löslichkeit in DMSO zeigte, jedoch mit dem phosphatpufferhaltigen Reaktionsansatz eine Trübung zeigte, so daß die Reaktion photometrisch nicht verfolgt werden konnte. Deshalb wurde das Rohextrakt wie unter 3.3. beschrieben über Säulenchromatographie vorfraktioniert. Jede Säulenfraktion (bis auf die ersten 2 Fraktionen, die ebenfalls im Reaktionsansatz eine Trübung zeigten) wurde hinsichtlich einer Hemmung überprüft, die am stärksten hemmende Fraktion über Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennt und die daraus resultierenden Dünnschichtbanden ebenfalls auf Hemmwirkung überprüft. So wurden die Substanzen für die späteren Hautversuche ermittelt.

Tabelle 6 : Hemmwirkung der einzelnen Säulenfraktionen im Photometer. Der für jeden Ansatz (zur Schätzung der Konzentration) bestimmte Leerwert wurde vor der Messung auf Null kalibriert.

Fraktion	Extinktion bei 475 nm vor Kalibrierung auf Null	Meßergebnis
1 (Orange)	0,53 trübe	Keine Messung möglich (Trübung)
2 (Braun)	0,84 trübe	Keine Messung möglich (Trübung)
3 (Blau / Farblos)	0,616	Keine Hemmung (9. Minute 0,823)
4 (Beige)	0,661	Keine Hemmung (9. Minute 0,911)
5 (Braun)	0,832	Keine Hemmung (9. Minute 0,883)
6 (Goldgelb)	0,828	Keine Hemmung (9. Minute 0,901)
7 (Zwischenfraktion)	0,509	Keine Hemmung (9. Minute 0,887)
8 (Hellgelb)	0,762	Zu Beginn Hemmung, später keine Hemmung mehr nachweisbar (9. Minute 0,833)
9 (Braun)	0,593	Hemmung (9. Minute 0,224)
10 (Orange)	0,667	Schwächere Hemmung im Vergleich zu Fraktion 9 (9. Minute 0,648)
11 (Braun)	0,778	Keine Hemmung (9. Minute 0,812)
12 (Gelb)	0,7	Schwächere Hemmung im Vergleich zu Fraktion 9 (9. Minute 0,781), nicht in jeder Messung reproduzierbar
13 (Ganz helles Gelb)	0,597	Keine Hemmung (9. Minute 0,810)
14 (Lila)	0,613	Keine Hemmung (9. Minute 0,898)
15 (Ganz helles Gelb)	0,541	Keine Hemmung (9. Minute 0,901)

Diagramm 4: Tyrosinaseinhibition durch Säulenfraktion 9 (entsprechend der säulenchromatographischen Trennung in Tabelle 4) im Vergleich zu Fraktion 6 (welche als Kontrolle in den folgenden Hautversuchen angewendet wird) sowie dem bekannten Tyrosinasehemmer 5-Hydroxyindol. Die Leerkurve ist die Kontrolle ohne Zugabe eines Stoffes. Dieser Versuch wurde nach jeder säulenchromatographischen Trennung des Rohextraktes durchgeführt bevor der Stoff den Hautversuchen zugeführt wurde. Es zeigten sich reproduzierbare Ergebnisse.

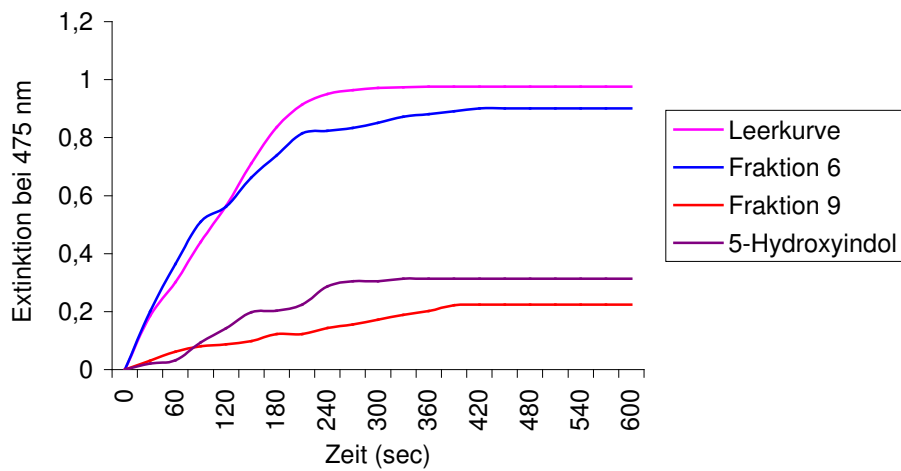
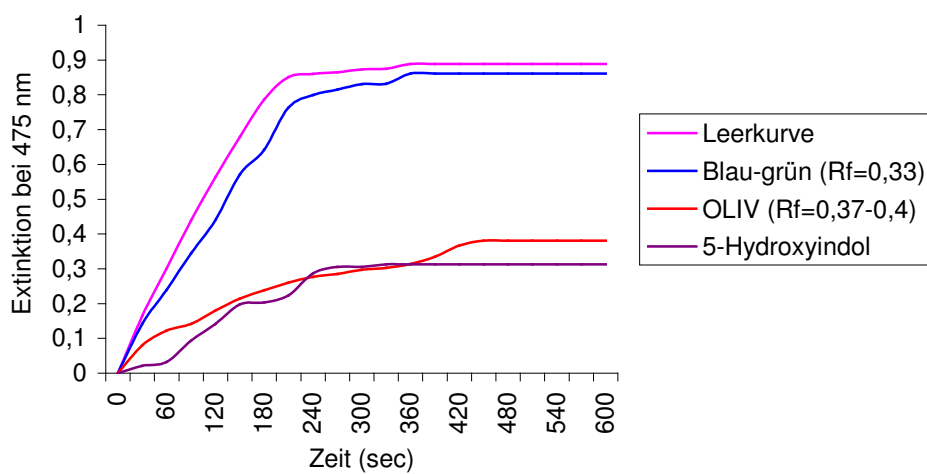


Tabelle 7: Hemmwirkung der Dünnschichtbanden der in der Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennten am stärksten hemmenden Säulenfraktion 9 (braun) (siehe Tabelle 6). Die hemmende Fraktion wies ein konstantes Bandenmuster auf (kursiv gedruckt: Banden mit Tyrosinaseinhibition, fett gedruckt: Bande mit stärkster Tyrosinaseinhibition). Auch hier wurde der für jeden Ansatz bestimmte Leerwert vor der Messung auf Null kalibriert.

Bande	Rf-Wert	Farbe im sichtbaren Licht	Farbe im UV-Licht	Extinktion bei 475 nm vor Kalibrierung auf Null	Messergebnis
1	0,042	Lila	Lila	0,377	Keine Hemmung (9. Minute 0,882)
2	0,10	Schwach Rosa	Gelb	0,459	Keine Hemmung (9. Minute 0,892)
3	0,12	Lila	Grau	0,434	Keine Hemmung (9. Minute 0,845)
4	0,14	Kräftig Orange (“Curry”)	Kräftig Orange	0,781	Keine Hemmung (9. Minute 0,792)
5	0,18	Blau / Rosa	Rosa	0,462	Keine Hemmung (9. Minute 0,851)
6	0,21	Blau (gebogen)	Blau-Grün	0,561	Keine Hemmung (9. Minute 0,793)
7	0,22	Orange (“falsches Curry”)	Stark fl. Gelb / Rosa	0,655	Keine Hemmung (9. Minute 0,781)
8	0,24	Grau / Lila	Orange / Rosa	0,545	Keine Hemmung (9. Minute 0,875)
9	0,26	Grau	Hellgrau	0,535	Keine Hemmung (9. Minute 0,813)
10	0,27	Orange (“Curry”)	Orange	0,603	Keine Hemmung (9. Minute 0,783)
11	0,29	Rosa	Rosa / Braun	0,585	Keine Hemmung (9. Minute 0,843)

12	0,31		Gelb	< 0,005	Keine Hemmung (9. Minute 0,883)
13	0,33	Blau-Grün	Stark Grau	0,56	Keine Hemmung (9. Minute 0,861)
14	0,35	Rosa	Grau	0,575	Keine Hemmung (9. Minute 0,801)
15	0,37	Schwach Gelb / Rosa		0,541	Keine Hemmung (9. Minute 0,812)
16	0,40	OLIV		0,472	Hemmung (9. Minute 0,381)
17	0,41	<i>Gelb leuchtend</i>	<i>Gelb (leuchtend)</i>	0,666	<i>Hemmung</i> <i>(9. Minute 0,663)</i>
18	0,42	Braun / Grau (o.u.o.)	Braun / Grau	0,453	Keine Hemmung (9. Minute 0,831)
19	0,43	Helles Gelb		<0,005	Keine Hemmung (9. Minute 0,887)
20	0,44	<i>Oliv-Grau</i>	<i>Rosa / Grau</i>	0,505	<i>Hemmung</i> <i>(9. Minute 0,592)</i>
21	0,46		Rosa-Orange	0,467	Keine Hemmung (9. Minute 0,861)
22	0,64	Rosa (blaß)	Lila	<0,005	Keine Hemmung (9. Minute 0,881)
23	0,68	Gelb (blaß)	Fluoreszierendes Rosa (dick)	<0,005	Keine Hemmung (9. Minute 0,884)
24	0,75		Fluoreszierendes Gelb	0,483	Keine Hemmung (9. Minute 0,858)
25	0,82		Fluoreszierendes Hellgelb	<0,005	Keine Hemmung (9. Minute 0,886)

Diagramm 5: Tyrosinaseinhibition durch Dünnschichtbande oliv (RF= 0,4) (gemäß der dünnschichtchromatographischen Trennung nach Tabelle 5) im Vergleich zur Dünnschichtbande blau-grün (RF= 0,33) (welche zur Kontrolle in den folgenden Hautversuchen verwendet wird) und dem bekannten Tyrosinaseinhibitor 5-Hydroxyindol. Auch dieser Versuch wurde nach jeder dünnschichtchromatographischen Trennung durchgeführt bevor der Stoff den Hautversuchen zugeführt wurde und lieferte reproduzierbare Ergebnisse.



Die stärkste Hemmwirkung zeigte Säulenfraktion neun (braun) und die durch ihre weitere Auftrennung zu erhaltende Dünnschichtbande oliv (grün) (Rf = 0,37 – 0,40). Bei den Untersuchungen der einzelnen Säulenfraktionen fand sich zudem eine geringere Hemmung des Enzyms durch die Fraktionen 8, 10 und 12. In den Säulenfraktionen 9, 10 und 11 konnte nach weiterer Aufbereitung in der Dünnschichtchromatographie die Dünnschichtbande oliv (RF=0,4) identifiziert werden, Fraktion 12 zeigte nach weiterer Aufbereitung keine derartige Bande. Daß die Fraktion 11 keine Tyrosinasehemmung aufwies, könnte daran liegen, daß das oliv nur sehr schwach ausgebildet war und somit eine zu geringe Hemmstoffmenge vorhanden ist. Die Fraktion 8 zeigte ebenfalls keine derartige Bande mit entsprechendem RF-Wert, es fand sich jedoch nach dünnschichtchromatographischer Trennung bei RF=0,17 ein gelb, welches zu Beginn eine Hemmung im Photometer und in den Hautversuchen aufwies, welche im Verlauf nur noch inkonstant nachvollziehbar war.

Für die weiteren Hautversuche wurde nur die Säulenfraktion 9 weiter aufbereitet, da diese die stärkste Hemmung aufwies und nach weiterer Aufbereitung durch die Dünnschichtchromatographie das konstanteste Bandenmuster zeigte.

Die Dünnschichtbanden 12, 19, 22, 23 und 25 (aus Tabelle 7) zeigten jeweils nur einen Leerwert von $< 0,005$, so daß angenommen werden kann, daß die Konzentration nicht für eine Hemmung ausreicht.

Eine im Photometer nachgewiesene Hemmung der Tyrosinase zeigte sich durch Dünnschichtbande oliv (RF=0,4), gelb (RF=0,41) und oliv-grau (RF=0,44). Da die Dünnschichtbande oliv (RF= 0,4) die stärkste Hemmung aufwies, wurde diese für die folgenden Hautversuche genutzt.

Die Hemmwirkung der Einzelbanden war jeweils schwächer als durch die Gesamtfraktion erzielte Tyrosinasehemmung. Um einen Vergleich der Stärke der Hemmwirkungen zu erhalten, wurde der Versuch mit der bekannten Hemmsubstanz 5-OH-Indol durchgeführt.

Die Umsatzraten für Dopa betragen für die Kontrollen 0,6 mMol/min, bei Zusatz von 5-OH-Indol 0,25 mMol/min, bei Zusatz der Säulenfraktion neun (braun) 0,105 mMol/min und bei Zusatz der Dünnschichtbande oliv (grün) (Rf = 0,37-0,40) 0,285 mMol/min. Da die gelösten Substanzen unterschiedlich hohe Leerwerte aufwiesen, wurde das Photometer für den jeweiligen Ansatz auf Null kalibriert. Je höher der Leerwert (vor der Kalibrierung auf Null) der Hemmsubstanz war, desto stärker war die Hemmung, d.h. desto langsamer wurde das Substrat umgebaut. Bei nicht hemmenden Fraktionen zeigten sich jedoch ähnlich hohe Leerwerte, so daß unspezifische toxische Effekte ausgeschlossen werden konnten. Es ist anzunehmen, daß die Höhe des Leerwertes mit der Substratmenge korreliert. Dennoch ist es schwierig, den Leerwert zur Bestimmung der Substratkonzentration heranzuziehen, da sich die einzelnen Fraktionen aus zahlreichen verschiedenen Substanzen zusammensetzten, deren Absorptionsmaxima zudem nicht bekannt waren.

Zum Vergleich wurden Hautversuche mit einer nicht hemmenden Säulenfraktion sowie einer nicht hemmenden Dünnschichtbande aus Fraktion 9 (braun) durchgeführt. Es wurde hierfür Säulenfraktion 6 (goldgelb) sowie Dünnschichtbande blau-grün (Rf = 0,33) genutzt. Beide verwendeten Säulenfraktionen wiesen im Verlauf ein konstantes Bandenmuster auf mit nur geringen Abweichungen der Rf-Werte. Aus Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß die Bandenmuster der beiden Fraktionen untereinander differieren, so daß angenommen werden kann, daß die Säulenfraktion 9 (braun) im Gegensatz zu Fraktion 6 (goldgelb) eine die Tyrosinase hemmende Substanz enthält.

4.3. Hautversuche

4.3.1. Allgemeines

Es wurden 129 Hautproben von 70 Personen untersucht, davon 35 Personen weiblichen Geschlechts und 32 Personen männlichen Geschlechts. Die Daten bezüglich des Geschlechts wurden bei 3 Personen, die bezüglich des Alters bei 4 Personen nicht übermittelt. Das Durchschnittsalter der Versuchspersonen betrug 62,1 Jahre, das der weiblichen Versuchspersonen 56,7 Jahre, das der männlichen 67,1 Jahre.

4.3.2. Vergleichbarkeit der Schnitte

Von jeder Hautprobe wurde die Gesamtzahl der angefärbten Melanozyten auf 30 mm Basalmembran gezählt. Die Proben waren aufgeteilt in vier hintereinanderliegende Schnitte, von denen je 7,5 mm gezählt wurden. So erhielt man vier Ergebniswerte für die Proben ohne Hemmstoff (O1 – O4 in den folgenden Ergebnistabellen) und vier für jene mit Hemmstoff (M1 – M4). Ob diese vier Schnitte wirklich einer Grundgesamtheit entstammen, wurde mit der *Friedmans Ranganalyse* überprüft. Dabei erwiesen sich die vier Schnitte ohne Zusatz (O1 – O4) rein statistisch als nicht vergleichbar ($p < 0,0001$), insbesondere $O1 \Leftrightarrow O2$, jedoch scheint der durchschnittliche Unterschied von 0,5 angefärbten Zellen / mm Basalmembran praktisch wenig relevant, zumal das Zählen der Zellen aufgrund der natürlichen Auffaltung der Basalmembran erschwert war. Die Anzahl der gezählten Zellen ist also eher ein grober Richtwert für den Unterschied, wobei versucht wurde, die Genauigkeit zu erhöhen, indem die längstmögliche Strecke (30 mm Basalmembran) ausgezählt wurde und die Ergebnisse der zu vergleichenden Proben mit und ohne Zusatz direkt hintereinander erhoben wurden. Zwischen den vier Proben mit Zusatz waren keine Unterschiede zu beobachten ($p = 0,68$), d. h. sie galten als statistisch einer Grundgesamtheit entstammend.

4.3.3. Optimum der L-Dopa-Konzentration für die Dopa-Reaktion von Bloch an Hautproben

Bevor die eigentlichen Versuche der Tyrosinasehemmung mit Hilfe der Dopa-Reaktion von Bloch auf Hautproben durchgeführt wurden, wurde die Konzentration des L-Dopa optimiert. Dazu wurde die Dopa-Reaktion mit unterschiedlichen L-Dopa-Konzentrationen durchgeführt und die Anzahl der angefärbten Zellen miteinander verglichen. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt, einmal mit Hautproben vom Kinn und einmal mit Hautproben vom Oberkopf. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen und Graphiken zusammengefasst.

Tabelle 8: Angefärbte Melanozyten (pro mm Basalmembran) bei unterschiedlicher L-Dopa-Konzentration (in g/l)

(Dopa-Reihe 1)

L-Dopa (g/l)	Angefärbte Melanozyten/mm Basalmembran	Alter	G	Lok
4	4,9	76	1	Kinn 1
3	3,72	76	1	Kinn 1
2	2,7	76	1	Kinn 1
1	2,67	76	1	Kinn 1
0,5	1,23	76	1	Kinn 1

Legende:

G = Geschlecht (1 weiblich, 2 männlich)

Lok = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdomen, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

Die Numerierung der Körperareale wurde für weitere Auswertungen bezüglich der Anzahl von Melanozyten an verschiedenen Lokalisationen des Körpers vorgenommen (siehe Kapitel 4.5)

Diagramm 6: Anzahl angefärbter Melanozyten (Angefärbte Melanozyten / mm Basalmembran) bei unterschiedlicher L-Dopa-Konzentration (L-Dopa in g/l) untersucht an an Hautproben vom Kinn (Dopa-Reihe 1) (Ergebnisse aus Tabelle 8)

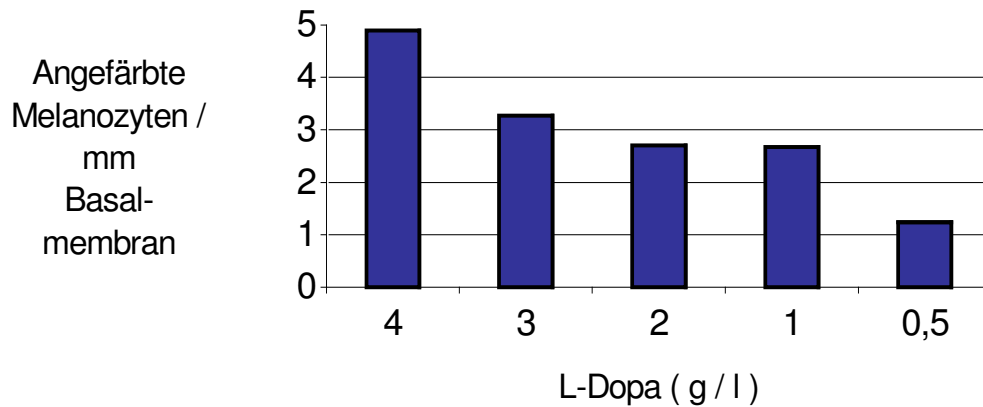


Tabelle 9: Angefärbte Melanozyten (pro mm Basalmembran) bei unterschiedlicher L-Dopa-Konzentration (in g/l) (Dopa-Reihe 2)

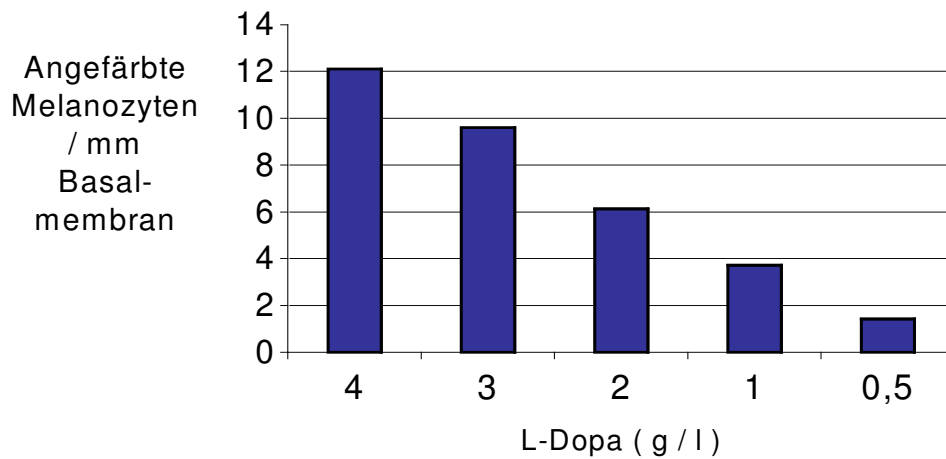
L-Dopa (g/l)	Angefärbte Melanozyten/mm Basalmembran	Alter	G	Lok
4	12,1	72	2	Kopf 1
3	9,6	72	2	Kopf 1
2	6,13	72	2	Kopf 1
1	3,73	72	2	Kopf 1
0,5	1,43	72	2	Kopf 1

Legende:

G = Geschlecht (1 weiblich, 2 männlich)

Lok = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdomen, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

Diagramm 7: Anzahl angefärbter Melanozyten (Angefärbte Melanozyten / mm Basalmembran) bei unterschiedlicher L-Dopa-Konzentration (L-Dopa in g/l) untersucht an Hautproben vom Oberkopf (Dopa-Reihe 2) (Ergebnisse aus Tabelle 9)



Je mehr Substrat im Versuch angeboten wird, desto mehr angefärbte Melanozyten stellen sich dar. Die mittels Photometerversuch vorgeschlagene Konzentration von L-Dopa (1g/l) (Mayser et al., 1998 [b]) erwies sich jedoch als für die Hautversuche ausreichend, da mit Zugabe dieser L-Dopa-Konzentration ein deutlicher Unterschied zwischen Melanozytenanzahl mit und ohne Hemmstoff zu erkennen war.

4.3.4. Untersuchung des Einflusses des Lösungsmittels DMSO auf die Untersuchungsergebnisse der Hautversuche

Die lipophilen Substanzen, welche sich aus dem Rohextrakt extrahieren liessen, waren am besten löslich in Dimethylsulfoxid (DMSO). Ein möglicher Einfluß des DMSO auf die Untersuchungsergebnisse der Hautversuche wurde untersucht, indem die Dopa-Reaktion mit unterschiedlichen Mengen von DMSO ohne Hemmsubstanz durchgeführt und diese mit einer Kontrolle ohne DMSO verglichen wurde. Das folgende Diagramm stellt die Ergebnisse dar.

Tabelle 10: Vergleich der Anzahl der angefärbten Melanozyten in der Dopa-Reaktion nach Zusatz von verschiedenen Mengen von DMSO (in µl) (Anzahl_mit) sowie ohne DMSO (Anzahl_ohne)

DMSO (µl)	Anzahl_mit	Anzahl_ohne	Alter	G	Lok.	
25	18,23	17,9	67	1	Kopf	1
50	17,27	19,3			Schläfe	1
100	18,47	19,3			Wange	1
200	17,17	19,3			Wange	1
300	23	23,53			Nase	1
400	6,67	7,06			Rumpf	2

Legende:

AZ_mit = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran mit Zugabe von DMSO

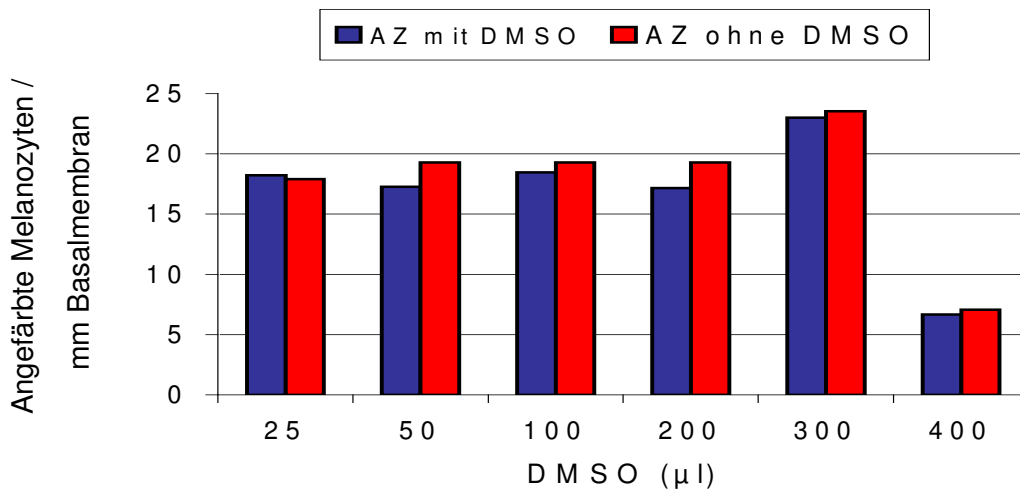
AZ_ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von DMSO

G = Geschlecht (1 weiblich, 2 männlich)

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

Fehlende Angaben bei Alter und Geschlecht: wurde von den Probanden nicht übermittelt.

Diagramm 8: Darstellung der unterschiedlichen Anzahl angefärbter Melanozyten mit (Anzahl mit DMSO) und ohne (Anzahl ohne DMSO) DMSO bei unterschiedlichen DMSO-Mengen (DMSO in μl) (Ergebnisse aus Tabelle 10)



Die Proben, die kein DMSO in ihren Inkubationslösungen enthalten, zeigen durchschnittlich eine geringfügig grössere Anzahl angefärbter Melanozyten/mm Basalmembran (durchschnittlich 0,9 Zellen mehr). Deshalb ist es bei den folgenden Hautversuchen wichtig, den Kontrollen die gleiche Konzentration an Dimethylsulfoxid zuzusetzen wie den Proben mit Hemmstoffen. 100 μl Dimethylsulfoxid erwiesen sich zum Lösen der Probesubstanzen als ausreichend.

4.3.5. Versuche zur Hemmwirkung der aus den Pilzkulturen extrahierten Stoffe an Hautproben mittels der Dopa-Reaktion von Bloch

Die Hautproben wurden wie in Kapitel 3.7. beschrieben behandelt. Es resultierten die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse.

Hemmversuche mit Hemmstoff „Rohextrakt“ (Art 1)

Tabelle 11: Vergleich der Anzahl angefärbter Melanozyten (pro mm Basalmembran) der Proben mit (AZ mit) und ohne (AZ ohne) Zugabe von Rohextrakt unterschiedlicher Extinktion bei 475 nm im Photometer als Maß für die Konzentration (wie in der Verdünnungsreihe in Kapitel 3.7.2. beschrieben) in der Dopa-Reaktion

Lok.	Alter	G	Art	Ext.	AZ ohne	AZ mit	AZ mit/ AZ ohne	O1	O2	O3	O4	M1	M2	M3	M4	
Gesicht	1	75	1	1	0,008	3,83	3,8	0,99	4	3,87	3,87	3,6	3,87	4	3,47	3,87
Stirn	1	66	2	1	0,015	7,6	7,3	0,96	7,73	7,33	7,87	7,47	7,2	7,33	7,47	7,2
Stirn	1	66	2	1	0,078	7,6	5,43	0,71	7,73	7,33	7,87	7,47	5,47	5,6	5,33	5,33
Oberarm	3	55	2	1	0,111	12,93	8,8	0,68	12,8	12,4	13,5	13,1	9,2	8,67	8,13	9,2
Vorhaut	7	32	2	1	0,157	12,9	7,4	0,57	13,9	12,3	12,8	12,7	7,3	7,46	7,2	7,6
Rücken	2	53	2	1	0,253	6,67	2,83	0,42	7,2	7,2	5,87	6,4	3,07	3,2	2,53	2,53
Oberarm	3	55	2	1	0,255	12,93	6,43	0,5	12,8	12,4	13,5	13,1	6,53	6,27	6,67	6,27
Wange	1	61	1	1	0,284	8,73	3,7	0,42	9,07	8,53	8,93	8,4	3,47	4	3,73	3,6
Nase	1	93	1	1	0,311	9,23	2,03	0,22	9,6	9,07	8,8	9,47	2,53	1,87	1,23	2
Vorhaut	7	32	2	1	0,311	12,9	4,06	0,31	13,9	12,3	12,8	12,7	4,93	3,73	3,6	4
Flanke	5	60	1	1	0,401	13,87	3,93	0,28	14	13,5	14,1	13,9	3,87	3,73	4	4,13
Stirn	1	63	2	1	0,517	8,63	1,53	0,18	9,2	8,13	8,53	8,67	1,2	1,6	1,73	1,6
Nase	1	93	1	1	0,977	9,23	0,93	0,10	9,6	9,07	8,8	9,47	0,67	0,93	1,07	1,07
Oberarm	3	55	2	1	1,093	12,93	1,77	0,14	12,8	12,4	13,5	13,1	1,6	1,87	1,73	1,6
Nase	1	71	2	1	1,15	10,67	1,26	0,12	11,1	10,1	10,5	10,9	1,47	1,2	1,2	1,2
Rücken	2	69	1	1	1,2	10,7	1,23	0,11	10,8	11,1	10	10,9	1,2	1,07	1,33	1,33
Gesicht	1	75	2	1	1,25	3,83	0,33	0,09	4	3,87	3,87	3,6	0,4	0,4	0,27	0,27
Bein	6	30	2	1		14,1	5,63	0,40	14	12,8	15,5	14,1	6,67	6,4	4,93	4,53
Rumpf	2			1		7,03	4,77	0,39	6,4	6,8	7,47	7,47	2,67	2,53	2,8	3,07
Nacken	1	52	2	1		19,27	15,0	0,78	19,1	18,7	19,5	19,9	15,9	15,1	14,5	14,7

Legende:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Fortsetzung Legende von Tabelle 11:

Art 1 = Hemmversuche mit Hemmstoff „Rohextrakt“

Ext. = Extinktion bei 475 nm

AZ ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von Rohextrakt zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Rohextrakt zur Dopa-Reaktion

O1-O4 = Einzelne Schnitte von AZ ohne

M1-M4 = Einzelne Schnitte von AZ mit

Diagramm 9: Effekt des Rohextraktes auf die Anfärbung der Melanozyten in der Dopa-Reaktion (Ergebnisse aus Tabelle 11)

Es wird die Anzahl der angefärbten Melanozyten / mm Basalmembran ohne (AZ ohne Rohextrakt) und mit (AZ mit Rohextrakt) Zugabe von Hemmstoff Rohextrakt (bei unterschiedlichen Extinktionen bei 475 nm als Maß für die Konzentration des Rohextraktes, von links nach rechts zunehmend) dargestellt.

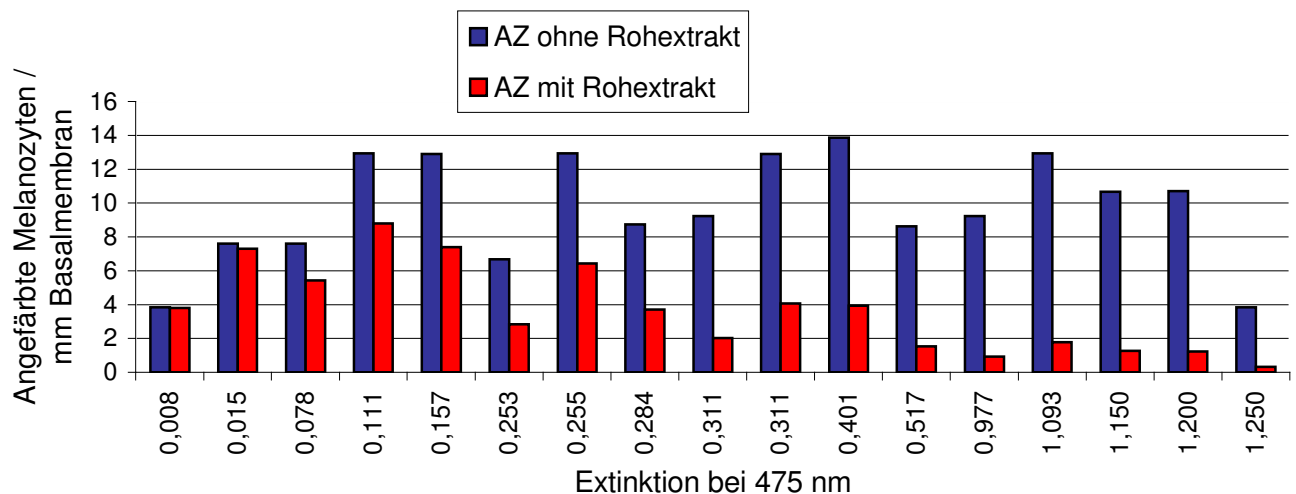
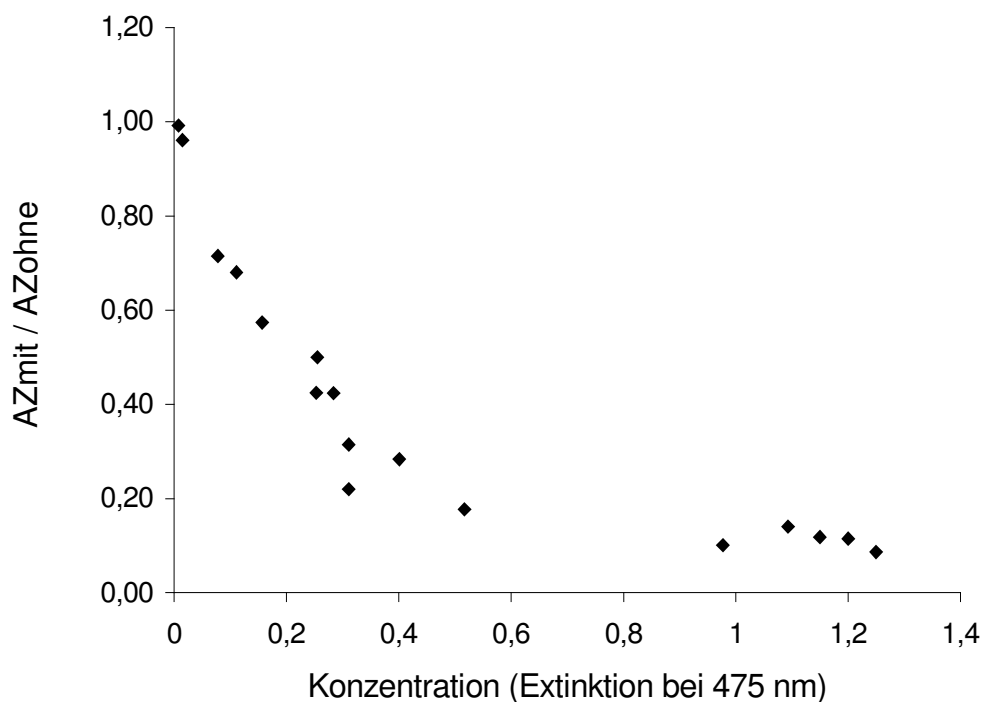


Diagramm 10: Effekt des Rohextraktes auf die Anfärbung der Melanozyten in der Dopa-Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration (Ergebnisse aus Tabelle 11)

Es wird das Verhältnis der angefärbten Zellen / mm Basalmembran mit Hemmstoff Rohextrakt (AZmit) und ohne Hemmstoff Rohextrakt (AZohne) gegen die Menge des Hemmstoffes Rohextrakt aufgetragen. Die "Menge" wurde mittels Verdünnungsreihen im Photometer (siehe Kapitel 3.7.2.) ermittelt.

Dargestellt ist also der Quotient (AZ mit/AZ ohne) der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von steigenden Konzentrationen (Extinktion bei 475 nm) des Rohextraktes zur Dopa-Reaktion und der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe des Rohextraktes zur Dopa-Reaktion. So kann die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des Rohextraktes anschaulich dargestellt werden.



Hemmversuche mit „Säulenfraktion 9“ (Art 2)

Tabelle 12: Vergleich der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran der Proben mit (AZ mit) und ohne (AZ ohne) die Zugabe der im Photometer am stärksten hemmenden Säulenfraktion 9 (braun) unterschiedlicher Extinktion bei 475 nm im Photometer als grobes Maß für die Konzentration (wie in der Verdünnungsreihe in Kapitel 3.7.2. beschrieben) in der Dopa-Reaktion

Lok.	Alter	G	Art	Ext.	AZ ohne	AZ mit	AZ mit/ AZ ohne	O1	O2	O3	O4	M1	M2	M3	M4	
Rücken	2	63	2	2	0,029	2,3	2,37	1,03	2,4	2,4	2,13	2,27	2,4	2,27	2,27	2,53
Bein	6	58	2	2	0,046	7	5,43	0,78	7,2	6,93	6,8	7,07	5,07	5,47	5,47	5,73
Nase	1	76	2	2	0,049	5,37	3,37	0,63	5,6	4,93	5,2	5,73	3,33	3,33	3,33	3,47
Rumpf	2	85	2	2	0,149	9,87	6,73	0,68	9,33	10,8	9,33	10	6,8	5,47	7,2	7,47
Rücken	2	63	2	2	0,154	2,3	2	0,87	2,4	2,4	2,13	2,27	2	2,13	2	1,87
Rücken 2	69	1	2	0,251	10,7	7,4	0,69	10,8	11,1	10	10,9	6,93	7,47	7,87	7,33	
Rumpf	2	85	2	2	0,313	9,87	5,9	0,60	9,33	10,8	9,33	10	6	5,6	6,53	5,47
Rücken	2	69	1	2	0,382	10,7	6,97	0,65	10,8	11,1	10	10,9	7,73	6,93	6,27	6,93
Stirn	1	58	2	2	0,414	16,43	10	0,61	16,9	16	15,6	17,2	11,9	9,33	9,07	9,73
Bein	6	23	1	2	0,424	21,23	11,7	0,55	21,5	21,6	20,7	21,2	11,9	12	11,3	11,7
Rücken	2	69	1	2	0,511	10,7	5,4	0,50	10,8	11,1	10	10,9	5,73	5,2	5,73	4,93
Vorhaut	7	32	2	2	0,513	12,9	5,6	0,43	13,9	12,3	12,8	12,7	5,33	5,33	6	5,73
Nase	1	76	2	2	0,561	5,37	1,73	0,32	5,6	4,93	5,2	5,73	1,87	1,73	1,6	1,73
Nase	1	71	2	2	0,653	11,83	5,1	0,43	12,3	11,1	12	12	5,47	5,07	4,93	4,93
Bein	6	58	2	2	0,653	7	1,63	0,23	7,2	6,93	6,8	7,07	2	1,6	1,47	1,47
Nase	1	76	2	2	0,653	5,37	1,07	0,20	5,6	4,93	5,2	5,73	0,93	1,07	1,07	1,2
Wange	1	75	2	2	0,655	8,87	2,27	0,26	8,4	8,13	9,6	9,33	2,53	2,13	2,13	2,27
Rumpf	2	85	2	2	0,702	9,87	4,43	0,45	9,33	10,8	9,33	10	4,4	4,4	4	4,93
Rücken	2	48	1	2	0,713	10,67	2,73	0,26	10,9	11,2	10,5	10	2,93	2,8	2,67	2,53
Nase	1	71	2	2	0,751	11,83	2,93	0,25	12,3	11,1	12	12	3,07	2,8	2,67	3,2
Rumpf	2	85	2	2	0,755	9,87	4,33	0,44	9,33	10,8	9,33	10	3,73	4,8	4,4	4,4

Rumpf	2	85	2	2	0,815	9,87	3,87	0,39	9,33	10,8	9,33	10	3,87	4,67	3,2	3,73
Vorhaut	7	32	2	2	0,958	12,9	3	0,23	13,9	12,3	12,8	12,7	3,6	4,67	2,67	3,07
Bein	6	23	1	2	0,983	21,23	2,93	0,14	21,5	21,6	20,7	21,2	2,8	2,67	3,2	3,07
Bein	6	58	2	2	1,101	7	0,9	0,13	7,2	6,93	6,8	7,07	0,93	1,07	0,8	0,8
Nase	1	76	2	2	1,101	5,37	0,83	0,15	5,6	4,93	5,2	5,73	0,93	0,93	0,8	0,67
Rücken	2	69	1	2	1,212	10,7	1,63	0,15	10,8	11,1	10	10,9	1,47	1,73	1,73	1,6
Abdomen	2	95	2	2	1,3	4,03	0,5	0,12	4,13	4	3,87	4,13	0,4	0,53	0,53	0,53
Rumpf	2	79	2	2	1,311	4,2	0,5	0,12	4,27	4,27	3,6	4,67	0,4	0,4	0,53	0,53
Nase	1	71	2	2	1,33	11,83	1,7	0,14	12,3	11,1	12	12	1,73	1,6	1,6	1,87
Vorhaut	7	32	2	2	1,351	12,9	1,2	0,09	13,9	12,3	12,8	12,7	1,73	2	2	1,6
Nase	1			2		23,53	13,2	0,56	23,9	24,3	23,2	22,8	13,0	12,5	14,1	12,9
Bein	6	42	1	2		21,4	10,4	0,49	22	21,5	21,2	20,9	10,5	9,87	11,3	9,87

Legende:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdomen, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Art 2 = Hemmversuche mit Hemmstoff Säulenfraktion 9

Ext. = Extinktion bei 475 nm

AZ ohne = Anzahl angefarbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von Säulenfraktion 9 zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefarbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Säulenfraktion 9 zur Dopa-Reaktion

O1-O4 = Einzelne Schnitte von AZ ohne

M1-M4 = Einzelne Schnitte von AZ mit

Diagramm 11: Effekt der Säulenfraktion 9 (braun) auf die Anfärbung von Melanozyten in der Dopa-Reaktion (Ergebnisse aus Tabelle 12).

Es wird die Anzahl der angefärbten Melanozyten / mm Basalmembran ohne (AZ ohne Säulenfraktion 9) und mit (AZ mit Säulenfraktion 9) Zugabe von Hemmstoff Säulenfraktion 9 (bei unterschiedlichen Extinktionen bei 475 nm als Maß für die Konzentration der Säulenfraktion 9, von links nach rechts zunehmend) dargestellt.

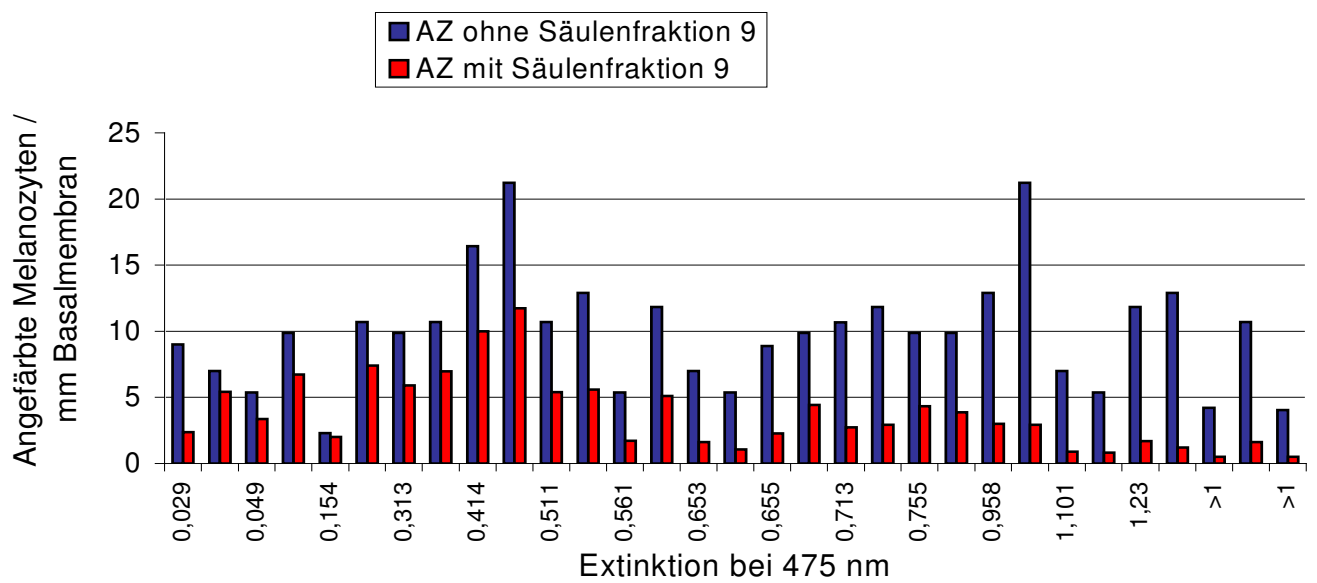
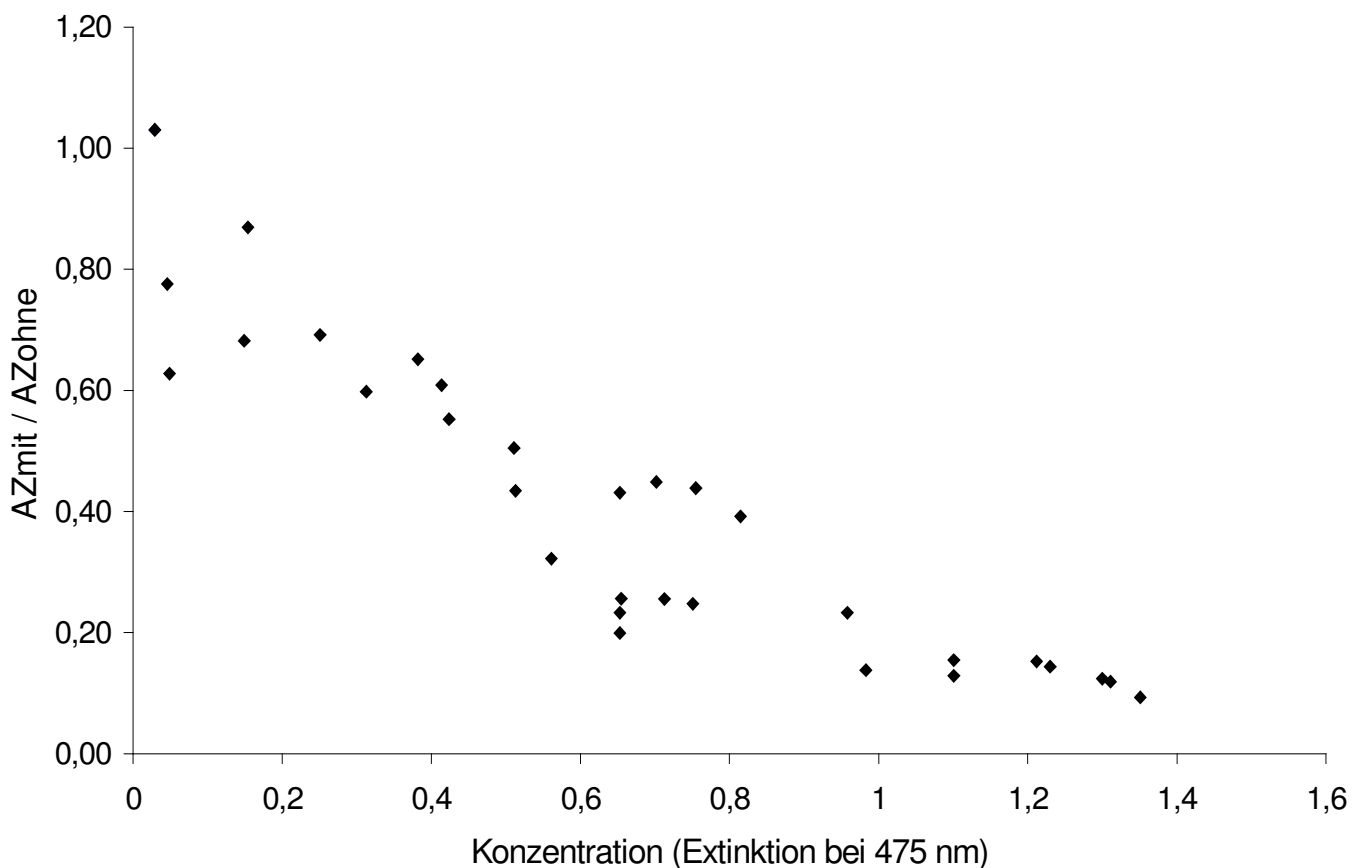


Diagramm 12: Effekt der Säulenfraktion 9 auf die Anfärbung der Melanozyten in der Dopa-Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration (Ergebnisse aus Tabelle 12)

Es wird das Verhältnis der angefärbten Melanozyten / mm Basalmembran mit Hemmstoff Säulenfraktion 9 (braun) (AZmit) und ohne Hemmstoff Säulenfraktion 9 (braun) (AZohne) gegen die Menge des Hemmstoffes Säulenfraktion 9 (braun) aufgetragen. Die "Menge" wurde mittels Verdünnungsreihen im Photometer (siehe Kapitel 3.7.2.) ermittelt.

Dargestellt ist also der Quotient (AZmit/AZohne) der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von steigenden Konzentrationen (Extinktion bei 475 nm) der Säulenfraktion 9 (braun) zur Dopa- Reaktion und der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe der Säulenfraktion 9 (braun) zur Dopa-Reaktion. So kann die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Säulenfraktion 9 (braun) anschaulich dargestellt werden.



Hemmversuche mit „Dünnschichtbande oliv“ (Art 3)

Tabelle 13 : Vergleich der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran der Proben mit und ohne die Zugabe der im Photometer am stärksten hemmende Dünnschichtbande oliv (RF-Wert 0,37-0,40) aus Säulenfraktion 9 (braun) unterschiedlicher Extinktion bei 475 nm im Photometer als grobes Maß für die Konzentration (wie in der Verdünnungsreihe in Kapitel 3.7.2. beschrieben) in der Dopa-Reaktion

Lok.	Alter	G	Art	Ext.	AZ ohne	AZ mit	AZ mit/ AZ ohne	O1	O2	O3	O4	M1	M2	M3	M4	
Schläfe	1	86	1	3	0,021	2,83	2,8	0,99	2,93	2,8	2,93	2,67	2,93	2,67	2,67	2,93
Schläfe	1	86	1	3	0,062	2,83	2,87	1,01	2,93	2,8	2,93	2,67	3,07	2,67	2,93	2,8
Schläfe	1	86	1	3	0,191	2,83	2,23	0,79	2,93	2,8	2,93	2,67	2,4	2,13	2,27	2,13
Schläfe	1	72	1	3	0,262	13,4	5,4	0,40	14	12,9	13,6	13,1	4,93	5,73	5,2	5,73
Nase	1	71	2	3	0,203	11,83	4,63	3,39	12,3	11,1	12	12	4,67	4,67	4,67	4,53
Nase	1	73	1	3	0,313	12,4	4,5	0,36	12,5	11,9	12,7	12,5	4,8	4	4,8	4,4
Wange	1	87	2	3	0,383	7,13	1,8	0,25	7,33	6,13	7,33	7,73	1,47	2	1,73	2
Unterarm	4	25	1	3	0,411	16,17	4	0,25	16,1	16,1	16,5	15,9	4	4	4,13	3,87
Schläfe	1	73	1	3	0,416	13,4	6,2	0,46	14	12,9	13,6	13,1	6	6,13	6,13	6,53
Nase	1	73	1	3	0,54	12,4	3,13	0,25	12,5	11,9	12,7	12,5	3,2	3,07	2,93	3,33
Vorhaut	7	32	2	3	0,589	12,9	3,5	0,27	13,9	12,3	12,8	12,7	3,33	3,6	3,2	3,87
Wange	1	74	2	3	0,601	11,13	2,6	0,23	11,3	11,1	10,9	11,2	2,53	2,67	2,67	2,53
Nase	1	73	1	3	1,095	12,4	1,67	0,13	12,5	11,9	12,7	12,5	1,6	1,73	1,47	1,87
Unterarm	4	25	1	3	1,215	16,17	1,57	0,10	16,1	16,1	16,5	15,9	1,47	1,33	1,73	1,73
Wange	1	74	2	3	1,344	11,13	0,83	0,07	11,3	11,1	10,9	11,2	0,8	0,93	0,8	0,8
Hals	1	70	2	3	1,377	14,63	1,63	0,11	15,1	14,1	14,8	14,5	1,6	1,47	1,87	1,6
Nase	1	93	1	3	1,395	9,23	1,4	0,15	9,6	9,07	8,8	9,47	1,6	1,2	1,33	1,47
Hals	1	70	2	3	1,396	14,63	0,43	0,03	15,1	14,1	14,8	14,5	0,13	0,4	0,53	0,13
Kopf	1	67	1	3		18,23	5,43	0,30	18,9	16,9	18,7	18,4	5,07	5,47	5,74	5,47
Abdomen	2	42	1	3		12,8	6,73	0,53	12,7	13,1	11,7	13,7	6,4	6,67	6,67	7,2
Rumpf	2	95	2	3	1,35	4,04	0,5	0,12	4,13	4	3,87	4,13	0,4	0,53	0,53	0,53

Legende von Tabelle 13:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Art 3 = Hemmversuche mit Hemmstoff „Dünnschichtbande oliv“

Ext. = Extinktion bei 475 nm

AZ ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von Dünnschichtbande oliv (Rf=0,4) zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Dünnschichtbande oliv (Rf=0,4) zur Dopa-Reaktion

O1-O4 = Einzelne Schnitte von AZ ohne

M1-M4 = Einzelne Schnitte von AZ mit

Diagramm 13: Effekt der Dünnschichtbande oliv (RF-Wert 0,37-0,40) auf die Anfärbung von Melanozyten in der Dopa-Reaktion (Ergebnisse aus Tabelle 13).

Es wird die Anzahl der angefärbten Melanozyten / mm Basalmembran ohne (AZ ohne Dünnschichtbande oliv) und mit (AZ mit Dünnschichtbande oliv) Zugabe von Hemmstoff Dünnschichtbande oliv (bei unterschiedlichen Extinktionen bei 475 nm als Maß für die Konzentration der Dünnschichtbande oliv, von links nach rechts zunehmend) dargestellt.

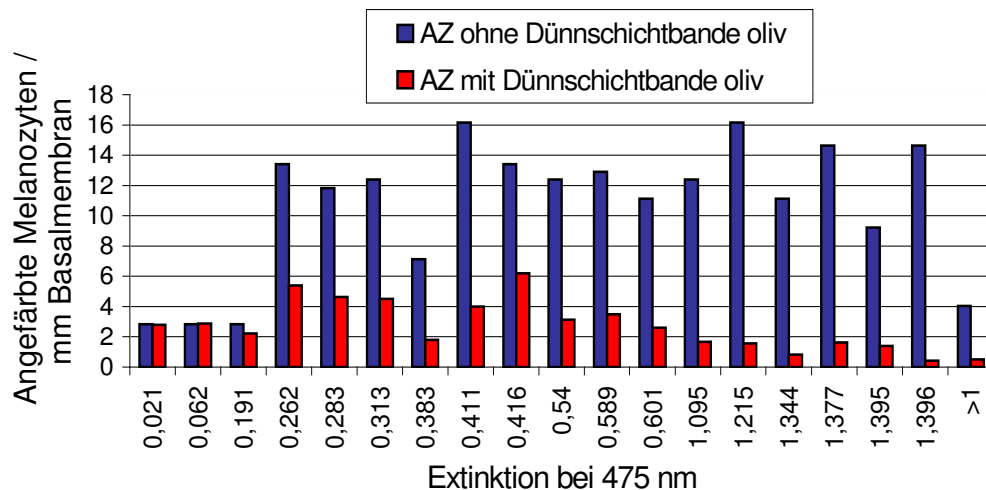
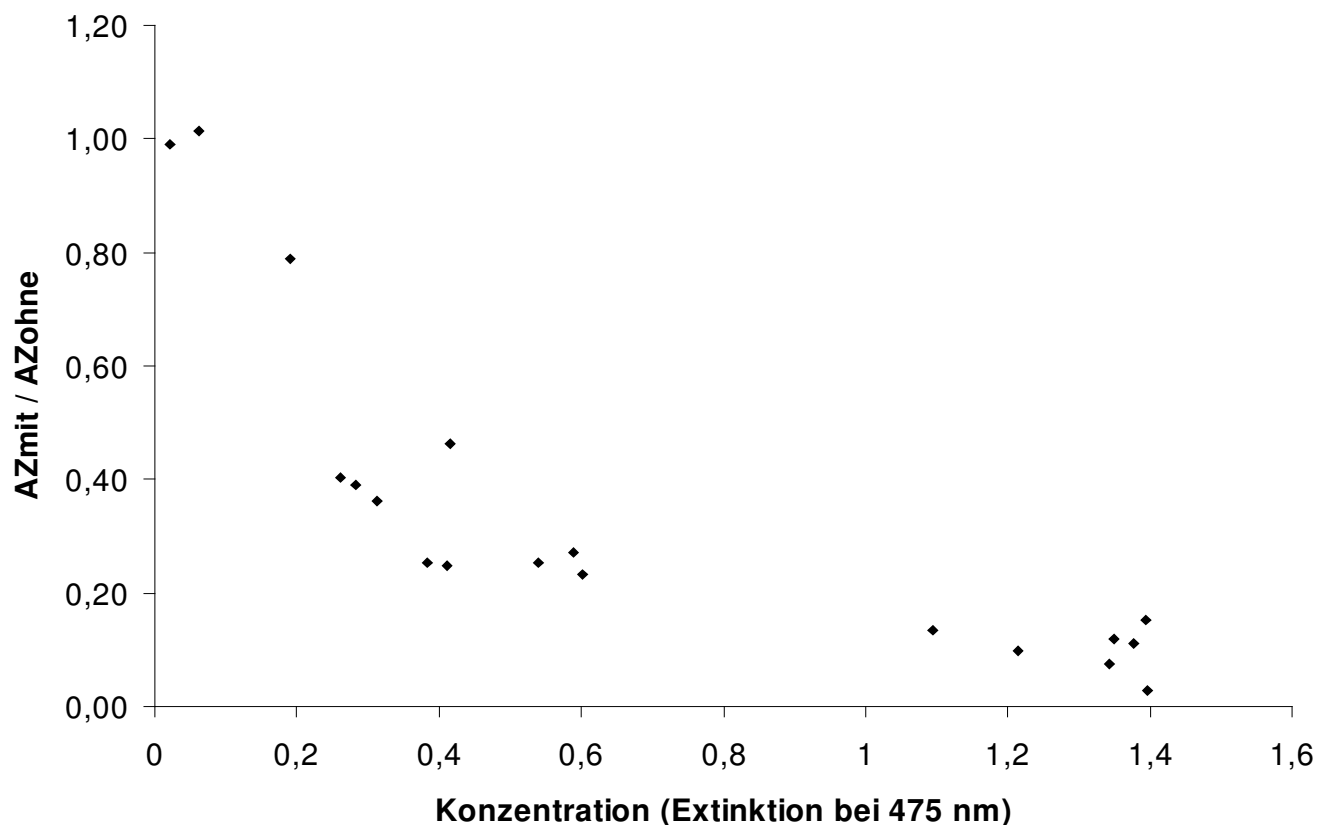


Diagramm 14: Effekt der Dünnschichtbande oliv (RF-Wert 0,37-0,40) auf die Anfärbung von Melanozyten in Abhängigkeit von der Konzentration (Ergebnisse aus Tabelle 13).

Es wird das Verhältnis der angefärbten Zellen / mm Basalmembran mit Hemmstoff Dünnschichtbande oliv (AZmit) und ohne Hemmstoff Dünnschichtbande oliv (AZohne) gegen die Menge des Hemmstoffes Dünnschichtbande oliv aufgetragen. Die "Menge" wurde mittels Verdünnungsreihen im Photometer (siehe Kapitel 3.7.2.) ermittelt.

Dargestellt ist also der Quotient (AZmit/AZohne) der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von steigenden Konzentrationen (Extinktion bei 475 nm) der Dünnschichtbande oliv zur Dopa- Reaktion und der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe der Dünnschichtbande oliv zur Dopa-Reaktion. So kann die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des Rohextraktes anschaulich dargestellt werden.



Hemmversuche mit 5-Hydroxyindol (Art 4)

Tabelle 14 : Vergleich der Anzahl gefärbter Zellen der Proben mit und ohne die Zugabe des bekannten Tyrosinasehemmers 5-Hydroxyindol unterschiedlicher Konzentrationen zur Dopa-Reaktion.

Lok.	Alter	G	Art	Konz. (mol/l)	AZ ohne	AZ mit	AZ mit/ AZ ohne	O1	O2	O3	O4	M1	M2	M3	M4	
Oberlippe	1	46	1	4	0,11	14,8	3,03	0,20	15,3	12,9	15,5	15,5	3,33	2,67	3,2	2,93
Stirn	1	65	2	4	0,11	13,87	2,93	0,21	14,5	13,5	13,9	13,6	3,07	2,67	2,93	3,07
Nase	1	43	1	4	0,11	12,13	2,87	0,24	20,3	19,5	20,8	20	2,93	3,07	2,4	3,07
Wange	1	90	1	4	0,028	6,83	1,8	0,26	6,4	6,93	6,8	7,2	1,73	1,87	1,87	1,73
Wange	1	87	2	4	0,075	7,13	2,13	0,30	7,33	6,13	7,33	7,73	1,47	2,4	2,27	2,4
Penis	7	35	1	4	0,028	17	5,17	0,30	18,7	16	16,5	16,8	3,87	5,87	5,2	5,73
Stirn	1	69	2	4	0,055	13,87	4,3	0,31	14,5	13,5	13,9	13,6	4,53	4,27	3,87	4,53
Nase	1	43	1	4	0,055	20,13	6,27	0,31	20,3	19,5	20,8	20	5,73	6,53	5,87	6,93
Abdomen	2	53	2	4	0,055	12,77	4,3	0,34	11,9	11,9	13,5	13,9	4,4	4,13	4,53	4,13
Penis	7	35	1	4	0,014	17	6,17	0,36	18,7	16	16,5	16,8	6,27	5,87	6,87	6,67
Kopf	1	67	1	4	0,045	18,1	7,1	0,39	18,4	17,6	18,4	18	8,13	7,2	6,13	6,93
Rücken	2	69	1	4	0,045	10,7	4,27	0,40	10,8	10,1	10	10,9	4,13	4,4	4,27	4,27
Schläfe	1	51	1	4	0,038	21,2	9,1	0,43	23,6	20,7	20	20,5	8,4	9,2	9,07	10
Abdomen	2	53	2	4	0,028	12,77	6,03	0,47	11,9	11,9	13,5	13,9	6,8	5,6	5,47	6,27
Achsel	2	53	2	4	0,014	8,53	4,86	0,57	8,4	8,8	8,67	8	5,07	4,4	4,93	5,07
Abdomen	2	53	2	4	0,014	12,77	7,33	0,57	11,9	11,9	13,5	13,9	6,53	8,93	9,33	4,53
Oberlippe	1	46	1	4	0,014	14,8	8,8	0,59	15,3	12,9	15,5	15,5	8	8,27	9,2	9,73
Bein	6	30	2	4	0,014	14,1	8,67	0,61	14	12,8	15,5	14,1	7,33	9,73	9,6	8
Bein	6	30	2	4	0,007	14,1	10,7	0,76	14	12,8	15,5	14,1	12,3	10,1	10,6	9,6
Gesicht	1	73	1	4	0,019	4,93	2,6	0,53	4,93	4,67	5,07	5,07	2,67	2,8	2,4	2,53
Gesicht	1	73	1	4	0,00075	4,93	4,87	0,99	4,93	4,67	5,07	5,07	4,93	4,8	4,93	4,8
Gesicht	1	73	1	4	0,000075	4,93	5	1,01	4,93	4,67	5,07	5,07	5,33	4,93	4,67	5,07
Rücken	2	20	1	4	0,0038	13,33	12,6	0,95	13,2	13,3	12,7	14	12	12,7	12	12,4

Legende (Tabelle 14):

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Art 4 = Hemmversuche mit Hemmstoff 5-Hydroxyindol

Konz. = Konzentration (in mol/l)

AZ ohne = Anzahl angefarbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von 5-Hydroxyindol zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefarbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von 5-Hydroxyindol zur Dopa-Reaktion

O1-O4 = Einzelne Schnitte von AZ ohne

M1-M4 = Einzelne Schnitte von AZ mit

Diagramm 15: Effekt des 5-Hydroxyindols auf die Anfärbung von Melanozyten in der Dopa-Reaktion (Ergebnisse aus Tabelle 14)

Es wird die Anzahl der angefarbten Melanozyten / mm Basalmembran ohne (AZ ohne 5-Hydroxyindol) und mit (AZ mit 5-Hydroxyindol) Zugabe von Hemmstoff 5-Hydroxyindol (bei unterschiedlichen Konzentrationen in mol/l, von links nach rechts zunehmend) dargestellt.

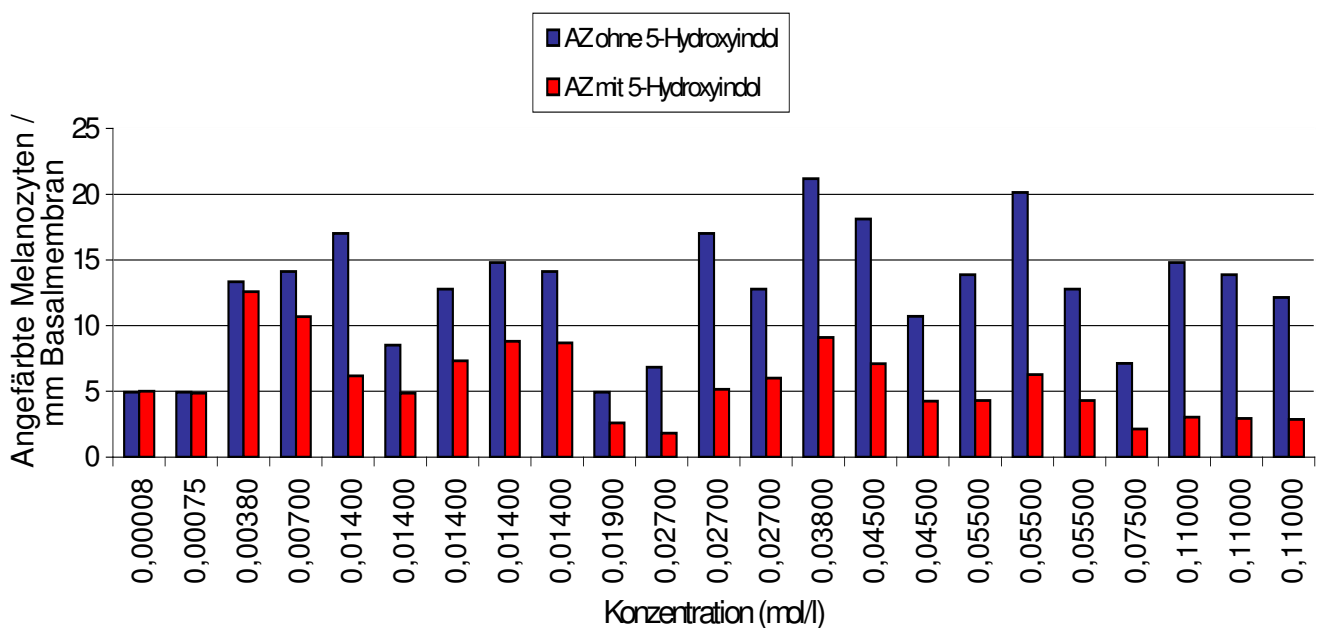


Diagramm 16: Effekt des 5-Hydroxyindols auf die Anfärbung von Melanozyten in der Dopa-Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration (Ergebnisse aus Tabelle 14):

Es wird das Verhältnis der angefärbten Melanozyten / mm Basalmembran mit Hemmstoff 5-Hydroxyindol (AZmit) und ohne Hemmstoff 5-Hydroxyindol (AZohne) gegen die Menge des Hemmstoffes 5-Hydroxyindol (in mol/l) aufgetragen.

Dargestellt ist also der Quotient (AZmit/AZohne) der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von steigenden Konzentrationen 5-Hydroxyindol zur Dopa-Reaktion und der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von 5-Hydroxyindol zur Dopa-Reaktion. So kann die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des 5-Hydroxyindols anschaulich dargestellt werden.

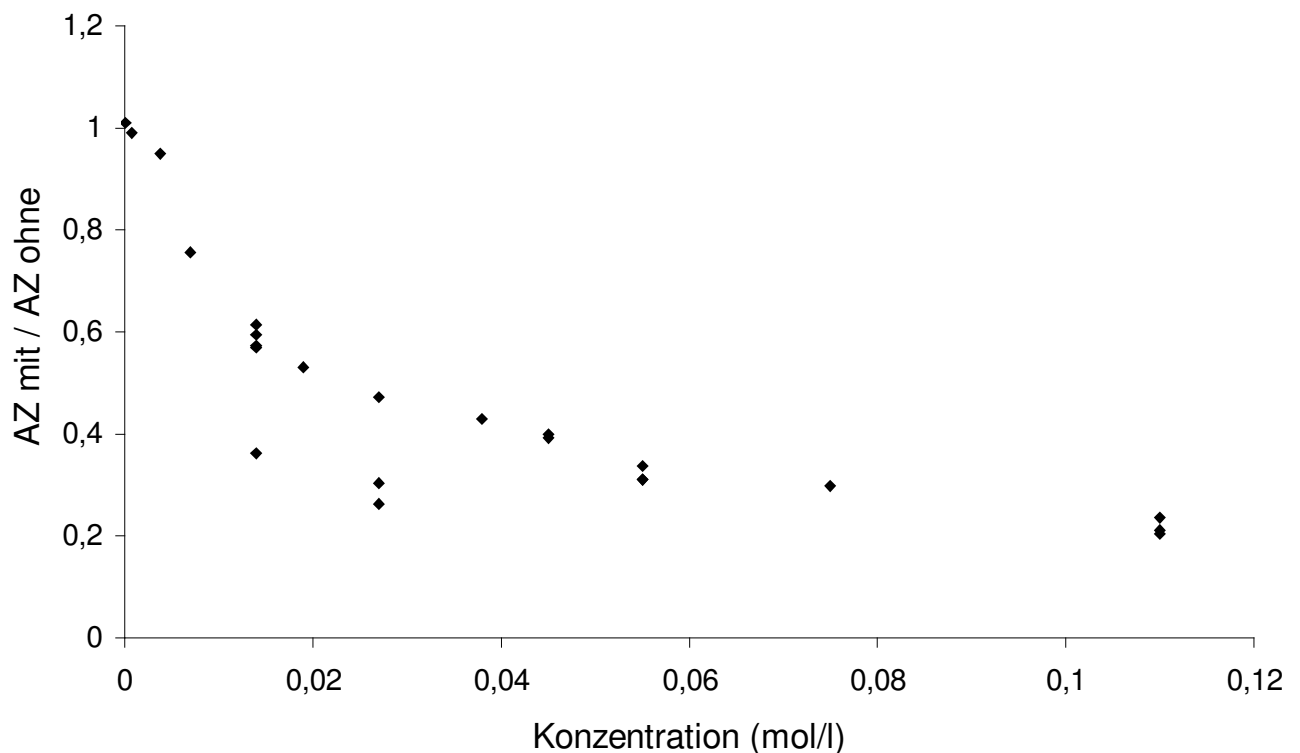


Abbildung 12, 13: Beispiel eines Hautversuches. Links ist die Haut ohne Zugabe von Säulenfraktion 9 (Inhibitor der Tyrosinase) dargestellt, rechts jene mit Zugabe von Säulenfraktion 9 zur Dopa-Reaktion nach Bloch (HE-Färbung)

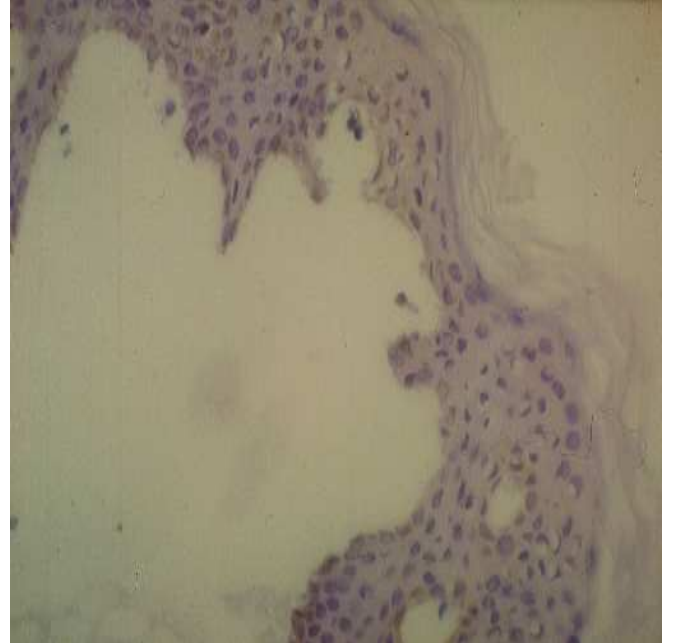
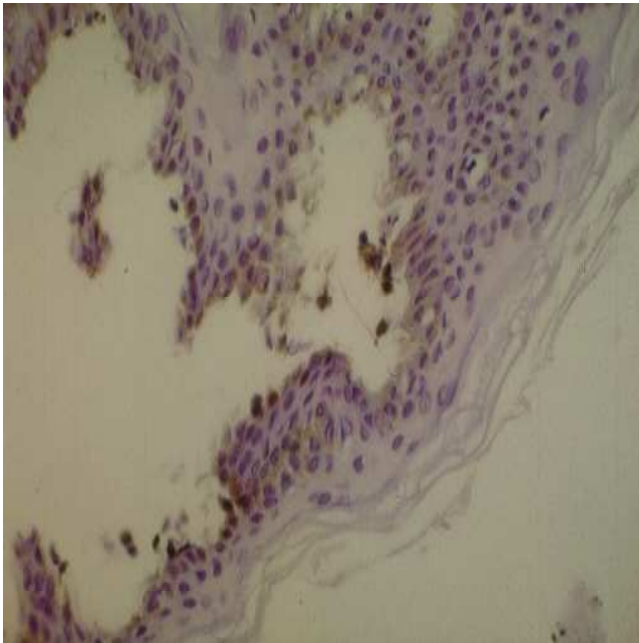
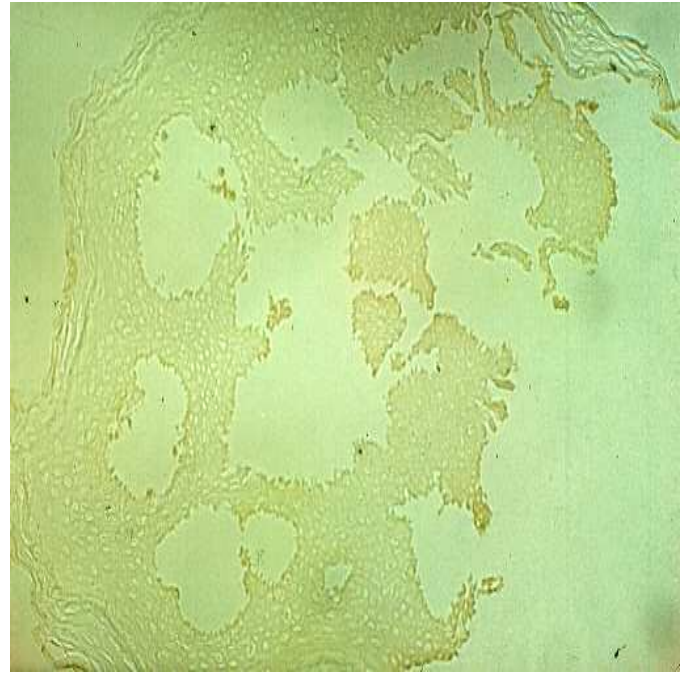


Abbildung 14, 15: Beispiel eines Hautversuches. Links ist die Haut ohne Zugabe von Dünnschichtbande oliv (Tyrosinaseinhibitor) dargestellt, rechts mit Zugabe von Dünnschichtbande oliv (ohne Färbung)



Die Ergebnisse zeigen, daß die Zugabe von Rohextrakt, Säulenfraktion 9 (braun), Dünnschichtbande oliv (aus Fraktion 9, RF= 0,37-0,4) und 5-Hydroxyindol zur Dopa-Reaktion im Vergleich zu Kontrollproben ohne Hemmstoff eine deutliche Abnahme der braun angefärbten Melanozyten / mm Basalmembran bewirken (p jeweils < 0,0001, Wilcoxon-Test für Paardifferenzen für zwei verbundene Stichproben). Die Stärke der Hemmung ist dabei bei allen vier Versuchsansätzen von der Ausgangsextinktion bei 475 nm (= grobes Maß für Konzentration) abhängig, d. h. je höher die Extinktion, desto stärker nimmt auch die Zahl der braun angefärbten Zellen ab. Dabei zeigen die Korrelationskoeffizienten folgende Werte: Art 1 = (-) 0,9785 ; Art 2 = (-) 0,9347 ; Art 3 = (-) 0,9140 ; Art 4 = (-) 0,8982 (Spearmannscher Rangkorrelationskoeffizient). Bei den Versuchen nach Zugabe von Säulenfraktion 9, Dünnschichtbande oliv und 5-Hydroxyindol zeigen sich einige wenige Versuche, bei denen keine Hemmung stattgefunden hat. Dies sind jeweils die Versuche nach Zugabe von Hemmstoffen mit der geringsten Extinktion bzw. Konzentration, so daß hier davon ausgegangen werden kann, daß die Menge des Hemmstoffes zur Tyrosinasehemmung nicht ausgereicht hat.

Einzelbeispiele zeigen Ergebnisse, in denen bei geringer Hemmstoffkonzentration eine sehr deutliche Hemmung und umgekehrt bei sehr hoher Hemmstoffkonzentration dennoch nur eine geringere Hemmung zu erkennen ist (siehe auch Kapitel 4.3.6.). Hier muß sicher berücksichtigt werden, daß es sich bei den Hemmstoffen Rohextrakt, Säulenfraktion 9 und Dünnschichtbande oliv um Stoffgemische handelt und somit die Extinktion bei 475 nm nur als sehr grobe Schätzung der Konzentration dienen kann, da die Extinktion bei 475 nm nicht nur durch den Tyrosinasehemmstoff im Stoffgemisch, sondern auch durch alle anderen Stoffe mitbestimmt wird und die Zusammensetzung des Stoffgemisches nicht als in jedem Fall identisch angesehen werden kann. Warum diese Beobachtung auch bei dem „reinen“ Hemmstoff 5-Hydroxyindol gemacht wird, ist jedoch so nicht zu erklären. Es ist aber auch immer wichtig, darauf hinzuweisen, daß diese „*semi-in vivo*-Melanogenese“, wie schon in der Einleitung erläutert, kein starrer Prozeß ist, sondern zahlreichen weiteren Faktoren unterliegt, so daß auch mit einer interindividuell (je nach Hautprobe mit Alter, Geschlecht und Lokalisation etc.) unterschiedlichen Reaktion der Melanozyten und ihrer endogenen Tyrosinase auf den Hemmstoff und das Substrat gerechnet werden muß.

Kontrollversuch mit einer nicht hemmenden Fraktion (Fraktion 6 „goldgelb“) aus der Säulenchromatographie (Art 5)

Tabelle 15 : Vergleich der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion mit und ohne Zugabe von Säulenfraktion 6 (goldgelb)

Lok.	Alter	G	Art (Pro- be)	Ext.	AZ Ohne	AZ mit	AZ mit/ AZ ohne	O1	O2	O3	O4	M1	M2	M3	M4	
Schulter	2	73	2	5(1)	1,4	7,93	8,37	1,06	8,13	7,73	8	7,87	8,27	8,53	8,27	8,4
Achsel	2			5(2)	1,4	7,6	7,23	0,99	7,73	7,6	7,47	7,6	7,6	6,93	7,2	7,2
Kopf	1	52	1	5(3)	1,4	17,7	18,07	1,02	18,1	17,1	17,9	17,7	19,3	17,5	18,1	17,3
Gesicht	1	31	1	5(4)	1,4	23,3	22,6	0,97	23,5	23,6	23,2	22,9	22	23,2	23,5	21,7
Oberarm	3	42	1	5(5)	1,4	19,1	19,57	1,02	19,6	20,1	19,7	16,9	20,9	19,9	20	17,5
Vorhaut	7	42	1	5(6)	1,4	12,9	12,57	0,97	12,7	13,1	11,7	13,7	12,7	12,5	12,5	12,5
Rumpf	2	79	2	5(7)	1,4	4,2	4,3	1,02	4,27	4,27	3,6	4,67	4,4	3,87	5,74	3,33
Bein	6	88	2	5(8)	1,4	11,63	11,57	0,99	13,3	10	11,3	11,9	11,6	11,5	11,5	11,7
Rücken	2	48	1	5(9)	1,4	10,6	10,8	1,02	10,9	11,2	10,5	10	11,2	10,4	10,7	10,9
Gesicht	1	91	1	5(10)	1,4	7,7	7,37	0,96	7,6	7,73	8	7,47	7,07	7,33	8	7,07
Stirn	1	63	2	5(11)	1,4	8,63	8,23	0,95	9,2	8,13	8,53	8,67	8	8,67	8,4	7,87
Stirn	1	63	2	5(12)	1,4	8,63	8,47	0,98	9,2	8,13	8,53	8,67	8,53	8,53	8,8	8
Wange	1	74	2	5(13)	1,4	11,13	11,03	0,99	11,3	11,1	10,9	11,2	10,7	11,2	10,8	11,5
Nase	1	93	1	5(14)	1,4	9,23	9,13	0,99	9,6	9,07	8,8	9,47	9,33	8,93	9,2	9,07
Vorhaut	7	32	2	5(15)	1,4	12,9	12,5	0,97	13,9	12,3	12,8	12,7	12,3	12,4	12,5	12,8

Legende:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Art 5 = Kontrollversuche mit nicht hemmender Fraktion

Probe = Numerierung der Versuche (siehe Darstellung in Diagramm 17)

Ext. = Extinktion bei 475 nm

AZ ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von Säulenfraktion 6 zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Säulenfraktion 6 zur Dopa-Reaktion

O1-O4 = Einzelne Schnitte von AZ ohne

M1-M4 = Einzelne Schnitte von AZ mit

Diagramm 17 : Effekt einer nicht hemmenden Säulenfraktion, Fraktion 6 (goldgelb). Es wird die Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran mit (AZ mit Säulenfraktion 6) und ohne (AZ ohne Säulenfraktion 6) Zugabe von Säulenfraktion 6 (bei maximaler Extinktion bei 475 nm > 1,4) dargestellt (Ergebnisse aus Tabelle 15).

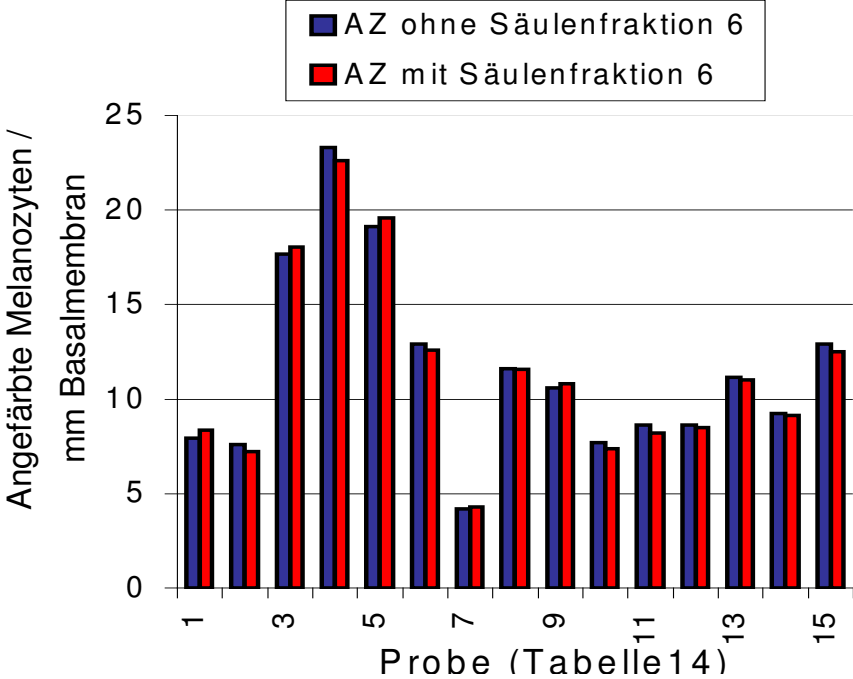
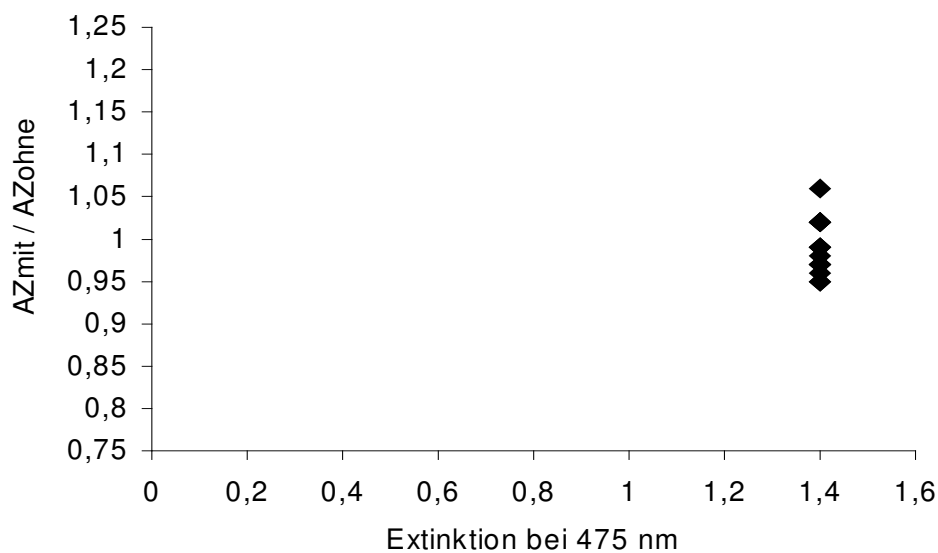


Diagramm 18: Effekt einer nicht hemmenden Säulenfraktion, Fraktion 6 (goldgelb), bei maximaler Extinktion bei 475 nm (Ergebnisse aus Tabelle 15).

Dargestellt ist der Quotient (AZ mit/AZ ohne) der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran (AZ) nach Zugabe der maximalen Stoffmenge (Extinktion bei 475 nm > 1,4) der nicht hemmenden Säulenfraktion 6 (goldgelb) zur Dopa-Reaktion und der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe der nicht hemmenden Säulenfraktion 6 (goldgelb) zur Dopa-Reaktion.

Das Diagramm zeigt, daß der Quotient in jedem Versuch ca. 1 ist, also keine Hemmung stattfindet.



Kontrollversuch mit einer nicht hemmenden Bande aus der Dünnschichtchromatographie (Dünnschichtbande blau-grün, Rf= 0,33) (Art 6)

Tabelle 16 : Vergleich der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion mit und ohne Zugabe der Dünnschichtbande blau-grün (Rf = 0,33) (aus Säulenfraktion 9)

Lok.	Alter	G	Art (Probe)	Ext.	AZ Ohne	AZ mit	AZ mit/ AZ ohne	O1	O2	O3	O4	M1	M2	M3	M4
Abdomen 2	61	2	6(1)	1,4	8,03	8,03	1,00	8,27	7,73	8,13	8	9,2	8	6,8	8,13
Abdomen 2	61	2	6(2)	1,4	8,03	7,9	0,98	8,27	7,73	8,13	8	7,87	8	8,27	7,47
Nase 1	61	2	6(3)	1,4	12,9	12,67	0,98	13,2	12,7	12,8	12,9	12,8	12,7	12,4	12,8
Nase 1	61	2	6(4)	1,4	12,9	12,7	0,98	13,2	12,7	12,8	12,9	12,9	12,4	12,8	12,7
Nase 1	61	2	6(5)	1,4	12,9	12,9	1,00	13,2	12,7	12,8	12,9	13,1	12,9	12,8	12,8
Rücken 2	73	2	6(6)	1,4	5,33	5,4	1,01	4,8	4,93	5,73	5,87	6,13	4,27	5,6	4,8
Rücken 2	73	2	6(7)	1,4	5,33	5,63	1,06	4,8	4,93	5,73	5,87	5,33	5,33	5,6	6,27
Bein 6	26	1	6(8)	1,4	10,63	10,43	0,98	10,5	10,9	10,4	10,7	10	11,1	10,1	10,5
Bein 6	26	1	6(9)	1,4	10,63	10,73	1,01	10,5	10,9	10,4	10,7	11,1	10,5	10,8	10,5
Wange 1	75	2	6(10)	1,4	13,03	12,73	0,98	12,9	12,7	13,2	13,3	12,5	12,4	12,5	13,5
Schläfe 1	51	1	6(11)	1,4	21,9	22,6	1,07	23,6	20,7	20	20,5	24	21,7	23,3	21,3
Vorhaut 7	32	2	6(12)	1,4	12,9	12,57	0,97	13,9	12,3	12,8	12,7	12,8	12,5	12,8	12,1
Vorhaut 7	32	2	6(13)	1,4	12,9	12,3	0,95	13,9	12,3	12,8	12,7	11,9	12,1	12,7	12,5
Vorhaut 7	32	2	6(14)	1,4	12,9	12,43	0,96	13,9	12,3	12,8	12,7	12,8	12,3	12,7	12
Abdomen 2	42	1	6(15)	1,4	12,8	12,8	1,00	12,7	13,1	11,7	13,7	12,5	11,9	13,2	13,6

Legende:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Art 6 = Kontrollversuche mit nicht hemmender Dünnschichtbande

Probe = Numerierung der Versuche (siehe Darstellung in Diagramm 18)

Ext. = Extinktion bei 475 nm

AZ ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von Dünnschichtbande blau-grün (Rf=0,33) zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Dünnschichtbande blau-grün (Rf=0,33) zur Dopa-Reaktion

O1-O4 = Einzelne Schnitte von AZ ohne

M1-M4 = Einzelne Schnitte von AZ mit

Diagramm 19 : Effekt einer nicht hemmender Dünnschichtbande (blau-grün, RF= 0,33).

Es wird die Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran mit (AZ mit Dünnschichtbande blau-grün) und ohne (AZ ohne Dünnschichtbande blau-grün) Zugabe von Dünnschichtbande blau-grün (bei maximaler Extinktion > 1,4) dargestellt (Ergebnisse aus Tabelle 16).

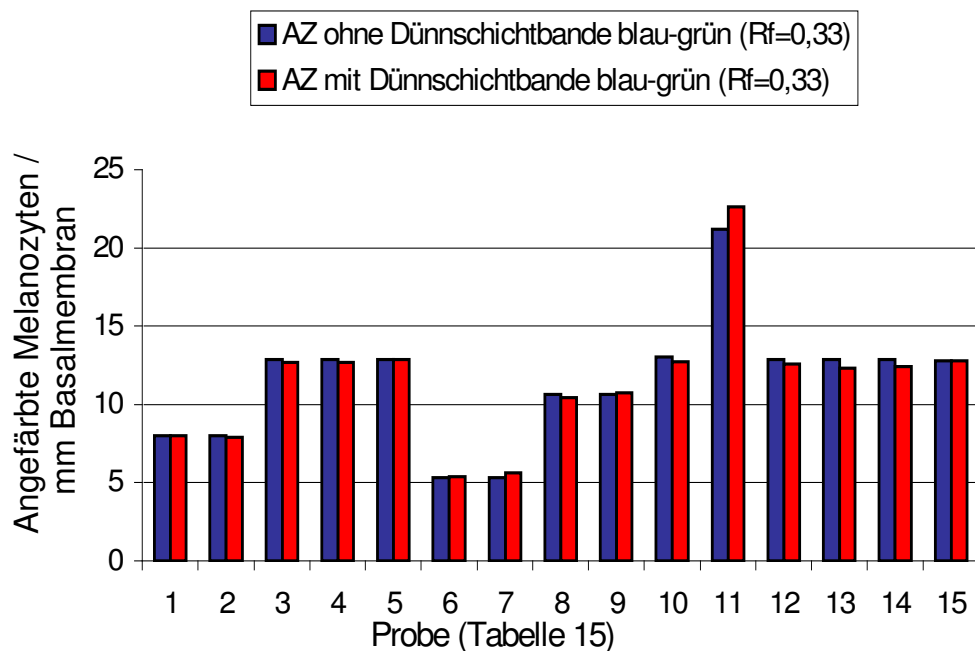
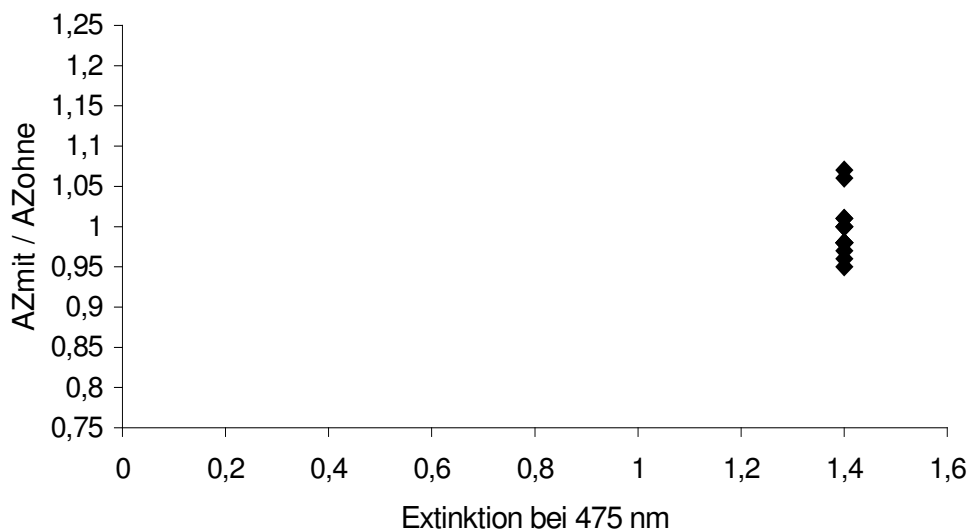


Diagramm 20: Effekt einer nicht hemmenden Dünnschichtfraktion (blau-grün, RF= 0,33) bei maximaler Extinktion (>1,4) (Ergebnisse aus Tabelle 16)

Dargestellt ist der Quotient (AZ mit/AZ ohne) der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe der maximalen Stoffmenge (Extinktion bei 475 nm > 1,4) der nicht hemmenden Dünnschichtbande blau-grün zur Dopa-Reaktion (AZmit) und der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe der nicht hemmenden Dünnschichtbande blau-grün (AZohne) zur Dopa-Reaktion.

Das Diagramm zeigt, daß der Quotient in jedem Versuch ca. 1 ist, also keine Hemmung stattfindet.



Die Säulenfraktion 6 (goldgelb) sowie die Dünnschichtbande blau-grün (RF = 0,33) (aus Säulenfraktion 9) zeigen bei Zugabe zur Dopa-Reaktion im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl braun angefärbter Zellen (Art 5 : p = 0,4100 ; Art 6 : p = 0,1952). Die Extinktion bei 475 nm wurde bei diesen Stoffen jeweils bei einem Maximalwert von E = 1,4 gehalten, um die Signifikanz der Ergebnisse zu erhöhen.

4.3.6. Untersuchung zur Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung der Tyrosinase in den Melanozyten durch Zugabe von externer Tyrosinase

5-Hydroxyindol

Tabelle 17 : Überprüfung der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung durch 5-Hydroxyindol auf die Tyrosinase in den Melanozyten nach Zugabe von externer Tyrosinase bei unterschiedlichen Konzentrationen des 5-Hydroxyindol (in mol/l)

Lokalisation	Alter	Geschlecht	Konz (mol/l)	AZ ohne	AZ mit	AZ Aufhebung	AZmit/ AZ ohne	AZ Aufhebung/ AZohne
Rücken 2	20	1	0,0038	13,3	12,6	16	0,95	1,20
Genital 7	35	1	0,014	17	6,17	13,37	0,36	0,79
Genital 7	35	1	0,028	17	5,17	9,93	0,30	0,58
Wange 1	90	1	0,028	6,83	1,8	3,67	0,26	0,54
Rücken 2	69	1	0,045	10,7	4,27	6,47	0,40	0,60
Wange 1	87	2	0,075	7,13	2,13	5,97	0,30	0,85

Legende:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Konz (mol/l) = Konzentration in mol/l

AZ ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von 5-Hydroxyindol zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von 5-Hydroxyindol zur Dopa-Reaktion

AZ Aufhebung = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von 5-Hydroxyindol und externer Tyrosinase zur Dopa-Reaktion

Diagramm 21 : Darstellung der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung durch 5-Hydroxyindol auf die Tyrosinase in den Melanozyten nach Zugabe von externer Tyrosinase. In diesem Diagramm wird die Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion mit (AZ mit) und ohne (AZ ohne) Hemmstoff (5-Hydroxyindol) sowie mit Hemmstoff nach Zugabe des Enzyms Tyrosinase (AZ Aufhebung) gegeneinander aufgetragen. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von 5-Hydroxyindol (in mol/l) verwendet (Daten aus Tabelle 17).

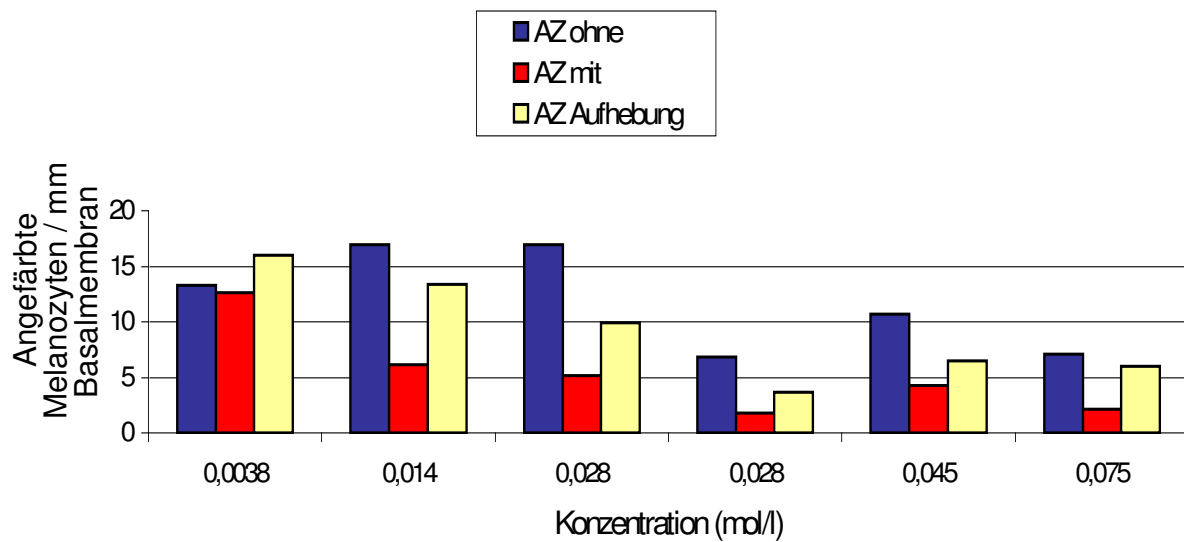
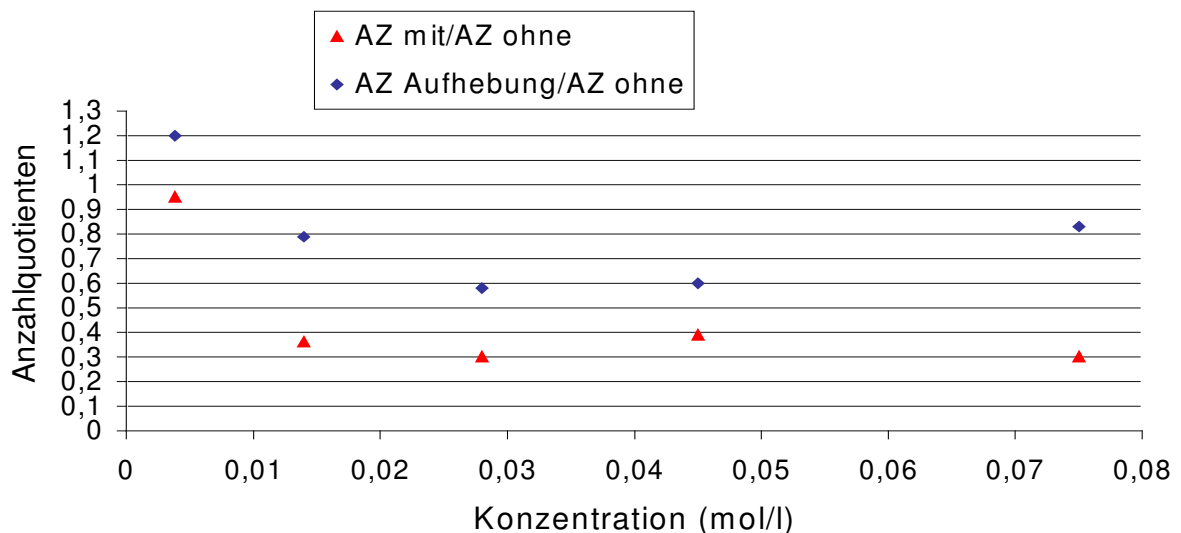


Diagramm 22 : Zusammenhang der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung des 5-Hydroxyindols auf die Tyrosinase der Melanozyten nach Zugabe einer konstanten Menge externer Tyrosinase mit der Anfangskonzentration des 5-Hydroxyindols

In diesem Diagramm werden die Quotienten der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran mit und ohne Hemmstoff 5-Hydroxyindol (AZ mit/ AZ ohne) sowie die Quotienten nach Zugabe von externer Tyrosinase mit Hemmstoff und ohne Hemmstoff (AZ Aufhebung / AZ ohne) gegen die Konzentration (in mol/l) aufgetragen. So kann ein eventueller Zusammenhang zwischen Konzentration des Hemmstoffes und Stärke der Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung erkannt werden. (Daten aus Tabelle 17).



Die roten Punkte (= Quotient AZ mit/AZ ohne) zeigen den noch vorhandenen prozentualen Anteil angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe des Hemmstoffes 5-Hydroxyindol im Vergleich zur Anfangssituation ohne Zugabe von Hemmstoff 5-Hydroxyindol, das heißt, je größer der Wert des Quotienten, desto geringer die Hemmung. Die Hemmstoffkonzentrationen wurden in Anlehnung an die Versuche zur Hemmwirkung (siehe Kapitel 4.3.5.) gewählt. Bei einer Konzentration von 0,0038 mol/l war die Hemmung am geringsten (AZ mit/AZ ohne = 0,95). Auffallend war jedoch, daß die Hemmung bei einer Konzentration von 0,045 mol/l geringer (AZ mit/AZ ohne = 0,40) war als bei einer Konzentration von 0,014 mol/l (AZ mit/AZ ohne = 0,36) und 0,028 mol/l (AZ mit/AZ ohne =

0,30 mol/l). Dies kann eigentlich nur, wie schon in Kapitel 4.3.5. erläutert, an Unterschieden in den Hautproben und ihrer Reaktion auf den Hemmstoff und das Substrat zusammenhängen, da alle anderen Bedingungen (Konzentration aller extern zugeführten Verbindungen und Behandlung der Hautproben) konstant gehalten wurden. Zudem kann es auch durch eventuelle Ungenauigkeiten in der Datenerhebung (Auszählung der Melanozyten / mm Basalmembran kann auch wegen der Auffaltung der Basalmembran nur als Schätzung der Anzahl der tatsächlich vorhandenen angefärbten Melanozyten dienen) erklärt sein.

Die blauen Punkte zeigen den noch vorhandenen prozentualen Anteil angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe des Hemmstoffes 5-Hydroxyindol mit externer Tyrosinase im Vergleich zur Anfangssituation ohne Zugabe von Hemmstoff an. Der Abstand der Punkte voneinander, das heißt die Differenz der beiden Quotienten (AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne) ist also ein Maß für die Stärke der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmung. Je größer der Abstand, das heißt der Wert für die Differenz der Quotienten, desto deutlicher die Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung des 5-Hydroxyindols auf die Tyrosinase der Melanozyten durch die extern zugegebene Tyrosinase.

Hier zeigte sich bei der geringsten Hemmstoffkonzentration (0,0038 mol/l) eine im Vergleich zu höheren Hemmstoffkonzentration weniger deutliche Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmung, was am ehesten daran liegt, daß eine kaum relevante Hemmung stattgefunden hat. Nach Zugabe von externer Tyrosinase zeigen sich hier sogar mehr angefärbte Melanozyten / mm Basalmembran (AZ rückgängig) als in der Kontrolle ohne Hemmstoff (AZ ohne), was eigentlich nur zu erklären wäre, wenn externe Tyrosinase in der Lage wäre, aktiv in die Melanogenese der Melanozyten einzugreifen. Wahrscheinlicher ist auch hier die Berücksichtigung einer gewissen Ungenauigkeit der Datenerhebung: So ist es möglich, daß die externe Tyrosinase ebenfalls das zugegebene L-Dopa umsetzte und hierdurch entstandene schwarze Ablagerungen in der Hautprobe fälschlicherweise als angefärbte Melanozyten erkannt wurden.

Bei Hemmstoffkonzentrationen zwischen 0,014 mol/l und 0,075 mol/l läßt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Hemmstoffkonzentration und Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmung nachweisen, bei einer Konzentration von 0,075 mol/l war die Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmung sogar deutlicher als bei geringeren Konzentrationen. Auch hierfür kann keine eindeutige Erklärung gefunden werden. Einzig möglich wäre eine unterschiedliche „Erreichbarkeit“ des Hemmstoffes sowie des exogen zugeführten L-Dopas in den Melanozyten der unterschiedlichen Hautproben.

Bei einer Konzentration von 0,028 mol/l wurden zwei Versuche durchgeführt, von denen im Diagramm nur einer aufgenommen wurde, da die Quotienten nahezu gleich sind und dies die Übersichtlichkeit des Diagramms verbessert.

Rohextrakt

Tabelle 18 : Überprüfen der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung durch Rohextrakt auf die Tyrosinase in den Melanozyten durch Zugabe von externer Tyrosinase bei unterschiedlichen Konzentrationen des Rohextraktes (Extinktion bei 475 nm als Maß für die Konzentration)

Lokalisation	Alter	Geschlecht	Ext.	AZ ohne	AZ mit	AZ Aufhebung	AZmit/AZohne	AZ Aufhebung/AZohne
Vorhaut 7	32	2	0,157	12,9	7,4	13,07	0,57	1,01
Gesicht 1	61	1	0,284	8,73	3,7	4,4	0,42	0,50
Nase 1	93	1	0,311	9,23	2,03	8,57	0,22	0,93
Vorhaut 7	32	2	0,311	12,9	4,07	8,27	0,32	0,64
Nase 1	93	1	0,977	9,23	0,93	1,1	0,10	0,12

Legende:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Ext. = Extinktion bei 475 nm

AZ ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von Rohextrakt zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Rohextrakt zur Dopa-Reaktion

AZ Aufhebung = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Rohextrakt und externen Tyrosinase zur Dopa-Reaktion

Diagramm 23 : Darstellung der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung des Rohextraktes auf die Tyrosinase in den Melanozyten nach Zugabe von externer Tyrosinase. In diesem Diagramm wird die Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion ohne (AZohne) und mit (AZmit) Hemmstoff (Rohextrakt) sowie mit Hemmstoff nach Zugabe des Enzyms Tyrosinase (AZ Aufhebung) gegeneinander aufgetragen. Es wurden unterschiedliche Extinktionen bei 475 nm und somit Konzentrationen von Rohextrakt verwendet (Daten aus Tabelle 18).

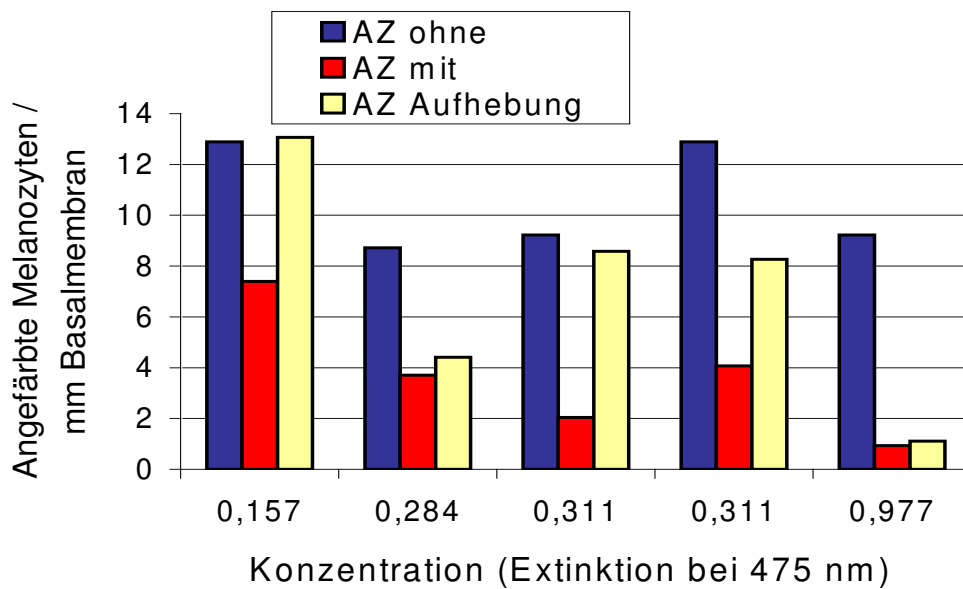
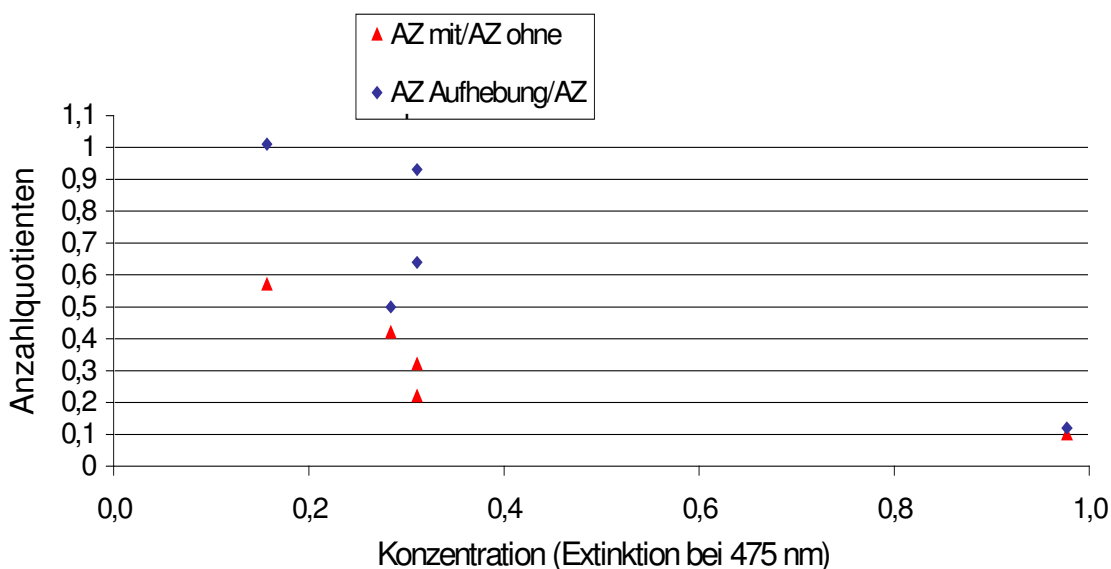


Diagramm 24 : Zusammenhang der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung des Rohextraktes auf die Tyrosinase der Melanozyten nach Zugabe einer konstanten Menge externer Tyrosinase mit der Anfangsextinktion bei 475 nm der Rohextraktlösung (als Maß für die Konzentration)

In diesem Diagramm werden die Quotienten der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran mit und ohne Hemmstoff Rohextrakt (AZmit/AZohne) sowie die Quotienten nach Zugabe von Hemmstoff Rohextrakt mit exterer Tyrosinase und ohne Hemmstoff Rohextrakt (AZ Aufhebung/AZohne) gegen die Extinktion (bei 475 nm) und somit die Konzentration aufgetragen. So kann erkannt werden, ab welcher Konzentration eines Hemmstoffes keine oder eine nur sehr geringe Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung zu erwirken ist (Daten aus Tabelle 18).



Die roten Punkte zeigen den noch vorhandenen prozentualen Anteil angefärbter Melanozyten/mm Basalmembran nach Zugabe des Hemmstoffes Rohextrakt im Vergleich zur Anfangssituation ohne Zugabe von Hemmstoff, das heißt, je größer der Wert des Quotienten, desto geringer die Hemmung. Hier zeigte sich bei ansteigender Extinktion auch eine stärkere Hemmung.

Die blauen Punkte zeigen den noch vorhandenen prozentualen Anteil angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe des Hemmstoffes 5-Hydroxyindol mit externer Tyrosinase im Vergleich zur Anfangssituation ohne Zugabe von Hemmstoff.

Der Abstand der Punkte voneinander, das heißt die Differenz der beiden Quotienten (AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne) ist also ein Maß für die Stärke der Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung. Je größer der Abstand, das heißt der Wert für die Differenz der Quotienten, desto deutlicher die Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung des Rohextraktes auf die Tyrosinase der Melanozyten durch die extern zugegebene Tyrosinase.

Die Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung war bei der geringsten Extinktion von 0,157 am deutlichsten (Differenz der Quotienten 0,44) und fand bei der höchsten Extinktion von 0,977 nahezu nicht mehr statt (Differenz der Quotienten 0,02 bzw. angefärbte Melanozyten / mm Basalmembran mit Zugabe von Hemmstoff 0,93, mit Zugabe von Hemmstoff und Tyrosinase 1,1). Für die übrigen Extinktionen fanden sich uneinheitliche Ergebnisse. So fand sich bei einer Extinktion von 0,284 eine weniger deutliche Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung (Differenz der Quotienten 0,08) als bei einer Extinktion von 0,311. Hier ist zu berücksichtigen, wie schon in Kapitel 4.3.5. erläutert, daß es sich gerade bezüglich des Hemmstoffes Rohextrakt bei den Extinktions-Werten nur um eine grobe Schätzung der Konzentration handelt, da wir es hier mit einem Stoffgemisch bestehend aus zahlreichen unterschiedlichen Substanzen zu tun haben, die sicherlich nicht immer in gleichen Verhältnissen im Rohextrakt vorhanden sind. So könnte auch zu erklären sein, daß bei gleicher Extinktion (es wurden zwei Versuche bei einer Extinktion von 0,311 durchgeführt) bei 475 nm in einem Versuch eine sehr viel deutlichere Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung zu erkennen war als im anderen: In dem einen Versuch zeigte AZmit/AZohne einen Wert von 0,22 und AZ rückgängig/AZohne einen Wert von 0,93 (d.h. eine Differenz von 0,71), bei dem anderen zeigte AZmit/AZohne einen Wert von 0,32 und AZ rückgängig/AZohne einen Wert von 0,64 (d.h. eine Differenz von 0,32). Hier zeigte sich jedoch im Falle der deutlicheren Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung auch eine bessere Hemmung bei alleiniger Zugabe von Hemmstoff (AZ mit/AZ ohne 0,22 gegen 0,32 im anderen Versuch), so daß hier eigentlich dennoch von einer höheren Hemmstoffkonzentration ausgegangen muß, so daß dieses Phänomen unklar bleibt. Die einzige Erklärung wäre eine schnellere Erreichbarkeit des Hemmstoffes in den Melanozyten der Hautproben von der Vorhaut (noch bevor er von der externen Tyrosinase „abgefangen“ werden kann) im Gegensatz zu den Melanozyten der Hautproben von der Nase.

Zu berücksichtigen ist auch, daß sich bei den Versuchen mit Hemmstoff Rohextrakt lichtmikroskopisch eine schmutzige braune Färbung des Präparates durch braun-schwarze Ablagerungen im phosphatpufferhaltigen Reaktionsansatz zeigte, so daß es etwas schwierig war, alle Melanozyten sicher zu identifizieren, es also leicht zu Ungenauigkeiten in der Datenerhebung kommen kann..

Säulenfraktion 9

Tabelle 19 : Überprüfen der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung durch Säulenfraktion 9 (braun) auf die Tyrosinase in den Melanozyten durch Zugabe von externer Tyrosinase bei unterschiedlichen Konzentrationen der Säulenfraktion 9 (braun) (Extinktion bei 475 nm als Maß für die Konzentration)

Lok.	Alter	Geschlecht	Ext.	AZ Ohne	AZ mit	AZ Aufhebung	AZmit/AZohne	AZ Aufhebung/AZohne
Nase 1	76	2	0,049	5,37	3,37	7,1	0,63	1,32
Vorhaut 7	32	2	0,513	12,9	5,6	7,27	0,43	0,56
Nase 1	76	2	0,561	5,37	1,73	4,83	0,32	0,90
Vorhaut 7	32	2	0,958	12,9	3	1,87	0,23	0,14
Vorhaut 7	32	2	1,351	12,9	1,83	1,2	0,14	0,09

Legende:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Ext- = Extinktion bei 475 nm

AZ ohne = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von Säulenfraktion 9 (braun) zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Säulenfraktion 9 (braun) zur Dopa-Reaktion

AZ Aufhebung = Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Säulenfraktion 9 (braun) und externen Tyrosinase zur Dopa-Reaktion

Diagramm 25 : Darstellung der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung der Säulenfraktion 9 (braun) auf die Tyrosinase in den Melanozyten nach Zugabe von externer Tyrosinase.

In diesem Diagramm wird die Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion ohne (AZohne) und mit (AZmit) Hemmstoff (Säulenfraktion 9, braun) sowie mit Hemmstoff nach Zugabe des Enzyms Tyrosinase (AZ Aufhebung) gegeneinander aufgetragen. Es wurden unterschiedliche Extinktionen bei 475 nm und somit Konzentrationen der Probe verwendet (Daten aus Tabelle 19).

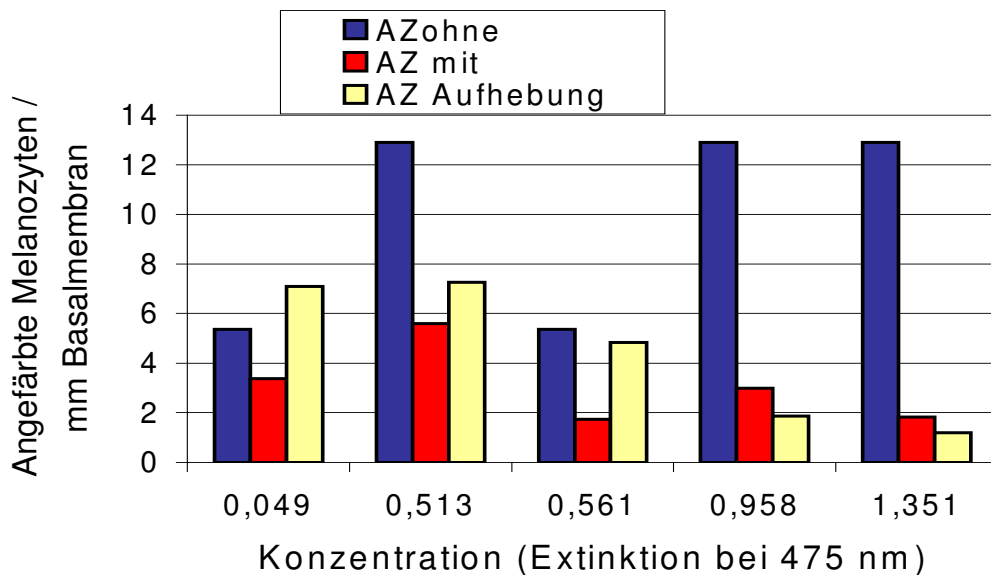
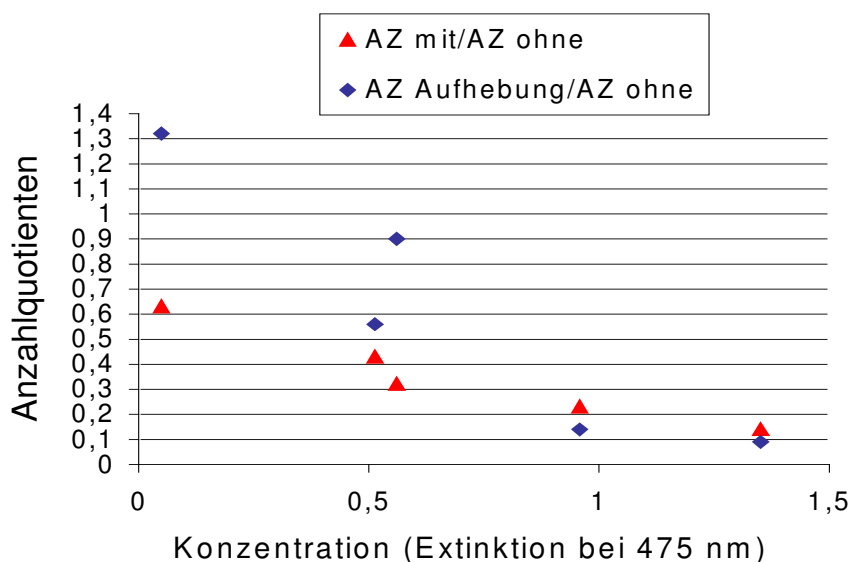


Diagramm 26 : Zusammenhang der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung der Säulenfraktion 9 (braun) auf die Tyrosinase der Melanozyten nach Zugabe einer konstanten Menge externer Tyrosinase mit der Anfangsextinktion bei 475 nm der Lösung der Säulenfraktion (als Maß für die Konzentration)

In diesem Diagramm werden die Quotienten der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran mit und ohne Hemmstoff Säulenfraktion 9 (AZ mit/ AZ ohne) sowie die Quotienten nach Zugabe von Tyrosinase mit Hemmstoff und ohne Hemmstoff (AZ Aufhebung/ AZ ohne) gegen die Extinktion bei 475 nm und somit die Konzentration aufgetragen. So kann erkannt werden, ab welcher Konzentration eines Hemmstoffes keine oder eine nur sehr geringe Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung zu erwirken ist (Daten aus Tabelle 19).



Die roten Punkte zeigen den noch vorhandenen prozentualen Anteil angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe des Hemmstoffes Säulenfraktion 9 im Vergleich zur Anfangssituation ohne Zugabe von Hemmstoff, das heißt, je größer der Wert des Quotienten, desto geringer die Hemmung. Auch hier ist bei zunehmender Extinktion (bei 475 nm), das heißt Konzentration, eine zunehmende Stärke der Hemmung zu erkennen.

Die blauen Punkte zeigen den noch vorhandenen prozentualen Anteil angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe des Hemmstoffes Säulenfraktion 9 mit externer Tyrosinase im Vergleich zur Anfangssituation ohne Zugabe von Hemmstoff.

Der Abstand der Punkte voneinander, das heißt die Differenz der beiden Quotienten (AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne) ist also ein Maß für die Stärke der Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung. Je größer der Abstand, das heißt der Wert für die Differenz der Quotienten, desto deutlicher die Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung der Säulenfraktion 9 (braun) auf die Tyrosinase der Melanozyten durch die extern zugegebene Tyrosinase.

Bei der geringsten Extinktion von 0,049 zeigte sich die deutlichste Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung (Differenz der beiden Quotienten AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,69). Auffällig ist jedoch auch hier (wie schon im Versuch mit 5-Hydroxyindol) wieder, daß die Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Hemmstoff mit externer Tyrosinase (AZ Aufhebung) höher ist als ohne Zugabe von Hemmstoff (AZ ohne).

Je höher die Extinktion bei 475 nm, desto schlechter wird die Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung. Auch hier gibt es wieder einen „Ausreißer“: Bei einer Extinktion von 0,513 zeigt sich eine deutlich schlechtere Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung (Differenz der beiden Quotienten AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,13) als bei einer Extinktion von 0,561 (Differenz der beiden Quotienten AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,58). Auch hier ist die einzig mögliche Erklärung eine unterschiedliche „Erreichbarkeit“ des Hemmstoffes sowie des exogen zugeführten L-Dopas in den Melanozyten der unterschiedlichen Hautproben.

Bei einer Extinktion von > 0,958 war keine Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung mehr nachweisbar, hier zeigen sich sogar negative Differenzen der Quotienten, das heißt nach Zugabe von Hemmstoff Säulenfraktion 9 mit externer Tyrosinase sind weniger angefärbte Melanozyten zu erkennen als nach alleiniger Zugabe von Säulenfraktion 9. Dies zeigt, daß die Hemmung der Tyrosinase wie in Kapitel 4.3.5. dargestellt, zwar konzentrationsabhängig durch den Hemmstoff Säulenfraktion 9 gehemmt wird, diese Hemmung aber dennoch erheblichen Schwankungen unterliegt.

Dünnschichtbande oliv

Tabelle 20 : Überprüfen der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung durch Dünnschichtbande oliv (RF= 0,37-0,40) (aus Säulenfraktion 9) auf die Tyrosinase in den Melanozyten durch Zugabe von externer Tyrosinase bei unterschiedlichen Konzentrationen der Dünnschichtbande oliv (Extinktion bei 475 nm als Maß für die Konzentration).

Lokalisation	Alter	Geschlecht	Ext.	AZ ohne	AZ mit	AZ Aufhebung	AZmit/AZohne	AZ Aufhebung/AZohne
Schläfe 1	72	1	0,262	13,4	5,4	10,27	0,4	0,77
Nase 1	73	1	0,313	12,4	4,5	6,57	0,36	0,53
Schläfe 1	72	1	0,416	13,4	6,2	9,77	0,46	0,73
Wange 1	74	2	0,601	11,13	2,6	2,7	0,23	0,24
Wange 1	74	2	1,344	11,13	0,83	0,93	0,07	0,08
Rumpf 2	95	2	1,35	4,03	0,5	2,8	0,12	0,69
Hals 1	70	2	1,396	14,63	0,43	0,47	0,03	0,03

Legende:

Lok. = Lokalisation (1 Kopfbereich, 2 Schulter / Rücken, 3 Oberarm, 4 Unterarm, 5 Brust / Abdoman, 6 Bein, 7 Genitalbereich)

G = Geschlecht (1 männlich, 2 weiblich)

Ext. = Extinktion bei 475 nm

AZ ohne = Anzahl angefarbter Melanozyten / mm Basalmembran ohne Zugabe von Dünnschichtbande oliv zur Dopa-Reaktion

AZ mit = Anzahl angefarbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Dünnschichtbande oliv zur Dopa-Reaktion

AZ Aufhebung = Anzahl angefarbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe von Dünnschichtbande oliv und externen Tyrosinase zur Dopa-Reaktion

Diagramm 27: Darstellung der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung der Dünnschichtbande oliv (RF= 0,37-0,40) (aus Säulenfraktion 9) auf die Tyrosinase in den Melanozyten nach Zugabe von externer Tyrosinase.

In diesem Diagramm wird die Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion ohne (AZ ohne) und mit (AZ mit) Hemmstoff (Dünnschichtbande oliv (RF=0,37-0,40) (aus Säulenfraktion 9) sowie mit Hemmstoff nach Zugabe des Enzyms Tyrosinase (AZ Aufhebung) gegeneinander aufgetragen. Es wurden unterschiedliche Extinktionen bei 475 nm und somit Konzentrationen der Probe verwendet (Daten aus Tabelle 20).

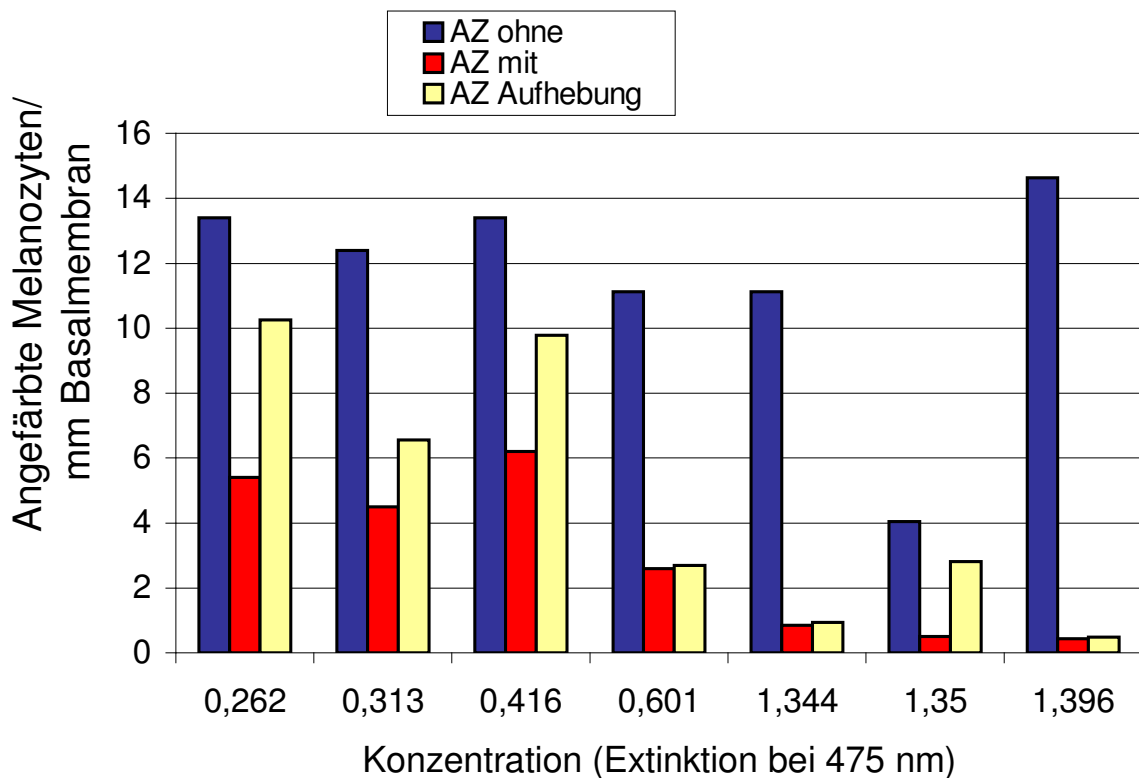
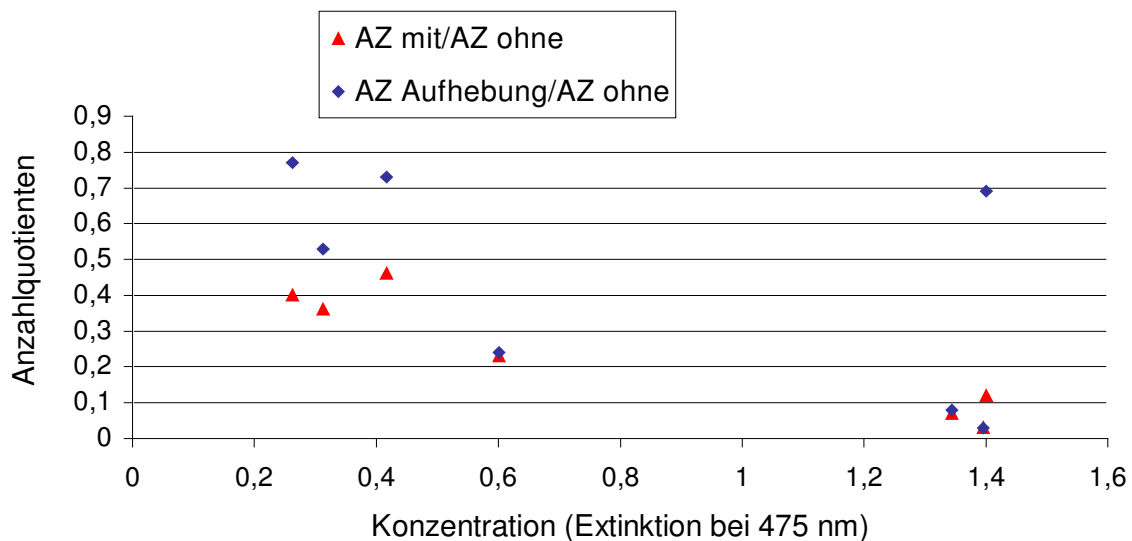


Diagramm 28 : Zusammenhang der Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmwirkung der Dünnschichtbande oliv auf die Tyrosinase der Melanozyten nach Zugabe einer konstanten Menge externer Tyrosinase mit der Anfangsextinktion bei 475 nm der Lösung der Dünnschichtbande (als Maß für die Konzentration)

In diesem Diagramm werden die Quotienten der Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran mit und ohne Hemmstoff Dünnschichtbande oliv (aus Säulenfraktion 9) (RF=0,37-0,40) (AZ mit/AZ ohne) sowie die Quotienten nach Zugabe von Tyrosinase mit Hemmstoff und ohne Hemmstoff (AZ Aufhebung/AZ ohne) gegen die Extinktion bei 475 nm und somit die Konzentration aufgetragen. So kann erkannt werden, ab welcher Konzentration eines Hemmstoffes keine oder eine nur sehr geringe Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung zu erwirken ist (Daten aus Tabelle 20).



Die roten Punkte zeigen den noch vorhandenen prozentualen Anteil angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe des Hemmstoffes Dünnschichtbande oliv im Vergleich zur Anfangssituation ohne Zugabe von Hemmstoff, das heißt, je größer der Wert des Quotienten, desto geringer die Hemmung.

Auch hier ist, grob gesehen, bei zunehmender Extinktion (bei 475 nm), das heißt Konzentration, eine zunehmende Stärke der Hemmung zu erkennen.

Die blauen Punkte zeigen den noch vorhandenen prozentualen Anteil angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran nach Zugabe des Hemmstoffes Säulenfraktion 9 mit externer Tyrosinase im Vergleich zur Anfangssituation ohne Zugabe von Hemmstoff.

Der Abstand der Punkte voneinander, das heißt die Differenz der beiden Quotienten (AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne) ist also ein Maß für die Stärke der Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung. Je größer der Abstand, das heißt der Wert für die Differenz der Quotienten, desto deutlicher die Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung der Dünnschichtbande oliv auf die Tyrosinase der Melanozyten durch die extern zugegebene Tyrosinase.

Bei der geringsten Extinktion von 0,262 zeigte sich eine sehr deutliche Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung (Differenz der beiden Quotienten AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,37), bei sehr hohen Extinktionen wie z.B. 1,344 und 1,396 findet sich nahezu keine Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung mehr (Differenz der beiden Quotienten AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,001 und 0). Auch bei einer Extinktion von 0,601 ist schon keine wesentliche Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung mehr nachweisbar (Differenz der beiden Quotienten AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,01).

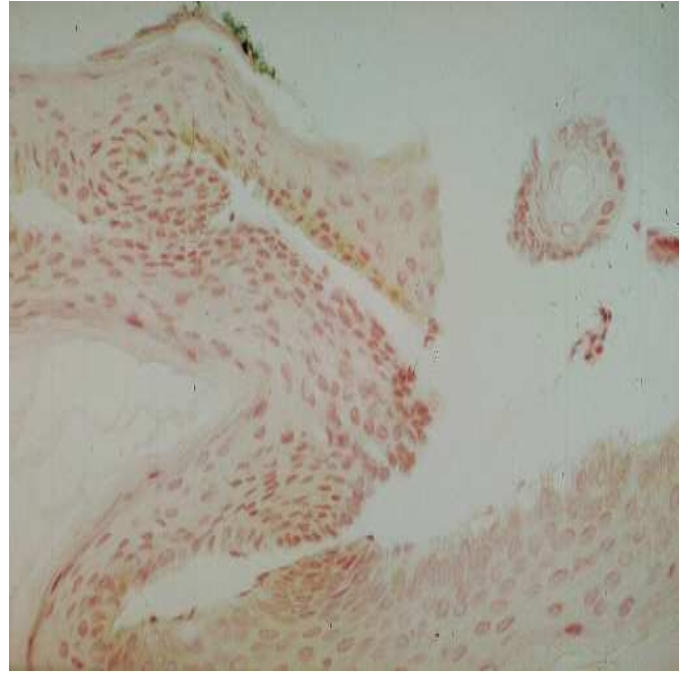
Daß bei einer Extinktion von 1,35 die höchste Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung (Differenz der beiden Quotienten AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,57) vorhanden sein soll, ist eigentlich nur mit einer fehlerhaften Versuchsdurchführung zu erklären, so daß dieser Versuch für die Arbeit ausgeklammert werden sollte.

Bei einer Extinktion von 0,313 (Differenz der beiden Quotienten AZ Aufhebung/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,17) zeigte sich eine schlechtere Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung als bei einer Extinktion von 0,416 (Differenz der beiden Quotienten AZ rückgängig/AZ ohne – AZ mit/AZ ohne = 0,27), dieser nicht gewaltige Unterschied dürfte aber bei zwei so dicht aneinander liegenden Extinktionen durch die gewöhnliche Ungenauigkeit der Konzentrationen (Extinktion nur als Schätzwert der Konzentrationen) zu erklären sein.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.4.6. zeigen, daß die Tyrosinasehemmung durch die Hemmstoffe 5-Hydroxyindol, Rohextrakt, Säulenfraktion 9 (braun) und Dünnschichtbande oliv (Rf 0,37-0,40) durch Zugabe von 100 µl externer Tyrosinase (siehe Versuchsbeschreibung Kapitel 3.7.5.) zu verringern bzw. aufzuheben ist (ANOVA-Varianzanalyse nach Friedman: p ist jeweils > 0,0001). In den Diagrammen ist zu erkennen, daß nach Zugabe von Hemmstoff *und* externer Tyrosinase im Gegensatz zur Zugabe von Hemmstoff allein ein Anstieg der angefärbten Melanozyten zu erkennen ist. Teilweise ist die Anzahl der angefärbten Melanozyten nach Zugabe von externer Tyrosinase sogar höher als ohne Zugabe von Hemmstoff, was zeigt, daß auch die Dopa-Reaktion erheblichen Schwankungen unterliegt. Auch in diesen Versuchen ist ein gewisser Zusammenhang mit der Extinktion (bei 475 nm) und somit Konzentration des Hemmstoffes zu erkennen: Je geringer die Extinktion (bei 475 nm) und somit die Konzentration des Hemmstoffes, desto deutlicher ist der Anstieg der Melanozytenfärbung nach Zugabe von externer Tyrosinase und somit die Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung. Dies gilt aber vor allem für sehr niedrig und sehr hoch gewählte Konzentrationen. Für die Werte dazwischen ist aus oben genannten Gründen bis auf die Versuche mit der Säulenfraktion 9 (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,800) keine sichere Korrelation zwischen Hemmstoffkonzentration und Stärke der Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmwirkung zu erkennen (Spearman-Korrelationskoeffizienten: 5-Hydroxyindol = 0,2319, Rohextrakt = 0,4104, Dünnschichtbande = 0,4144). Mitbedingt ist dies sicher auch durch die geringe Fallzahl der Versuche, der genaue Grund hierfür bleibt jedoch unklar.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass der Hemmstoff durch die zugesetzte Tyrosinase abgefangen wird und somit die Menge an Hemmstoff nicht mehr beziehungsweise nicht mehr ganz ausreicht, um die in den Melanozyten vorhandene Tyrosinase *in vivo* zu blockieren. Man kann also von einer Kompetition des exogen zugegebenen und des endogen vorhandenen Enzyms ausgehen und somit beweisen, daß es sich bei unseren Hemmstoffen tatsächlich um Tyrosinasehemmer handelt.

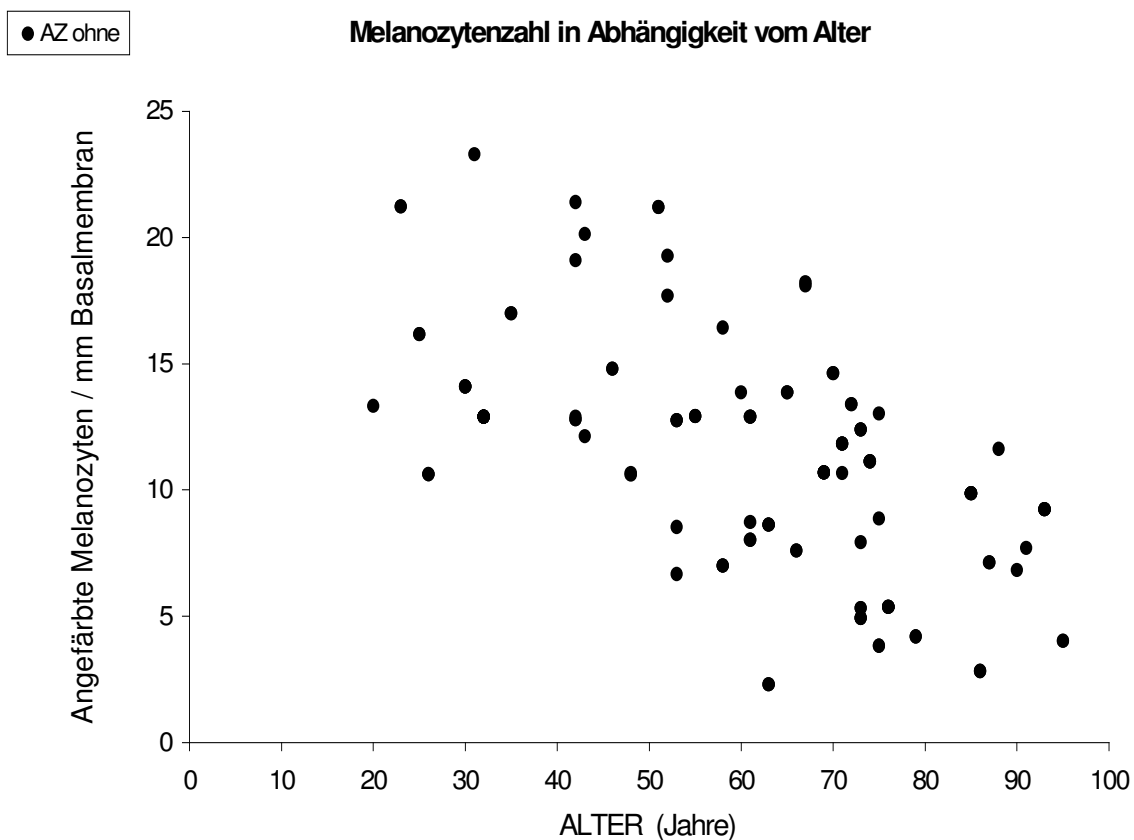
Abbildung 16, 17, 18: Mikroskopisches Beispiel der Austitrierbarkeit der Hemmwirkung. Dargestellt sind die Hautproben ohne Zugabe des Tyrosinaseinhibitors „Dünnschichtbande oliv“ (links oben) , mit Zugabe von „Dünnschichtbande oliv“ (rechts oben) sowie mit Zugabe von „Dünnschichtbande oliv“ *und* externer Tyrosinase (links unten). Man erkennt, daß sich nach Zugabe von externer Tyrosinase trotz Inhibitor Melanozyten darstellen lassen.



4.4. Melanozytenanzahl in Abhängigkeit vom Alter

Diagramm 29: Darstellung der Melanozytenanzahl in Abhängigkeit vom Alter

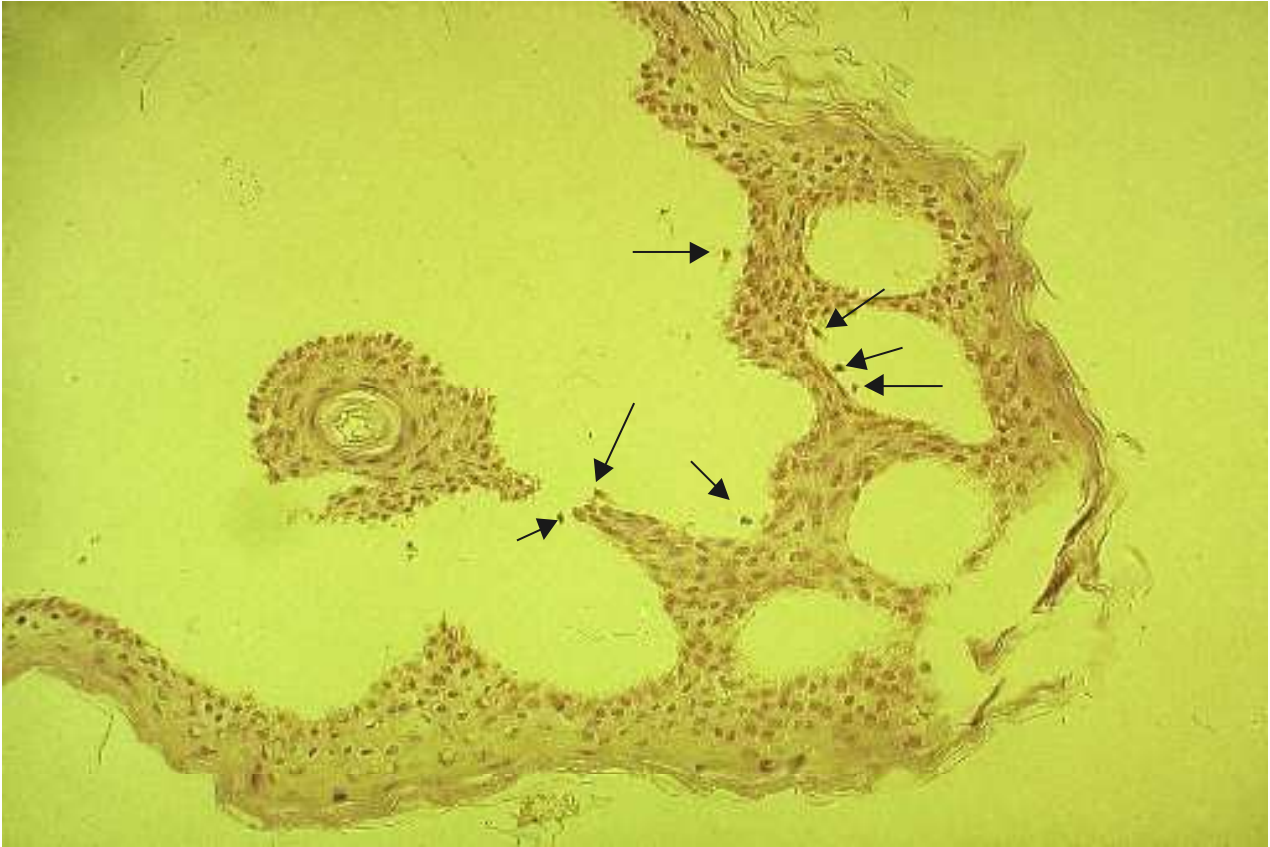
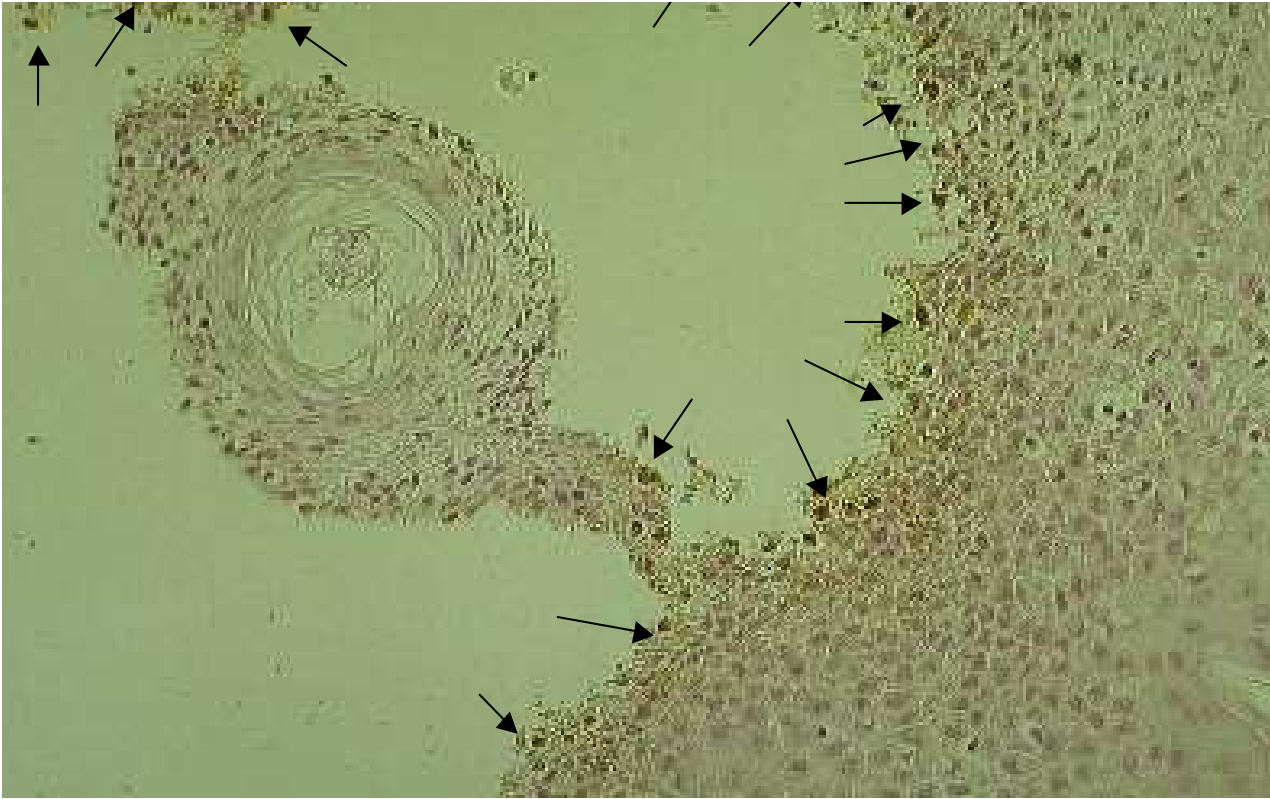
Aufgetragen ist die Anzahl angefärbter Melanozyten / mm Basalmembran in der Dopa-Reaktion (AZ ohne) gegen das Alter der Versuchspersonen.



Das Diagramm zeigt, daß die Anzahl der Melanozyten auch in den hier durchgeführten Untersuchungen mit zunehmendem Alter deutlich abnimmt, in unserem Fall um 0,16 Zellen pro Jahr.

Das Durchschnittsalter der Versuchspersonen in dieser Arbeit ist mit 62,1 Jahren relativ hoch. Dabei beträgt das Durchschnittsalter der Frauen 56,7 Jahre, das der Männer 67,7 Jahre.

Abbildung 19, 20: Vergleich der Melanozytendarstellung in der DOPA-Reaktion bei einer 25jährigen Patientin (oben, Arm) und einer 76jährigen (unten, Arm)



4.5. Melanozytenanzahl in Abhängigkeit zur Lokalisation

Gruppe	Fallbeispiele	Melanozytenzahl
1 (Kopf)	40	12,39
2 (Schulter / Rücken)	11	8,02
3 (Oberarm)	4	10,35
4 (Unterarm)	1	16,17
5 (Brust / Abdomen)	4	10,49
6 (Bein)	7	12,04
7 (Genitalbereich)	3	11,67

Statistisch ist zu erkennen, daß auch in unseren Versuchen an unterschiedlichen Lokalisationen des Körpers eine unterschiedliche Anzahl von Melanozyten vorhanden ist. Hierbei sind die Altersunterschiede bereits berücksichtigt. Hier ist besonders auffällig, daß die Anzahl am Rücken deutlich geringer ist als an anderen Körperstellen. Weitere signifikante Aussagen lassen sich aber hier aufgrund der unterschiedlichen Fallzahlen (es wurden z.B. am häufigsten Kopfproben untersucht, wohingegen nur wenige Proben von Extremitäten oder Brustbereich zur Verfügung standen) nicht treffen.

4.6. Melanozytenzahl in Abhängigkeit zum Geschlecht

Vergleicht man die 35 weiblichen (1) und 32 männlichen (2) Versuchspersonen direkt miteinander, so ergibt sich bei ersteren eine durchschnittliche Anzahl von 13,46 Melanozyten pro Millimeter Basalmembran, bei letzteren eine Anzahl von 9,51 Melanozyten pro Millimeter Basalmembran.

Vergleicht man zur besseren Genauigkeit der Ergebnisse nur Proben aus dem Gesichtsbereich (Gruppe 1) und somit 19 weibliche und 17 männliche Proben mit annähernd gleichem Durchschnittsalter (weiblich 70,7, männlich 70,37), ergibt sich bei ersteren eine durchschnittliche Anzahl von 11,22 Melanozyten pro Millimeter Basalmembran, bei letzteren eine durchschnittliche Anzahl von 12,49 pro Millimeter Basalmembran:

DISKUSSION

Hefen der Gattung *Malassezia* gehören zur residenten Keimflora der menschlichen Haut. Unter bestimmten Bedingungen wie z.B. feuchtwarmes Klima oder erhöhte Schweißneigung, verursacht dieser saprophytäre Keim eine der häufigsten erregerbedingten Hauterkrankungen, die Pityriasis versicolor. Es handelt sich um eine Hauterkrankung, die mit Pigmentverschiebungen der Haut einhergeht (Sunenshine et al., 1998). Beschreibend durch den Namen „Pityriasis versicolor“ ist die Erkrankung charakterisiert durch pityriasiform schuppene Läsionen unterschiedlichster Farbgebung, von schwarz über braun bis milchkaffeefarben, auch ins gelblich bis rötliche gehend (Castellani und Chalmers, 1913; Ruete, 1933; Hay und Moore, 1996). Eine spezielle Form, die „Pityriasis versicolor alba“ zeigt bevorzugt unter UV-Strahlung eine Umwandlung der hyperpigmentierten Areale in eine depigmentierte Form.

Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die Pathogenese dieser Erkrankung näher zu beleuchten. Um weitere Untersuchungen zu den ungeklärten Punkten der Pathogenese der Pityriasis versicolor anzustellen, muß der Erreger zunächst kultiviert werden. Die Kultur der lipiddependenten *Malassezia*-Hefen ist auf einem Minimalmedium aus Agar, einer Lipid- und einer Stickstoffquelle möglich. Durch die Gabe von Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle wurde ein bisher unbekannter Stoffwechselweg in *Malassezia furfur* induziert (Mayser et al., 1998 [b]), welcher die Bildung eines braunen Pigments mit gelblich-grüner Fluoreszenz im UV-Licht beinhaltet. Hierbei ist es interessant zu beleuchten, ob das entstandene Pigment und die gegebenenfalls hieraus zu isolierenden Stoffwechselmetabolite von *M. furfur* eine mögliche Ursache der klinischen Erscheinungen der Pityriasis versicolor (Hyperpigmentierung, Depigmentierung, Fluoreszenz im Wood-Licht, Schuppung) darstellt, für die es, wie in Kapitel 1.2.4. beschrieben, in der Vergangenheit zahlreiche Theorien, aber noch keine zufriedenstellende Erklärung gab. Einige interessante Verbindungen wurden bereits aus diesem Stoffwechselweg isoliert (siehe Kapitel 1.1.6.) und konnten durch ihre Eigenschaften mit den klinischen Erscheinungen der Pityriasis versicolor in Verbindung gebracht werden (Thoma et al., 2001; Wille et al., 2001; Dahms et al., 2002; Stapelkamp et al., 2002; Mayser et al., 2003 [a, b]; Irlinger et al., 2004; Irlinger et al., 2005; Krämer et al., 2005 [a, b]; Thoma et al., 2005; Wroblewski et al., 2005; De Almeida und Mayser, 2006).

Die oben erwähnte Pigmentbildung in Kultur wird nur beobachtet bei Gabe von Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle. Der Zusatz anderer Aminosäuren verhindert die Pigmentbildung. Da die Erkrankung assoziiert ist mit starkem Schwitzen, ist zu überlegen,

inwiefern hier ein für die Erkrankung optimales Milieu geschaffen wird. Durch das Schwitzen verbleiben vor allem lipophile Substanzen auf der Haut, was die Bedingungen zur Vermehrung von *Malassezia furfur* begünstigt.

Tryptophan stellt zusammen mit Phenylalanin die am stärksten hydrophobe Aminosäure dar. Die ausgesprochen starke Hydrophobie des Tryptophans wird hervorgerufen durch die relativ große Seitenkette bestehend aus einem Indolring an einer Methylengruppe (Stryer, 1994). Im Gegensatz zum Phenylalanin wird Tryptophan nicht im Schweiß als freie Aminosäure identifiziert (Liappis et al., 1980). Im Oberflächenfilm der Haut ist Tryptophan jedoch vorhanden (Burke, 1962). Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß Tryptophan bei starkem Schwitzen auf der Haut akkumuliert, während andere Aminosäuren (selbst stärker hydrophobe AS wie Phenylalanin) mit dem Schweiß von der Haut gespült werden. Der Vorteil des Pigmentstoffwechselwegs unter starker Sonnenstrahlung für die *Malassezia*-Hefen könnte in der Reduktion von Tryptophan auf der Haut liegen. Tryptophan zeigt im UVB – Bereich starke Photoreaktivität, die mit der Bildung reaktiver Formen von Sauerstoff [singuleter Sauerstoff ($1O_2$) und Superoxidradikale (O_2^-)] einhergeht. Diese Sauerstoffradikale werden für Membran- und DNA-Schäden verantwortlich gemacht (Babu und Joshi, 1992). Somit könnte die Verstoffwechslung dieser Substanz in der Reduktion schädigender Einflüsse auf die Hefen unter gleichzeitiger Produktion eines Lichtschutzes einhergehen (Mayser und Pape, 1998; Mayser et al., 2003 [b]).

In dieser Arbeit wurde, unterstützt durch weitere Arbeiten (Mayser et al., 1998 [b]; Mayser et al., 2003 [b]; Hort et al., 2006), davon ausgegangen, dass die zahlreichen Farbtöne der Pityriasis versicolor auf diesen Pigmentstoffwechsel von *Malassezia furfur* zurückgeführt werden können. Es wurde zunächst eine Trennung und Aufreinigung des bei der Kultur entstehenden Pigments in Anlehnung an Mayser et al. (1998 [b]) durchgeführt. Durch verschiedene Schritte konnte aus der Kultur ein Rohextrakt isoliert werden. Wird dieses Extrakt durch Säulen- und Dünnschichtchromatographie (in weiteren Arbeiten auch durch HPLC) weiter aufgetrennt, so erkennt man, daß dieses Rohextrakt aus einer Vielzahl von verschiedenfarbigen Einzelsubstanzen (Pigmente und Fluorochrome) mit unterschiedlichsten Eigenschaften besteht. Die Eigenfarbe und die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Farbveränderungen des gebildeten Pigments zeigen starke Ähnlichkeit mit der bei Pityriasis versicolor auftretenden Pigmentierung. Da die Induktion der Pigmentbildung durch Hinzugabe von Tryptophan erfolgte, lag die Vermutung nahe, daß es sich bei den aufgereinigten Stoffen um Tryptophanmetabolite handelte. Es stellte sich die Frage, ob diese Metabolite die Hyper- oder Depigmentierung bei Pityriasis versicolor erklären können.

Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung wurden zahlreiche Pigmente des gesamten Farbspektrums sichtbar. Die bei Pityriasis versicolor auftretende und für die Diagnostik genutzte Fluoreszenz der erkrankten Hautareale kann auf die Bildung der Fluorochrome (gelb und blau fluoreszierende Banden in der Dünnschichtchromatographie) zurückgeführt werden. Es konnte zudem in anderen Arbeiten gezeigt werden, daß die Fluoreszenz eines aufgereinigten Fluorochroms (Pityrialactone $C_{20}H_{12}N_2O_3$) in Abhängigkeit von der Lipophilie des Lösungsmittels farblich variiert (Mayser et al., 2003 [a]). Mayser et al. zeigten 1998 (b), daß die dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Pigmente gegenüber äußeren Faktoren wie Sauerstoff, UV-Licht, Temperatur und pH-Schwankungen empfindlich sind. Hier zeigten sich teilweise deutliche Farbumschläge, welche den bei der Pityriasis versicolor charakteristischen Farbwandel der Erkrankungsherde erklären könnten.

Diese Arbeit beschäftigte sich vor allem mit der Theorie, daß ursächlich für die Depigmentierungsherde der Pityriasis versicolor alba eine Beeinflussung der Melanogenese der Melanozyten ist. Diese Depigmentierung tritt nach Abblassen der Hyperpigmentierung auf. Anschließend zeigt sich in diesen Arealen unter UV-Einstrahlung keine Bräunung der Haut. Der komplexe Prozeß der Melanogenese bietet eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten. Die hier vorgelegte Arbeit fokussierte sich auf den Einfluß von *Malassezia*-Metaboliten auf die Tyrosinase, welche durch Steuerung der ersten zwei Schritte ein Schlüsselenzym der Melanogenese ist.

Die Eingangs in Kapitel 2 gestellten Fragen können mit den vorgelegten Ergebnissen wie folgt beantwortet werden:

1. Läßt sich mit dem Rohextrakt aus *M. furfur*, welcher mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle angezüchtet wurde, eine Hemmwirkung der Tyrosinasereaktion *in vitro* nachweisen?

Schon in der Vergangenheit wurde eine Tyrosinasehemmung durch Stoffwechselprodukte der *Malassezia*-Hefen als Grund für die Depigmentierungsherde in der Erkrankung Pityriasis versicolor vermutet. So stellten El-Gothamy und Abdel-Fattah die Hypothese einer Störung des Tyrosinmetabolismus schon 1975 auf. Sie stellten ein Schuppenextrakt her, welches *in vitro* die Tyrosinase, das Schlüsselenzym der Melanogenese, um 30% hemmen konnte. In Repigmentationsstudien zeigten sie die Reversibilität dieser Hemmung. Jung und Bohnert (1976) beschrieben eine Hemmung der DOPA-Tyrosinase-Reaktion durch Ether-Extrakte aus Schuppen befallener Hautareale. Nazzaro-Porro und Passi zeigten 1978, daß Pityrosporum-

Spezies *in vitro* Substanzen produzieren können, die den Metabolismus der Melanozyten beeinflussen und die Aktivität der Tyrosinase hemmen. Sie konnten Dicarbonsäuren identifizieren, vor allem Azelainsäure, eine C9-Dicarbonsäure (HOOC-(CH₂)₇-COOH), die *in vitro* eine kompetitive Inhibition des Enzyms zeigten, was sich in späteren Untersuchungen bestätigte (Schallreuter, 1990). Folgeuntersuchungen ergaben allerdings, daß diese Fettsäuren in ihren angenommenen *in-vivo*-Konzentrationen gesunde Melanozyten nicht beeinflussen konnten (Breathnach et al., 1984; Robins et al., 1987). Zudem wurde die Dicarbonsäure auch von *Malassezia*-Hefen der residenten Hautflora auf gesunder Haut produziert, ohne daß Zeichen von Depigmentation zu erkennen waren. Auch ihr therapeutischer Nutzen in der Behandlung von Hyperpigmentierungen und Melanomen, basierend auf Tyrosinaseinhibition, lieferte enttäuschende Ergebnisse (Breathnach et al., 1984). Daher kann die Azelainsäure-Theorie den Depigmentierungen der Pityriasis versicolor alba nicht gerecht werden.

Es liegt also die Vermutung nahe, daß die Hefen eine die Pigmentierung der Haut beeinflussende Substanz produzieren, die möglicherweise das Enzym Tyrosinase hemmt und dessen Identität noch nicht vollständig geklärt ist.

Um dieser Vermutung auf den Grund zu gehen, wurde das durch *Malassezia furfur* gebildete Pigment in dem unter 3.6. beschriebenen Assay photometrisch auf Tyrosinaseinhibition untersucht. Wie bereits unter 4.2. beschrieben konnte das Rohextrakt selbst aufgrund einer Trübung nicht untersucht werden, so daß eine Hemmwirkung der Tyrosinase *in vitro* durch Rohextrakt zunächst nicht nachweisbar war, sondern nur vermutet werden konnte.

2. Läßt sich diese Hemmwirkung gegebenenfalls einzelnen Banden/Verbindungen, welche mittels Auftrennung des Rohextraktes durch Säulen- und Dünnschichtchromatographie gewonnen wurden, zuordnen?

Da eine Tyrosinasehemmung durch das Rohextrakt *in vitro* nicht untersucht werden konnte, wurde das Rohextrakt zunächst über Säulenchromatographie vorfraktioniert. Die einzelnen Säulenfraktionen konnten bis auf die ersten zwei Fraktionen, die ebenfalls im Reaktionsansatz Trübung zeigten, auf Inhibition im beschriebenen Ansatz untersucht werden. Es zeigte sich, daß die Hemmung drei einzelnen Säulenfraktionen zugeordnet werden konnte. Diese Hemmung war in Folgeversuchen reproduzierbar. Die Hemmung der drei Fraktionen war jedoch unterschiedlich stark. So zeigten zwei Fraktionen nur eine schwache Hemmung, während eine dritte Säulenfraktion eine deutlichere Hemmung zeigte. Nach weiterer dünnschichtchromatographischer Auftrennung dieser am stärksten hemmenden Säulenfraktion wurden die einzelnen Dünnschichtbanden wie unter 3.5. beschrieben

aufgereinigt und ebenfalls photometrisch auf Tyrosinaseinhibition untersucht. Auch hier konnte die Hemmung wieder drei Dünnschichtbanden unterschiedlicher Färbung zugeordnet werden. Die Dünnschichtbanden zeigten einen Rf-Wert von 0,37 bis 0,44, lagen also dicht beieinander. Auch hier zeigte eine Dünnschichtbande (oliv, Rf = 0,37 bis 0,4) eine besonders starke Tyrosinaseinhibition.

3. Wie stark ist die Hemmwirkung im Vergleich zu dem bekannten Tyrosinaseinhibitor 5-OH Indol?

Um einen Vergleich der Stärke der Hemmwirkungen zu erhalten, wurde der Versuch mit der bekannten Hemmsubstanz 5-OH-Indol (Tomita, 1990) durchgeführt. Die Säulenfraktion braun zeigte im Vergleich zum 5-Hydroxyindol eine stärkere Hemmung, die Dünnschichtbande oliv eine vergleichbar starke Hemmung (Umsatzraten für DOPA: Kontrolle 0,6 mMol/min, 5-Hydroxyindol 0,25 mMol/min, Säulenfraktion braun 0,105 mMol/min, Dünnschichtbande oliv 0,285 mMol/min). Da man im Gegensatz zum 5-Hydroxyindol bei den aus dem Rohextrakt isolierten Verbindungen keine genaue Konzentration des Hemmstoffes bestimmen konnte, da es sich hier um Stoffgemische handelte, ist dieser Vergleich jedoch problematisch. Festhalten kann man jedoch, daß die Hemmwirkung der Einzelbande jeweils schwächer war als die durch die Gesamtfraktion erzielte Tyrosinasehemmung und daß die Tyrosinasehemmung der isolierten Stoffe umso stärker war, desto höher die Anfangsextinktion des in 3.6. beschriebenen Assays (welche als grobes Maß der Hemmstoffkonzentration dienen kann) war. In ersten Versuchen zur Art der Hemmung zeigten Mayser et al.(1998 [b]) in der Enzymkinetik einen nicht-kompetitiven Inhibitor der Tyrosinase.

Zusammenfassend konnte die Tyrosinasehemmung *in vitro* zwar durch das Rohextrakt selbst nur angenommen werden, es zeigte sich jedoch nach weiterer säulen- und dünnschichtchromatographischer Auftrennung, daß sich eine reproduzierbare Hemmwirkung einzelnen aus dem Rohextrakt isolierten Fraktionen zuordnen ließ. Diese biochemisch zunächst unbekanntem isolierten Fraktionen konnten im Folgenden zur Untersuchung einer Tyrosinaseinhibition an *ex-vivo* gewonnenen humanen Melanozyten herangezogen werden.

In Folgearbeiten wurde untersucht, ob sich die hier gefundene Fraktion in der Dünnschichtchromatographie mittels HPLC weiter aufreinigen läßt. Die Arbeiten beschäftigten sich damit, die gefundenen Tyrosinaseinhibitoren zu entschlüsseln. Hier zeigte sich, dass die Pigmentbildung aus der Aminosäure Tryptophan durch *Malassezia*-Hefen mit

der Bildung von Indolderivaten einhergeht (Mayser et al., 2003[b]), welche zum Teil schon genauer charakterisiert werden konnten (siehe Kapitel 1.1.6.). Besonders interessant ist hier das durch die die Dünnschichtbande weiter auftrennende HPLC entdeckte (Thoma et al., 2001) Indolderivat namens *Malassezin* [2-(1H-Indol-3-ylmethyl)-1H-Indol-3-Carbaldehyd], welches -wie in Kapitel 1.1.6. erläutert- bezüglich der Krankheitssymptome Depigmentation und Schuppung eine Rolle in der Pathogenese der Pityriasis versicolor spielen könnte. Eine Hemmung der Tyrosinase durch *Malassezin* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen an Melanozytenkulturen zeigten jedoch Schädigungen der Melanozyten durch Komponenten des Pigments aus *M. furfur*, und zwar insbesondere durch das Malassezin (Krämer et al., 2005[b]), so daß vorstellbar ist, daß dieses über zellschädigende Eigenschaften für die elektronenmikroskopisch sichtbare Schädigung der Melanozyten verantwortlich sein könnte. Weitere interessante Verbindungen sind das *Malassezin*-Derivat *Keto-Malassezin* sowie das *Malassezia Indol A*, welche eine Tyrosinaseinhibition *in vitro* zeigen. Zudem zeigte das *Keto-Malassezin* in neueren Untersuchungen eine Hemmung der Dopa-Reaktion menschlicher epidermaler Melanozyten *in situ* (Dahms et al., 2002). Es konnten also mittlerweile durch *Malassezia furfur* aus Tryptophan gebildete Tyrosinaseinhibitoren identifiziert werden, welche, wie in Kapitel 1.1.6. näher erläutert möglicherweise für die Erkrankung Pityriasis versicolor eine entscheidene Rolle spielen.

4. Läßt sich eine Hemmwirkung auch an *ex-vivo* gewonnenen humanen Melanozyten nachweisen und ist das verwendete Modell, die oben beschriebene Dopa-Reaktion, hierfür geeignet?

Um die photometrisch nachgewiesene Hemmung der Tyrosinase auf eine Untersuchung *in vivo* („*semi-in-vivo*“) zu übertragen, wurde sich in dieser Arbeit der Dopa-Reaktion bedient.

Es wird, wie in Kapitel 3.7.1. beschrieben, an einer aus Hautproben gewonnenen humanen Epidermis die Melaninsynthese in einer DOPA-Lösung *in vivo* angestoßen, was zum Nachweis braun angefärbter Melanozyten führt. Die Dopa-Reaktion ist somit abhängig von einer aktiven Tyrosinase in den gewonnenen Melanozyten, welche das Schlüsselenzym für die Entstehung des Melanins ist (siehe Kapitel 1.3.2.). Schon in der Vergangenheit erwies sich diese Reaktion als geeignet, den Einfluß einzelner Verbindungen auf die Tyrosinaseaktivität durch Beobachtung der Melanogenese *in vivo* („*semi-in-vivo*-Reaktion“) zu untersuchen (Grüneberg und Schade, 1934; Schroeder, 1934; Duijin, 1953; Iijima und Watanabe, 1957; Stanka, 1979). Neuere Studien, welche sich der Dopa-Reaktion zu diesem

Zweck bedienen, sind jedoch nicht zu finden, was wohl am ehesten in den nicht zu verleugnenden Schwierigkeiten bei der quantitativen Datenerhebung begründet ist .

Schon nach Zugabe des aus Kulturen von *Malassezia furfur* isolierten Rohextraktes fand sich eine Verringerung der Anzahl angefärbter Melanozyten im Gegensatz zur Kontrolle, so daß von einer Hemmung der Tyrosinase ausgegangen werden konnte. In diesen Versuchen zeigte sich jedoch lichtmikroskopisch eine schmutzige braune Färbung des Präparates durch braunschwarze Ablagerungen im phosphatpufferhaltigen Reaktionsansatz, so daß es im Gegensatz zu den Folgeversuchen etwas schwierig war, alle Melanozyten sicher zu identifizieren. Im Folgenden konnte eine isolierte Säulenfraktion sowie die hieraus isolierte Dünnschichtbande, welche im Photometer die stärkste Tyrosinasehemmung zeigten, auch in der der Dopa-Reaktion eine Hemmung zeigen. Es fand sich bei Zugabe des isolierten Stoffes eine deutliche Abnahme der Anzahl braun angefärbter Melanozyten. Dabei zeigte sich im Schnitt eine Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung, das heißt, nur wenn genügend Hemmstoff zur Verfügung steht, ist eine Hemmung mit Hilfe der Dopa-Reaktion nachzuweisen. Der einfach durchzuführende Test liefert reproduzierbare Ergebnisse, wenn auch nur semiquantitativ. Hier wurden die angefärbten Zellen in Querschnitten entlang der Basalmembran im histologischen Präparat im Vergleich zur Kontrolle pro mm Basalmembran gezählt, wobei versucht wurde, ausschließlich Melanozyten zu zählen. Aufgrund der natürlichen Auffaltung der Basalmembran war diese Datenerfassung sehr aufwändig und zeigte auch Ungenauigkeiten. Technisch gelang es hier jedoch nicht, so dünne Längsschnitte herzustellen, daß die Melanozyten pro Quadratmillimeter gezählt werden konnten. Eine weitere Ungenauigkeit lag darin, daß die Melanozyten in den Proben mit Hemmstoff zum Teil eine hellere Pigmentierung zeigten als in den Kontrollen und dennoch als pigmentierte (positive) Zellen in die Zählung mit aufgenommen wurden, obwohl davon ausgegangen werden kann, daß auch hier eine Tyrosinasehemmung stattgefunden hat. Diese Beobachtung wurde, wie schon Eingangs erwähnt, auch in der Vergangenheit gemacht. Während Ruete (1933) als Einziger eine komplett negative Dopa-Reaktion in erkrankten Arealen der Pityriasis versicolor zeigen konnte, war in anderen Untersuchungen die Dopa-Reaktion überwiegend positiv, jedoch zeigte sich auch hier in den depigmentierten Hautbereichen eine geringere Pigmentdichte in den Melanozyten der Dopa-Reaktion verglichen mit normaler Haut desselben Individuums (Allen, 1976; El-Gothamy und Abdel-Fattah, 1975). In Folgearbeiten wurde nun versucht, das gebildete Melanin quantitativ durch Messungen der Dichte der Hautabschnitte genauer zu bestimmen.

Trotz dieser technischen Schwierigkeiten konnte schon optisch eindeutig belegt werden, daß in den Proben mit Tyrosinasehemmstoff deutlich weniger Melanin vorhanden war.

Mit der Dopa-Reaktion können also Melanozyten durch ihre Aktivität entdeckt werden, wobei lichtmikroskopisch keine Unterscheidung zwischen einer Minderung der Melanozytenanzahl und einem Verlust der Dopa-Oxidase-Aktivität möglich ist. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, die nicht angefärbten Melanozyten mittels immunhistologischer Färbungen (S-100, HMB45) rückwirkend anzufärben. Diese Versuche zeigten jedoch keine eindeutig positiven Ergebnisse. Eine toxische Schädigung der Melanozyten als Grund für die Hemmung der Melanogenese konnte also auch hier nicht sicher ausgeschlossen werden, zumal erste Untersuchungen an Melanozytenkulturen Schädigungen der Melanozyten durch Komponenten des Pigments aus *M. furfur* zeigen. Die Hemmung der Tyrosinase wurde jedoch zusätzlich vor den Versuchen mit der Dopa-Reaktion schon photometrisch nachgewiesen, so daß auch hier eine Tyrosinaseinhibition im Präparat wahrscheinlicher scheint als eine möglicherweise toxische Verringerung der melaninbildenden Melanozyten. Außerdem konnte eine Verringerung bzw. Aufhebung der kompetitiven Hemmung durch zusätzliche Gabe von externer Tyrosinase in einem dritten Versuchsansatz unter gleichen Grundbedingungen durch die Dopa-Reaktion nachgewiesen werden. Der Hemmstoff vermochte –konzentrationsabhängig- hier nicht immer die insgesamt vorhandene Tyrosinase (gebunden und ungebunden) zu inhibieren, wobei die Konzentrationsabhängigkeit dieser Kompetition ohne wirklich befriedigende Erklärung nur sehr inkonstant nachweisbar war.

Es kann also davon ausgegangen werden, daß durch *M. furfur* gebildete Stoffwechselprodukte an der bei der Pityriasis versicolor beobachteten Depigmentierung durch Tyrosinasehemmung zumindest mitbeteiligt sind, möglich wäre auch eine Kombination aus Tyrosinasehemmung und toxischer Schädigung der Melanozyten durch die von *M. furfur* gebildeten Metaboliten. Jedoch wurde *M. furfur* bisher nur selten, zumindest deutlich seltener als *M. globosa*, aus Läsionen der Pityriasis versicolor isoliert (Crespo Erchiga et al., 2000; Nakabayashi et al., 2000; Romano et al., 2005; Kalinowska-Pujdak et al., 2006; Gaitanis et al., 2006; Prohic und Ozegovic, 2007; Rasi et al., 2009; Karakaş et al., 2009), was die Bedeutung des Tryptophan-abhängigen Stoffwechselweges für die Erkrankung wiederum in Frage stellt. Auch das Pigment selbst konnte noch nicht aus Läsionen der Pityriasis versicolor isoliert werden.

5. Lassen sich aus dem Modell weitere Korrelationen ableiten, z.B. Zahl der Melanozyten mit Alter, Geschlecht und Körperregion ?

Durch die Dopa-Reaktion konnten in dieser Arbeit auch einige interessante histologische Zusatzuntersuchungen durchgeführt werden. Die Hautfarbe des Menschen korreliert mit Sitz, Anzahl und Grad der Melanisierung und Speicherfähigkeit dieser Melanosomen sowie mit der Melanozytenanzahl. Diese Eigenschaften sind unter anderem genetisch verankert. Im Mittel besitzt die menschliche Epidermis 1000-1500 Melanozyten pro Quadratmillimeter (Szabo, 1954).

Die Melanozytendichte variiert innerhalb und zwischen verschiedenen Personen in Abhängigkeit von verschiedenen Einflußfaktoren:

So konnte in dieser Arbeit eine Verringerung der Melanozytenzahl mit zunehmenden *Alter* nachgewiesen werden, es ergab sich eine Abnahme von 0,16 Zellen pro Jahr gezählt pro Millimeter Basalmembran. Dieses Phänomen wurde schon in früheren Untersuchungen gezeigt: Fitzpatrick et al. (1965) und Gilchrest et al. (1979) zeigten eine Verringerung der Melanozytendichte mit zunehmendem Alter um ca. 6-8%, Ortonne (1990) um 10-20% pro Dekade. Auch die Entwicklung grauen Haares hängt mit diesem Melanozytenschwund zusammen (Ortonne, 1990). Frenk und Schellhorn (1969) vermuteten, daß die Reduktion der Melanozytenzahl im Alter einer Atrophie mit Zellverminderung der gesamten Epidermis entspreche. Nordlund (1989) beschrieb eine relative Konstanz in Anzahl und Funktion der pigmentbildenden Zellen bis zur annähernden Lebensmitte, also bis zur vierten oder fünften Lebensdekade. Danach sinkt die Zahl der Melanozyten in der Epidermis, den Haaren und in den Augen ebenso wie die Anzahl der Naevi. Dies konnte in dieser Arbeit aufgrund des höheren Durchschnittsalters der Probanden nicht nachvollzogen werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß in verschiedenen *anatomischen Regionen des Körpers* die Anzahl der epidermalen Melanineinheiten beträchtlich variiert. Es fanden sich deutliche Unterschiede in der Melanozytendichte zwischen Stamm (Schulter- und Rückenbereich ca. 8 pro mm Basalmembran, Brust und Abdomenbereich ca. 10 pro mm Basalmembran) und anderen Lokalisationen des Körpers (ca. 11 – 16 pro mm Basalmembran). Viele Autoren machen das ortsspezifische Auftreten von malignen Melanomen für dieses Phänomen verantwortlich. Rosdahl und Rosman (1983) konnten nachweisen, daß in Gesicht und Genitalregion die Melanozytendichte am größten ist. Sie beschrieben im Gesicht eine Dichte von ca. 2900 epidermalen Melanozyten pro Quadratmillimeter und in der Genitalregion von ca. 1550 pro Quadratmillimeter. Die geringste Dichte wurde für den Oberarm beschrieben (ca. 1100 pro Quadratmillimeter), die Dichte am Stamm betrug ca. 1250 pro Quadratmillimeter.

Diese Verteilung der Melanozytendichte konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden, was aber vor allem an der unterschiedlichen Fallzahl gelegen haben dürfte. Es wurden hauptsächlich Regionen aus dem Gesichtsbereich untersucht, da hier die häufigsten dermatologischen Eingriffe durchgeführt werden. In Einzelfällen konnten aber histologisch deutliche Unterschiede gesehen werden. So verdunkelte sich die Farbe der Epidermis aus der Genitalregion bei gleichen Versuchsbedingungen mittels der Dopa-Reaktion sehr rasch, die Melanozyten stellten sich im histologischen Bild sehr dunkel dar. Auch die Morphologie der Melanozyten ist an verschiedenen anatomischen Regionen unterschiedlich. So haben die Pigmentzellen in der Region von Abdomen, Brust und Extremitäten zwei polare Verzweigungen, aus denen weitere Dendriten erwachsen, wohingegen die Zellen in Gesicht und Genital ein eher sternförmiges Bild zeigen. In den einzelnen Arealen sind die Melanozyten uniform. Die Anzahl der Keratinozyten um einen Melanozyten ist konstant (Rosdahl und Rosman, 1983). Zu berücksichtigen ist, daß auch innerhalb einer Hautregion die interindividuelle Melanozytenpopulation sehr schwankt. In Untersuchungen von Stierner et al. (1989) variierte die Melanozytendichte im Bereich des Gesäßes vor und nach UVB-Bestrahlung um den Faktor 4, nach Elimination der drei extremsten Abweichungen noch um den Faktor 2 zwischen den einzelnen Individuen.

Bei diesen Untersuchungen darf auch nicht vergessen werden, daß es auch weitere Faktoren gibt, die Einfluß auf die Melanozytendichte nehmen, so hat neben oben genanntem Alter (welches in der Lokalisationsstudie berücksichtigt wurde) zum Beispiel auch die Sonnenexposition einen Einfluß auf die Melanozytendichte, welche in stark exponierter Haut etwa doppelt so hoch ist wie in nicht exponierter Haut (Gilchrest et al., 1979). Die Melanogenese sowie die Vermehrung melanozytärer Zellen stellt zudem in Verbindung mit UV-Bestrahlung ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Hormonen, Prostaglandinen, Zytokinen und Stoffwechselprodukten dar (Abdel-Malek et al., 1987; Fuller und Ehlers, 1984; DiSorbo et al., 1983; Sawyer et al., 1983).

Bezüglich des *Geschlechtes* fand sich in dieser Arbeit bei der Untersuchung aller Hautproben ohne Berücksichtigung von Lokalisation und Alter bei den weiblichen Versuchspersonen eine durchschnittliche Anzahl von 13,46 Melanozyten pro Millimeter Basalmembran, wohingegen bei den männlichen Versuchspersonen eine durchschnittliche Anzahl von 9,51 Melanozyten pro Millimeter Basalmembran vorhanden war. Dies ist sicherlich im deutlich geringeren Durchschnittsalter der Frauen begründet. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei Untersuchungen von Hautproben aus dem Kopfbereich von 19 weiblichen und 17 männlichen Versuchspersonen mit nahezu gleichem Durchschnittsalter eine geringfügige Verschiebung

zugunsten der männlichen Versuchspersonen (Männer 12,49 Melanozyten pro Millimeter Basalmembran, Frauen 11,22 Melanozyten pro Millimeter Basalmembran). Obwohl in Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, daß weibliche Haut insgesamt heller ist als männliche, fanden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise darauf, dass das Geschlecht keinen Einfluß auf die Melanozytendichte hat (Bleehen, 1977). Insgesamt kann auch hier davon ausgegangen werden, daß die Melanozytendichte bei statistisch nicht signifikantem Unterschied bei beiden Geschlechtern gleich ist.

Bezüglich der Melanozytendichte in unterschiedlichen *Rassen* konnte in vorliegender Arbeit keine Aussage gemacht werden, da aus geographischen Gründen lediglich Personen mit weißer Hautfarbe untersucht worden sind. In der Literatur zeigt sich, wie in Kapitel 1.3.1. beschrieben, daß diese weitgehend konstant ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte bei Versuchen zur Morphologie und Kultivierungsbedingungen von *Malassezia*-Hefen gezeigt werden, daß die Spezies *Malassezia furfur* auf einem Medium aus Agar, einer Lipidquelle und Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle ein braunes in den Agar diffundierendes Pigment bildet. Dieses könnte aufgrund der Eigenfarbe sowie dem Vorweisen einer grünlichen Fluoreszenz verantwortlich für die charakteristische Pigmentierung mit auffallender Farbvarianz und anderen Eigenschaften der Erkrankungsherde bei Pityriasis versicolor sein. Durch Aufbereiten der Kulturen konnte ein bräunliches Rohextrakt isoliert werden, welches durch weitere chromatographische Auftrennung (Säulen- und Dünnschichtchromatographie) eine Vielfalt von Pigmenten mit unterschiedlichsten Eigenschaften zeigte. Hier konnten insbesondere Eigenschaften entdeckt werden, die mit der Pathogenese der Erkrankung in Einklang zu bringen sind, wie z.B. Fluoreszenz, Farbvarianz (Pigmentierung, Depigmentierung) sowie Schutz gegen UV-Strahlung.

Für diese Arbeit entscheidend war die Entdeckung von Pigmenten, die in *in-vitro*-Untersuchungen in der Lage waren, das Enzym Tyrosinase (photometrisch erfaßt) zu hemmen. Diese Hemmung der Melanogenese durch Bestandteile des Pigmentstoffwechsels könnte eine Erklärung für die Depigmentierungen bei Pityriasis versicolor alba bieten.

Anlehnend an diese Untersuchungen konnte diese Arbeit zeigen, daß sich diese Hemmung auf „*semi-in-vivo*-Bedingungen“ übertragen ließ, indem die isolierten Pigmente ebenfalls eine Hemmung der Melanogenese in der Dopa-Reaktion von Bloch aufwiesen.

Es konnte also hier eine Hemmung der Tyrosinase durch Metaboliten von *M. furfur* durch zwei differente Methoden nachgewiesen werden. Zum einen fand sich *in vitro* eine Hemmung der Enzymreaktion der Tyrosinase, welche photometrisch erfaßt wurde, zum anderen unter gleichen Bedingungen (Konzentration des Hemmstoffes etc.) *in vivo* eine Hemmung dargestellt durch die Dopa-Reaktion. Die Hemmung zeigte sich durch ein aus den Pilzkulturen hergestelltes Rohextrakt. Durch weitere säulen- und dünnschichtchromatographische Auftrennung konnte die Hemmung weiterhin einer einzelnen Säulenfraktion sowie letztendlich einer einzelnen Dünnschichtbande zugeordnet werden, so daß die Hemmung auf die Substanzen, aus denen sich die Bande zusammensetzt, eingegrenzt werden konnte. In Folgeversuchen konnten aus dieser Bande tryptophanabhängige Indolderivate mit tyrosinaseinhibitorischen Eigenschaften aufgereinigt werden.

Bei allen Verbindungen (Rohextrakt, Säulenfraktion, Dünnschichtbande) zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Hemmstoffkonzentration und Stärke der Hemmung. Desweiteren zeigte sich nach Zugabe von externer Tyrosinase, daß diese Hemmung teilweise kompetitiv aufgehoben werden konnte.

In histologischen Zusatzuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe der Dopa-Reaktion auch Aussagen zur Anzahl angefärbter Melanozyten bzw. Menge des L-Dopa in den Melanozyten bei Probanden verschiedenen Alters bzw. Geschlechts sowie an verschiedenen Lokalisationen des Körpers gemacht werden konnten.

CONCLUSION

While studying the morphology and cultivation conditions of *Malassezia* yeasts, it was possible to demonstrate that the species / genus *M. furfur* in a minimal medium of agar, a lipid source and tryptophan as the only source of nitrogen, forms a brown pigment diffusing into the agar. Because of its natural colour and the provision of a green fluorescence, this pigment could account for the characteristic pigmentation with striking colour variance and other attributes observed in pathological lesions of pityriasis versicolor.

Reprocessing the cultures, it was possible to isolate a brown crude extract, which in further chromatographic separation (column and thin-layer chromatography) showed a variety of pigments featuring a wide range of different attributes. In this respect it proved in particular

possible to detect properties which can be aligned with the complaint's pathogenesis such as, for example fluorescence, colour variance (pigmentation, depigmentation) and protection from UV radiation. Decisive for this work was the discovery of pigments able to inhibit the enzyme tyrosinase in *in vitro* studies (ascertained photometric). This inhibition of melanogenesis by elements of the pigment metabolism could provide an explanation for the depigmentation observed with pityriasis versicolor alba.

Building on these studies the work in hand was able to show that this inhibition is transferable to „*semi-in-vivo* conditions“, by virtue of the fact that the isolated pigments also exhibited a melanogenesis inhibition in Bloch's Dopa reaction.

It hence proved possible in this respect to document a tyrosinase inhibition by *M. furfur* metabolites by way of two different methods.

On the one hand the inhibition of the tyrosinase-catalysed reaction, which could be ascertained photometric, was found *in vitro*, and on the other an *in vivo* inhibition was represented by the Dopa reaction under the same conditions (inhibitor concentration, etc.).

The inhibition showed up through a crude extract produced from the fungal cultures. By way of further column and thin-layer chromatography separation, the inhibition could furthermore be assigned to a single column fraction and ultimately a single thin-layer band, enabling the inhibition to be narrowed down to the substances making up the band. It was in subsequent operations possible to filter tryptophan-dependent indol derivatives with tyrosinase-inhibiting properties from this band.

All compounds (crude extract, column fraction, thin-layer band) showed a positive correlation between inhibitor concentration and inhibitory power. It could furthermore be shown that this inhibition can be partially lifted competitive, following the addition of external tyrosinase.

Additional histological studies showed that the Dopa reaction could also be used to arrive at statements concerning the number of discoloured melanocytes and/or quantity of L-Dopa in the melanocytes of probands of various ages and both sexes, as well as at various localizations on the body.

LITERATURVERZEICHNIS

Abdel-Malek ZA, Swope VB, Amornsiripanitch N, Nordlund JJ: in vitro modulation of proliferation and melanization of S91 melanoma cells by prostaglandins. *Cancer Res.* 47: 3141-3146, 1987.

Abraham Z, Berderly A, Lefler, E: Pityrosporum orbiculare in children. *Mykosen* 30: 581-583, 1987.

Achten G, Wanet-Rouard J, Wiane A, Van Hoof F: Les onychomycoses à moisissures. *Dermatologica.* 159 (Suppl. 1): 128-140, 1979.

Ackerman AB: Histologic diagnosis of inflammatory skin disease. 2nd ed., Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 757-758, 1997.

Adamson HG: Pityriasis versicolor with subsequent leukodermic patches. *Br. J. Dermatol.* 61: 322, 1949.

Ahtonen P, Lehtonen OP, Kero P, Tunnela E, Havu V: Malassezia furfur: Colonization of Neonates in an Intensiv Care Unit. *Mycoses* 33: 543-547, 1990.

Aizawa T, Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A: The genetic diversity of clinical isolates of Malassezia pachydermatis from dogs and cats. *Med. Mycol.* 39: 329-334, 2001.

Akaza N, Akamatsu H, Sasaki Y: Malassezia folliculitis is caused by cutaneous resident Malassezia species. *Med. Mycol.* 47: 618-624, 2009.

Allen HB, Charles CR, Johnson BL: Hyperpigmented tinea versicolor. *Arch. Dermatol.* 112 : 1110-1112, 1976.

Alteras I, Eliazar IF: Prevalence of pathogenic fungi in the toe-webs and toe-nails of diabetic patients. *Mycopathology.* 67: 157-159, 1979.

- Amaya M, Tajima M, Okubo Y, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R*: Molecular analysis of *Malassezia* microflora in the lesional skin of psoriasis patients. *J. Dermatol.* 34 : 619-624, 2007.
- Aste N*: Clinical efficacy and tolerability of terbinafine in patients with pityriasis versicolor. *Mycoses* 34: 353-357, 1991.
- Babu V, Joshi PC*: Tryptophan as an endogenous photosensitizer to elicit harmful effects of ultraviolet B. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 29: 296-298, 1992.
- Baillon EH*: *Traité de botanique médicale cryptogamique suivi du tableau.* Faculté de Médecine de Paris, p. 234, 1889.
- Balus L, Pityri S, Grigoriu D*: *Pityriasis versicolor.* Alsbach, Cilag GmbH, 1982.
- Barchmann T, Hort W, Krämer HJ, Mayser P*: Glycine as a regulator of tryptophan-dependent pigment synthesis in *Malassezia furfur*. *Mycoses.* 2009 Aug. 21. (Epub ahead of print).
- Barney RE*: Pseudo-Achromia Postparasitaria- Tinea versicolor. *Arch. Derm. Syph.* 25: 1167, 1932.
- Bears JM*: In: *Textbook of Dermatology* (Rook , Wilkinson and Ebling) Oxford, Blackwell Scientific Publications: p752 , 1968.
- Benedek T*: *Cryptococcus Malassez, Pityrosporum Malassez*: Sabouraud. *Zbl. Bakt. Parasit. Kde. I,* 116: 317-332, 1930.
- Bergbrant IM, Faergemann J*: Seborrhoeic dermatitis and *Pityrosporum ovale*: a cultural and immunological study. *Acta Derm. Venereol.* 69: 332-335, 1989.
- Besnier E, Balzer F*: Les dermatomycoses. *Gaz. Hebdom. Med. Chir.* 19: 326-344, 1882.
- Billingham RE, Medawar PB*: The technique of free skin grafting in mammals. *J. Exp. Biol.* 28: 385, 1951.

Bischoff A: Malassezia furfur: Fördert der Pilz auch eine Ekzem-Variante? Dtsch. Ärztebl. 97: 18, 2000.

Bizzozero J: Über die Mikrophyten der normalen Oberhaut des Menschen. Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. 98: 441-459, 1884.

Bleehen SS: Skin bleaching preparations. J. Soc. Cosmet. Chem. 28: 407-412, 1977.

Bloch B, Ryhiner P: Histochemische Studien in überlebendem Gewebe über fermentative Oxidation und Pigmentbildung. Z. Gesamte Exp. Med. 5: 179-263, 1917.

Blömer M: Eine vierarmige, doppelblinde, randomisierte, placebokontrollierte Studie bezüglich der Wirksamkeit einer Zink-Octopirox Shampoo Formulierung vs. einer Oxiconazol- bzw einer Zink-Pyrithion-haltigen Formulierung bei Pityriasis simplex capillitii (Kopfschuppen). Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, 2005.

Blumenthal H: Tinea versicolor of the penis. Arch. Dermatol. 103: 461-462, 1971.

Boardman CR, Malkinson FD: Tinea versicolor in steroid treated patients. Arch. Dermatol. 85: 44-52, 1962.

Borelli D, Jacobs PH, Nall L: Tinea versicolor: epidemiological, clinical and therapeutic aspects. J. Am. Acad. Dermatol. 25: 300-305, 1991.

Breathnach AS, Nazzaro-Porro M, Martin B: Ultrastructure of skin in pityriasis versicolor. Giorn. It. Dermatol. 110: 457-469, 1975.

Breathnach AS, Nazzaro-Porro M, Passi S: Azelaic acid. Br. J. Dermatol. 111: 115-120, 1984.

Bregman MD, Peters E, Sander D, Meyskens FL: Dexamethasone, Prostaglandin A and retinoic acid regulation of murine and human melanoma cells grown in soft agar. J. Natl. Cancer Inst. 71: 927-931, 1983.

Bregman MD, Abdel-Malek ZA, Meyskens, FL: Anchorage independent growth of murine melanoma in serumless media is dependent on insulin or melanocyte-stimulating-hormone. *Exp. Cell. Res.* 157: 419-428, 1985.

Brotherton J: Lack of swelling and shrinking of *Pityrosporum ovale* in media of different osmotic pressures and its relationship with survival in the relatively dry condition of the scalp. *J. Gen. Microbiol.* 48: 305-308, 1967 (a).

Brotherton J: The sulphur metabolism of *Pityrosporum ovale* and its inhibition by selenium compounds. *J. Gen. Microbiol.* 49: 393-400, 1967 (b).

Burke RC: Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infections in human beings. *J. Invest. Dermatol.* 36: 389-401, 1961.

Burke RC: Investigations in tinea versicolor: Lipid and aminoacid studies. *Yale J. Biol. Med.* 35: 206-221, 1962.

Cabañes FJ, Theelen B, Castellá G, Boekhout T: Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res.* 7: 1064-1076, 2007.

Caprilli F, Mercanti R, Nazzaro-Porro M, Passi S, Tonolo A: Studies of the genus *Pityrosporum* in submerged culture. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 51: 171-189, 1973.

Castellani A: Tropical forms of pityriasis versicolor. *J. Cut. Dis.* 26: 393-399, 1908.

Castellani A, Chalmers AJ: Manual of tropical medicine, 2nd ed., London, Baillière Tindall & Cox, p1747, 1913.

Charles CR, Sire DJ, Johnson BL, Beidler JG: Hypopigmentation in tinea versicolor: A histochemical and electronmicroscopic study. *Int. J. Dermatol.* 12: 48-58, 1973.

Chatterji A: Observation on dopa reaction in the lesions of pityriasis versicolor. *Indian J. Dermatol.* 17: 4, 93-95, 1972.

Chen TA, Hill PB: The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* 16: 4-26, 2005.

Chetty GN, Kamalam A, Thambiah AS: Pityriasis versicolor – A study of 200 cases in a tropical skin clinic. *Mycoses* 22: 234-246, 1979.

Clemmensen O, Hjorth N: Treatment of dermatitis of the head and neck with ketoconazole in patients with type I sensitivity to *Pityrosporum orbiculare*. *Semin. Dermatol.* 2: 26-29, 1983.

Cohen MM: A simple procedure for staining tinea versicolor (*M. furfur*) with fountain pen ink. *J. Invest. Dermatol.* 22: 9-10, 1954.

Crespo Erchiga V, Ojeda Mertos A, Vra Casano A, Crespo Erchiga A, Sanchez Fajardo F: *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. *Br. J. Dermatol.* 143: 799-803, 2000.

Crespo Erchiga V, Florencio VD: *Malassezia* yeasts and pityriasis versicolor. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19: 139-147, 2006.

Crespo Erchiga V, Gómez-Moyano E, Crespo M: Pityriasis versicolor and the yeasts of genus *Malassezia*. *Actas Dermosifiliogr.* 99: 764-771, 2008.

Cunningham AC, Leeming JP, Ingham E, Gowland G: Differentiation of three serovars of *M. furfur*. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 439-446, 1990.

Dahms K, Krämer HJ, Thoma W, Mayser P: Tyrosinaseinhibition durch Tryptophan-metabolite von *Malassezia furfur* in humaner Epidermis. *Mycoses* 45: 230, 2002.

De Almeida Jr Hiram, Mayser P: Absence of sunburn in lesions of pityriasis versicolor alba. *Mycoses* 49: 516, 2006.

Degreef H: Clinical aspects of pityriasis versicolor. *Mykosen* 21: 146-149, 1978.

Delescluse J: Itraconazole in tinea versicolor: a review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 23: 551-554, 1990.

De Luca M, Siegrist W, Bondanza M, Mathor M, Cancedda R, Eberle AM: Alpha melanocyte stimulating hormone (alpha MSH) stimulates normal human melanocyte growth by binding to high-affinity receptors. *J. Cell. Sci.* 105: 1079-1084, 1993.

De Luca C, Picardo M, Breathnach A, Passi S: Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor. *Exp. Dermatol.* 5: 49-56, 1996.

Deppe R, Pullmann H, Steigleder GK: Dopa-positive cells and melanin in basal cell epithelioma (BCE). *Arch. Dermatol. Res.* 256: 79-83, 1976.

Derbel M, Benzina Z, Ghorbel I, Abdelmoula S, Makni F, Ayadi A, Feki J: *Malassezia* fungal blepharitis: a case report. *J. Fr. Ophtalmol.* 28: 862-865, 2005.

DiSorbo DM, McNulty B, Nathanson L: In vitro growth inhibition of human malignant melanomacells by glucocorticoids. *Cancer Res.*, 43: 2664- 2667, 1983.

Dodge CW: Medical Mykology. Fungous Diseases of men and other mammals, St. Louis, C.V. Mosby Co., p 198, 1935.

Dold H: On the so-called Bottle Bacillus (*Dermatophyton Malassez*). *Parasitology* 3: 279-287, 1910.

Dorn M, Roehnert K: Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Dermatol.* 69: 224-248, 1977.

Dotz WI, Henrikson DM, Yu GS, Galey CI: Tinea versicolor: a light and electron microscopic study of hyperpigmented skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 12: 37-44, 1985.

Duijin P: Inactivation experiment on the dopa factor. *J. Histochem. Cytochem.* 1: 143, 1953.

Duval C, Regnier M, Schmidt R: Distinct melanogenetic response of human melanocytes in mono-culture, in co-culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV-exposure. *Pigment Cell Res.*14: 348-355, 2001.

Eichstedt CF: Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde*. 853: 270-271, 1846.

El-Gothamy Z, Abdel-Fattah A: Tinea versicolor hypopigmentation: histochemical and therapeutic studies. *Int. J. Dermatol.* 14: 510-515, 1975.

El-Hefnawi H, El-Gothamy Z, Refai M: Studies on pityriasis versicolor in Egypt. II. Clinical and therapeutic. *Mykosen* 14: 483-490, 1971.

El-Hefnawi H, El-Gothamy Z, Refen M: Studies on pityriasis versicolor in Egypt. *Mycoses*, 15: 165-170, 1972.

Faergemann J: Tinea versicolor and *Pityrosporum orbiculare*: Mycological investigations, experimental infections, and epidemiological surveys. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* 86: 1-23, 1979.

Faergemann J, Bernander S: Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum orbiculare*. *Sabouraudia* 17: 171-179, 1981.

Faergemann J, Aly R, Maibach HI: Quantitative variations in distribution of *Pityrosporum orbiculare* on clinically normal skin. *Acta Derm. Venereol.* 63: 346-348, 1983.

Faergemann J: Lipophilic yeasts in skin disease. *Semin. Dermatol.* 4: 173-184, 1985.

Faergemann J, Meinhof W: *Pityrosporum*-Folliculitis. *Aktuelle Derm.* 14: 400-403, 1988.

Faergemann J: Treatment of pityriasis versicolor with a single dose of fluconazole. *Acta Derm. Venereol.* 72: 74-75, 1992.

Faergemann J: *Pityrosporum* yeasts - what's new? *Mycoses* 40: 29-32, 1997.

Faergemann J, Todd G, Pather S, Vawda Z, Gillies J, Walford T, Barranco C, Quiring J, Briones M: A double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-finding study of oral pramiconazole in the treatment of pityriasis versicolor. *J. Am. Acad. Dermatol.* 61: 971-976, 2009.

Felsher Z: Studies on the adherence on the epidermis to the corium. *J. Invest. Dermatol.* 8: 35-47, 1947.

Fistarol SK, Itin PH: Disorders of pigmentation. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 8: 187-203, 2009.

Fitzpatrick TB, Szabo G, Mitchell RE: Age changes in the human melanocyte system. In: Montagna W, ed. *Advances in Biology of skin. Vol VI. Aging.* Oxford: Pergamon, 35-50, 1965.

Fitzpatrick TB, Qnevedo WC, Szabo G, Seiji M: Biology of the melanin pigmentary system. In: *Dermatology in general Medicine* (Ed. by Fitzpatrick, T.B., Arndt, K.A., Clark, W.H., Eisen, A.Z., Van Scott, E.J. and Vaughan, J.H.) 2nd ed. 117-146. New York: McGraw-Hill, 1971.

Fitzpatrick TB: Ultraviolet-induced pigmentary changes: Benefits and hazards. *Curr. Prob. Dermatol.* 15: 25-38, 1986.

Frenk E, Schellhorn JP: Zur Morphologie der epidermalen Melanineinheit. *Dermatologica.* 139: 271-277, 1969.

Fuller BB, Ehlers SE: Insulin-mediated inhibition of tyrosinase activity and protein sythesis in melanoma cell cultures. *Endocrinology.* 114: 222-226, 1984.

Fuller BB: Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. *Exp. Cell Res.,* 262: 197-208, 2001.

Gaitanis G, Chasapi V, Velegraki A: Novel application of the masson-fontana stain for demonstrating *Malassezia* species melanin-like pigment production in vitro and in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4147-4151, 2005.

Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A: Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. Br. J. Dermatol. 154: 854-859, 2006.

Galadari I, El Komy M, Mousa A, Hashimoto K, Mehregan AH: Tinea versicolor: histologic and ultrastructural investigation of pigmentary changes. Int. J. Dermatol. 31: 253-256, 1992.

Gamblicher T, Krämer HJ, Boms S, Skrygan M, Tomi NS, Altmeyer P, Mayser P: Quantification of ultraviolet protective effects of pityriacitrin in humans. Arch. Dermatol. Res. 299: 517-520, 2007.

Gershoni-Baruch R, Benderly A, Brandes JM, Gilher A: Dopa reaction test in hair bulbs of fetuses and its application to the prenatal diagnosis of albinism. J. Am. Acad. Dermatol. 24: 220-222, 1991.

Gilchrist BA, Blog FB, Szabo G: Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. J. Invest. Dermatol. 73: 141-143, 1979.

Gilhar A: Vitiligo and idiopathic guttate hypomelanosis. Repigmentation of skin following engraftment onto nude mice. Arch. Dermatol. 125: 1363-1366, 1989.

Görnitz K: Versuch einer Klassifikation der häufigsten Federfärbungen. J. Ornithol.: 127-131, 1923.

Götz H: Pityriasis versicolor. Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermatophyten. In: Handbuch für Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg.: A. Marchionimi, H. Götz), Erg. Bd. IV/3, Heidelberg: Springer-Verlag, 352-360, 1962.

Götz H: Verzicht auf Sauna bei Pityriasis versicolor? Med. Klin. 75: 6-7, 1980.

González-Morán E, Rodríguez-Valero S, Del Monte ML, Briceno M, Sintjago S, Mesa LM, García D, Vgillalobos R, Pereia N: Isolation and identification of *Malassezia* species isolated from healthy skin of malnourished and eutrophic children cared for in daycare centers in Venezuela. Invest. Clin. 50: 145-152, 2009.

Gonzales-Ochoa A: Pityriasis versicolor. Rev. Med. (Mex) 2: 81-88, 1956.

Gordon MA: The lipophilic mycoflora of the skin. *In vitro* culture of *Pityrosporum orbiculare*. Mycologia 43: 524-534, 1951 (a).

Gordon MA: Lipophilic yeastlike organisms associated with tinea versicolor. J. Invest. Dermatol. 17: 267-272, 1951 (b).

Grüneberg T, Schade H: Zur Frage der Beeinflussung der Dopa-Reaktion durch Vitamin C. J. Mol. Med. 13: 1353-1354, 1934.

Guého E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 69: 337-355, 1996.

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

Guillot J, Guého E, Chevrier G, Chermette R: Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. Res. Vet. Sci. 62: 22-25, 1997.

Gupta AK, Bluhm R, Summerbell R: Pityriasis versicolor. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 16: 19-33, 2002.

Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Faergemann J: Pityriasis versicolor. Dermatol. Clin. 21: 413-42, 2003.

Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr: Skin diseases associated with *Malassezia* species. J. Am. Acad. Dermatol. 51: 785-98, 2004.

Hagler AN, Ahearn DG: Rapid diazonium blue B test to detect *basidiomycetous* yeasts. Int. J. Syst. Bacteriol. 31: 204-208, 1981.

Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J: bFGF from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. J. Cell. Biol. 107: 1611-1619, 1988.

Hantschke D: Zur Frage der Besiedelung des Kopfes durch den Erreger der Pityriasis versicolor. *Z. Haut Geschlechtskr.* 46: 79-80, 1971.

Hay RJ, Roberts SOB, Mackenzie DWR: Pityriasis versicolor. In: *Textbook of Dermatology* (Champion R.H., Burton J.L., Ebling F.J.G., eds.) 5th edn., Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 1176-1178, 1992.

Hay RJ, Moore M: Pityriasis versicolor. In: *Textbook of Dermatology* (Rook, Wilkinson, Ebling, eds.) 6th edn., Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 1287-1289, 1996.

Hay RJ, Roberts SOB, Mackenzie DWR: Pityriasis versicolor. In: *Textbook of Dermatology* (Champion R.H., Burton J.L., Ebling F.J.G., eds.) 6th edn., Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 1286–1290, 1998.

Hearing VJ: New regulators of melanogenesis are associated with purified tyrosinase isoenzymes. *J. Invest. Dermatol.* 79: 16-18, 1982.

Hearing VJ: Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol.*, 4: 24-27, 1999.

Hedayati MT, Hajheydari Z, Hajjar F, Ehsani A, Shokohi T, Mohammadpour R: Identification of *Malassezia* species isolated from Iranian seborrheic dermatitis patients. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 14: 63-68, 2010.

Henke H: Preparative gel chromatography on sephadex LH-20. Hüthig GmbH. Heidelberg, 1995.

Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 623-627, 2004.

Hort W, Nilles M, Mayser P: *Malassezia*-Hefen und ihre Bedeutung in der Dermatologie. *Hautarzt* 57: 633-654, 2006.

Hort W, Lang S, Brunke S, Mayser P, Hube B: Analysis of differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *M. furfur* by cDNA subtraction technology. *Med. Mycol.* 47: 248-258, 2009.

Hossain HM, Landgraf V, Weiß R, Mann M, Hayatpour J, Chakraborty T, Mayser P: The genetic and biochemical characterization of the species *Malassezia pachydermatis* with particular attention on pigment-producing subgroups. *Med. Mycol.* 45: 41-49, 2007.

Hunter JAA: Human malignant melanoma. Melanosomal polymorphism and the ultrastructural Dopa-Reaktion. *Br. J. Dermatol.* 98:381-390, 1978.

Iijima S, Watanabe K: Studies on Dopa reaction. I. A simple technic for Dopa reaction. *J. Invest. Dermatol.* 26: 235-237, 1956.

Iijima S, Watanabe K: Studies on Dopa reaction. II. Effects of chemicals on the reaction. *J. Invest. Dermatol.* 28: 1-4, 1957.

Inazu M: Detection of eumelanogenetic and pheomelanogenetic melanosomes in the same normal human melanocyte. *J. Invest. Dermatol.* 100: 172S-175S, 1993.

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

Irlinger B, Bartsch A, Krämer HJ, Mayser P, Steglich W: New tryptophan metabolites from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Helv. Chim. Acta* 88: 1472-1485, 2005.

Ishibashi Y, Kato H, Asahi Y, Sugita T, Nishikawa A: Identification of the major allergen of *Malassezia globosa* relevant for atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 55: 185-129, 2009.

Ito S: High-performance liquid chromatographie (HPLC) analysis of eu- and pheomelanin in melanogenesis control. *J. Invest. Dermatol.* 100: 166S-171S, 1993.

Jeliffe DB, Jacobson FW: The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. *J. Trop. Med. Hyg.* 57: 290-293, 1954.

Jimbow M, Marusyk H, Jimbow K: The *in vivo* melanocytotoxicity and depigmenting potency of N-2,4-acetoxypheyl thioethylacetamide in the skin and lav. *Br. J. Dermatol.* 133: 526-536, 1995.

Jones HE: Ketoconazol today. A review of clinical experience. Adies Press. Manchester, 8-21, 1987.

Juncu CG: Synthese von Melanin und Pityriacitrin bei *Exophiala Dermatitidis*: Ein Vergleich zweier UV-protektiver Substanzen. Inauguraldissertation zur Erlangung eines Doktors der Zahnmedizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2007.

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

Juntachai W, Oura T, Murayama SY, Kajiwara S: The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Med. Mycol.* 47: 477 – 484, 2009.

Kalinowska-Pudjak A, Schmalreck A, Haustein UF, Nenoff P: Speziesdifferenzierung von Hefen der Gattung *Malassezia* mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie. *Hautarzt* 57: 127-136, 2006.

Karakaş M, Turaç-Biçer A, Ilkit M, Durdu M, Seydaoğlu G: Epidemiology of pityriasis versicolor in Adna, Turkey. *J. Dermatol.* 36: 377-382, 2009.

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

Karaoui R, Bou-Resli M, Al-Zaid NS, Mousa A: Tinea versicolor. Ultrastructural studies on hypopigmented and hyperpigmented skin. *Dermatologica.* 162: 69-85, 1981.

Keddie FM: Tinea versicolor: the electron microscopic morphology of the genera *Malassezia* and *Pityrosporum*. In: XIII Congressus Internationalis Dermatologiae. Vol 2. Edited by W. Jadassohn and C. G. Schirren. Springer-Verlag, Berlin. p. 867-872, 1967.

Keddie FM: Tinea versicolor, 1846-1900. A historial survey based on selections from the writings of the nineteenth century. In: The diagnosis and treatment of fungal infections (Hrsg.: H.M. Robinson jr.) Springfield: C.C. Thomas, pp.169-184, 1974.

Kesavan S, Holland KT, Ingham E: The effects of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species in vitro. *Med. Mycol.* 38: 239-247, 2000.

Kiernan JA: Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Micros. Today* 1: 18-12, 2000.

Kistiakovsky EV: Pityriasis versicolor and ultraviolet rays. *Arch. Dermatol. Syph.* 15: 685-689, 1927.

Konrad K, Wolff K: Hyperpigmentation, melanosome size, and distribution patterns of melanosomes. *Arch. Dermatol.* 107: 853-860, 1973.

Körner A, Pawelek J: Mammalian Tyrosinase Catalyzes Three Reaktionen in the Biosynthesis of Melanin. *Science* 217: 1163-1165, 1982.

Kose O, Bulent Tastan H, Riza Gur A, Kurumlu Z: Comparison of a single 400 mg dose versus a 7-day 200 mg daily dose of itraconazole in the treatment of tinea versicolor. *J. Dermatolog. Treat.* 13: 77-79, 2002.

Krämer HJ, Dahms K, Podobinska M, Bartsch A, Steglich W, Mayser P: Tryptophanstoffwechsel von *Malassezia furfur*: Störung der Pigmentbildung der Haut durch Apoptose von Melanozyten und Tyrosinase-Inhibition. *Mycoses* 47: 363, 2004.

Krämer HJ, Kessler D, Hipler UC, Irlinger B, Hort W, Bödeker RH, Steglich W, Mayser P: Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bisindolylmaleimide arcylarubin A. *Chembiochem.* 6: 2290-2297, 2005 (a).

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

Krisanty RI, Bramono K, Made Wisnu I: Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor in Indonesia and its relationship with clinical characteristics. *Mycoses*. 52: 257-262, 2009.

Labows JN, McGinley KJ, Leyden JJ: Characteristic gamma-lactone odor production of the genus *Pityrosporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 412-415, 1975.

Labows JN, McGinley KJ, Leyden JJ, Webster GF: Characteristic gamma-lactone odor production of the genus *Pityrosporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 412-415, 1979.

Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA: Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 38: 143-58, 2003.

Laidlaw GF, Blackberg SN: Melanoma studies, II. A simple technique for the Dopa-Reaktion. *Am. J. Pathol.* 8: 491-498, 1932.

Laugier R: Le lias inférieur et magen du nord-est de la France. *Mem. Sciences de la Terre, Nancy*, 21: 1-300, 1971.

Leeming JP, Notman FH: Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 2017-2019, 1987.

Leeming JP, Notman F, Holland KT: The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 47-52, 1989.

Lewis GM: Tinea versicolor (white). *Arch. Derm. Syph.* 31: 911-913, 1935.

Lewi GM, Hopper ME: Pseudoachromia of tinea versicolor. *Arch. Dermatol. Syph.* 34: 850-861, 1936.

Liappis N, Kochbeck E, Eckhardt G, Hahne H, Kessler K, Bantzer P: Aminosäurenverluste im menschlichen Schweiß. Arch. Dermatol. Res. 269: 311-323, 1980.

Lockshi, NA: Tinea versicolor masquerading as vitiligo. Cutis 12: 245-247, 1973.

Londero AT: Dermatomycosis in the Hinterland of Rio Grande do Sul (Brazil). J. Int. Dermatol. 3: 64-68, 1964.

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

Mac Lennan R, O`Keeffe MF: Superficial fungal infections in an area of low land New Guinea. Aust. J. Dermatol. 8: 157-164, 1966.

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

Malassez L: Note sur le champignon de la pèlade. Arch. de Physiol. Norm. et Path. II 1: 203-212, 1874.

Marples MJ: The genus *Pityrosporum*. The ecology of the human skin. (Ed. By Charles C Thomas), Springfield, Illinois: 408-422, 1965.

Mason HS: The chemistry of melanin. III Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. J. Biol. Chem. 172, 83-99, 1948.

Matolby AG: Eine Studie von menschlichen Epidermisproteinen. J. Exp. Biol. 30: 34, 1955.

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

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

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

Mayser P, Schäfer U, Krämer HJ, Irlinger B, Steglich W: Pityriacitrin – an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch. Dermatol. Res.* 294: 131-134, 2002.

Mayser P, Stapelkamp H, Krämer HJ, Irlinger B, Steglich W: Pityrialactone – a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 84: 185-191, 2003 (a).

Mayser P, Stapelkamp H, Thoma W, Krämer HJ, Irlinger B, Steglich W: Tryptophan-dependent synthesis of isomeric bisindolyl derivatives by *M. furfur*. *Arch. Dermatol. Res.* 294: 486, 2003 (b).

Mayser P, Töws A, Krämer HJ, Weiß R: Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains. *Mycoses* 47: 34-39, 2004.

Mayser, P., Wenzel, M., Krämer, H.J., Kindler, B.L., Spitteller, P., Haase, G.: Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Med. Mycol.* 45: 519-524, 2007.

Mayser P, Rieche I: Rapid reversal of hyperpigmentation in pityriasis versicolor upon short-term topical cycloserine application. *Mycoses.* 52: 541-543, 2009.

Mc Curdy HM: Enzyme localization during melanogenesis. *J. Cell Biol.* 43: 220-228, 1969.

Mc Ginley KJ, Lantis LR, Marples RR: Microbiology of tinea versicolor. *Arch. Dermatol.* 102: 168-171, 1970.

Mc Ginley KJ, Leyden LJ, Marples RR, Kligman AM: Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff and seborrheic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 64: 401-405, 1975.

Meinhof W, Braun-Falco O: Über lipotrophe Hefen auf der menschlichen Haut und deren Bedarf an bestimmten Fettsäuren. *Fette, Seifen, Anstrichmittel.* 69: 861-864, 1967.

Midgley G: The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) yeasts *in vivo* and *in vitro*. *Mycopathologia* 106: 143–155, 1989.

Mishima H: Melanogenesis in the retinal pigment epithelial cell of the chick embryo. Dopa-reaction and electron microscopic autoradiography of 3H-dopa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17: 403-411, 1978.

Mittag H: Fine structural investigations of *Malassezia furfur*. II The envelope of the yeast cells. *Mycoses* 38: 13-21, 1995.

Morelli JG, Kincannon J, Yohn JJ, Zekman T, Weston WL, Norris DA: Leukotriene C4 and TGF-Alpha are stimulators of human melanocyte migration *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* 98: 290-295, 1992.

Moynahan EJ: Pityriasis versicolor alba and mediterranean holidays. *Lancet* 28: 471-472, 1976.

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

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

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

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

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

Nell A, James SA, Bond CJ, Hunt B, Herrtage ME: Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. *Vet. Rec.* 150: 395-398, 2002.

Nenoff P, Reinl P, Hausteil UF: Der Hefepilz *Malassezia*. *Hautarzt.* 52: 73-86, 2001.

Nenoff P, Kalinowska-Pujdak A, Schmalreck A: Spezies-abhängige In-vitro-Empfindlichkeit von Malassezia gegenüber Antimykotika. Akt. Dermatol. 33: 26-32, 2007.

Nia AK, Smith EL: Pityriasis versicolor of the glans penis. Br. J. Vener. Dis. 55: 230, 1979.

Nies SM: Tryptophanabhängige Synthese von indolhaltigen Pigmenten bei verschiedenen humanpathogenen Asco- und Basidiomyceten. Inauguraldissertation zur Erlangung eines Doktors der Zahnmedizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2006.

Noble WC, Midgley G: Scalp carriage of Pityrosporum species: The effect of physiological maturity, sex and race. Sabouraudia 16229-16232, 1978.

Noble WC: Skin as a habitat. In: Noble, W.C. (ed.) Microbiology of Human Skin. Lloyd-Luke Ltd., London, pp. 3-65, 1981.

Nordlund JJ, Collins CE, Rheins LA: Prostaglandin E2 and D2 but not MSH stimulate the proliferation of pigment cells in the pinnal epidermis of the DBA/2 mouse. J. Invest. Dermatol. 86: 433-437, 1986.

Nordlund JJ: The lives of pigment cells. Clin. Geriatr. Med. 5: 91-108, 1989.

Ortonne JP: Pigmentary changes of the ageing skin. Br. J. Dermatol. 122 Suppl. 35: 21-28, 1990.

Ota M, Huang PT: Sur les champignons du genre Pityrosporum Sabouraud. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 11: 49-58, 1933

Panja G: The Malassezia of the skin, their cultivation, morphology and species. Trans. 7th Cong. Far Eastern Assn. Trop. Med. 2: 442-456, 1927.

Pardo-Castello V: Achromia parasitaria. Arch. Dermatol. Syph. 25: 785-789, 1932.

Parunovic A, Halde C: Pityrosporum orbiculare. Its possible role in seborrheic blepharitis. Am. J. Ophthalmol. 63: 815-820, 1967

Pavel S: Dynamics of melanogenesis intermediates. *J. Invest. Dermatol.* 100: 162S-165S, 1993.

Prohic A, Ozegovic L: *Malassezia* spezies isolated from lesional and non-lesional skin in patients with pityriasis versicolor. *Mycoses.* 50: 58-63, 2007.

Prota G: Regulatory mechanisms of melanogenesis: beyond the tyrosinase concept. *J. Invest. Dermatol.*, 100: 156S-161S, 1993.

Prota G: Melanins and melanogenesis. *Cosmet. Toilettries* 111: 43-51, 1996.

Raper HS: The tyrosinase-tyrosin-reaction. *Biochem. J.* 21:89, 1927.

Raper HS: The aerobic oxidases. *Physiol. Rev.* 8, 245-282, 1928.

Rasi A, Naderi R, Behzadi AH, Falahati M, Farehyar S, Honarbakhsh Y, Akasheh AP: *Malassezia* yeast species isolated from Iranian patients with pityriasis versicolor in a prospective study. *Mycoses.* Early view (Articles online in advance of print), 2009 Jun 4.

Razack EMA, Tambiah AS: A clinical study of pityriasis versicolor in Madras. *Sabouraudia* 15: 305-311, 1977.

Reed WB, Pidgeon J, Becker SW: Patients with spinal cord injury. *Clinical cutaneous studies.* *Arch. Dermatol.* 83: 379-385, 1961.

Reinl P, Nenoff P, Hipler UC, Hausteil UF: *Malassezia furfur*- *in vitro* Empfindlichkeit sowie Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend, aktueller Stand von Klinik und Forschung.* Springer Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 367-371, 2000.

Rhie S: Clinical features and treatment of *Malassezia* folliculitis with fluconazole in orthotopic heart transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant.*19: 215-219, 2009.

Rivolta S: In DiGiulio Speiranai F (ed) *Dei parassiti vegetali.* 1st ed. Figli, Torino, Italy, pp 469-471, 1873.

Roberts SOB: Pityrosporum orbiculare: incidence and distribution on clinically normal skin. Br. J. Dermatol. 81: 264-269, 1969 (a).

Roberts SOB: Pityriasis versicolor: A clinical and mycological investigation. Br. J. Dermatol. 81: 315-326, 1969 (b).

Roberts SOB: The mycology of the clinically normal scalp. Brit. J. Dermatol. 81: 626-628, 1969 (c).

Robin C: Histoire naturelle des vegetaux parasites. Paris, J.B. Baillière, 436-439, 1853.

Robins EJ, Breathnach AS, Bennet D, Picardo M, Passi S, Nazzaro-Porro M: Ultrastructural observations on the effect of azelaic acid on normal human melanocytes and human melanoma cell line in tissue culture. Br. J. Dermatol. 113: 687-697, 1987.

Romano C, Maritati E, Ghilardi A, Miracco C, Mancianti F: A case of pityriasis versicolor atrophicans. Mycoses 48: 439-441, 2005.

Rook A, Wilkinson DS, Ebling FGG.: Textbook of Dermatology. 2nd edn., Oxford-Edinburgh: Blackwell Scientific Publications: p 867, 1969.

Rosdahl I, Rosman H: An estimate of the melanocyte mass in humans. J. Invest. Dermatol. 81: 278-281, 1983.

Ruete AE: Pityriasis versicolor. In: Jadassohns Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg.: J. Jadassohn). Bd. XI., Berlin: Springer Verlag, pp. 696-710, 1928.

Ruete AE: Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor. Dermatol. Wochenschr. 96: 333-336, 1933.

*Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Cunliffe WJ, Ingham E: Cell-mediated immunity to the mycelial phase of *Malassezia* spp. in patients with pityriasis versicolor and controls. Br. J. Dermatol. 144: 77-84, 2001.*

Sabouraud R: Maladies du cuir chevelu. II Les maladies desquamatives. Paris: Masson et cie. Arch. Dermatol. Res. 75: 150-157, 1904.

Salkin IF, Gordon MA: Polymorphism of *Malassezia furfur*. Can. J. Microbiol. 23: 471-475, 1977.

Sandström MH, Tengvall Linder M, Johansson C, Bartosik J, Back O, Sarnhult T: The prevalence of *Malassezia* yeasts in patients with atopic dermatitis, seborrhoeic dermatitis and healthy controls. Acta Derm. Venereol. 85: 17–23, 2005.

Sawyer TK, Hruby VJ, Hadley ME, Engel MH: α -Melanocyte stimulating hormone: Chemical nature and mechanism of action. Amer. Zool. 23: 529-540, 1983.

Schallreuter K: A possible mechanism of action for azelaic acid in human epidermis. Arch. Dermatol. Res., 282: 168-171, 1990.

Schallreuter K, Slominski A, Pawelek JM, Jimbow K, Gilchrest BA: What controls melanogenesis ? Exp. Dermatol. 7: 143-150, 1998.

Schallreuter K: The importance of L-phenylalanin transport and its autocrine turnover to L-tyrosin for melanogenesis in human epidermal melanocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 262: 423-428, 1999.

Schmidt JV, Bradfield CA: A receptor signaling pathways. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12: 55-89, 1996.

Schmidt A: *Malassezia furfur*: A fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders. Cutis. 59: 21-24, 1997.

Schmitz S, Thomas PD, Allen TM, Poznansky MJ, Jimbow K: Dual role of melanins and melanin precursors as photoprotective and phototoxic agents: inhibition of ultraviolet radiation- induced lipid peroxidation. Photochem. Photobiol. 61: 650-655, 1995.

Schroeder H: Über die Hemmung der Dopareaktion durch das Vitamin C. *J. Mol. Med.* 13: 553-554, 1934.

Shifrine M, Marr A: The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*. *J. Gen. Microbiol.* 32: 263-270, 1963.

Shumer A, Nathanson N, Kaplan B: Itraconazole versus ketoconazole in the treatment of tinea versicolor. *J. Dermatolog. Treat.* 104: 11-23, 1999.

Simmons RB, Ahearn DG: Cell wall ultrastructure and diazonium blue B reaction of *Sporopachydermia quercum*, *Bullera tsugae*, and *Malassezia* spp. *Mycologia* 79: 38-43, 1987.

Simmons RB, Guého E: A new species of *Malassezia*. *Mycol. Res.* 94: 1146-1149, 1990.

Slooff WCH: Genus *Pityrosporum* Sabouraud. In: *The yeasts – A Taxonomic Study* (Hrsg. J. Lodder). 2nd ed, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, pp. 1167-1186, 1970.

Später S, Hipler UC, Haustein UF, Nenoff P: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in vitro durch *Malassezia* –Hefen. *Hautarzt* 60: 122-127, 2009.

Stanka P: Die Dopa-Reaktion, eine brauchbare Methode in der Elektronenmikroskopie. Untersuchung am retinalen Pigmentepithel von Hühnerembryonen. *Mikroskopie* 26: 169-174, 1979.

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

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

Stierner U, Rosdahl I, Augustsson A, Kagedal B: UVB irradiation induces melanocyte increase in both exposed and shielded human skin. *J. Invest. Dermatol.* 92: 561-564, 1989.

Stryer L: Biochemie 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford: pp. 18/19, 1994.

Sugita T, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Shinoda T, Nishikawa A: Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. J. Clin. Microbiol. 39: 3486-3490, 2001.

Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A: New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. J. Clin. Microbiol. 40: 1363-1367, 2002.

Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A: Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J. Clin. Microbiol. 41: 4695-4699, 2003.

Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A: A new yeast, *M. yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. Microbiol. Immunol. 48: 579-583, 2004.

Sugita T, Suzuki M, Goto S, Nishikawa A, Hiruma M, Yamazaki T, Makimura K: Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. Med. Mycol. 21: 1-5, 2009.

Sunenshine PJ, Schwartz RA, Janninger CK: Tinea versicolor. Int. J. Dermatol. 37: 648-655, 1998.

Swift JA, Dunbar SF: The ultrastructure of *Pityriopsis ovale* and *Pityriopsis canis*. Nature 206: 1174-1175, 1965.

Swope VB, Abdel-Malek Z, Kassem LM, Nordlund JJ: Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. J Invest. Dermatol. 96: 180-185, 1991.

Szabo G: The number of melanocytes in human epidermis. Br. Med. J. 1: 1016-1017, 1954.

Szabo G: The regional anatomy of the human integument with special reference to the distribution of hair follicles, sweat glands and melanocytes. *Philos. Trans. R. Soc. London* 252: 447-485, 1967.

Tajima M, Sugita G, Nishikawa A, Tsuboi R: Molecular Analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J. Invest. Dermatol.* 128: 345-351, 2008.

Thoma W, Trinkaus M, Mayser P: Tyrosinaseinhibition durch Stoffwechselprodukte von *M. furfur*. *Z. Haut Geschlechtskr.* 75: 473, 2000 (Poster).

Thoma W, Dahms K, Krämer HJ, Steglich W, Irlinger B, Mayser P: Tyrosinaseinhibition durch KO27- einen Stoffwechselmetaboliten von *Malassezia furfur*. *Mycoses* 44: 238-239, 2001.

Thoma W, Mayser P: *Malassezia*-Hefen und ihre Bedeutung. *Dt. Dermatol.* 52: 260-265, 2004.

Thoma W, Krämer HJ, Mayser P: Pityriasis versicolor alba. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 19:147-152, 2005.

Thompson E, Colvin JR: Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani & Chalmers. *Can. J. Microbiol.* 16: 263-265, 1970.

Tomita K: A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot.* 12: 1601-1605, 1990.

Tosti A, Villardita S, Fazzinni ML: The parasitic colonization of the horny layer in tinea versicolor. *J. Invest. Dermatol.* 59: 223-237, 1972.

Tóth J, Bausz M, Imre L: Unilateral *Malassezia furfur* blepharitis after perforating keratoplasty. *Br. J. Ophthalmol.* 80: 488, 1996.

Van Abbe NJ: The investigation of dandruff. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 15: 609-630, 1964.

Vanbreuseghem R: Nouvelles observations sur les teignes en République de Somalie. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 48: 513-526, 1968.

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

Vuillemin P: Les champignon parasites et les mycoses de l'homme. In: Encyclopédie Mycologique 2, p 1-290, 1931.

Wahab MA, Ali ME, Rahman MH, Chowdhury SA, Monamie NS, Sultana N, Khondoker L: Single dose (400mg) versus 7 day (200mg) daily dose itraconazole in the treatment of tinea versicolor: a randomized clinical trial. Mymensingh. Med. J. 19: 72-76, 2010.

Wassermann HP: Melanokinetics and the biological significance of melanin. Br. J. Dermatol. 82: 530-4, 1970.

Weidner F: Letter: Pityriasis versicolor. Z. Allgemeinmed. 50: 193, 1974.

Wertheim L: Über Lichtwirkung und Leukoderma bei Pityriasis versicolor. Dermatol. Z. 38: 343-354, 1928.

Whitlock FA: *Pityrosporum ovale* and some scaly conditions of the scalp. Br. Med. J. 1 : 484-487, 1953.

Wilde PF, Stewart PS: A study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*. Biochem. J. 108: 225-231, 1968.

Willan R: Description and treatment of the cutaneous diseases. Order II. Scaly diseases of the skin, London: pp 192-196, 1801.

Wille G, Mayser P, Thoma W, Monsees T, Baumgart A, Schmitz HJ, Schrenk D, Polborn K, Steglich W: Malassezin - A novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. Bioorg. Med. Chem. 9: 955-960, 2001.

Wilson JW, Plunkett OA: In: The fungal diseases of man. University of California. Berkeley and Los Angeles, p. 252, 1965.

Wroblewski N, Bär S, Mayser P: Missing granulocytic infiltrate in pityriasis versicolor – indication of specific anti-inflammatory activity of the pathogen? *Mycoses* 48: 66-71, 2005.

Wu X, Hammer JA: Making sense of melanosome dynamics in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res.* 13: 241-247, 2000.

Xu J, Saunders CW, Hu P, Grant RA: Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 18730–18735, 2007.

Yaar M, Grossman K, Eller M, Gilchrist BA: Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J. Cell. Biol.* 115: 821-828, 1991.

Yarrow D, Ahearn DG: *Malassezia* Baillon. In: The yeasts: A taxonomic study (Kreger van Rij NJW), 3rd ed., Amsterdam: North Holland Publishing Co. pp. 882-885, 1984.

Zuther K, Mayser P, Hettwer U, Wu W, Spiteller P, Kindler BL, Karlovsky P, Basse CW, Schirawski J: The tryptophan aminotransferase Tam1b catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 68: 152-172, 2008.

Danksagung

Besonders Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Mayser für die interessante Themenstellung, die stets freundliche und kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für seine große Geduld bis zu ihrer Fertigstellung.

Ein weiterer Dank gilt Hans-Jochen Krämer, der mir beim Verfassen der Doktorarbeit mit Rat zur Seite stand.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei dem OP-Team der Dermatologie und den Probanden für die Bereitstellung von Hautproben.

Danken möchte ich auch den Mitdoktoranden und Mitarbeitern im Labor, vor allem Frau Förste für die Versorgung mit Kulturmedien und Frau Führer für die Hilfe bei der Durchführung und Färbung der Hautschnitte.

Für die Wegbereitung und Begleitung danke ich meinen Eltern und meiner Familie.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die aus 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.

Marlene Trinkaus

Saarbrücken, Juli, 2010