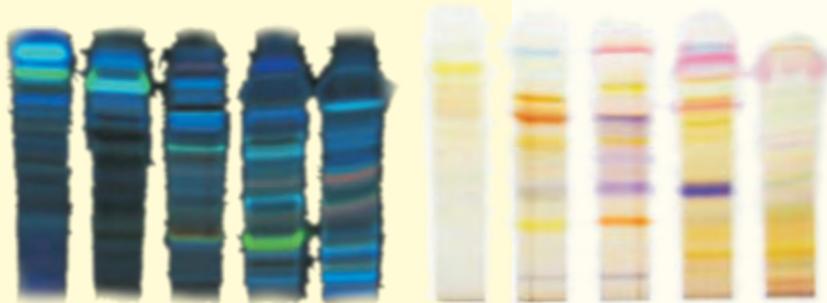


Tryptophanabhängige Synthese von indolhaltigen Pigmenten bei verschiedenen humanpathogenen Asco- und Basidiomyceten

SILKE MARIE NIES

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Tryptophanabhängige Synthese von indolhaltigen
Pigmenten bei verschiedenen humanpathogenen
Asco- und Basidiomyceten**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von **Silke Marie Nies**
aus Hachenburg

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Komm. Leiter: Prof. Dr. P. Mayser
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. P. Mayser
Gutachter: Prof. Dr. A. Szegoleit

Tag der Disputation: 18.10.2006

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

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Name	Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Pigmente	1
1.1.1	Definition und Funktion	1
1.1.2	Pigmente bei Pilzen	1
1.1.2.1	Melanine	2
1.1.2.2	Carotenoide	3
1.1.2.3	Naphthoquinone	3
1.1.2.4	Phenoxazine	4
1.1.2.5	Flavonoide	4
1.1.2.6	Indolhaltige Pigmente	4
1.2	Charakterisierung der verschiedenen Pilzarten	9
1.2.1	<i>Exophiala</i> Spezies	9
1.2.2	<i>Exophiala dermatitidis</i>	10
1.2.3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	12
1.2.4	<i>Nattrassia mangiferae/Scytalidium dimidiatum</i>	13
1.2.5	<i>Aspergillus terreus</i>	14
1.2.6	<i>Schizophyllum commune</i>	15
1.2.7	<i>Trichosporon</i> -Hefen	16
1.2.8	<i>Geotrichum capitatum</i>	17
2.	Hintergrund und Fragestellung	19
3.	Material und Methoden	21
3.1	Anzucht und Kultur	21
3.1.1	Verwendete Isolate	21
3.1.1.1	Basidiomyceten	21

3.1.1.1.1	Klasse: Hymenomyceten; Ordnung: Tremellales	21
3.1.1.1.2	Klasse: Hymenomyceten; Ordnung: Sterealen	21
3.1.1.2	Ascomyceten	22
3.1.1.2.1	Klasse: Hemiascomyceten; Ordnung: Saccaromycetalen	22
3.1.1.2.2	Klasse: Euascomyceten; Ordnung: Eurotialen	22
3.1.1.2.3	Klasse: Euascomyceten; Ordnung: Chaetothyriales	22
3.1.2	Anzucht und Nährmedien	24
3.2	Bildung von Pigmenten und Fluorochromen	24
3.2.1	Kulturbedingungen	24
3.2.2	Screening	25
3.2.2.1	<i>Trichosporon</i> - und <i>Geotrichum</i> -Hefen	25
3.2.2.2	Schwärzepilze	26
3.2.2.3	<i>Aspergillus terreus</i> und <i>Schizophyllum commune</i>	27
3.3	Pigmentgewinnung und Aufreinigung	27
3.3.1	Gewinnung des Rohextraktes	27
3.3.2	Säulenchromatographie	28
3.3.3	Dünnschichtchromatographie	29
3.3.4	Hochleistungs-Flüssigkeit-Chromatographie - HPLC	33
3.3.4.1	Präparative HPLC	33
3.3.4.2	Analytische HPLC	34
3.3.5	Untersuchung zur Strukturaufklärung	34
4.	ERGEBNISSE	36
4.1	Screeningergebnisse	36
4.1.1	Übersicht	36
4.2	Strukturaufklärung der gebildeten Substanzen der einzelnen Spezies	39
4.2.1	<i>Exophiala</i> -Spezies	39
4.2.1.1	<i>Exophiala dermatitidis</i>	39
4.2.1.2	<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	45
4.2.1.3	<i>Exophiala spinifera</i>	48
4.2.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	51
4.2.3	<i>Trichosporon</i> -Hefen	54

4.2.3.1	<i>Trichosporon asteroides</i>	55
4.2.3.2	<i>Trichosporon cutaneum</i>	56
4.2.3.3	<i>Trichosporon loubieri</i>	58
4.2.4	<i>Geotrichum capitatum</i>	59
4.2.5	<i>Schizophyllum commune</i>	61
4.2.6	<i>Phialocephala</i>	63
4.2.7	<i>Natrassia mangiferae/Scytalidium dimidiatum</i>	66
4.2.8	<i>Aspergillus terreus</i>	69
5.	DISKUSSION	72
6.	ZUSAMMENFASSUNG	87
7.	SUMMARY	90
8.	LITERATUR	93
9.	ANHANG	104
	DANKSAGUNG	
	LEBENS LAUF	

1. Einleitung

1.1 Pigmente

1.1.1 Definition und Funktion

In der Biologie versteht man unter Pigmenten einen in Zellen und Geweben gelösten oder in Körnchenform vorkommenden Stoff mit Eigenfarbe. Der Farbeindruck entsteht entweder durch Absorption oder Reflexion bestimmter Frequenzanteile des sichtbaren Lichts.

Die Aufgabe der Pigmente in der Natur beschränkt sich aber nicht nur auf die Farbgebung der Zellen und Geweben. Viel bedeutsamer ist, dass zahlreiche natürliche Pigmente mit wichtigen metabolischen oder physiologischen Prozessen verknüpft sind. Wichtige Beispiele hierzu sind das Chlorophyll in der Photosynthese, das Hämoglobin als Sauerstoffträger, antioxidative Pigmente in der humoralen Abwehr und im UV-Strahlenschutz (BRITTON, 1983).

1.1.2 Pigmente bei Pilzen

Pilze sind fähig, ein großes Spektrum verschiedenster Pigmente mit unterschiedlichsten Funktionen zu synthetisieren. Dadurch ergibt sich, dass bis heute nur einzelne dieser Pigmente gut erforscht sind. Melanine beispielsweise (*Cryptococcus neoformans*, *Exophiala dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus*) stehen in großem Interesse der Forschung (SCHNITZLER ET AL., 1999; JACOBSON ET AL., 1995; JACOBSON, 2000; HAMILTON ET AL., 1999; LANGFELDER ET AL., 2003; BRAKHAGE ET AL., 1999).

1.1.2.1 Melanine

Zur großen Gruppe der Melanine gehören verschiedene Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften (z.B. Größe, Unlöslichkeit in Wasser oder organischen Lösungsmitteln, Heterogenität, Fähigkeit als Radikalfänger, Neutralisation von Oxidantien und UV-Protektion). Im Allgemeinen sind es Makromoleküle, die durch oxidative Polymerisation von phenol- oder indolhaltigen Komponenten entstanden sind (JACOBSON, 2000; HAMILTON ET AL., 1999; LANGFELDER ET AL., 2003; ESSER ET AL., 2001, HAMILTON ET AL., 2002).

Die Melaninproduktion in Pilzen wird mittels Polyketidsynthesen katalysiert. Neben der Möglichkeit Melanin über Dihydroxyphenylelanin (DOPA) zu synthetisieren, wie zum Beispiel in *Cryptococcus neoformans*, stammt das Melanin hauptsächlich von dem Vorläufermolekül 1,8-Dihydroxynaphthalen (DHN) ab (FENG ET AL., 2001). Die Biosynthese von DHN-Melanin über den PKS-Weg wurde in *Exophiala dermatitidis* intensiv untersucht. In den letzten Schritten dieser Synthese wird 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen zu Scytalon, Vermelon und schließlich zu DHN umgeformt. Tricyclazol inhibiert als reduktives Enzym die Umformung von Scytalon zu Vermelon (FENG ET AL., 2001; JACOBSON, 2000; LANGFELDER ET AL., 2003; ESSER ET AL., 2004).

In diesem Zusammenhang wurde ein Polyketidsynthase-Gen, WdPKS1, in *Exophiala dermatitidis* durch Versuche mit melaninfreien Mutanten dargestellt (FENG ET AL., 2001).

Melanine haben einen ausgeprägten Einfluss auf die Pathogenität, indem sie beispielsweise vor UV-Strahlung, vor enzymatischer Auflösung, vor Oxidantien und manchmal sogar vor extremen Temperaturen schützen. Des Weiteren können sie Aufgaben übernehmen wie Metallbindung und physiologische Redox-Pufferung (LANGFELDER ET AL., 2003; ESSER ET AL., 2004).

Melanin ist in vielen human- und pflanzenpathogenen Pilzen in der Zellwand zu finden, wie z.B. *Exophiala dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* und *Magnaporthe grisea*.

1.1.2.2 Carotenoide

Die Carotenoide umfassen eine weitverbreitete und wichtige Gruppe von Pigmenten. Ihre besondere Bedeutung haben sie in der Tier- und Pflanzenwelt (involviert in Photosynthese, Photorezeption und Farbgebung).

Bei Pilzen ist ein Photoinduktionsmechanismus bekannt, der sicherstellt, dass Carotenoide zum gewünschten Zeitpunkt vorhanden sind. Die lichtabsorbierende Eigenschaft der Carotenoide schützt die Pilze vor den schädlichen Folgen exzessiver UV-Strahlung oder Sauerstoff (BRITTON, 1983).

SCHNITZLER ET AL. beschrieben 1999 Torulen und Torularhodin als Schutz sensitiver Moleküle oder Organellen vor UV-Strahlen in *Exophiala dermatitidis*. Die Biosynthese der Carotenoide wurde anhand von Mutanten des Schimmelpilzes *Phycomyces blakesleeanus* untersucht (BRITTON, 1983).

1.1.2.3 Naphthoquinone

Naphthoquinone werden bei Pilzen unter Bedingungen von Wachstumshinderung oder -einstellung gebildet (MEDENTSEV ET AL., 1998). Hauptproduzenten stellen pflanzenpathogene Pilze dar. Aber auch humanpathogene Pilze sind fähig, diese Stoffe zu synthetisieren (z.B. *Hendersonula toruloidea*). Es wird vermutet, dass sie eine signifikante Rolle im Pathogenitätsmechanismus spielen, welche aber noch nicht bewiesen ist. Sie zeigen eine große Variabilität von biologischer Aktivität. Diese reicht von phytotoxischen, insektiziden, antibakteriellen (gram positiv) und fungiziden Eigenschaften über zytostatischer bis zu anti-karzinogener Wirkung. MEDENTSEV und AKIMENKO beschrieben 1998 100 verschiedene Naphthoquinone von 63 Pilzspezies. Sie dokumentierten ebenfalls, dass die Zusammensetzung dieser Stoffe von dem pH-Wert des Wachstumsmediums und von dem Vorhandensein von Stickstoff sowie Kohlenstoff abhängt. Die Produzenten dieser Substanzen können so die Art des synthetisierten Stoffes je nach den vorliegenden Umweltbedingungen verändern, um sich selbst vor den schädlichen Effekten der eigenen Metabolite zu schützen.

1.1.2.4 Phenoxazine

Die bekanntesten Phenoxazine sind die Ommochrome (braun) (BRITTON, 1983). Sie entstehen durch den Umbau der Aminosäure Tryptophan. Phenoxazin-Derivate gehören zu den Mycelprodukten höherer Pilze (SCHLUNEGGER ET AL., 1976).

1.1.2.5 Flavonoide

Flavonoide sind als UV-Schutz und Radikalfänger fast ausschließlich Produkte höherer Pflanzen. Über das Vorkommen von Flavonoiden bei Pilzen ist wenig bekannt (BRITTON, 1983). Von *Aspergillus candidus* sowie *Acanthostigmella* Spezies ist bekannt, dass sie Flavonoide synthetisieren können, welche das Wachstum von pathogenen Pilzen wie *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* sowie *Aspergillus fumigatus* hemmen können (WATANABE ET AL., 2001).

1.1.2.6 Indolhaltige Pigmente

Indole sind als Naturpigmente seit langem bekannt. Purpur und Indigo stellen nur zwei Beispiele von Farbstoffen mit Indolgrundstruktur dar (BREUER, 1989). Sie zählen zu den bekannten Syntheseprodukten von Pilzen. Medizinisch bedeutsam sind z.B. Serotonin-Antagonisten mit LSD-ähnlicher Wirkung wie Psilocybin, Psilocin und Baeocystin (vergleiche beispielhaft Abbildung 1). Diese werden insbesondere von *Psilocybe*-Arten gebildet (PIERROT ET AL., 2000).

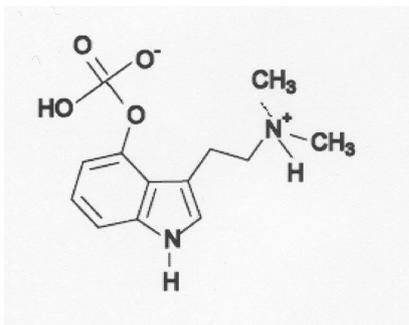


Abb. 1 Psilocybin

Im Rahmen von Untersuchungen bezüglich der Pathogenität von *Schizophyllum commune* gelang es HOSOE ET AL. 1999 ein neuartiges Indolderivat, das Schizocommunin, zu isolieren (vergleiche Abbildung 2). Auch die Pigmente Indigotin, Indirubin, Isatin und Tryptanthrin wurden extrahiert. Schizocommunin hat nachgewiesene Zytotoxizität gegen murine Lymphom-Zellen.

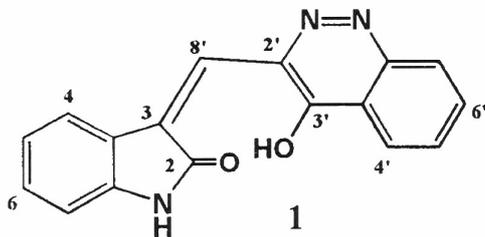


Abb. 2 Schizocommunin

Bei der Hefe *Malassezia furfur* wurde als erstes die Fähigkeit entdeckt und beschrieben, dass bei Anwesenheit der Aminosäure L-Tryptophan im Agar als einziger Stickstoffquelle sich der Nährboden dunkel verfärbt. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Peter Mayser erlangten mit dem Hintergrund der noch nicht völlig geklärten Pathogenese der Pityriasis versicolor zu der Erkenntnis, dass Tryptophan *Malassezia furfur* zur Bildung von bislang unbekanntem Pigmenten und Fluorochromen veranlasst (MAYSER ET AL., 1998), die mit der klinischen Erscheinung dieser weit verbreiteten Hautmykose in Beziehung stehen.

Bei dem ersten Metabolit, der isoliert werden konnte, handelt es sich um das 2,3-Methylenbisindolyl-3-carbaldehyd, dem Malassezin (vergleiche Abbildung 3). Diese Substanz ist ein Agonist des Aryl-Hydrocarbon Rezeptors, führt zur Apoptose von Melanozyten und könnte so die Depigmentierungserscheinungen bei der Pityriasis versicolor erklären (KRÄMER ET AL., 2005).

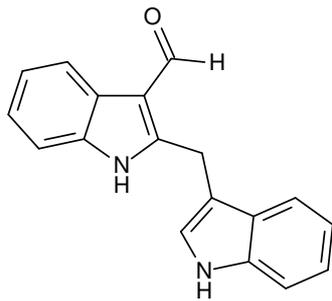


Abb. 3 Malassezin
 $C_{18}H_{14}N_2O$
MW 274.32

Pityriacitrin ($C_{20}H_{13}N_3O$), ein gelber weitgehend fettlöslicher Feststoff (vergleiche Abbildung 4), zeigt eine breite Absorption im UV-Bereich und stellt deshalb möglicherweise neben dem Melanin, Scytonemin und Flavonoiden einen weiteren potenten UV-Filter bei Mikroorganismen dar (MAYSER ET AL., 2002).

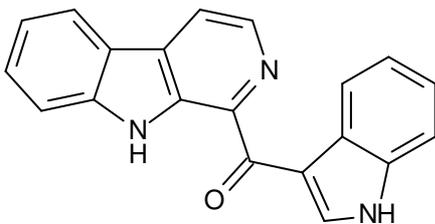


Abb. 4 Pityriacitrin
 $C_{20}H_{13}N_3O$
MW 311.34

Pityrialacton ($C_{20}H_{12}N_2O_3$) ist ebenfalls eine vorher unbekannte Substanz (vergleiche Abbildung 5). Seine gelbgrüne Fluoreszenz im Wood-Licht (366nm) stellt einen Erklärungsansatz für das Phänomen der Fluoreszenz von Läsionen der Pityriasis versicolor dar.

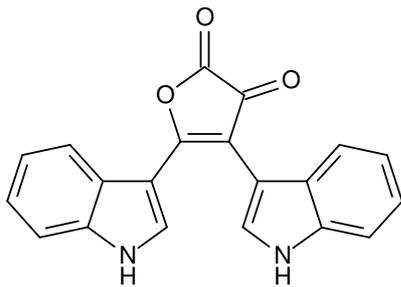
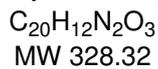


Abb. 5 Pityrialacton (FO22)



Aus dem aus der Hefe *Malasszia furfur* gewonnenen Pigmentrohextrakt konnte des weiteren eine orangefarbene Substanz herausgefiltert werden, das Pityriaanhydrid ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$), ein Strukturisomer des Pityrialactons (vergleiche Abbildung 6). Auch diese Verbindung wurde bis dahin nicht als Naturstoff beschrieben. Es tritt aber als Zwischenprodukt bei der Synthese von Bis(indolyl)maleimiden auf (MAYSER ET AL., 2003).

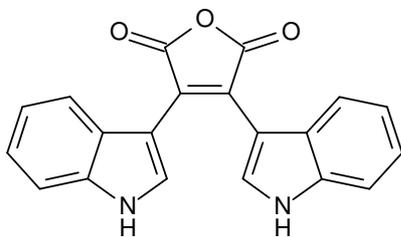
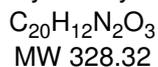


Abb. 6 Pityriaanhydrid (O54)



Malassezia furfur ist ebenfalls fähig, drei biologisch aktive Bis(indolyl)spirane zu synthetisieren. Die orange-roten Pityriarubine A ($\text{C}_{32}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$), B ($\text{C}_{32}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$) und C ($\text{C}_{32}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5$) stammen wie die zuvor benannten Verbindungen Pityrialacton und -anhydrid von einem gemeinsamen Vorgängermolekül, dem hypothetischen Triketon, oder von dessen Hydrat ab (IRLINGER ET AL., 2004).

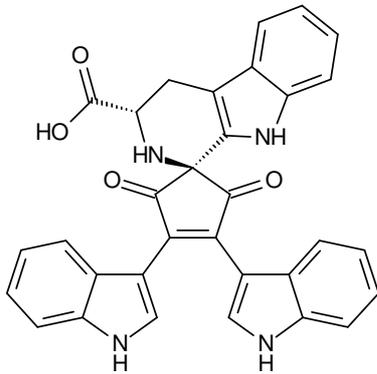


Abb. 7 a) Pityriarubin A (CIII49)
 $C_{32}H_{22}N_4O_4$
MW 526.55

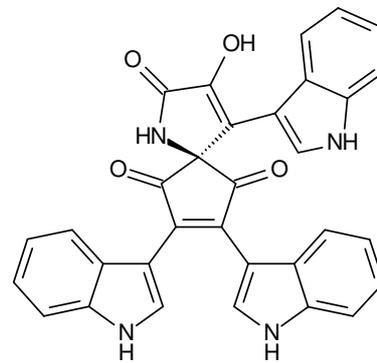


Abb. 7 b) Pityriarubin B (C48)
 $C_{32}H_{20}N_4O_4$
MW 524.53

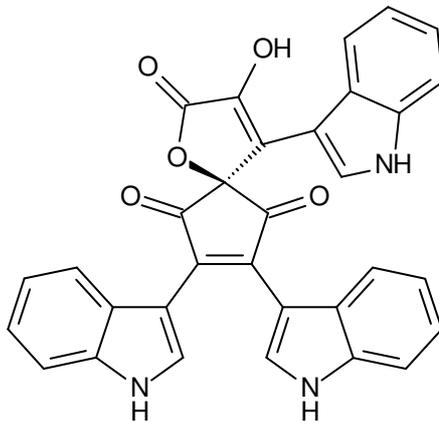


Abb. 7 c) Pityriarubin C (KO52)
 $C_{32}H_{19}N_3O_5$
MW 525.51

Die interessante biologische Aktivität dieser drei Pityriarubine besteht in ihrer engen Strukturverwandtschaft zu Bis(indolyl)maleimiden, die kürzlich als Protein-Kinase-C-Inhibitoren beschrieben worden sind. Diese unterdrücken den „oxidativen burst“ von neutrophilen Granulozyten. Diese entzündungshemmenden Eigenschaften sind ein Erklärungsversuch für die bemerkenswert schwache inflammatorische Aktivität der Granulozyten bei der Pityriasis versicolor (KRÄMER ET AL., 2003).

1.2 Charakterisierungen der verschiedenen Pilzarten

Pigmente bestimmen verschiedenste physiologische oder z. T. pathologische Prozesse. Sie entstehen auf unterschiedlichsten Synthesewegen. Unklar ist bislang, ob Pilze eventuell mehrere dieser unterschiedlichen Synthesewege in sich vereinbaren können. Viele humanpathogene Pilze lösen ausgeprägte Mykosen aus. Um mögliche Zusammenhänge zwischen den Pigmenten und den Mykosen vermuten zu können, werden im Folgenden verschiedene pigmentbildende Erreger mit ihren Erkrankungen charakterisiert.

1.2.1 *Exophiala* Spezies

Exophiala-Spezies sind in der Natur weit verbreitet. Dennoch gehören sie zu den ungewöhnlichen menschlichen Infektionserregern (GARCIA-MARTOS ET AL., 2002). In den letzten Jahren scheinen aber Infektionen durch *Exophiala*-Spezies mit der steigenden Zahl immunsupprimierter Patienten vermehrt aufzutreten. Beispielhaft gelten Patienten nach Transplantation, mit Steroid-Therapie sowie Patienten mit Krebsleiden und AIDS (MYOKEN ET AL., 2003; GARCIA-MARTOS ET AL., 2002).

Zu den häufigsten Erkrankungen zählen die Phaeohyphomykose, die Chromoblastomykose, das eumykotische Mycetom sowie ausgedehnte systemische Infektionen.

Die Phaeohyphomykose zählt zu den opportunistischen Mykosen. Zu Ihnen gehören Mykosen, bei denen der Pilz im Gewebe melanisierte Filamente ausbildet (DE HOOG, 1997). Die Erkrankung kann oberflächlich in Haut- oder Unterhautgewebe, in den Nasennebenhöhlen sowie im Gehirn vorkommen. Im schwarz verfärbten Gewebe stellt sich eine Papel oder Zyste dar, die eventuell von einer sekundären Ulzeration begleitet werden kann. Im histologischen Bild zeigt sich die Subkutis mit Granulomen, Abszessen oder Zysten sowie die Hyphen des Pilzes. Der Phaeohyphomykose geht meist ein Trauma voraus. Als Erreger gelten nicht nur *Exophiala*-Spezies wie z.B. *Exophiala jeanselmei*, *spinifera* und *dermatitidis*, sondern auch andere Schwärzepilze wie *Phialophora*-, *Aureobasidium*-, *Cladosporium*- und *Alternaria*-Spezies (BRAUN-FALCO ET AL., 1997). Nach DE HOOG (1998) sollte der Begriff Phaeohyphomykose allerdings rein deskriptiv ohne biologische Bedeutung aufgefasst werden.

Die Chromoblastomykose (Synonym: Dermatitis verrukosa) gehört zu den subkutanen Mykosen. Meist kommt sie in den Tropen und Subtropen, sehr selten in Europa vor. Die Pilze gelangen durch Verletzungen in die Haut, wobei Hände und Füße Prädilektionsstellen bilden (besonders bei der barfußgehenden Bevölkerung). Im Verlauf der Erkrankung entwickeln sich derbe Knoten, die sich entweder zu flächenhaft verhornenden Warzen ausbilden, blumenkohlartig wuchern oder geschwürartig zerfallen. Kommt es zu einer tumorartigen Verdickung, ist die Behandlung langwierig (6-12 Monate) oder nur noch chirurgisch möglich (BRAUN-FALCO ET AL., 1997). Histologisch zeigt sich neben granulomatöser, abszedierender und fibrosierender Entzündung auch eine pseudoepitheliomatöse Hyperplasie der Epidermis. Generalisierung unter Beteiligung der inneren Organe ist nicht beobachtet worden. Als Erreger gelten neben *Exophiala*-Spezies auch *Cladosporium*- sowie *Phialophora*-Spezies.

Das Mycetom (Synonym: Madurafuß, Maduramykose) gehört zu den subkutanen Mykosen. Es zeigt sich eine lokale chronische Infektion meist der Füße und Unterschenkel, seltener der Hände und anderer Körperstellen, die die Haut, subkutanes Gewebe und eventuell den Knochen durchsetzt. Die Erkrankung findet sich meist in den Tropen und Subtropen durch Inokulation beim Barfußlaufen, aber auch in Europa (Rumänien, Bulgarien). Es erscheint eine tumorartige deformierende Schwellung sowie Fisteln mit trübeitrigem Sekret, welches Drusen enthält. Als Erreger gelten Bakterien wie *Actinomyces israelii* sowie Pilze (*Exophiala*-Spezies). Eine Generalisation ist selten. Die Therapie ist bei Pilzinfektionen schwierig. Oft bleibt nur die Amputation (HOF ET AL., 2003).

1.2.2 *Exophiala dermatitidis* (vormals: *Wangiella dermatitidis*)

Bei den Schwärzepilzen ist *Exophiala dermatitidis* am häufigsten an Infektionen des Menschen beteiligt (DE HOOG ET AL., 2005). Er begegnet uns in (sub)kutanen Läsionen traumatischen Ursprungs (Mycetom, Chromoblastomykose und Phaeohyphomykose) sowie als systemische und disseminierte Infektion (MYOKEN ET AL., 200; DE HOOG ET AL., 2005). Des weiteren ist er als asymptomatischer

Kolonisierer der Lungen bei Mukoviszidose-Patienten bekannt (HORRÉ ET AL., 2004, HAASE ET AL., 1990).

Auf der Suche nach einer Infektionsquelle wurde von MATOS ET AL. 2002 herausgefunden, dass *Exophiala dermatitidis* oft in türkischen Dampfbädern zu finden ist. Die Zellzahl ist dort bemerkenswert hoch, obwohl noch nie über die Übertragung durch Luft oder Dampf berichtet worden ist (DE HOOG ET AL., 2005). Eine weitere interessante Fähigkeit von *Exophiala dermatitidis* wird in der Präsenz des Pilzes im Darmtrakt gesehen. Er ist fähig, im Darm prädisponierter Patienten für lange Zeit zu bleiben und kann nur in Phasen von Durchfallerkrankungen in ausreichenden Zellzahlen entdeckt werden (DE HOOG ET AL., 2005). Hierbei ist es bemerkenswert, dass alle isolierten Stämme vom Genotyp A waren. Genotyp B scheint lediglich in der Umwelt lokalisiert zu sein. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. de Hoog führt zur Klärung dieser Frage ein Forschungsprojekt „The origin of pathogenicity of black yeasts: animal-associated natural life cycle and host shift of *Exophiala dermatitidis* in Thailand“ durch.

Bei Infektionen des ZNS konnte ebenfalls nur Genotyp A isoliert werden (DE HOOG ET AL., 2005; KANTARCIOĞLU ET AL., 2004). In diesen Fällen können mehrere Formen unterschieden werden: a) Infektion des Cerebrums, b) Ausdehnung der Infektion von anliegenden Höhlen ins Gehirn, c) Befall des Liquors oder d) Meningitis. Die meisten dieser Infektionen verliefen tödlich. Durch die Konzentrierung dieser Fälle auf Ostasien wird eine genetische Veranlagung vermutet (KANTARCIOĞLU ET AL., 2004).

Exophiala dermatitidis scheint ebenfalls fähig zu sein, in jungen und gesunden Patienten granulomatöse Läsionen mit einer großen Anzahl mehrkerniger Riesenzellen, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten auszulösen (KANTARCIOĞLU ET AL., 2004).

Bei Patienten mit Mukoviszidose (CF) liegt ein erhöhtes Risiko pulmonaler Kolonisation durch opportunistische Mikroorganismen vor (HORRÉ ET AL., 2004), wie z.B. *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* und *Exophiala dermatitidis*. Obwohl er als asymptomatischer Kolonisierer gilt, sind Pneumonien bei CF-Patienten durch *Exophiala dermatitidis* bekannt (KUSENBACH ET AL., 1992). Behandlungen mit Glukokortikoiden, Antibiotika-Gaben und Mangelernährung verstärken das Risiko für diese Erkrankung. Des weiteren wird auch in diesen Fällen eine genetische Disposition vermutet (HORRÉ ET AL., 2004, KANTARCIOĞLU ET AL., 2004).

Zwischen 1990 und 1992 wurden diese Lungeninfektionen mit *Exophiala dermatitidis* zum ersten Mal beobachtet (HORRÉ ET AL., 2004, KUSENBACH ET AL., 1992). Mit einem neuartigen Kultivierungsmedium, dem Erythritol-Chloramphenicol-Agar (ECA), wurde eine effektive Diagnostizierungsmöglichkeit geschaffen (DE HOOG ET AL., 1993). Seit dieser Zeit wurde der Pilz in höheren Zahlen in Sputumproben von CF-Patienten gefunden (HORRÉ ET AL., 2004).

Obwohl die meisten orofazialen Pilzinfektionen in immunsupprimierten Patienten Candidosen sind, wird mit steigenden Zahlen über Infektionen anderer Art berichtet. Auch *Exophiala dermatitidis* verursachte bei einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie eine nekrotisierende Stomatitis (MYOKEN ET AL., 2003). Hierbei bildete sich am Gaumen ein nekrotisierendes Ulkus von 1,4 cm Durchmesser, welches durch eine graue Pseudomembran abgedeckt und von einem schwarzen Rand umgeben war. Lokale Exzision mit adäquaten Antimykotika konnte basierend auf einer frühen Diagnose zu einer Heilung führen.

1.2.3 *Aureobasidium pullulans*

Die Gattung *Aureobasidium* umfasst 14 Arten, von denen *Aureobasidium pullulans* („Schwarze Hefe“) die größte klinische Relevanz besitzt (BOLIGNANO ET AL., 2003; HOFFMAN-LA ROCHE, 1989). *Aureobasidium pullulans* wurde in der Literatur aufgrund seiner großen morphologischen Variabilität unter mehr als 50 Synonymen beschrieben (SALKIN ET AL., 1986). Seine Kolonien sind weit verbreitet und nicht nur in der Luft, im Staub, im Wald und auf Früchten und Samen zu finden, sondern auch im häuslichen Umfeld wie Farbanstrichen und Tapeten (BOLIGNANO ET AL., 2003; LANGFELDER ET AL., 2003). Als gefürchteter Materialzerstörer von Innenräumen ist er häufig Auslöser von Allergien (LANGFELDER ET AL., 2003; TOROK ET AL., 1981). Dabei ist er oft im Aerosol von Klimaanlage nachweisbar und führt so zu Lungenerkrankungen (BAUR ET AL., 1992). In einem Fall wurden zusätzlich zu einer hypersensitiven Pneumonitis auch Läsionen der Schleimhaut wie intraorale Aphten gefunden (WADA ET AL., 1996).

Gewöhnlicherweise kolonisiert er beim Menschen Haare, Haut und Nägel und zählt deshalb zu den Erregern von Phaeohyphomykosen, Keratomykosen, eumykotischer Dermatitis, Chromoblastomykose und Keloid-Blastomykose, aber auch von Septikämien und peritonealer Sepsis (BOLIGNANO ET AL., 2003; HOFFMANN-LA ROCHE, 1989; REDONDO-BELLON ET AL., 1997; VERMEIL ET AL., 1971).

Die Fälle von systemischen Infektionen waren meist nur bei immunsupprimierten Patienten zu finden (BOLIGNANO ET AL., 2003; KACZMARSKI ET AL., 1986). Es wurden wenige Fälle einer Peritonitis beschrieben und in einem Fall konnte *Aureobasidium pullulans* aus einem Abszess der Milz isoliert werden (SALKIN ET AL., 1986). Im Allgemeinen gelten Infektionen, bei denen *Aureobasidium pullulans* aus dem Blut zu isolieren ist, als ungewöhnlich. BOLIGNANO ET AL. beschrieben 2003 einen Fall einer ausgedehnten nosokomialen Infektion durch *Aureobasidium pullulans var melanigenum* bei einem Patienten mit Polytrauma nach einem Verkehrsunfall. Sie gelten ansonsten als Rarität.

1.2.4 *Natrassia mangiferae* (vormals: *Hendersonula toruloidea*)

Synanamorph: *Scytalidium dimidiatum*

Natrassia mangiferae ist in vielen tropischen und subtropischen Ländern weltweit beschrieben worden. Meist ist er in der Nähe von Bäumen, wie Walnuss, Eukalyptus, Ficus, Arbutus oder Zitrus zu finden (FARR ET AL., 1989). Der Pilz löst in diesen Wirten eine endemische Erkrankung aus, die in Zusammenhang mit bekannten Patientenfällen zu stehen scheint. Hierbei wird eine direkte Übertragung von den Pflanzen auf den Menschen vermutet; die Übertragung von Mensch zu Mensch wird ausgeschlossen (WILLINGER ET AL., 2004).

Literaturübersichten bezüglich *Natrassia mangiferae*- und *Scytalidium*-Spezies-Infektionen wurden von FRANKEL UND RIPPON (1989) sowie von MOORE (1992) vorgenommen. Das klinische Bild reicht von Onychomykosen, Tinea pedis, verruköser Dermatitis, Mycetomen und subkutanen Abszessen bis hin zu Gesichtsläsionen und Enophthalmitis nach vorausgegangenen Traumen (DHINDSA ET AL., 1998; SIGLER ET AL., 1997; MARIAT ET AL., 1978).

Das klinische Bild der Tinea pedis ähnelt dem des Fußpilzes *Trichophyton rubrum* (GREER ET AL., 1987).

Ausgedehnte Infektionen sind selten. Es existieren nur wenige Berichte darüber. 2004 erschien von WILLINGER ET AL. ein erster Bericht eines Patienten nach Nierentransplantation mit ausgedehnter Infektion durch *Nattractia mangiferae*, der an schwarzen granulomatösen Hautläsionen, Lungeninfiltraten, inflammatorischer Destruktion der Rippen und Spondylodiscitis litt. Eine prominente granulomatöse Läsion des großen Zehs wurde als die erste Hautläsion gedeutet und als Eintrittspforte vermutet.

Auch bei *Nattractia mangiferae* steht die Erkrankung in einem klaren Zusammenhang mit einem defekten Immunsystem (WILLINGER ET AL., 2004; SIGLER ET AL., 1997; MARIAT ET AL., 1978). Diabetes mellitus und Organtransplantationen werden in diesem Zusammenhang angegeben.

1.2.5 Aspergillus terreus

Aspergillus terreus gilt hinter *Aspergillus fumigatus* als zweithäufigster Auslöser der invasiven Aspergillose (IA), einer Erkrankung, die als häufigster Grund von Erkrankungen und dem Versterben immunsupprimierter Patienten gilt (HACHEM ET AL., 2004). Ursachen des defekten Immunsystems werden hier mit 84% die Leukämie und mit 40% die Knochenmarkstransplantation angegeben. Invasive Aspergillosen durch *Aspergillus terreus* zeigen sich mit höherer Frequenz bei Patienten mit Neutropenien. Nosokomiale Ursachen der Infektion sind bei dieser Spezies signifikant höher als bei *Aspergillus fumigatus* ($p=0,03$) (HACHEM ET AL., 2004).

Obwohl Pilzinfektionen, die das Herz betreffen, selten sind, werden sie durch die vermehrte Verwendung von künstlichen Herzklappen immer öfter beobachtet. Diese Infektionen stellen sich als Myokarditis, Endokarditis und intrakardialen Pilzmassen dar (ALVAREZ ET AL., 2004). Die *Aspergillus*-Endokarditis ist eine opportunistische

Infektion, die gewöhnlicherweise aufgrund der schwierigen Diagnose und Behandlung tödlich endet.

Das Aspergillom ist die nichtinvasive Form der Aspergillose und kann sich selbst in gesunden Patienten entwickeln. In diesen Fällen zeigt sich ein destruktiver Prozess, ähnlich wie bei Leukämien, der meist das Herz betrifft (ALVAREZ ET AL., 2004). Lungenaspergillome sind eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung, die durch Besiedlung der Lunge oder der Pleurahöhle überwiegend durch *Aspergillus fumigatus* hervorgerufen werden. In diesen Fällen kann es zur Hämoptoe oder sogar zu lebensgefährlichen Blutungen kommen (SCHULTE ET AL., 2005).

Trotz dieser Tatsache ist auch ein atypisches Isolat von *Aspergillus terreus* als Erreger eines bilateralen Lungenaspergilloms von KHAN ET AL. beschrieben worden (KHAN ET AL., 2000).

Interessanterweise zeigen Patienten mit *Aspergillus terreus*-Infektionen eine höhere Resistenz gegen Amphotericin B als *Aspergillus fumigatus*, *flavus* und *niger* (HACHEM ET AL., 2004). Diese Tatsache macht es nötig, die verschiedenen *Aspergillus*-Spezies diagnostisch vor der Behandlung zu unterscheiden (STEINBACH ET AL., 2004). Es existieren zwar nur begrenzte klinische Daten, dennoch wird eine größere Todesrate bei *Aspergillus terreus* als bei den anderen *Aspergillus*-Spezies angegeben. Eine retrospektive Analyse von 83 Fällen zwischen 1997 und 2002 von STEINBACH ET AL. (2004) gab die Frequenz einer *Aspergillus terreus*-bedingten Infektion mit 3 bis 12,5%, die Todesrate mit 66,3% an.

1.2.6 *Schizophyllum commune*

Schizophyllum commune wurde zunächst als nicht-pathogen angesehen. Der als gewöhnlicher Waldpilz, als gemeiner Spaltblättling, bekannte Pilz wurde erst 1989 als humanpathogener Pilz erwähnt, als der erste Fall einer allergischen bronchopulmonaren Mykose beschrieben wurde (HOSOE ET AL., 1999). Hier wurde *Schizophyllum commune* aus einem Bronchus isoliert. Er ist weltweit verbreitet und gilt als destruktiver Mykoparasit oft auf hölzernem Untergrund (TZEAN ET AL., 1978).

Es wird angenommen, dass Patienten mit chronischen Erkrankungen der Nasennebenhöhlen häufiger von Infektionen mit *Schizophyllum commune* betroffen

sind (BUZINA ET AL., 2003). Des Weiteren wurde dieser Pilz bei Diabetikern, bei AIDS-Patienten und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gefunden (ROH ET AL., 2005; MARLIER ET AL., 1993). Im Allgemeinen lösen diese Isolate Erkrankungen im Bereich der Luftwege aus. Beschrieben wurden chronische Sinusitiden und chronische Pneumonien (MARLIER ET AL., 1993; BUZINA ET AL., 2003; KAWAYAMA ET AL., 2003). 1999 wurde von HOSOE ET AL. ein Zusammenhang zwischen einem von dem Pilz gebildeten Indolderivat, dem Schizocommunin, und der Zytotoxizität auf murinen Lymphom-Zellen nachgewiesen.

Diese Zytotoxizität wurde als ein möglicher Pathogenitätsfaktor bei allergischen bronchopulmonalen Mykosen vermutet.

1.2.7 *Trichosporon* Hefen

Trichosporon-Hefen finden sich gewöhnlich im Erdreich und nur gelegentlich als Bestandteil der residenten Flora, wobei vom menschlichen Körper isolierte Stämme selten in der Umwelt vorkommen und umgekehrt (GUÈHO ET AL., 1992). Außer der weißen Piedra finden sich nur wenige Hinweise in der dermatologischen Literatur auf superfizielle Mykosen durch *Trichosporon*-Hefen. Die Trichomycosis nodularis ist charakterisiert durch weiche, schleimige, leicht ablösbare, weiß-grüne bis leicht bräunliche Knoten an den Haaren, insbesondere der Genitalregion und des Bartes, seltener an Kopfhaaren, Brauen und Wimpern (KALTER ET AL., 1986; LASSUS ET AL., 1982). *Trichosporon inkin*, *ovoides*, *asteroides* und *cutaneum* wurden in diesen Fällen von oberflächlichen Hautinfektionen isoliert. *Trichosporon mucoides* zeigte sich dabei gehäuft bei Zehnnagelmykosen (MAYSER ET AL., 1996). Mitunter lösten alle genannten Spezies Fälle mit systemischen Mykosen aus. Es handelte sich meist um Katheter-assoziierte Infektionen (MARTY ET AL., 2003).

Tiefe Mykosen durch Hefen der Gattung *Trichosporon* (Trichosporonose) werden in der heutigen Zeit mit wachsender Anzahl von Organtransplantationen, Zytostatika-Behandlungen und AIDS-Infektionen gehäuft beobachtet (KAMALAM ET AL., 1988; HERBRECHT ET AL., 1982;). Hier sind es vornehmlich *Trichosporon asahii* und seltener

Trichosporon mucoides, die isoliert werden. *Trichosporon loubieri* erwies sich erst kürzlich bei einem Patienten nach Nephrektomie als Erreger humaner Infektionen (MARTY ET AL., 2003; PADHYE ET AL., 2003).

Trichosporonosen können lokalisiert oder disseminiert auftreten, wobei klinische Erscheinung und Prognose erheblich voneinander abweichen. Bei Befall der Einzelorgane sind lokale Ursachen vorhanden wie beispielsweise eine Entzündung des Auges nach chirurgischem Eingriff. Disseminierte Formen treten insbesondere bei hämatologischen Grundleiden wie bei der akuten myeloblastischen Leukämie auf (HERBRECHT ET AL., 1993).

1.2.8 *Geotrichum capitatum*

(vormals *Trichosporon capitatum*; jetzt *Blastoschizomyces capitatus*)

Infektionen mit *Geotrichum capitatum* sind selten und ebenfalls auf Patienten mit defektem Immunsystem beschränkt. Durch Unterdrückung der normalen Mikroflora wird es dem Pilz ermöglicht, durch verschiedene Eintrittspforten in den Wirt einzudringen. Hierbei werden der Darm- sowie der Respirationstrakt vermutet (FOUASSIER ET AL., 1998). Auch tiefe und lange Neutropenien werden als kritische prädisponierende Faktoren für *Geotrichum capitatum*-Infektionen gesehen (CHRISTAKIS ET AL., 2005).

Die durch den Pilz hervorgerufenen Läsionen verteilen sich im Körper auf verschiedenste Organe und rufen systemische invasive Infektionen hervor (CHRISTAKIS ET AL., 2005). Ein Patient zeigte neben Lungeninfiltraten auch Mycetom-ähnliche Kavitäten sowie Merkmale einer fokalen Hepatitis (MARINO ET AL., 1990). Daneben können auch die Milz, das Pankreas und die Nieren betroffen sein (COFRONCESCO ET AL., 1995; HERBRECHT ET AL., 1992). SCHIEMANN ET AL. beschrieb 1998 einen Fall einer akuten myeloischen Leukämie, bei dem der Patient an akutem Nierenversagen verstarb. Es wurde angenommen, dass durch die Hyphen die Glomeruli verlegt wurden (SCHIEMANN ET AL., 1998).

Geotrichum capitatum kann ebenfalls Läsionen ähnlich denen des *Varizella-Zoster*-Virus verursachen. Er löst papulo-vesikulöse Effloreszenzen auf der Kopfhaut, im Gesicht und am Rumpf aus (HUANG ET AL., 2004).

Behandlungswege sowie Prophylaxemaßnahmen sind für *Geotrichum capitatum*-Infektionen noch nicht etabliert. Die Prognose gilt mit einer Letalität von 75% als sehr schlecht (FOUASSIER ET AL., 1998).

In einer retrospektiven Studie über Trichosporonosen in Italien in den letzten 20 Jahren bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen stellten sich 35 von 52 Fälle als *Geotrichum capitatum*-Infektionen heraus. Diese Infektionen scheinen sich in Europa besonders in speziellen Gebieten des Mittelmeerraumes zu manifestieren, wohingegen *Trichosporon*-Spezies sich auf alle Länder zu verteilen scheinen (GIRMANIA ET AL., 2005).

2. Hintergrund und Fragestellung

Diverse phylogenetisch weit entfernte Pilze (*Malassezia*- und *Candida*-Hefen) können auf einem Minimalagar bei der Gabe von Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle zur Bildung von Pigmenten und Fluorochromen angeregt werden (MAYSER ET AL., 1998; WENZEL ET AL., 2005). Diese zeigen sich durch braune Verfärbung des Nährbodens sowie gelblich-grüner Fluoreszenz im UV-Licht. Bei den bisherigen auf diesem Sachverhalt basierenden Studien wurden die gebildeten Sekundärmetabolite als komplexe Indolderivate identifiziert (siehe 1.1.2). Sie könnten zur Klärung der Pathogenese der Pityriasis versicolor beitragen. Es stellte sich daher die Frage, ob weitere Pilze ebenfalls zu diesem Stoffwechselweg in der Lage sind. Darüber hinaus sollte in dieser Studie untersucht werden, ob mit Hilfe der Pigmentbildung weitere Hinweise zur Pathogenese anderer Mykosen gefunden werden können.

Mit der Auswahl der verschiedenen Pilz-Spezies für diese Untersuchung wurde zum einen versucht, ein breites Spektrum an gebildeten Pigmenten zu erreichen. Zum anderen wurden solche Pilze ausgewählt, die eine unterschiedliche Wuchsform (Hefen, Hyphen, Dimorph) zeigen. Des Weiteren wurden phylogenetisch weit entfernte Pilze gewählt, um mögliche evolutive Zusammenhänge feststellen zu können. Aus diesem Grund richtete sich die Auswahl der verwandten Pilze nicht nur nach der Einteilung phylogenetisch verwandter und klinisch relevanter Pilze, sondern auch nach Hinweisen auf Pigmentbildung in der Literatur.

Die *Trichosporon*-Hefen gehören zur gleichen Familie wie die *Malassezia*-Hefen und wurden so Bestandteil dieser Untersuchung (Basidiomyceten; Ständerpilze).

Geotrichum capitatum wurde erst in den 80er Jahren zur Spezies *Geotrichum* (Ascomycet) reklassifiziert. Bislang gehörte er ebenfalls dieser Familie an.

Schizophyllum commune gehört ebenfalls zur Gruppe der Basidiomyceten. Bei diesem Pilz ist bereits seit HOSOE ET AL. (1999) bekannt, dass er in der Lage ist, indol-haltige Substanzen zu synthetisieren. *Schizophyllum commune* bildet keine

Hefeform wie die bisher genannten Pilze aus. Er lässt so Aussagen zu, ob die Wuchsform Auswirkungen auf die Pigmentbildung hat.

Eine ganz andere Art der Pigmentbildung ist von den Schwärzepilzen (Dematiaceae) bekannt. Ihr Name stammt von der (1,8-Dihydroxynaphthalen-)Melanin-Einlagerung in der Zellwand dieser Pilze (DIXON ET AL., 1991), welches mittels Polyketidsynthesen synthetisiert wird. Schwärzepilze sind polymorph wachsende Pilze, die sowohl als Hefe- als auch als Hypheform wachsen können (DE HOOG ET AL., 1994). Dieser Polymorphismus ermöglicht weitere Untersuchungen, ob die Wuchsform Auswirkungen nicht nur wie bereits bekannt auf die Pathogenität, sondern auch auf die Pigmentbildung hat. Die Zugehörigkeit zu den Ascomyceten (Schlauchpilze) ermöglicht zusätzlich, Rückschlüsse auf evolutive Zusammenhänge zu ziehen.

Aspergillus terreus zeigt bereits auf einem von unserem Untersuchungsmedium verschiedenen Agar (Kimmig-Agar) eine Pigmentierung und führte uns zu der Frage, ob es sich bei dieser Pigmentierung ebenfalls um Indolderivate handelt oder ob verschiedenartige Stoffwechselwege vorliegen.

Aus diesem Sachverhalt konnten folgende Fragestellungen abgeleitet werden:

- 1) Sind weitere Pilz-Spezies in der Lage, auf dem verwendeten Minimalagar Pigment zu bilden?
- 2) Ist jede braune Pigmentbildung auf dem Tryptophan-Medium eine Indolverbindung?
- 3) Wenn sich diese Pigmente als Indolverbindungen herausstellen,
 - a. Können sie als Pathogenitätsfaktor fungieren?
 - b. Sind nur Pilze, die in Hefeform wachsen, fähig, diese Indolverbindungen zu synthetisieren?
 - c. Sind evolutive Zusammenhänge zwischen den Pigmentbildnern festzustellen?

3. Material und Methoden

3.1 Anzucht und Kultur

3.1.1 Verwendete Isolate

3.1.1.1 Basidiomyceten

3.1.1.1.1 Klasse: Hymenomyceten; Ordnung: Tremellales

Es wurden die folgenden *Trichosporon*-Isolate des Centraalbureaus voor Schimmelcultures (Utrecht, the Netherlands) verwendet (vergleiche Tabelle 1). Die Patientenkulturen stammen aus dem Gut des Zentrums für Dermatologie der Justus-Liebig-Universität Giessen. Es handelt sich dabei um Wildstämme, deren Zuordnung zur Spezies *Trichosporon* durch ITS-Sequenzierung (Prof. Haase, Aachen) bestätigt wurde. Eine exaktere Zuordnung liegt nicht vor:

Tab. 1 Verwendete *Trichosporon*-Isolate

Name	CBS-Nummer	Patientennummer
<i>Trichosporon asteroides</i>	2481	
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2480	
<i>Trichosporon loubieri</i>	2114	
<i>Trichosporon</i> - Spezies		24a/04
<i>Trichosporon</i> - Spezies		34
<i>Trichosporon ovoides</i>	7612	
<i>Trichosporon asahii</i>	2479	
<i>Trichosporon inkin</i>	7655	
<i>Trichosporon mucooides</i>	7626	
<i>Trichosporon debeummanianum</i>		32
<i>Trichosporon</i> - Spezies		P2145

3.1.1.1.2 Klasse: Hymenomyceten; Ordnung: Stereales

Das verwendete Beispiel der Spezies *Schizophyllum commune* wurde am Botanischen Institut der Universität Tübingen durch PD Dr. Begerow sequenziert.

3.1.1.2 Ascomyceten

3.1.1.2.1 Klasse: Hemiascomyceten; Ordnung: Saccharomycetales

Geotrichum capitatum, als Vertreter der Familie der Dipodascaceae, entstammt dem Patientengut des Zentrums für Dermatologie der Justus-Liebig-Universität Giessen. Dessen Identität wurde ebenfalls durch Prof. Haase (Aachen) mittels Sequenzierung bestätigt.

3.1.1.2.2 Klasse: Euascomyceten; Ordnung: Eurotiales

Aspergillus terreus als Vertreter der Familie der Trichocomaceae stammt aus Tübingen und wurde dort sequenziert.

3.1.1.2.3 Klasse: Euascomyceten; Ordnung: Chaetothyriales

Die Vertreter der Familie der Herpotrichiellaceae setzen sich aus verschiedenen Spezies der sogenannten „Schwärzepilze“ zusammen (vergleiche Tabelle 2). Sie wurden von Prof. Haase, Aachen sequenziert. Die mit „*“ gekennzeichneten Isolate stammen aus dem Patientengut des Zentrums für Dermatologie der JLU Giessen und wurden ebenfalls sequenziert.

Tab.2 Verwendete Schwärzepilze

Name	Herkunft	Referenz	Patientennummer
<i>Alternaria alternata</i>	Hornhautgewebe Augen- klinik, Uni Aachen		P2027
<i>Aureobasidium pullulans</i>		CBS 577.93	P1741
<i>Aureobasidium pullulans</i>		CBS 147.97	P1740
<i>Aureobasidium pullulans</i>		DSM 2404	P1151
<i>Aureobasidium pullulans</i>		CBS 584.75	P1742
<i>Aureobasidium pullulans v. melan.</i>		CBS 699.76	P1744
<i>Cladophialophora boppii</i>	Zehenzwischenraum, Diabetiker		126c/04* P2408
<i>Cladophialophora boppii</i>		CBS 126.86	P1209
<i>Cladophialophora minourae</i>		CBS 987.96	P1359
<i>Exophiala alcalophiala</i>		CBS 520.82	P1003
<i>Exophiala cf. pisciphila</i>	Zehennagel, Diabetiker		1969/04* P2426
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		Mel 2 ATCC 44503	P1112
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		Mel 3 ATCC 44504	P201

<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		Mel 4 ATCC 58058	P914
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		Mel 5 ATCC 58059	P1109
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		Mel 6 ATCC 58060	P1113
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		UAMH 3691	P1814
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp B	CF-Patient, Uni Würzburg		P2065
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp B		CBS 109136	P2432
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		Mel 1 ATCC 44502	P1108
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		CBS 207.35 ¹	P195
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A		CBS 109143	P2429
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp B	Sauna	DH 13223	P2428
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A			P961
<i>Exophiala dopicula</i>		UTMB 1229 T	P109
<i>Exophiala heteromorpha</i>		CBS 463.80	P1022
<i>Exophiala lecanii-cornii</i>		CBS 232.39	P963**
<i>Exophiala lecanii-cornii</i>	Zehennagel, Diabetiker		1975/04* P2427
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>			13105*
<i>Exophiala phaeomuriformis</i> Typ IA	Isolat aus Umgebung Waschbecken		P919
<i>Exophiala</i> Spezies	Zehennagel, Diabetiker		157a/04* P2419
<i>Exophiala</i> Spezies	Zehennagel, Diabetiker		24a/04* P2409
<i>Exophiala spinifera</i>		CBS 899.68	P990
<i>Fonsecaea compacta</i>		CBS 285.47	P960***
<i>Nattractia mangiferae</i>		CBS 204.33	
<i>Phialocephala</i>	Fußsohle, Diabetiker		40b* P2407
<i>Phialophora americana</i>		CBS 273.37	P1002
<i>Phialophora europaea</i>			854/99* P1723
<i>Phialophora europaea</i>	Zehennagel, Diabetiker		29a/04* P2412
<i>Phialophora europaea</i>	Fußsohle, Diabetiker		151b* P2420
<i>Phialophora reptans</i>	Zehennagel, Diabetiker		69a/04* P2413
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>		CBS 313.73	P957
<i>Rhinocladiella similes</i>	Zehennagel, Diabetiker		51a/04* P2414

* Patientengut JLU Giessen

** Type strain *Hormodendrum negronii**** Type strain *Rhinocladiella compacta*

3.1.2 Anzucht und Nährmedien

Die Anzucht der *Trichosporon*- und *Geotrichum*-Hefen sowie der filamentösen Pilze *Aspergillus terreus* und *Schizophyllum commune* erfolgte zunächst auf Pilz-Agar nach Kimmig (Merck, Darmstadt).

Eine typische Zusammensetzung (g/Liter): Peptone e carne 15,0; Natriumchlorid 1,0; D(+)-Glucose 19,0; Agar-Agar 15,0. Zusätzlich Glycerin 5,0 ml.

Die Anzucht der Schwärzepilze erfolgte zunächst auf Selektivagar für pathogene Pilze (SPF; Merck, Darmstadt)

Eine typische Zusammensetzung (g/Liter): Pepton aus Sojamehl 10,0; D(+)-Glucose 10,0; Cycloheximid 0,4; Chloramphenicol 0,05; Agar-Agar 12,5

Er enthält additiv Cycloheximid (Actidione[®]) zur selektiven Darstellung der pathogenen Pilze mit weitgehender Hemmung der unerwünschten Bakterien und Schimmelpilz-Begleitflora.

3.2 Bildung von Pigmenten und Fluorochromen

3.2.1 Kulturbedingungen

Zur Induktion der Pigmentbildung wurde bei der Hefe *Malassezia* ein transparenter Minimalagar verwendet, der um Vitamine, Spurenelemente, Elektrolyte und Kohlenhydrate reduziert wurde und nur noch aus einer Lipidquelle und der Aminosäure Tryptophan besteht. Die in dieser Studie verwendeten Pilze benötigen im Gegensatz dazu Kohlenhydrate zum weiteren Wachstum. Der Minimalagar wurde aus diesem Grund mit Glukose ergänzt.

Die Verwendung von Tween war nicht essentiell für das Wachstum der Pilze. Dessen Anwendung macht den Nährboden lipophiler und bewirkte, dass das Pigment in den Agar diffundiert. Es beschleunigte damit den Prozess der Verfärbung des Nährbodens und erlaubte, Pigmentbildung einfach nachzuweisen.

Zusammensetzung des Pigment-Induktionsmediums (1b-Medium) für die hier verwendeten Spezies:

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

Für die Herstellung von 300 ml Nährboden werden 6 g Agar-Agar und 3 g D(+)-Glucose eingewogen und mit Aqua dest. auf 300 ml aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren bei 1 bar über 30 min (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin) und abkühlen auf etwa 50° C werden 9 ml Tween 80 sowie 0,9 g L-Tryptophan hinzugegeben.

Jeweils 15 ml des Nährbodens wurden unter einer Uniflow Biohazard Laminar Flow Sicherheitsbank (Gerätetyp UVUB1200, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried) in Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegossen. Nach dem Erkalten und Verfestigen des Agars werden die Kulturen mit einem sterilen Tupfer ausgestrichen (Hefen) oder mittels sterilem Skalpell durch Inokulation weiterverimpft (Hyphen).

3.2.2 Screening

3.2.2.1 *Trichosporon*- und *Geotrichum*-Hefen

Um aus der Vielzahl der zu untersuchenden Pilze diese herauszufiltern, welche Pigmente bilden, wurde dem weiteren Vorgehen ein Screening vorgeschaltet.

Die auf Kimmig-Agar angezüchteten Hefen wurden jeweils auf einem 1b-Nährboden mit Tween und einem 1b-Nährboden ohne Tween (zur Kontrolle) mit einem sterilen

Tupfer/Skalpell ausgestrichen und für ca. 5-7 Tage in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 32 °C angezchtet.

Nach dieser Zeit konnten die Pilze auf Pigmentbildung beurteilt werden.

3.2.2.2 Schwärzepilze

Das Screening bei den Schwärzepilzen gestaltete sich je nach Wuchsform der verschiedenen Spezies different. Bei denjenigen Schwärzepilzen, welche nicht in Hefeform, sondern in Hyphenform wachsen, zeigt der Agar nach ca. 2 Wochen einen braunen Hof um die Pilzkultur, die zunächst eine Unterscheidung zwischen Melanin oder einem Pigment anderer Art unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde der Nährboden mit der Pilzkultur zunächst auf Fluoreszenz unter UV-Licht 366 nm untersucht. Hellblaue Fluoreszenz des Agars galt als negativ, da sie auf die Eigenfluoreszenz des Tryptophans im Spezialnährboden zurückzuführen war. Gelbgrüne Fluoreszenz wurde als positiv bewertet und galt als Fluoreszenz der neu gebildeten Pigmente. Melanin als Lichtschutzsystem zeigt keine Fluoreszenzerscheinung.

Von den so voruntersuchten Pilzen wurden jeweils 15-20 Platten des 1b-Nährboden ohne Zusatz von Tween beimpft und bei 32° C für ca. 10-14 Tage im Brutschrank angezchtet. Anschließend wurden die Nährböden der gewachsenen Kulturen mit einem Pürierstab (Quelle, Fürth) fein zerkleinert und zur Pigmentextraktion mit Ethylacetat (Merck) aufgegossen. Nach ca. 4 Stunden wurde das Extrakt auf eine mögliche Färbung hin beurteilt. Es zeigte sich nach dieser Zeit bei den Pilzen, die Pigmente anderer Art bilden, eine Verfärbung des Ethylacetats im gelb-braunen, manchmal sogar rötlichen Bereich. Melanin dagegen ist mit Ethylacetat nicht extrahierbar.

Durch das Verzichten auf Tween ist das gewonnene Pigment-Rohextrakt fettfrei und kann bereits nach dem Abrotieren mit einem Rotationsverdampfer (Typ VVI, Heidolph-Elektro KG, Kehlheim) dünnschichtchromatographisch untersucht werden.

Diejenigen Schwärzepilze, welche in Hefeform wachsen, wurden in der bereits in Punkt 3.2.2.1 beschriebenen Art gescreent.

3.2.2.3 *Aspergillus terreus* und *Schizophyllum commune*

Auch diese Spezies wurden auf den 1b-Minimalagar mit und ohne Tween geimpft und für 5-7 Tage in einem Brutschrank bei 32 °C inkubiert. Anschließend wurden sie auf eine Verfärbung des Agars untersucht.

3.3 Pigmentgewinnung und Aufreinigung

3.3.1 Gewinnung des Rohextraktes

Es wurden ca. 190 1b-Agarplatten (mit Tween) mit „positiv“ getesteten Spezies beimpft und für ca. 4 Wochen lang bei 32 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit zeigte sich in der vorher transparenten Nährbodenschale eine durch die Pigmentbildung begründete durchgehende Verfärbung des Agars. Diese deutliche Verfärbung nahm auch nach weiterer Inkubation nicht mehr an Intensität zu.

Im UV-Licht zeigte sich bei 254 und 366 nm eine deutliche Fluoreszenz im gelbgrünen Bereich.

Der Inhalt dieser Schalen wurde gleich dem Screening der Schwärzepilze mit einem Pürierstab zerkleinert und ebenfalls mit Ethylacetat übergossen. Nach ca. 12 Stunden wurde das Extrakt mittels Glaswolle abfiltriert. Anschließend wurde diese Flüssigkeit mit Aqua dest. in einem Scheidetrichter aufgegossen und gut durchmischt.

Nach kurzer Zeit konnten zwei Phasen getrennt werden: eine obere Ethylacetat-Phase und eine untere schaumige Wasser-Phase, welche ebenfalls Agar- und Fettreste enthielt. Nach der Trennung wurde dem Ethylacetat-Pigment-Gemisch Natriumsulfat zur Bindung des Restwassers beigegeben. Nach wiederholtem Abfiltrieren wurde das Extrakt mit einem Rotationsverdampfer (Typ VVI, Heidolph-Elektro KG, Kehlheim) getrocknet und das hochvisköse Pigment in 96%igem Methanol aufgenommen. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt in Autosampler-Gewindeflaschen (Volumen 1,8 ml) bei -18° C bis zur weiteren Aufreinigung der Pigmente.

3.3.2 Säulenchromatographie

Zunächst wurde das Rohextrakt durch die Säulenchromatographie aufgetrennt. Das Prinzip, welches hier zugrunde liegt, ist die Gelpermeations- und Ausschlusschromatographie. Moleküle unterschiedlicher Größe werden in einer flüssigen (mobilen) Phase durch eine feste (stationäre) Phase geführt. Infolge eines Siebeffektes erfolgt dabei eine Verteilung der Moleküle nach ihrer Größe. Verantwortlich für den Siebeffekt ist die stationäre Phase, die aus einem Gel besteht, dass Poren bestimmter Größe aufweist:

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

Verwendet wurde eine Säule mit einer Nutzlänge von ca. 525 mm (NS29 mit Fritte, Durchmesser 30 mm, Por. 1, PTFE-Küken NS 14/2,5 mm spitz ausgezogen, Fa. Pfeuffer, Hannover). Als Träger diente Sephadex LH 20 (Sigma), ein hydroxypropyliertes Derivat des Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Es wird für die Gelpermeationschromatographie, die Normalverteilungs- und Adsorptionschromatographie von z. B. Lipiden, Steroiden, Fettsäuren, Hormonen und Vitaminen verwendet (HENKE, 1999).

Als Laufmittel diente Methanol, der Fluss betrug etwa 19 ml/min bei Druckaufbau über einen Gummiball (Laufzeit der Säule etwa 130 min, Elutionsvolumen 2500 ml). Das aufgetragene Rohextrakt wurde unter UV-Licht (Desaga GmbH, Heidelberg, Type 131200) von 366 nm Wellenlänge in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Diese Fraktionen wurden in getrennten Glasgefäßen aufgefangen, jeweils zur Trocknung mittels Rotationsverdampfer abrotiert, in etwa 2 ml Methanol wieder aufgenommen und in Autosamplern überführt.

Sephadex LH 20 wurde regelmäßig regeneriert, um verminderte Trenneigenschaften durch Verschmutzung des Gels zu reduzieren. Dabei kamen zwei Methoden zur Anwendung:

Methode A:

Dem Sephadex wird 0,2 N NaOH zugeführt und unter gelegentlichem Schwenken über Nacht inkubiert (keinen Magnetrührer verwenden). Am folgenden Tag wird das NaOH über eine Nusche abgesaugt und das Sephadex mit Aqua dest. bis zum Erreichen des neutralen pH-Wertes gewaschen.

Methode B:

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

3.3.3 Dünnschichtchromatographie

Die einzelnen aus der Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen wurden mit der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60-Platten, Merck) weiter aufgetrennt. Zum Auftragen wurde eine Linomat IV mit folgender Einstellung zur analytischen Trennung der Fraktionen verwendet:

Tab.3 Einstellung des Linomaten für Analytische Trennung der Fraktionen

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

Die Entwicklung der Kieselgelplatten erfolgte in einem Laufmittelgemisch Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 innerhalb von ungefähr 45 min. Die charakteristischen Bandenmuster der jeweiligen Fraktionen erlaubten sowohl die

Überprüfung des nicht immer konstanten Säulenabschnitts, gleichzeitig erleichterten sie in Kombination mit den Rf-Werten die Identifikation der interessierenden Banden.

Nach der Entnahme aus den Laufkammern wurden die Platten unter einem Abzug getrocknet. Anschließend erfolgte die Fotografie mit einem Camag Reprostar 3 (Camag, Muttenz, Schweiz) zum weiteren Verfahren:

Tabelle 4 listet die standardisierte Einstellung des dazu verwendeten „WinCATS“-Programms (Camag, Muttenz, Schweiz) zum Abfotografieren der Dünnschichtplatten auf. Die Bedampfung der Kieselgelplatten mit HCl bzw. NH₃ diente der Überprüfung einer möglichen pH-Abhängigkeit der vorliegenden Banden:

Tab. 4 Einstellung des WinCATS-Programms zum Abfotografieren der Dünnschichtplatten

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

Anhand des Computerprogramms „WinCATS“ erfolgte anschließend die Charakterisierung der einzelnen Banden jeder Fraktion durch die Bestimmung des Rf-Wertes (Rf-Wert: Strecke Start-Fleck/Strecke Start-Lauffront).

Diejenigen Banden, welche vermutlich durch bereits vorausgegangene Untersuchungen bekannte Stoffe enthielten (IRLINGER ET AL., 2004; MAYSER ET AL., 2003; KRÄMER ET AL., 2003; MAYSER ET AL., 2002; MAYSER ET AL., 1998), wurden für weitere Versuche gekennzeichnet. Zur Orientierung diene hierzu Tabelle 5. Ebenfalls wurden weitere interessierende Banden für anschließende Verfahren ausgewählt.

Tab. 5 Auflistung von bereits aus Giessener Studien bekannten neuartigen Indolderivaten (Die Bestimmung des Rf-Wertes erfolgte nach Entwicklung der Kieselgel 60-Platten durch das Laufmittelgemisch Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3)

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

Diejenigen Fraktionen, welche die gewünschte Bande enthielten, wurden mit dem Linomaten zur präparativen Trennung noch einmal aufgetragen. Tabelle 6 listet die Einstellung des Linomaten zur präparativen Trennung der Fraktionen auf:

Tab. 6 Einstellung des Linomaten zur präparativen Trennung der Fraktionen

Plattenbreite	200 mm
Bandbreite	165 mm
Auftragungsgeschwindigkeit	8 sec/ μ l
Startposition	20 mm
Abstand der Banden	0
Volumen	300 μ l
Druck am Hauptventil	> 100 bar
Druck am Reduzierventil	5 bar

Die so präparierte Dünnschichtplatte wurden ebenfalls mit dem o. g. Laufmittel entwickelt.

Anschließend wurde nach Trocknung der Platte die gewünschte Bande mit Bleistift angezeichnet, mit dem Einmalskalpell ausgekratzt, das Kieselgel sorgfältig mit Mörser und Pistill zerkleinert und mit Ethylacetat und Aqua dest. aufgegossen.

Es bildeten sich zwei Phasen: die obere ethylacetathaltige Phase enthielt das gelöste Pigment, die untere wasserhaltige Phase beinhaltete das ausgefallene Kieselgel.

Die obere Phase wurde mittels Einmalpipette abpipettiert und zur Bindung des Restwassers mit Natriumsulfat (Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz) versetzt.

Die Flüssigkeit wurde nun mittels Rotationsverdampfer bis kurz vor der kompletten Trocknung abrotiert. Die nun erhaltene visköse Lösung wurde in Autosampler überführt und unter einem Stickstoffstrom in einem Techne DRI-Block DB (Thermo Dux, Heidelberg) bei 40° C getrocknet.

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

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

3.3.4.1 Präparative HPLC

Durch präparative HPLC können die trotz Vorreinigung noch recht komplexen Sephadex-Säulen-Fractionen (durchschnittlich 5 – 10 Komponenten) über einen Gradienten mit einer LiChrospher-RP8 Säule (Merck, Darmstadt, 30x250mm) mit entsprechender Vorsäule getrennt und in grösseren Mengen rein dargestellt werden. Als Gradientenpumpe diente die Gilson Masterpumpe M305 gekoppelt mit einer Pumpe Gilson Modell 302 (Gilson, USA) mit jeweils einem präparativen 50ml/min Pumpenkopf, gesteuert von einem Gilson 802-Modul. Mittels UV-Detektor (Holochrome, Gilson) erfolgte die Detektion bei 220 nm. Die Chromatogramme wurden mittels XY-Schreiber (LKB, Schweden) aufgezeichnet. Der verwendete lineare Gradient (180 min) lief von 0 – 100 % Acetonitril bzw. 100 – 0 % Wasser (Lösungsmittel sind Gradient Grade von Merck, Darmstadt). Die Flussrate betrug 5 ml/min. In 180 Fractionen von je 5 ml wurden die eluierenden Verbindungen mittels Fractionensammler (Super Frac, Pharmacia Biotech) aufgefangen und anschließend lyophilisiert (Lyovac GT2). Die Fraction wurden nach Chromatogrammverlauf, Farbe und Fluoreszenz kombiniert, lyophilisiert und nach analytischer HPLC eines Aliquots nochmals mittels eines im Verlauf flacheren und gespreizten Gradienten weiter aufgetrennt. Auch hier wurden entsprechende Fractionen vereinigt und erneut lyophilisiert. Anschließend wurde ein Aliquot zur analytischen HPLC verwendet und bei ausreichender Reinheit im Zellkulturversuch eingesetzt bzw. oder per Express unter Stickstoffatmosphäre auf Trockeneis zur Strukturaufklärung an den Kooperationspartner in München (Dr. Spiteller, Institut für Organische Chemie und Biochemie, TU München) geschickt.

3.3.4.2 Analytische HPLC

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

3.3.5 Untersuchung zur Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung isolierter Substanzen erfolgte durch Dr. Peter Spittler, Organ. Chemie und Biochemie II, TU München. Es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

NMR-Spektren [Bruker AMX-600, (^1H : 600.19 MHz, ^{13}C : 150.92 MHz) und ARX-300 (^1H : 300.13 MHz, ^{13}C : 75.47 MHz)], hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) mit Finnigan MAT 90/ MAT 95 Q und IR-Spektrum (Perkin-Almer 1420 oder Bruker IFS 45 FT-IR). Röntgenstrukturanalyse (Enraf-Nonius CAD4), UV-Spektrometrie (Perkin-Almer Lambda 16) sowie Schmelzpunktbestimmung mittels Reichert Thermovar.

Da diese Untersuchungen ausschließlich in München durchgeführt wurden, wird hier auf eine ausführliche Darstellung der dort verwendeten Methoden verzichtet. Verwiesen sei an dieser Stelle auf die Dissertation von Dr. G. Wille (2000).

Pigmentgewinnung und Aufreinigung sind in Abbildung 8 noch einmal schematisch zusammengefasst.

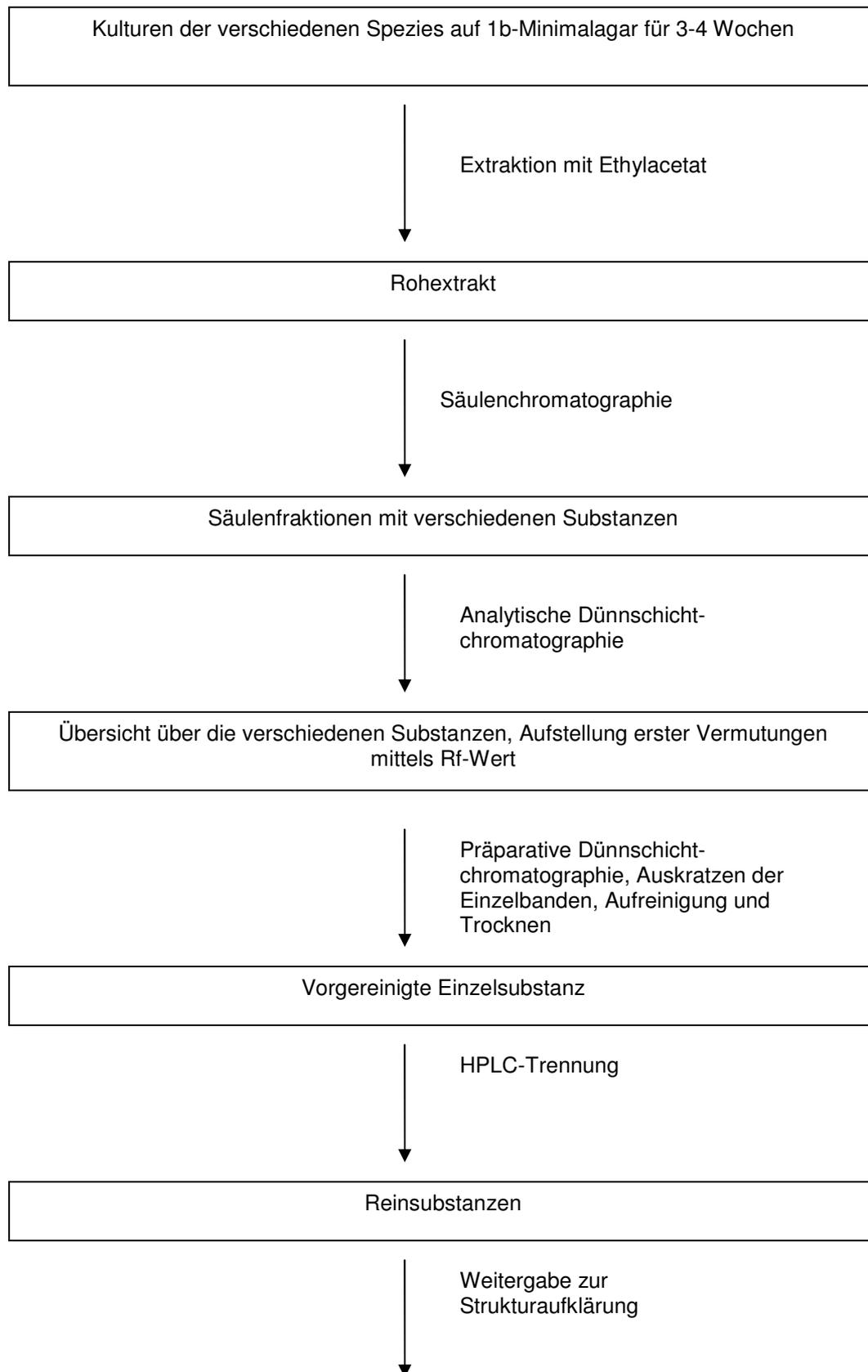


Abb.8 Schematische Zusammenfassung der Pigmentgewinnung und der Aufreinigung

4. Ergebnisse

4.1 Screeningergebnisse

4.1.1 Übersicht

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse des Screenings vereinfacht und zusammenfassend dargestellt. Für eine ausführliche Auflistung der einzelnen Isolate sei auf die Tabellen 10 bis 12 im Anhang verwiesen (siehe Kapitel 9.1).

Tab. 7 Zusammenfassung der Screeningergebnisse

a) Nachgewiesene Nährbodenverfärbung und/oder Pigmentbildung

Pigmentbildung nachweisbar
<i>Trichosporon asteroides</i>
<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>Trichosporon loubieri</i>
<i>Geotrichum capitatum</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Exophiala dermatitidis</i>
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>
<i>Exophiala spinifera</i>
<i>Natrassia mangiferae</i> *
<i>Phialocephala</i>
<i>Schizophyllum commune</i> *
<i>Aspergillus terreus</i> *

* Durch die Hyphenbildung konnte lediglich die Pigmentbildung, nicht aber die Fluoreszenz des Nährbodens nachgewiesen werden.

b) Nährbodenverfärbung und Pigmentbildung nicht nachweisbar

Pigmentbildung nicht nachweisbar
<i>Trichosporon ovoides</i>
<i>Trichosporon asahii</i>
<i>Trichosporon inkin</i>
<i>Trichosporon mucoides</i>
<i>Trichosporon debeummanianum</i>
<i>Alternaria alternata</i>
<i>Cladophialophora boppii</i>
<i>Exophiala minourae</i>
<i>Exophiala alcalophila</i>
<i>Exophiala cf. pisciphila</i>
<i>Exophiala dopicula</i>
<i>Exophiala heteromorpha</i>
<i>Exophiala lecanii-cornii</i>
<i>Fonsecaea compacta</i>
<i>Phialophora americana</i>
<i>Phialophora europaea</i>
<i>Phialophora reptans</i>
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>
<i>Rhinocladiella similes</i>

Aus der Tabelle 7a kann man entnehmen, dass verschiedenste Spezies zur Pigmentbildung fähig sind. Bei den Basidiomyceten sind manche *Trichosporon*-Hefen (*Trichosporon asteroides*, *Trichosporon cutaneum* und *Trichosporon loubieri*) sowie *Schizophyllum commune* in der Lage, Tryptophan zu Pigmenten umzuwandeln. Es hat sich bei dieser Untersuchung herausgestellt, dass neben Basidiomyceten auch Ascomyceten indolhaltige Pigmente bilden können. *Geotrichum capitatum* sowie die „Schwarzen Hefen“ (*Aureobasidium pullulans*, *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala phaeomuriformis* sowie *Exophiala spinifera*) stellten sich als potente Produzenten verschiedenster Substanzen heraus, die erstmals bei *Malassezia furfur* isoliert werden konnten (siehe 1.1.2.6, Seite 4). Auch ein Isolat von *Phialocephala* konnte zur Pigmentbildung angeregt werden.

Tabelle 7b listet die negativ gescreenten Spezies auf. Bei den *Trichosporon*-Hefen erwiesen sich *Trichosporon ovoides*, *asahii*, *inkin*, *mucoides* sowie *debeummanianum* nicht als Pigmentbildner. Auch war eine Fluoreszenz des Nährbodens nicht festzustellen. Des Weiteren konnte bei *Alternaria alternata*, *Cladophialophora boppii*, einigen *Exophiala*-, *Phialophora* und *Rhinocladiella*-Spezies sowie *Fonsecaea compacta* ebenfalls keine Verfärbung des Nährbodens nachgewiesen werden. In diesen Fällen war die Fluoreszenz des Agars ebenfalls nicht nachzuweisen.

Bei den Schwärzepilzen fiel auf, dass fast ausschließlich alle zur Pigmentbildung fähigen Spezies eine Hefeform ausgebildet haben (siehe beispielhaft Abbildung 9). Ihre Nährböden fluoreszierten deutlich im gelb-grün Bereich. Diejenigen, die in Hyphenform gewachsen waren, zeigten meist keine Anzeichen einer Fluoreszenzerscheinung oder Verfärbung des Nährbodens, die auf eine Pigmentbildung hinweisen könnte. Ein brauner Hof, der sich konzentrisch um die Verimpfungsstelle zeigte, ist auf die Melaninbildung der Schwärzepilze zurückzuführen (siehe Abbildung 10).



Abb. 9 Positive Pigmentbildung bei *Exophiala dermatitidis* P 201. Deutliche Verfärbung des Agars sichtbar.

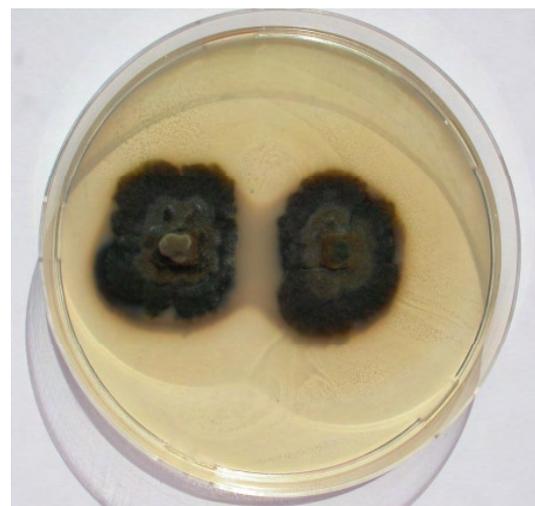


Abb. 10 Keine Pigmentbildung bei *Exophiala dopicula*. Der braune Hof ist auf die Melaninbildung zurückzuführen.

4.2 Strukturaufklärung der gebildeten Substanzen der einzelnen Spezies

4.2.1 *Exophiala*-Spezies

4.2.1.1 *Exophiala dermatitidis*

Zur Untersuchung der Spezies *Exophiala dermatitidis* standen 13 Isolate für das Screening zur Verfügung (siehe Tabelle 2, Seite 22). Sie alle wiesen bereits am zweiten Wachstumstag eine beginnende Verfärbung des Minimalagars auf. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den melaninbildenden Isolaten (1814, 2065, 2432, 1108, 1112, 195, 961, 2429 und 2428) oder den zur Melaninbildung nicht mehr befähigten Mutanten (201, 914, 1109 und 1113) festgestellt werden. Zwischen den Isolaten des Genotyps A und B konnten in Bezug auf die Pigmentbildung zunächst ebenfalls keine Unterschiede festgestellt werden. Des Weiteren konnte bei allen Screening-Nährbodenschalen der o.g. Spezies eine gelb-grüne Fluoreszenz im UV-Licht (366 nm) deutlich beobachtet werden. Darüber hinaus konnte bei den 13 Isolaten eine bemerkenswert hohe Pigmentsyntheseleistung erkannt werden, welche sich durch große Mengen von extrahierbarem Rohextrakt zeigte. Aus 187 beimpften 1b-Nährbodenschalen konnten 32 ml Rohextrakt gewonnen werden. (Im Vergleich: Bei *Aureobasidium pullulans* konnten aus 190 beimpften Nährbodenschalen 10 ml, bei *Trichosporon cutaneum* aus 200 beimpften Nährbodenschalen lediglich 0,4 ml Rohextrakt gewonnen werden.)

Abbildung 11 a) zeigt das dünnschichtchromatographische Bild der unterschiedlichen Fraktionen des Isolates P 201, die nach Durchführung der Säulenchromatographie erhalten wurden. Die einzelnen Fraktionen beinhalten eine Vielzahl von unterschiedlich farbigen Banden. Eine exakte Beschreibung der einzelnen WinCATS-Aufnahmen dieser Chromatographien ist Tabelle 17 (Seite 110) zu entnehmen.

Bei der beobachteten Pigmentbildung wurden zum Nachweis der von MAYSER ET AL. (1998) entdeckten Indolderivate einzelne Banden weiter vorgereinigt. Bei einer gelben Bande des Isolates P 201 mit dem Rf-Wert 0,16 aus der sechsten Fraktion konnte das Indolderivat Pityriacitrin im Vergleich mit der in Tabelle 5 (Seite 31) angegebenen Werte vermutet werden. Es wurde deshalb diese Bande mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (siehe Kapitel 3.3.3, Seite 29)

vorbereitend gesäubert. Bei der sich anschließenden analytischen HPLC betrug die Elutionszeit der gelben Bande 63-64 min. Diese Zeit ist – wie bereits aus den vorausgegangenen Untersuchungen bekannt – charakteristisch für Pityriacitrin, weil die entsprechenden Banden nur wenige oder keine Begleitstoffe enthalten. Darüber hinaus konnten die strukturaufklärenden Spektroskopien der TU München ebenfalls diese gelbe Bande erstmals als Pityriacitrin bei einem Schwärzepilz identifizieren. Die Struktur- sowie die Summenformel ist Abbildung 4 (Seite 6) zu entnehmen.

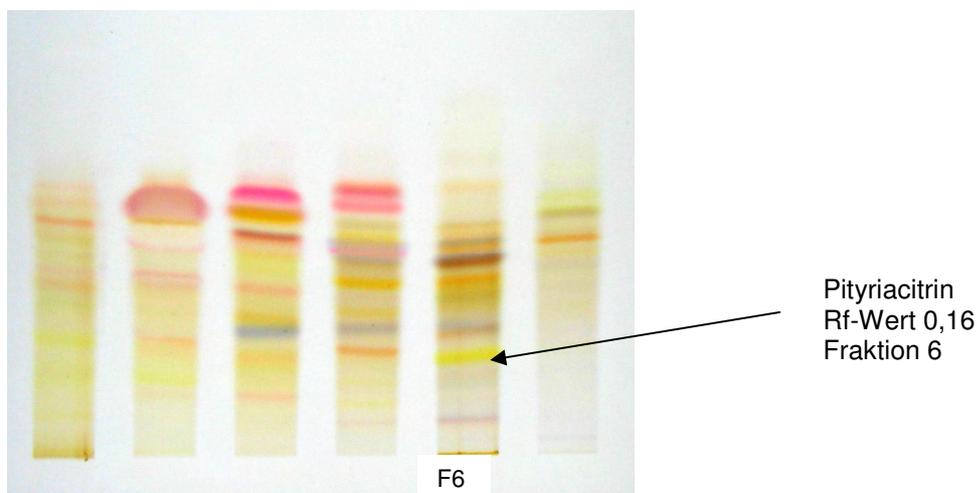


Abb. 11 a) Tageslicht (WinCATS Image 1)

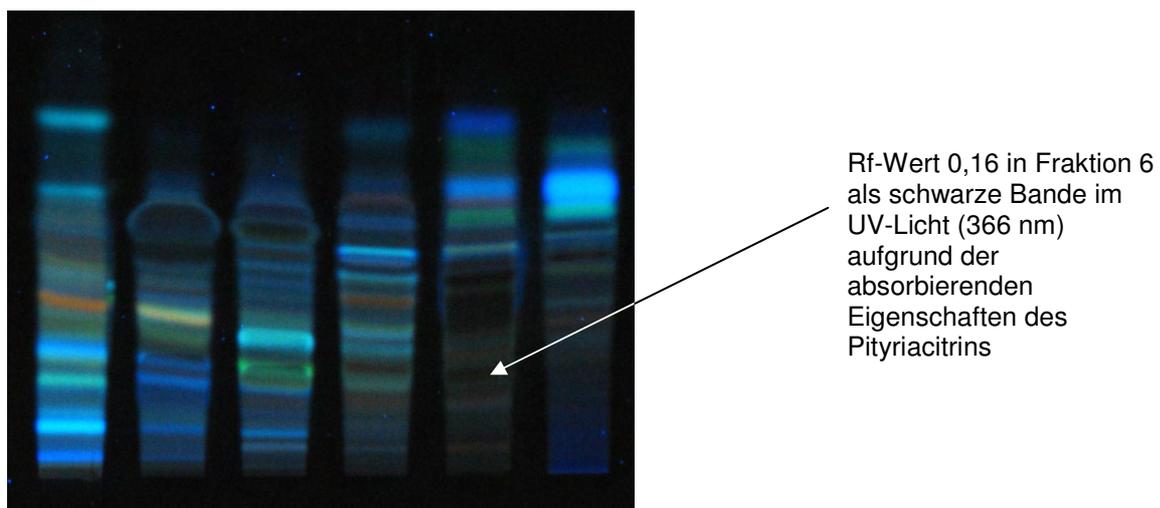


Abb. 11 b) UV-Licht, 366 nm (WinCATS Image 2)

Abb. 11 Darstellung der verschiedenen Banden von *Exophiala dermatitidis* P 201 nach dünn-schichtchromatographischer Aufreinigung; Darstellung der Banden in Tageslicht (a) und im UV-Licht, 366 nm (b), Fraktion 2-7

Abbildung 11 b zeigt bei dem Isolat P201 stellvertretend für alle verwendeten *Exophiala dermatitidis*-Isolate die verschiedenen Fluorochrome, die in den einzelnen Banden enthalten sind, im UV-Licht (366 nm). Fast alle dieser Fluorochrome sind bislang nicht beschrieben.

Abbildung 12 zeigt in gleicher Weise das Dünnschichtbild des Isolates P 914. Auch hier sei für die genaue Beschreibung auf Tabelle 16 (Seite 109) verwiesen. Wiederum sind verschiedenfarbige Banden in den einzelnen Fraktionen erkennbar. Es konnte auch bei P 914 in der vierten und fünften Fraktion durch eben genanntes Procedere eine gelbe Bande mit dem Rf-Wert 0,15 als Pityriacitrin isoliert werden. Dieses Indolderivat wurde ebenfalls mittels HPLC und Massenspektroskopie bestätigt.

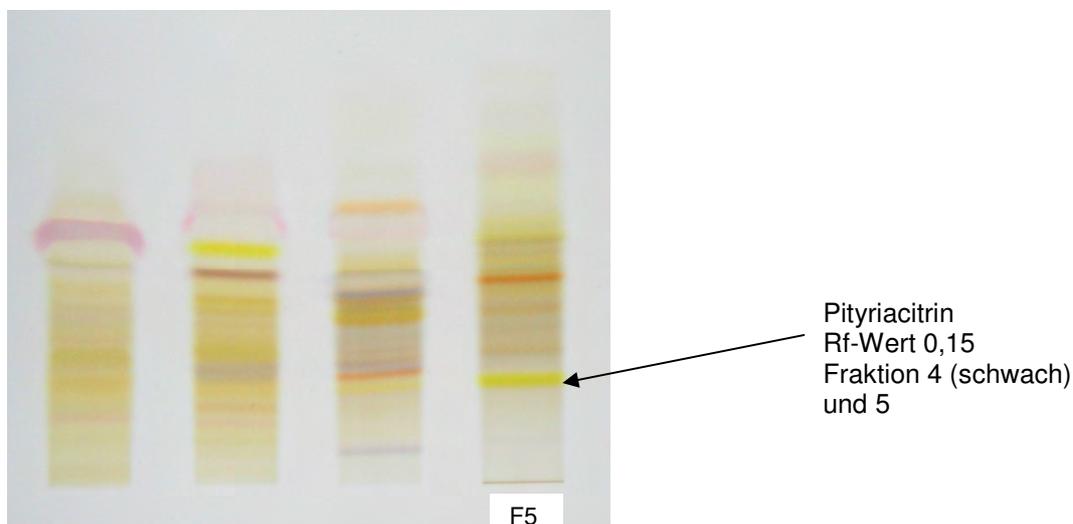


Abb. 12 Darstellung der einzelnen Banden in der Dünnschichtchromatographie von *Exophiala dermatitidis* P 914 (WinCATS Image 1), Fraktion 2-5

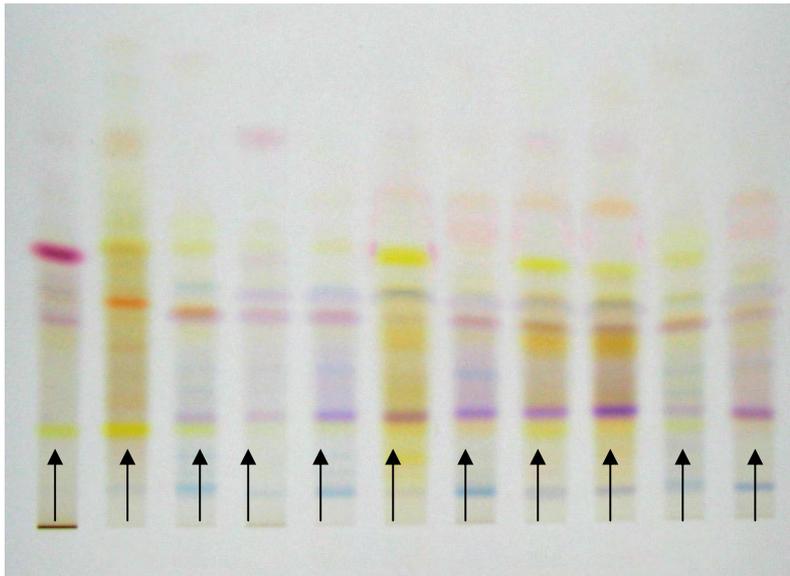
Um nun herauszustellen, ob alle verwendeten 13 Isolate von *Exophiala dermatitidis* Pityriacitrin synthetisieren können, wurden diejenigen Fraktionen der einzelnen Isolate, in welchen das Indolderivat vermutet wurde, nebeneinander auf einer Kieselgelplatte aufgetragen (vergleiche Tabelle 8) und die Dünnschichtplatte in dem beschriebenen Laufgemisch im Verhältnis 10:5:3 (vergleiche Kapitel 3.3.3, Seite 29) entwickelt. Auf das Auftragen des Isolates P 201 wurde verzichtet, da hier das Pityriacitrin bereits nachgewiesen wurde. Das ebenfalls nachgewiesene Pityriacitrin des Isolate P 914 aus der vierten und fünften Fraktion diene bei dieser Untersuchung als Vergleichsstandard.

Tab. 8 Auflistung der Banden der verschiedenen Isolate von *Exophiala dermatitidis*, die für den dünn-schichtchromatographischen Vergleich mit einem nachgewiesenen Pityriacitrin verwendet wurden

Isolat	Fraktion	Rf-Wert	Bemerkung
P 1108	6	0,21	
P 914	4,5	0,15	Vergleichsstandard (Pityriacitrin durch TU München bestätigt)
P 1109	4	0,20	
P 1112	3	0,20	
P 1113	3	0,18	
P 195	3	0,17	
P 2065	4	0,19	
P 2428	3	0,17	
P 2429	3	0,21	
P 1814	5	0,17	
P 2432	4	0,15	

Die Schwankungen der Rf-Werte der einzelnen Isolate sind durch z. T. nicht beeinflussbare unterschiedliche Bedingungen bei der Entwicklung der Kieselgelplatten bedingt (z.B. Temperatur, Luftfeuchtigkeit). Abbildung 13 stellt das Ergebnis dieses Vergleichs dar. In unterschiedlicher Intensität ist eine gelbe Bande (mit ↑ gekennzeichnet) bei jedem dieser Isolate erkennbar. Sie stimmen mit dem Pityriacitrin von P 914 überein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass alle verwendeten 13 Isolate von *Exophiala dermatitidis* Pityriacitrin bilden können. Dabei

spielt es keine Rolle, ob es sich um melaninbildende oder im Melaninsyntheseweg mutierte Isolate handelt. Erstmals konnte so in dieser Studie gezeigt werden, dass auch melaninproduzierende Pilze (Schwärzepilze) zusätzlich den UV-Filter Pityriacitrin bilden können.



Isolat (P):1108 914 1109 1112 1113 195 2065 2428 2429 1814 2432

Abb. 13 Dünnschichtchromatographischer Vergleich von elf *Exophiala dermatitidis* Isolaten zur Darstellung des Pityriacitrins. Für diesen Vergleich wurden jeweils diejenigen Banden der einzelnen Isolate aufgetragen, in denen Pityriacitrin vermutet wurde (WinCATS Image 1). Die Laufstrecken dieser gelben Banden stimmen mit der des Pityriacitrins überein. (Das nachgewiesene Pityriacitrin in P 914 diente als Standard)

Das Isolat P 961 konnte in diesem Vergleich nicht miteinbezogen werden, da es zeitlich verzögert dieser Studie zur Verfügung stand. Stattdessen wurde die sechste Fraktion dieses Isolats (Rf-Wert 0,19) in Abbildung 21 (Seite 50) zusammen mit *Exophiala spinifera* mit einem Pityriacitrin-Standard verglichen. Die Laufstrecken dieser Banden stimmen überein, so dass auch hier von einer Pityriacitrin-Bildung ausgegangen werden kann.

Das Isolat P 1108 weist darüber hinaus auffällige rote Banden auf (vergleiche Abbildung 14, exakte Beschreibung siehe Anhang Tabelle 15). Aus der fünften bzw. sechsten Fraktion wurde eine Bande mit dem Rf-Wert 0,37 durch präparative Dünnschichtchromatographie vorgereinigt. Anschließend wurde diese Bande mittels

HPLC weiter vorgesäubert. Eine dadurch erhaltene bislang unbekannte Substanz wurde zur exakten Strukturaufklärung nach München geschickt. Dort konnte eine völlig neuartige Verbindung mit bislang unbekannten Eigenschaften nachgewiesen werden. Auskunft über ihre Struktur- sowie Summenformel ist Abbildung 15 zu entnehmen. Auch nach Bedampfung mit HCl oder NH₃ zeigte diese Verbindung keinerlei sichtbare Veränderungen. Darüber hinaus fluoreszierte sie ebenfalls nicht.

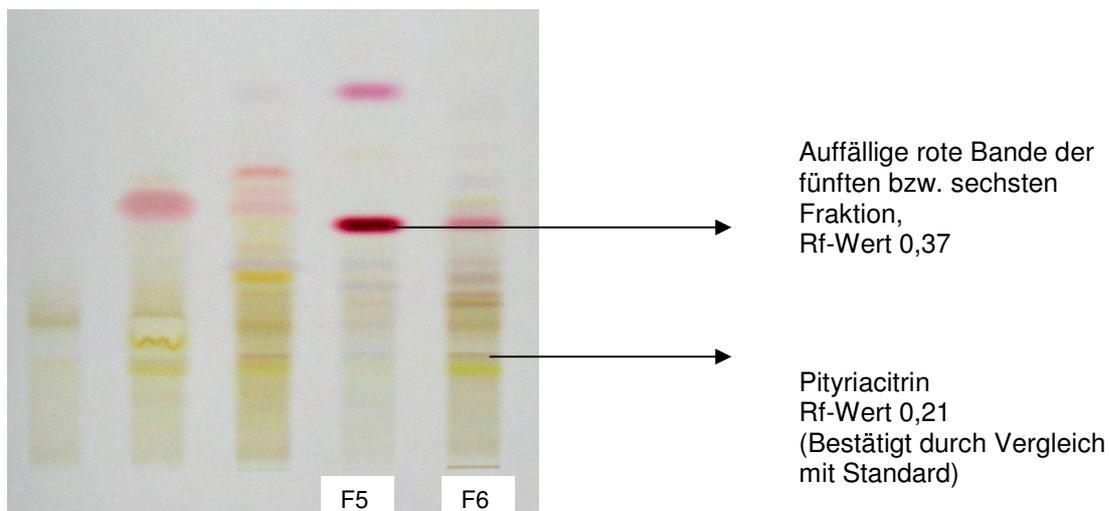


Abb. 14 a) Darstellung der verschiedenen Banden von *Exophiala dermatitidis* P 1108 dünnschichtchromatographisch im Tageslicht (WinCATS Image 1), Fraktion 2-6

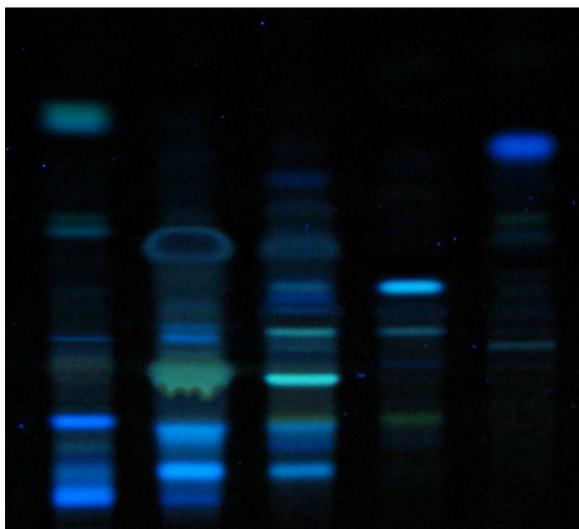


Abb. 14 b) Darstellung der verschiedenen Banden *Exophiala dermatitidis* P 1108 dünnschichtchromatographisch im UV-Licht (366 nm) (WinCATS Image 2), Fraktion 2-6

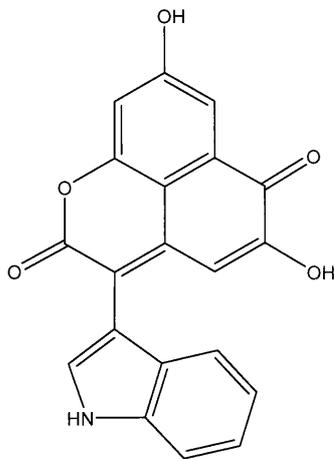


Abb. 15 Strukturformel der neuartigen violett-roten Substanz aus der fünften bzw. sechsten Fraktion von *Exophiala dermatitidis* P1108 (Rf-Wert 0,37). Vorläufige Bezeichnung: Exophialin
 $C_{20}H_{11}NO_5$, MW 345,305

4.2.1.2 *Exophiala phaeomuriformis*

Exophiala phaeomuriformis ist der nächste Verwandte von *Exophiala dermatitidis*. (Analysen der 18 S RNA zeigten Gemeinsamkeiten, Unterschiede in der ITS aber vorhanden). Nach dem positiven Screening-Ergebnis durch Nährbodenverfärbung sowie -fluoreszenz erfolgte die Anzucht des Isolats sowie die anschließende Aufreinigung interessanter Banden. Eine Übersicht dieser verschiedenen Fraktionen zeigt Abbildung 16 a). Tabelle 18 listet die exakte Auswertung der WinCATS-Aufnahmen auf.

Auch bei dieser Gattung zeigen sich viele unterschiedlich farbige Banden sowie im UV-Licht (366 nm) viele unterschiedliche Fluorochrome (siehe Abbildung 16 b).

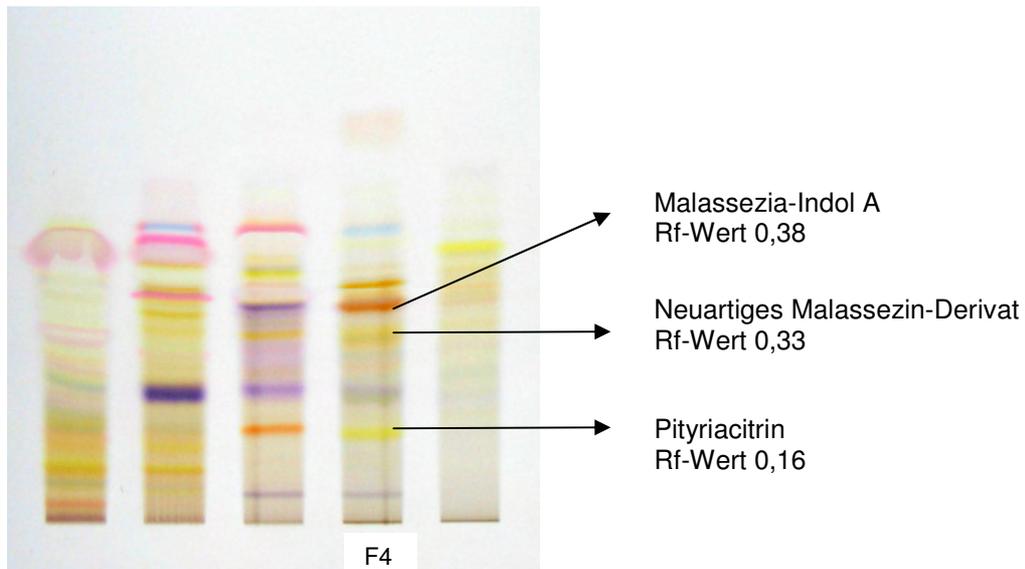


Abb. 16 a) Darstellung der verschiedenen Banden von *Exophiala phaeomuriformis* (WinCATS Image 1), Fraktion 1-5

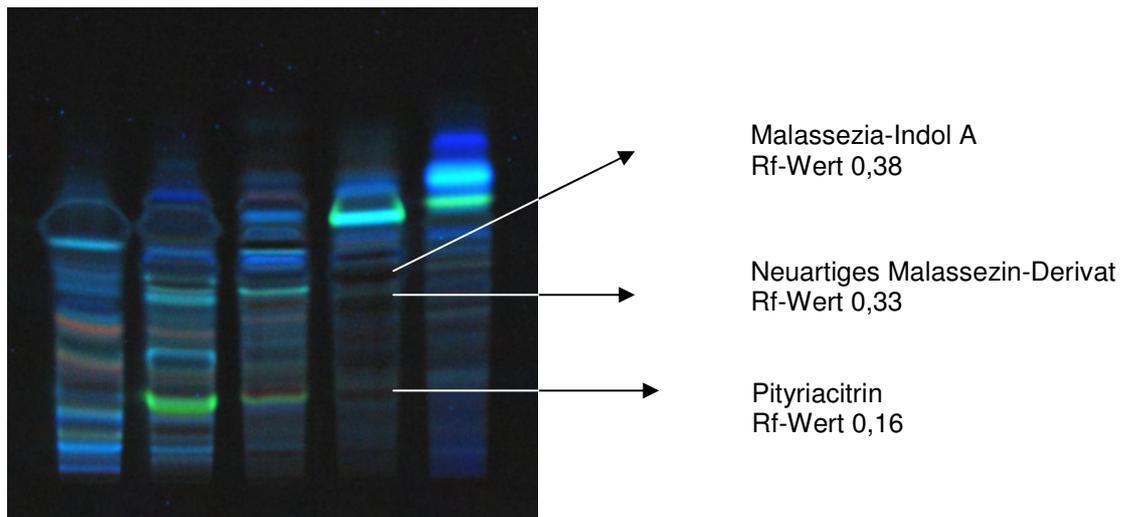


Abb. 16 b) Darstellung der verschiedenen Fluorochrome der einzelnen Banden bei *Exophiala phaeomuriformis* (WinCATS Image 2), Fraktion 1-5

Auch bei diesem Isolat zeigen sich viele unterschiedlich farbige Banden. Fraktion vier zeigt mit dem Rf-Wert 0,16 eine gelbe Bande, welche nach Vorreinigung durch die Elutionszeit der analytischen HPLC (63-64 min) als Pityriacitrin identifiziert werden konnte (Strukturformel vergleiche Abbildung 4, Seite 6). Des Weiteren zeigt sich in dieser Fraktion mit dem Rf-Wert 0,38 eine orange-rote Bande, welche als Malassezia-Indol A vermutet wurde. Die Strukturformel dieser Verbindung ist in

Abbildung 17 dargestellt. Sie zeigt Stabilität bei pH-Schwankungen und fluoresziert nicht im UV-Licht (366 nm sowie 254 nm). Bemerkenswerterweise konnte diese Substanz ohne Pityriarubin C isoliert werden. In laboreigenen Voruntersuchungen wurden beide Stoffe stets in einer Bande gefunden.

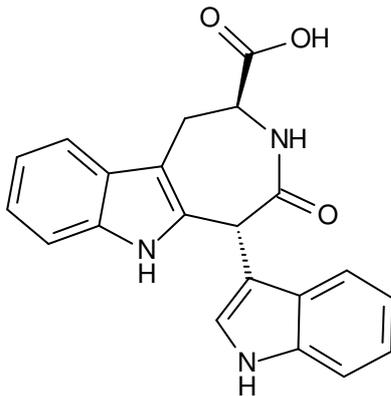


Abb. 17 Malassezia-Indol A
 $C_{21}H_{17}N_3O_3$
MW 359.38

Darüber hinaus konnte die neuartige Struktur einer weiteren Bande der vierten Fraktion in München nach Vorreinigung durch chromatographische Verfahren aufgeklärt werden. Nach erfolgreicher NMR-Untersuchung konnte die Strukturformel dieses Malassezin-Derivates, welches aus dieser gelb-orangen Banden mit dem Rf-Wert 0,33 aufgereinigt wurde, aus Abbildung 18 entschlüsselt werden. Diese Verbindung weist eine pH-Stabilität auf. Fluoreszenz kann weder bei Betrachtung im UV-Licht mit 366 nm sowie mit 254 nm festgestellt werden.

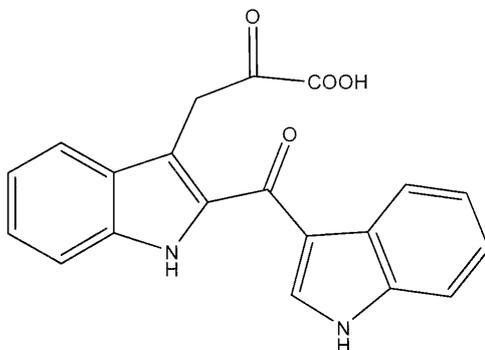


Abb. 18 Strukturformel des neuartigen orange-gelben Malassezin-Derivates aus *Exophiala phaeomuriformis*; die Substanz wurde aus der vierten Fraktion (Rf-Wert 0,33) isoliert
 $C_{20}H_{14}N_2O_4$, MW 346,3362

Es wurde weiterhin versucht, die orangene Bande der dritten Fraktion (Rf-Wert 0,17) zu identifizieren. Die Vermutung Pityriarubin A konnte nicht bestätigt werden.

4.2.1.3 *Exophiala spinifera*

Exophiala spinifera wurde ebenfalls auf Pigmentbildung bei Anzucht auf dem verwendeten Minimalagar gescreent. Seine Kolonien zeigen ein von den bisher beschriebenen *Exophiala*-Spezies abweichendes Bild. So ist um einen dunkelbraunen Hefe-Bereich eine milchige Eintrübung des Agars fest zu stellen. Abbildung 19 demonstriert einen mit *Exophiala spinifera* beimpften Pigment-Nährboden nach nur wenigen Tagen Wachstum.

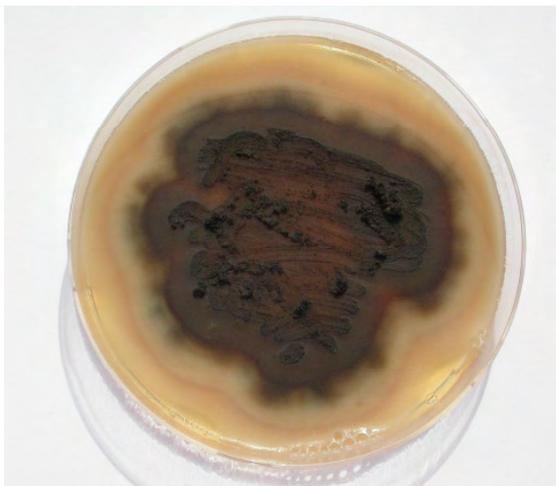


Abb. 19 Kultur von *Exophiala spinifera* nach einer Wachstumsphase von nur wenigen Tagen

Durch diese Eintrübung des Nährbodens war zunächst nicht eindeutig, ob *Exophiala spinifera* in gleicher Weise Pigment bildet wie *Exophiala dermatitidis* oder *phaeomuriformis*. 20 Agar-Schalen wurden beimpft und ca. 2 Wochen später nach Pürierung des Nährbodens mit Ethylacetat übergossen. Auch bei diesem Isolat konnte sodann eine extrahierbare Menge Pigmentrohextrakt gewonnen werden. Nach Vorreinigung mittels Säulenchromatographie wurden die entstandenen Fraktionen durch einen Linomaten auf die Kieselgelplatten aufgetragen und die Dünnschichtchromatographie in der bekannten Weise entwickelt (Kapitel 3.3.3, Seite 29). Es stellte sich das in Abbildung 20 erkennbare Bild der Fraktionen dar. Tabelle 19 gibt die exakte Auswertung dieser WinCATS-Aufnahmen wieder (Seite 112).

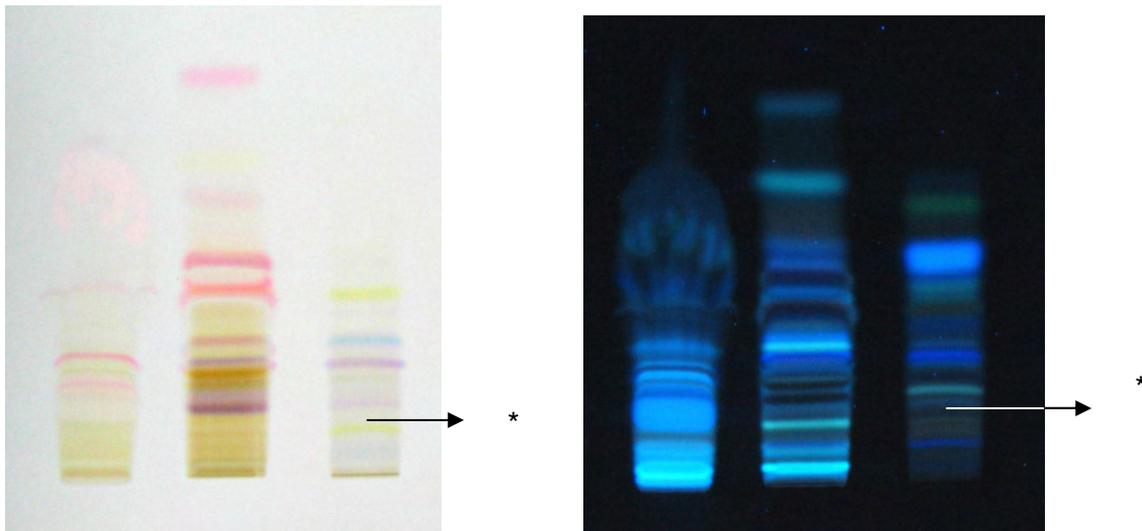


Abb. 20 a) im Tageslicht (WinCATS Image 1) Abb. 20 b) im UV-Licht (WinCATS Image 2)

Abb. 20 Dünnschichtchromatographische Darstellung der verschiedenen Banden von *Exophiala spinifera*, Fraktion 1-3

* Pityriacitrin, bestätigt durch Dünnschichtchromatographie

Die drei Fraktionen weisen rosa, lila, orange und gelbe Banden sowie eine blaue Bande im Tageslicht auf. Auch bei Betrachtung im UV-Licht (366 nm) zeigen sich ebenfalls verschiedene fluoreszierende Banden. Zum Nachweis von indolhaltigen Pigmenten wurde getestet, ob eine gelbe Bande der dritten Fraktion (Rf-Wert 0,10), welche UV-Licht absorbiert, im dünnschichtchromatographischen Vergleich mit einem Pityriacitrin-Standard übereinstimmt. Abbildung 21 stellt das Ergebnis dieses Versuchs dar.

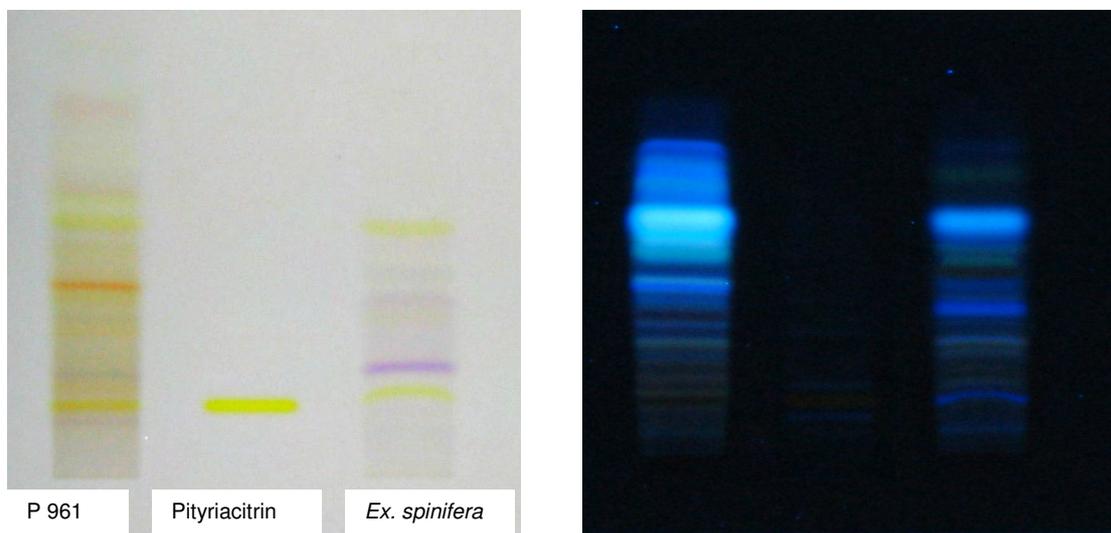


Abb. 21 a) Tageslicht (WinCATS Image 1)

Abb. 21 b) UV-Licht, 366 nm (WinCATS Image 2)

Abb. 21 Dünnschichtchromatographischer Vergleich der dritten Fraktion von *Exophiala spinifera*, *Exophiala dermatitidis* P 961 (sechste Fraktion) und einem Pityriacitrin-Standard

Anhand dieses Vergleichs kann davon ausgegangen werden, dass es sich auch bei *Exophiala spinifera* bei dieser gelben Bande um Pityriacitrin handelt. Fluoreszenzen sind in dem Bereich des untersuchten Rf-Wert-Bereiches nicht zu erkennen (Rf-Wert 0,10).

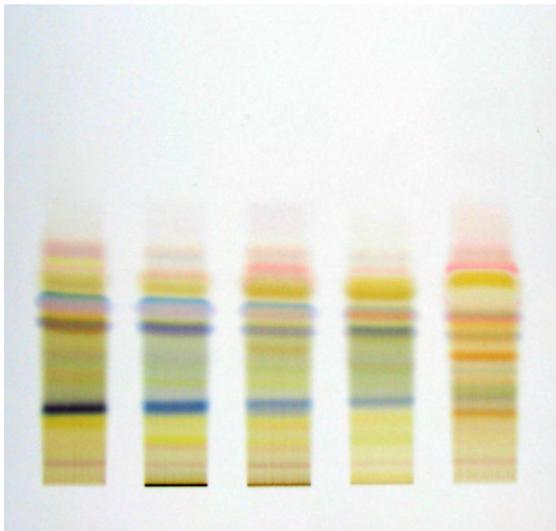
4.2.2 *Aureobasidium pullulans*

Zur Untersuchung von *Aureobasidium pullulans* standen ebenfalls mehrere Isolate zur Verfügung. Diese sind nochmals in Tabelle 9 aufgelistet.

Tab. 9 In dieser Studie verwendete Isolate von *Aureobasidium pullulans*

Isolat	Referenz	Interne Bezeichnung
<i>Aureobasidium pullulans</i>	CBS 577.93	P1741
<i>Aureobasidium pullulans</i>	CBS 147.97	P1740
<i>Aureobasidium pullulans</i>	DSM 2404	P1151
<i>Aureobasidium pullulans</i>	CBS 584.75	P1742
<i>Aureobasidium pullulans v. melan.</i>	CBS 699.76	P1744

Nach Gewinnung des Rohextraktes von 20 Pigment-Nährbodenschalen jedes dieser Isolate wurde dieses zum ersten Vergleich auf einer Kieselgelplatte nebeneinander aufgetragen und die Dünnschichtplatte entwickelt. Abbildung 22 zeigt diesen ersten Eindruck der Pigmente der verwendeten *Aureobasidium pullulans* -Isolate. Während die Isolate P 1151, P 1741, P 1740 und P 1744 im Vergleich fast identische Banden aufweisen, zeigt P 1742 ein abweichendes Bild. Dies gestaltet sich derart, dass statt drei auffallend blauen Banden hier orange-farbene Banden zu sehen sind.



P 1151 P 1741 P 1740 P 1744 P 1742

Abb. 22 Dünnschichtchromatographische Darstellung des Rohextraktes der verwendeten Isolate *Aureobasidium pullulans* (WinCATS Image 1)

Zum weiteren Vorgehen wurde nun das Isolat P 1741 ausgewählt und weiter angezüchtet. Nach Vorreinigung des jetzt gewonnenen Rohextraktes mittels Säulenchromatographie entstand das in Abbildung 23 dargestellte Bild der verschiedenen Banden von P 1741 (Die genaue Auswertung dieser WinCATS-Aufnahmen ist Tabelle 14 auf Seite 107 zu entnehmen).

Auch hier imponieren die blauen Banden dieser Gattung. Zum Nachweis, dass auch die schwarze Hefe *Aureobasidium pullulans* den gleichen Stoffwechselweg wie die *Malassezia*-Hefen sowie die Hefeformen der Spezies *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala phaeomuriformis* sowie *Exophiala spinifera* nutzen können, wurden dennoch gelbe und orangene Banden ausgewählt und mit bereits bekannten Verbindungen verglichen. Nach einer ersten Einschätzung konnte eine gelbe Bande in der vierten und fünften Fraktion mit dem Rf-Wert 0,22 als Pityriacitrin vermutet werden. Nach der Vorreinigung konnte dieser Verdacht durch die HPLC sowie Massenspektroskopien bestätigt werden (Strukturformel vergleiche Abbildung 4). Weiter konnte eine orangefarbene Bande in der vierten Fraktion mit dem Rf-Wert 0,41 als Pityriarubin C klassifiziert werden. Abbildung 7 c) gibt die Strukturformel des Pityriarubin C wieder.

In bisherigen Untersuchungen bezüglich Pityriarubin C wurde stets eine begleitende Substanz, das *Malassezia*-Indol A, mit isoliert. Dies konnte hier nicht beobachtet werden.

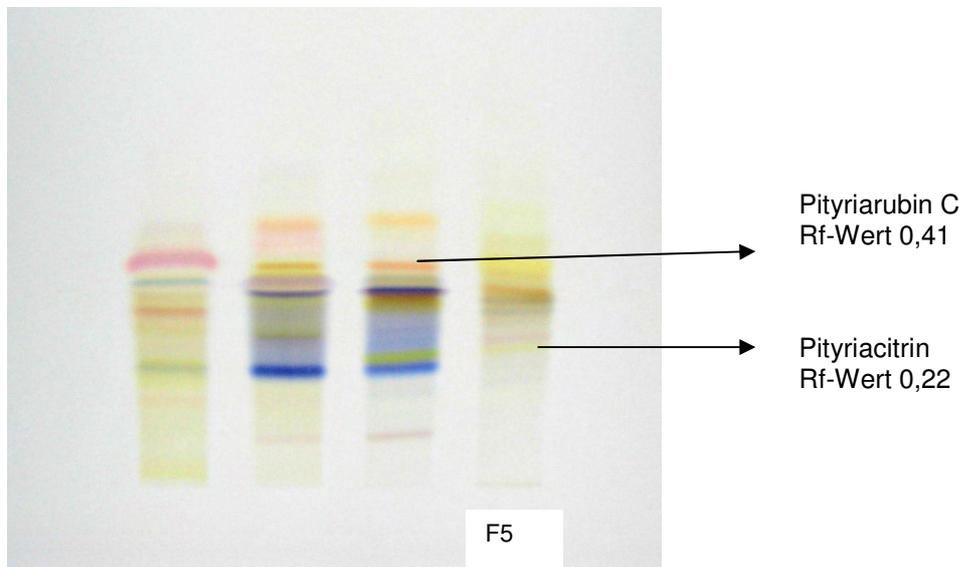


Abb. 23 a) Dünnschichtchromatographische Darstellung der verschiedenen Banden von P 1741 im Tageslicht (WinCATS Image 1), Fraktion 2-5

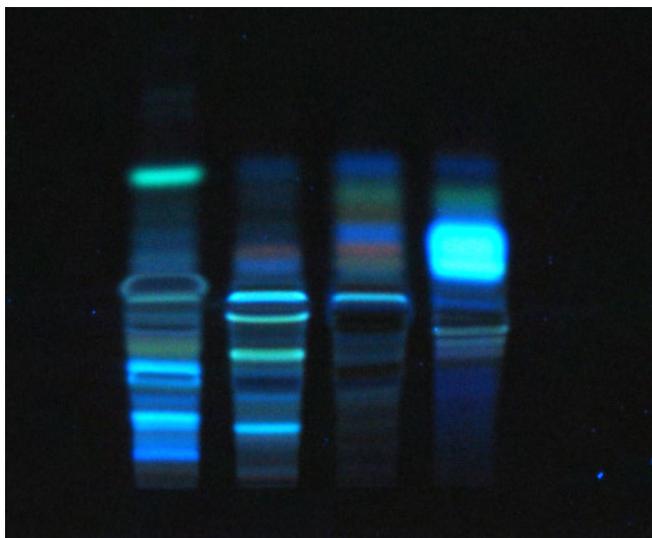


Abb. 23 b) Dünnschichtchromatographische Darstellung der verschiedenen Banden von P 1741 im UV-Licht (366 nm) (WinCATS Image 2), Fraktion 2-5

Auch das aus Tryptophan gebildete Pigment von *Aureobasidium pullulans* weist eine Vielzahl von Fluorochromen auf. Bei dieser Gattung konnten ebenfalls bislang nur wenige seiner Bestandteile aufgeklärt werden. Die bisher bekannt fluoreszierenden Substanzen sind der Tabelle 5 auf Seite 31 zu entnehmen.

4.2.3 *Trichosporon*-Hefen

Bei den *Trichosporon*-Hefen erwiesen sich Isolate von drei der acht verwendeten Spezies, nämlich *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon asteroides* sowie *Trichosporon loubieri*, als Pigmentbildner. Von ihnen wies nur *Trichosporon loubieri* ein vergleichbares Potential der Pigmentbildung mit *Aureobasidium pullulans* auf. Abbildung 24 zeigt dazu eine Agarschale des Pigmentagars beimpft mit *Trichosporon loubieri* nach mehrtägiger Wachstumsphase. *Trichosporon cutaneum* sowie *Trichosporon asteroides* zeigten selbst nach 4-wöchiger Wachstumsphase nur eine sehr geringe Verfärbung des Agars und somit auch eine geringe extrahierbare Rohextraktmenge (vergleiche dazu Abbildung 25). Sie alle aber wiesen die gelbgrüne Fluoreszenzerscheinung des Agar bereits nach wenigen Tagen auf. Beim Betrachten der dünnschichtchromatographischen Darstellung der unterschiedlichen Banden dieser pigmentbildenden *Trichosporon*-Hefen fiel auf, dass sie im Vergleich zu den pigmentbildenden Schwärzepilzen oder auch im Vergleich zu *Geotrichum capitatum* ein geringeres Farbspektrum aufweisen.



Abb. 24 Positive Pigmentbildung bei *Trichosporon loubieri* nach mehrtägiger Wachstumsdauer



Abb. 25 Positive Pigmentbildung bei *Trichosporon asteroides* nach mehrtägiger Wachstumsdauer; vergleichbar weniger Pigmentbildung als bei *Trichosporon loubieri* (Abb. 24)

4.2.3.1 *Trichosporon asteroides*

Bei *Trichosporon asteroides* konnte nur eine sehr geringe Menge Rohextrakt extrahiert werden. Auch nach vier-wöchiger Wachstumsdauer waren die 200 beimpften Nährböden nur schwach gelb verfärbt. Abbildung 26 stellt die einzelnen Banden des durch Säulenchromatographie vorgereinigten Pigments von *Trichosporon asteroides* im Tageslicht sowie im UV-Licht bei 366 nm dar (Tabelle 24 auf Seite 117 listet die Auswertung der Chromatogramme der WinCATS-Aufnahmen dieses Isolats auf). Bei Betrachtung fällt das geringere Farbspektrum im Vergleich zu den bisher beschriebenen Pilzen deutlich auf. Im Tageslicht beschränken sich die Banden lediglich auf gelbe, orangene oder rosa Banden. Im UV-Licht dagegen können wiederum viele Fluorochrome beobachtet werden. Aber auch hier sind fast ausschließlich alle unbekannt.

Bei dem verwendeten Isolat, CBS 2481, konnte auch Pityriacitrin in einer schwach gelben Bande der vierten Fraktion (Rf-Wert 0,12) vermutet werden. Durch die präparative Dünnschichtchromatographie gelang es, eine geringe Menge dieser gelben Substanz zu isolieren und eine analytische HPLC durchzuführen. Hier eluierte dieser gelbe Stoff zwischen 63 und 64 min und bestätigte so den Verdacht. Auch die massenspektroskopischen Untersuchungen klärten anschließend diese gelbe Substanz als Pityriacitrin auf, welches zum ersten Mal bei einer *Trichosporon* –Hefe nachgewiesen wurde. Pityriarubine konnten nicht nachgewiesen werden.

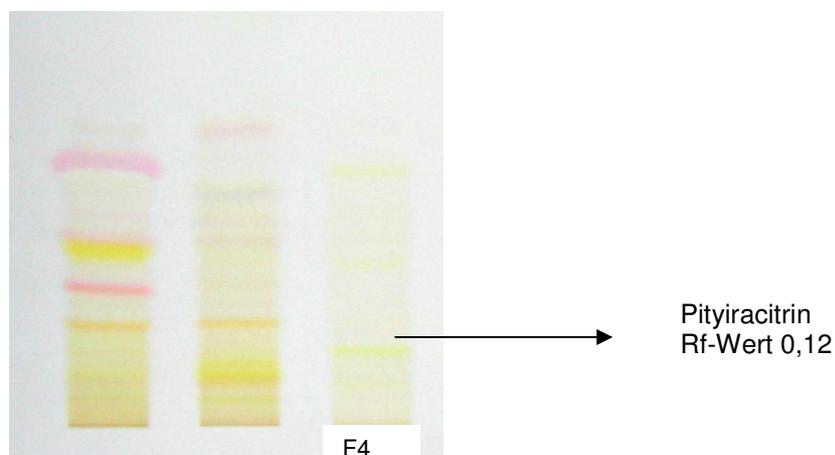


Abb. 26 a) Darstellungen der verschiedenen Banden bei *Trichosporon asteroides* im Tageslicht (WinCATS Image 1), Fraktion 2-4

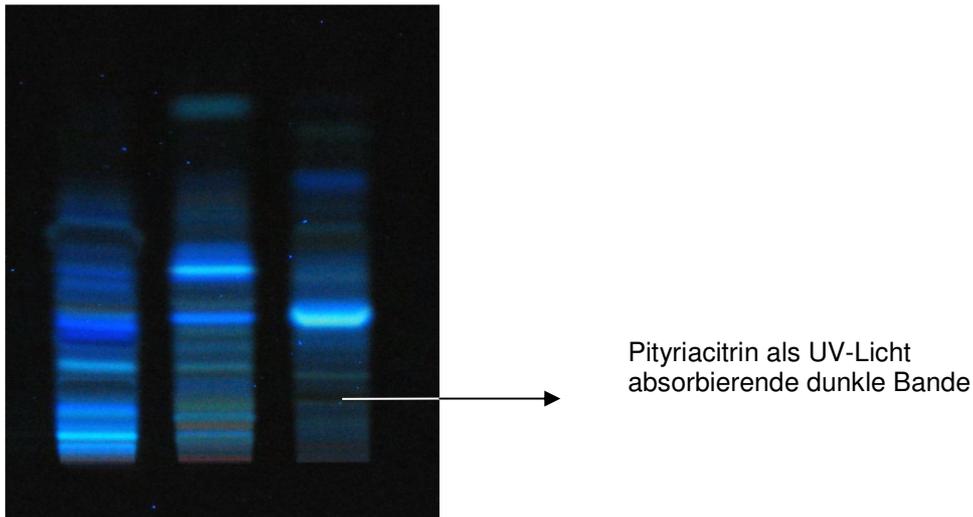


Abb. 26 b) Darstellung der verschiedenen Banden bei *Trichosporon asteroides* im UV-Licht, 366 nm (WinCATS Image 2), Fraktion 2-4

4.2.3.2 *Trichosporon cutaneum*

Die einzelnen Banden von *Trichosporon cutaneum* (CBS 2480) gibt Abbildung 27 im Tageslicht sowie im UV-Licht bei 366 nm wieder. Dieses Isolat weist ebenfalls wenig unterschiedlich farbige Banden nach dem Entwickeln einer mit den unterschiedlichen Fraktionen bestückten Dünnschichtchromatographie-Platte auf. Sie beschränken sich auf gelbe, rosa und lila Banden. In gleicher Weise wie bei *Trichosporon asteroides* wurde hier trotz geringer Pigmentbildung Pityriacitrin aus einer gelben Bande der dritten Fraktion mit dem Rf-Wert 0,15 nachgewiesen (Übereinstimmung in der Elutionszeit der HPLC sowie Bestätigung der TU München). Die exakte Auswertung der Chromatogramme dieses Isolats ist Tabelle 25 (Seite 118) zu entnehmen.

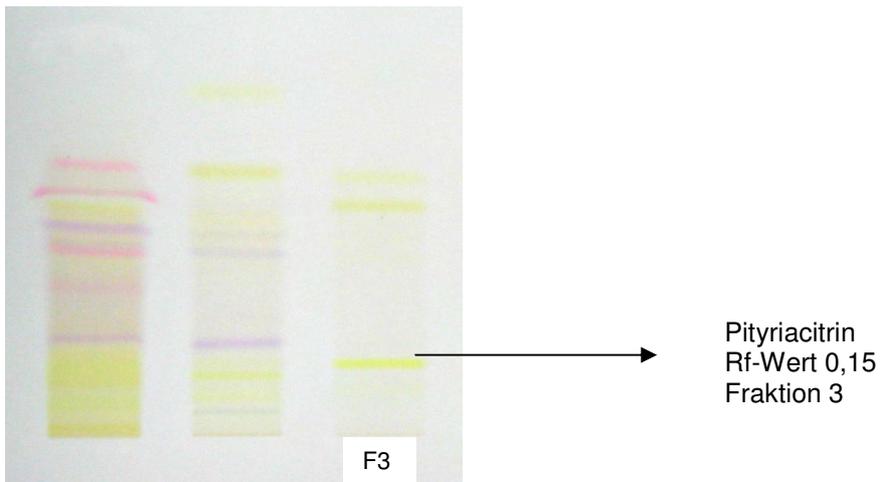


Abb. 27 a) Darstellung der verschiedenen Banden bei *Trichosporon cutaneum* im Tageslicht (WinCATS Image 1), Fraktion 1-3

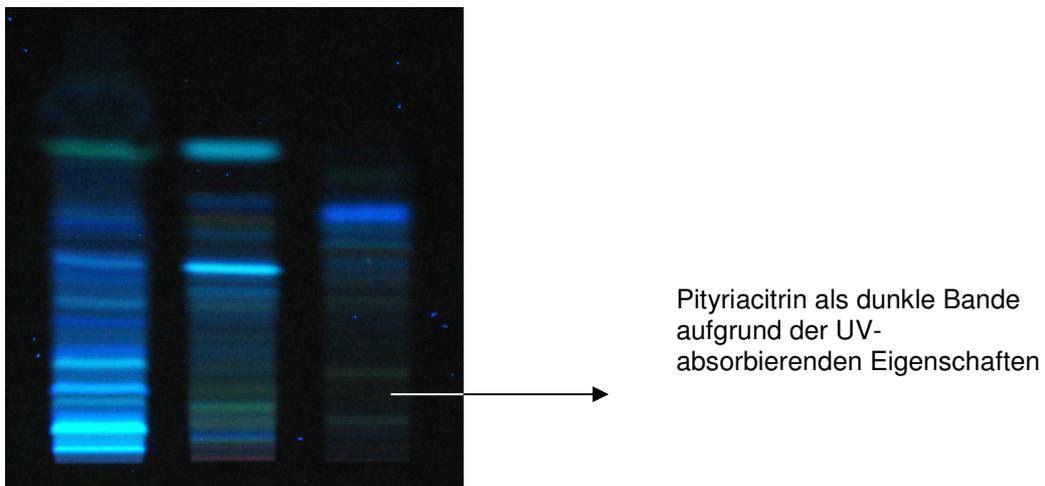


Abb. 27 b) Darstellung der verschiedenen Banden bei *Trichosporon cutaneum* im UV-Licht, 366 nm (WinCATS Image 2), Fraktion 1-3

4.2.3.3 *Trichosporon loubieri*

Trichosporon loubieri - als potentester Pigmentbildner der *Trichosporon*-Hefen - zeigt mit seinen Banden das in Abbildung 28 dargestellte Bild. Dessen genaue Auswertung ist Tabelle 26 (Seite 119) zu entnehmen.

Neben einer gelben Bande der fünften Fraktion (Rf-Wert 0,18) sind auch diverse orange-farbene Banden sichtbar. Die gelbe Bande wurde aufgrund ihrer Elutionszeit in der HPLC sowie der Massenspektroskopie als Pityriacitrin nachgewiesen. Bei den orangenen Banden konnten nach einem Vergleich der Rf-Werte mit bereits bekannten Strukturen die Pityriarubine A und B vermutet werden (Rf-Werte 0,15 und 0,26 in der vierten Fraktion). Die angefallenen Mengen dieser Substanzen waren aber zu gering, um eine Strukturaufklärung durchführen zu können.

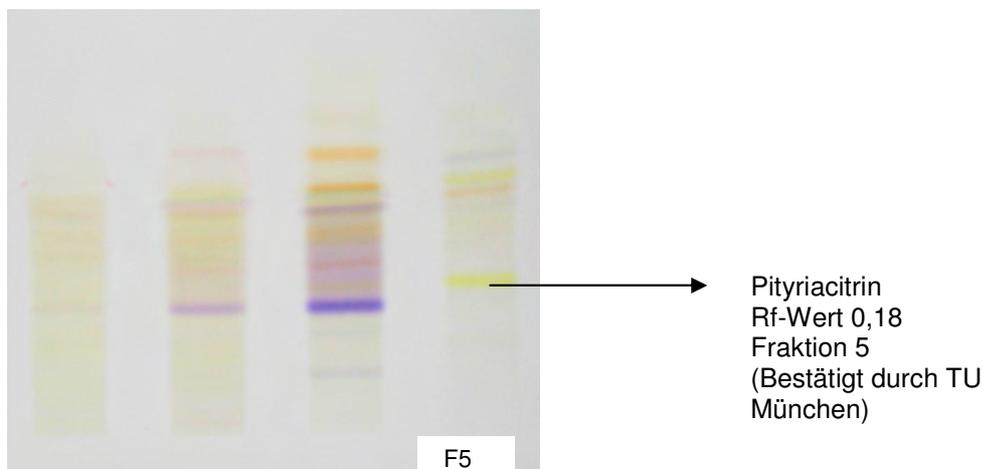


Abb. 28 a) Darstellung der verschiedenen Banden bei *Trichosporon loubieri* im Tageslicht (WinCATS Image 1), Fraktion 2-5

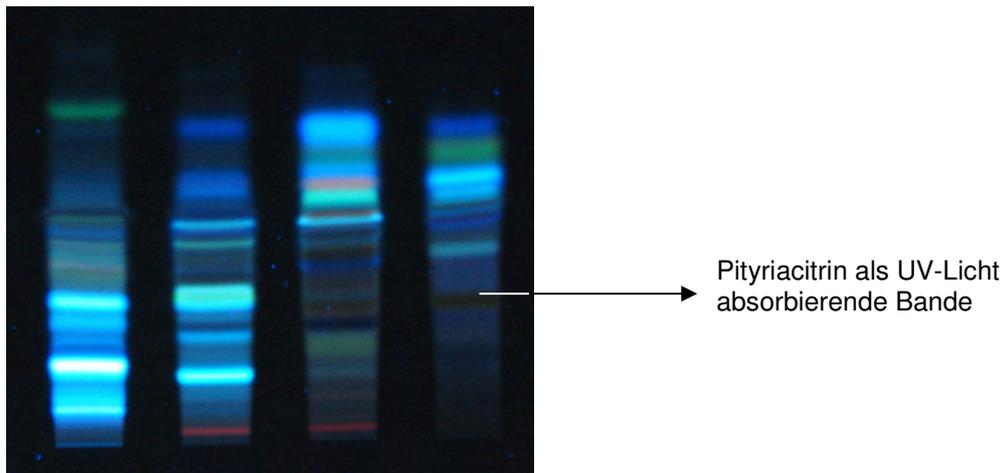


Abb. 28 b) Darstellung im UV-Licht, 366 nm (WinCATS Image 2), Fraktion 2-5

4.2.4 *Geotrichum capitatum*

Die vormals zu den *Trichosporon*-Hefen zugeordnete Spezies *Geotrichum capitatum* wurde ebenfalls positiv auf Synthese von pigmentierten Indolderivaten getestet. Es wurde sowohl die Verfärbung des Minimalagars als auch die gelb-grüne Fluoreszenz beobachtet. Nach Anzucht und Reinigung stellte sich das in Abbildung 29 sichtbare Bild der einzelnen Banden dieser Spezies in der Dünnschichtchromatographie dar. Unter den verschiedenen Substanzen wurde Pityriacitrin in der fünften Fraktion mit dem Rf-Wert 0,18 vermutet. Auch bei dieser Spezies gelang es, dies nach chromatographische Vorreinigung durch die Elutionszeit der HPLC (63-64 min) sowie in weiteren Verfahren der TU München bestätigen zu können. Auffälligerweise zeigten sich nach der Säulenchromatographie und dem Abrotieren der dritten Fraktion Farbkristalle von gelblicher Farbe. Diese waren allerdings auch nach dem Reinigen mittels HPLC für eine Strukturaufklärung noch zu komplex. Es wurde vermutet, dass diese Kristalle sich aus ca. 12 Einzelbestandteilen zusammensetzten. Der Verdacht auf Pityriarubin A (Rf-Wert 0,17 in der vierten Fraktion) sowie Pityriarubin C (Rf-Wert 0,40 in der vierten Fraktion) konnten die spektroskopischen

Untersuchungen in München nicht bestätigen. Darüber hinaus stellte sich die Vermutung Pityriacitrin (Rf-Wert 0,49 in der vierten Fraktion) nicht als zutreffend heraus.

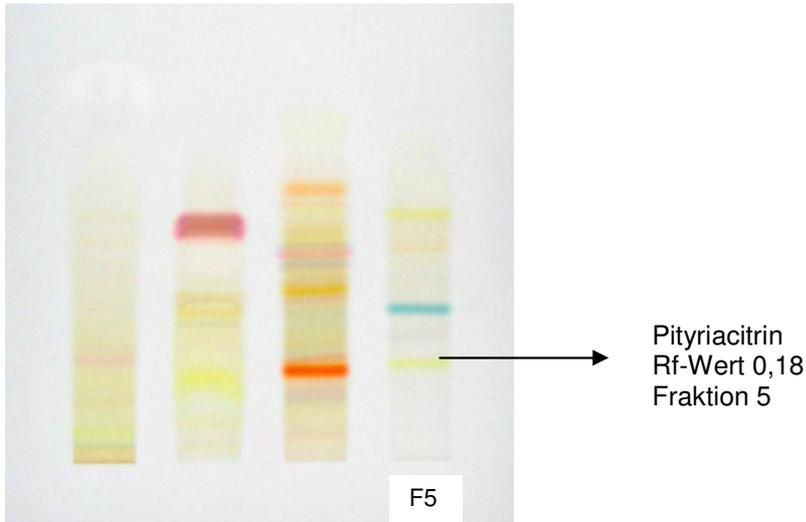


Abb. 29 a) Darstellung der verschiedenen Banden von *Geotrichum capitatum* im Tageslicht (WinCATS Image 1), Fraktion 2-5

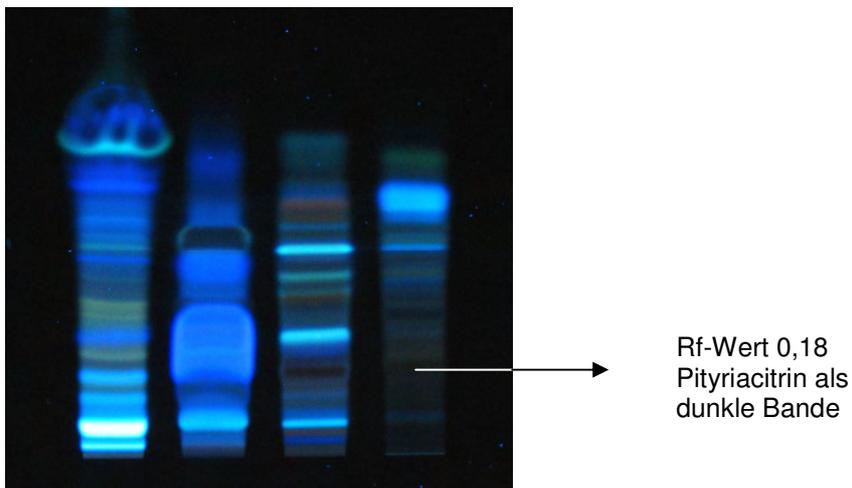


Abb. 29 b) Darstellung im UV-Licht, 366 nm (WinCATS Image 2), Fraktion 2-5

4.2.5 *Schizophyllum commune*

Nach Beimpfung des Pigmentagars (1b) mit *Schizophyllum commune* zeigt sich nach wenigen Tagen eine Verfärbung im gelb-braunen Bereich. Nährbodenfluoreszenzen sind aufgrund des Luftmyzels nicht feststellbar. Abbildung 30 beweist den positiven Screeningbefund nach nur wenigen Tagen Wachstum.

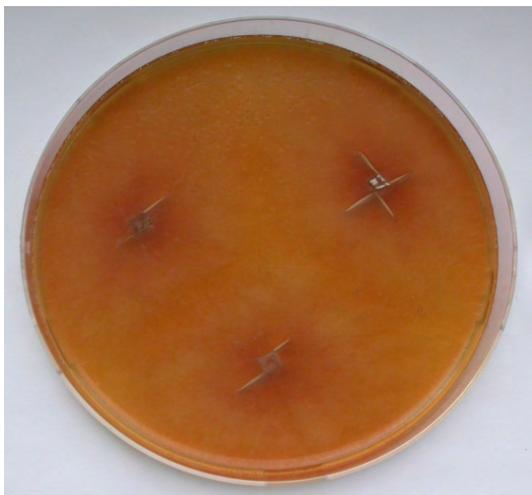


Abb. 30 Positiver Screeningbefund von *Schizophyllum commune* nach einer Wachstumsphase von wenigen Tagen

Nach der ersten Aufreinigung des Rohextraktes mittels Säulenchromatographie von *Schizophyllum commune* zeigte sich das in Abbildung 31 zu betrachtende Bild der Dünnschichtchromatographie. Tabelle 23 (Seite 116) listet die exakte Auswertung dieses Bildes auf.

Auffällig erschienen rote Banden (Rf-Werte 0,10 bis 0,12) in allen Fraktionen. Nach weiterer Aufreinigung wurden die isolierten Banden zur strukturaufklärenden Untersuchung weiter nach München geleitet. Dennoch konnten auch dort diese Substanzen leider nicht aufgeklärt werden, das von uns vermutete Schizocommunin in den Fraktionen eins bis drei nicht bestätigt werden.

Eine gelbe Bande (Rf-Wert 0,16) wurde durch das Verfahren der präparativen Dünnschichtchromatographie aus der dritten Fraktion isoliert und im Folgenden weiter aufbereitet. Bereits durch die HPLC wurde das erstaunliche Ergebnis geliefert,

dass es sich auch bei *Schizophyllum commune* um Pityriacitrin handeln könnte. Die Elutionszeiten stimmen überein. Im Vergleich zu *Exophiala dermatitidis* zeigt sich allerdings nach der Aufreinigung mittels HPLC nur ein schwacher Peak, also nur eine geringe Menge gebildeten Pityriacitrins.

Weitere orange-rote Banden (Fraktion drei, Rf-Wert 0,13 und 0,3 sowie Fraktion vier, Rf-Wert 0,36) konnten nicht, wie vorher vermutet, als Pityriarubine A, B bzw. C bestimmt werden. Ihr unterschiedliches Verhalten wurde bereits durch die HPLC deutlich.

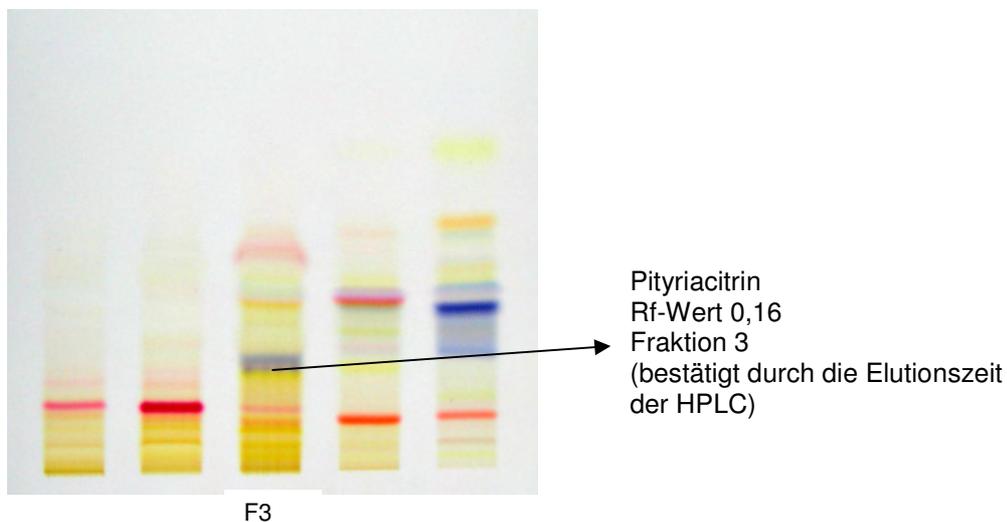


Abb. 31 a) Darstellung der verschiedenen Fraktionen von *Schizophyllum commune* (WinCATS Image 1), Fraktion 1-5

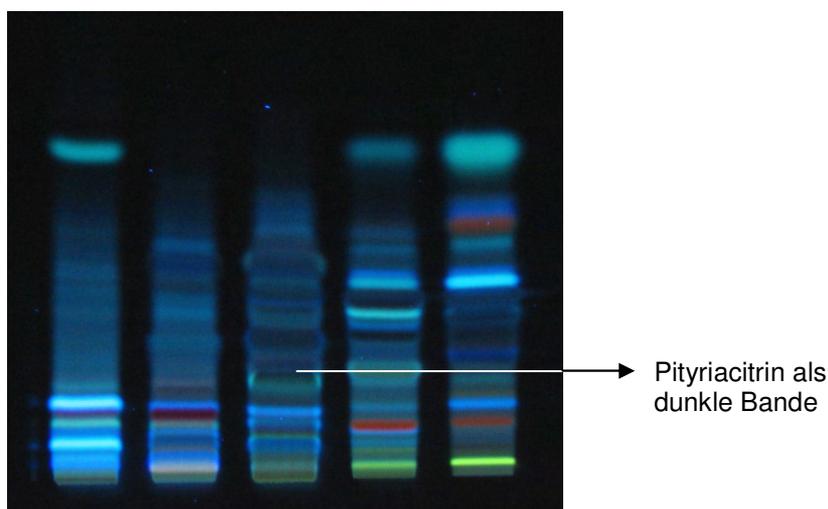


Abb. 31 b) Darstellung der verschiedenen Fraktionen von *Schizophyllum commune* im UV-Licht (WinCATS Image 2)

4.2.6 *Phialocephala*

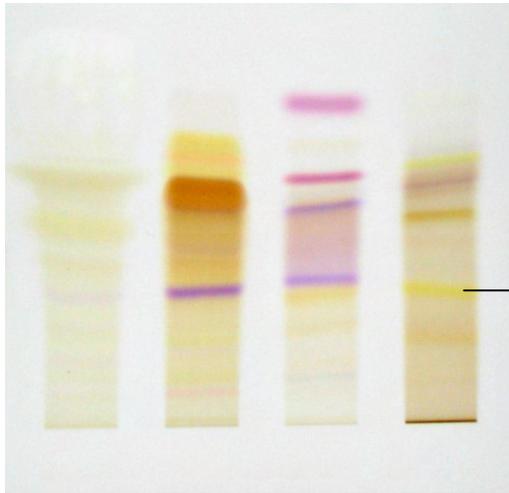
Die Spezies *Phialocephala* nimmt unter den verwendeten Spezies aufgrund des ausgeprägt dimorphen Wachstums eine Sonderstellung ein. Konzentrisch um einen myzelialen Bereich ist ein hefeartiges Wachstum festzustellen. Pigmentbildung ist ebenso festzustellen wie eine gelb-grüne Fluoreszenzerscheinung bereits nach wenigen Tagen (vergleiche Abbildung 32).



Abb.32 Positive Pigmentbildung bei *Phialocephala*
(Screeningbefund nach Wachstumsdauer von einer Woche)

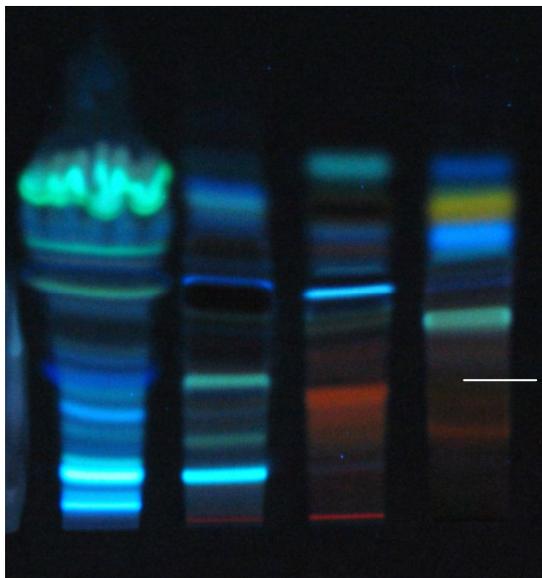
In Abbildung 33 a) ist das dünnschichtchromatographische Bild von *Phialocephala* im Tageslicht, in Abbildung 33 b) im UV-Licht bei 366 nm zu sehen. Tabelle 22 des Anhangs listet die exakte Auswertung der einzelnen Banden auf.

Abbildung 33 b) verdeutlicht die Vielzahl der fluoreszierenden Banden innerhalb der einzelnen Fraktionen. Auffällig erscheint ein feuerrotes Fluorochrom in der vierten Fraktion. Dieses bleibt auch bei Bedampfung mit rauchender Salzsäure oder Ammoniak konstant zu erkennen (vergleiche Images 3-7 auf Seite 130). Es wurde versucht, dieses Fluorochrom ebenfalls durch präparative Dünnschichtchromatographie zu isolieren. Die anfallenden Mengen waren leider zu gering für eine weiterführende Aufreinigung. Darüber hinaus erscheint eine in gelb-ocker fluoreszierende Bande auffallend. Weitere Fluoreszenzen im Bereich von grün und blau dominieren ansonsten das UV-Bild.



Vermutetes Pityriacitrin
der fünften Fraktion
Rf-Wert 0,23

Abb. 33 a) Dünnschichtchromatographische Darstellung
der verschiedenen Banden von *Phialocephala* im Tageslicht
(WinCATS Image 1)



Vermutetes Pityriacitrin der
fünften Fraktion. Eine dunkle
Bande Rf-Wert 0,23 passt zu
dieser Vermutung

Abb. 33 b) Dünnschichtchromatographische Darstellung
der verschiedenen Banden von *Phialocephala* im UV-Licht, 366 nm
(WinCATS Image 2)

Eine gelbe Bande der fünften Fraktion lässt das Indolderivat Pityriacitrin vermuten (Rf-Wert 0,23). Nach präparativer Dünnschichtchromatographie wurde die vorgereinigte Bande mit einem Pityriacitrin-Standard verglichen. Abbildung 34 erhärtet den Verdacht auf Pityriacitrin, da sie demonstriert, dass diese Bande die gleiche Laufstrecke wie die Referenz zurücklegt.

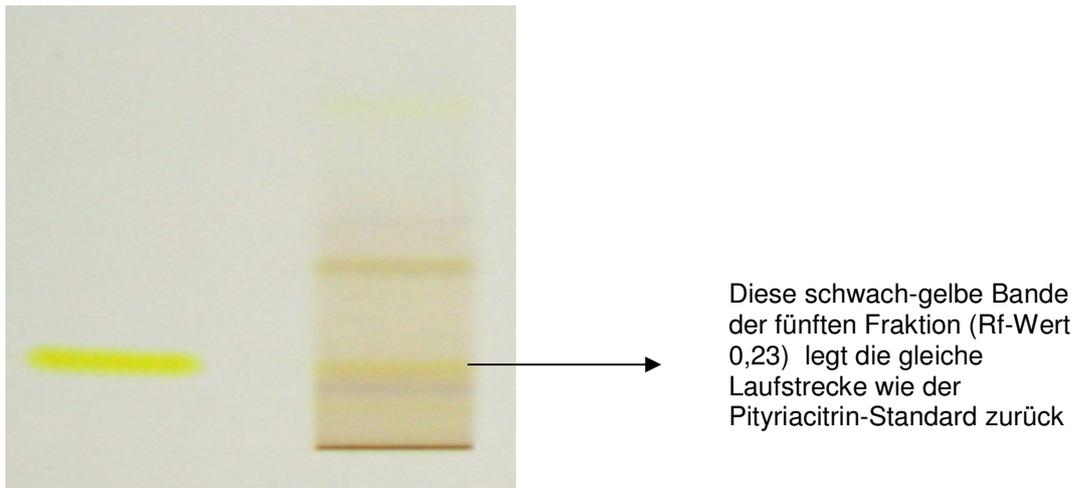


Abb.34 Vergleich der fünften Fraktion *Phialocephala* (rechts) mit Pityriacitrin-Standard (links) (WinCATS Image 1)

Darüber hinaus verdeutlicht Abbildung 35 die enge Beziehung des *Phialocephala*-Isolats (Fraktion vier, rechts) mit einer Mutante der *Exophiala dermatitidis*-Gruppe (P 1108, Fraktion fünf (Rf-Wert 0,37), links). Die beiden Rottöne legen die gleiche Laufstrecke in der Dünnschichtchromatographie zurück. Wie Punkt 4.2.1.1 zu entnehmen ist, konnte diese neuartige Verbindung in dieser Studie neu aufgeklärt und vorläufig als Exophialin bezeichnet werden. Abbildung 15 gibt Auskunft über diese Strukturformel (Seite 45).

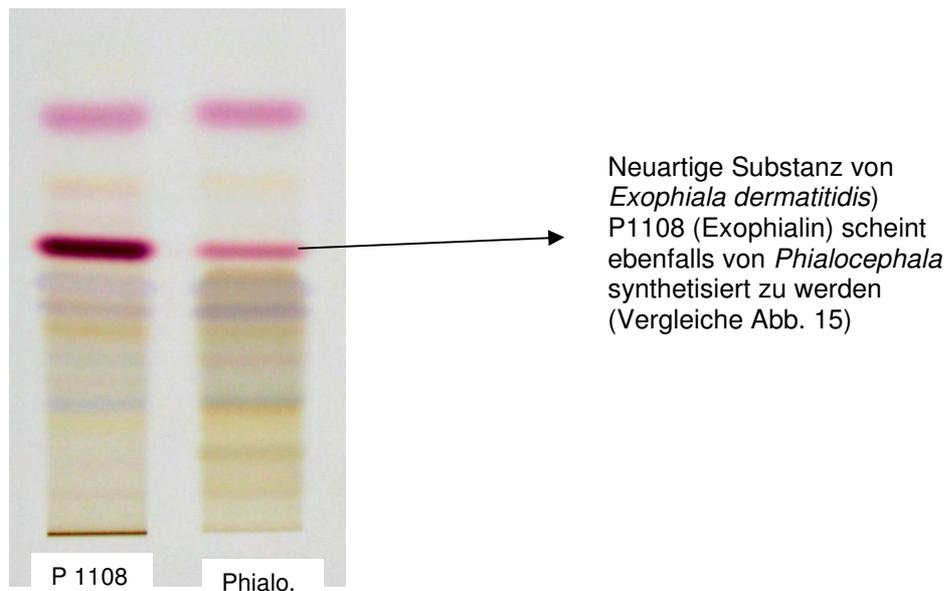


Abb. 35 Vergleich der roten Banden der fünften Fraktion von *Exophiala dermatitidis* (P 1108) (links) mit der vierten Fraktion von *Phialocephala* (rechts) (WinCATS Image 1)

4.2.7 *Nattrassia mangiferae* (*Hendersonula toruloidea*)

Trotz der Zugehörigkeit von *Nattrassia mangiferae* zu den Schwärzepilzen unterscheidet er sich doch in vielen Punkten von der *Exophiala*- oder *Aureobasidium*-Gruppe. Abbildung 36 zeigt eine Kultur nach einer Wachstumsphase von zwei bis drei Tagen. Es ist eine deutliche Myzelbildung sowie eine deutliche Färbung des Pigment induzierenden Mediums ähnlich der bei der *black yeasts* deutlich erkennbar. Nach weiterer Wachstumsdauer zeigen sich deutliche orange-farbene Einlagerungen, die im Laufe von einer weiteren Woche kristallin ausfallen. Die typische gelb-grüne Fluoreszenz des Nährbodens ist hier aufgrund des gebildeten Luftmyzels nur schwer nachzuweisen.



Abb. 36 Beginnende Pigmentbildung bei *Natrassia mangiferae*
nach 2-3 Tagen Wachstumsdauer

Nach der dünnschichtchromatographischen Aufteilung des reichlich gebildeten Rohextraktes - 25 ml - lassen sich deutlich viele gelbe sowie rötliche bis bläuliche Banden in der Dünnschichtchromatographie unterscheiden (vergleiche Abbildungen 39 a) und b). Die exakte Auswertung dieser Banden listet Tabelle 21 des Anhangs auf.

In der zweiten Fraktion ist eine sonnengelbe Bande (Rf-Wert 0,43) erkennbar. Diese Bande wurde bereits nach der Säulenchromatographie aufgrund der sich im Autosampler bildenden Farbkristalle auffällig, welche in Methanol nicht, in Ethylacetat aber löslich sind. Die Bande fluoresziert nicht im UV-Licht.

Des Weiteren zeigt die Dünnschichtchromatographie eine auffallende weinrote Bande (Rf-Wert 0,30) in der vierten und fünften Fraktion sowie eine rosa Bande (Rf-Wert 0,18) in der dritten und vierten Fraktion.

Nach der präparativen Auftrennung der rosa Bande (Rf-Wert 0,18) mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC konnten zwei neue Strukturen isoliert werden. Diese neuartigen Substanzen sind in Abbildung 37 und 38 dargestellt. Isoliert stellte sich die Verbindung aus Abbildung 37 blau, die Verbindung aus Abbildung 38 pink dar.

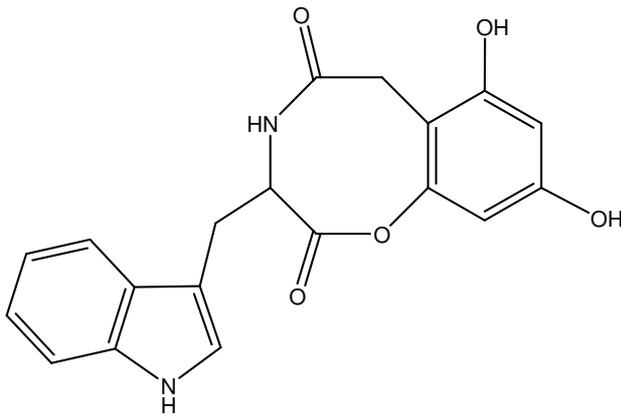


Abb. 37 Neuartige Substanz, die aus der dritten bzw. vierten Fraktion mit dem Rf-Wert 0,18 als ein Nebenprodukt isoliert werden konnte, $C_{19}H_{16}N_2O_5$; MW 352,1059

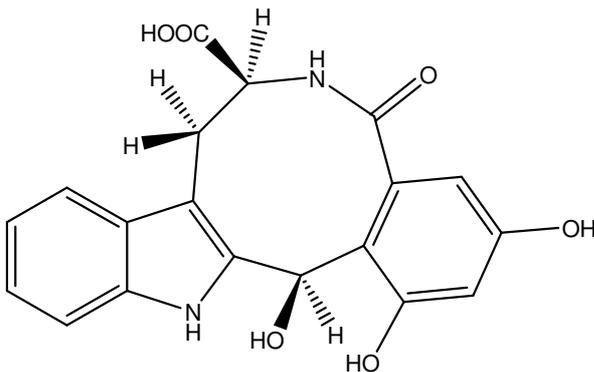


Abb. 38 Neuartige Substanz, die aus der dritten bzw. vierten Fraktion mit dem Rf-Wert 0,18 hauptsächlich isoliert werden konnte, $C_{19}H_{16}N_2O_6$; MW 368,3401

Eine weitere gelbe Bande (Rf-Wert 0,08) in der vierten Fraktion fluoresziert ebenfalls gelblich im UV-Licht (366 nm). Hier konnte eine pH-Abhängigkeit festgestellt werden. Nach Bedampfung mit HCl zeigt sich diese Bande im UV-Licht hellblau, nach Bedampfung mit NH_3 orange.

Aufgrund der sich darstellenden gelben Banden bei *Natrassia mangiferae* wurde ein Vergleich mit einem Pityriacitrin-Standard mittels Dünnschichtchromatographie angefertigt (siehe Abbildung 39 a) und b). Das Betrachten der Chromatographien im Tageslicht sowie im UV-Licht verdeutlicht, dass keine dieser Banden mit dem Standard übereinstimmt, Pityriacitrin von *Natrassia mangiferae* also nicht synthetisiert wird.

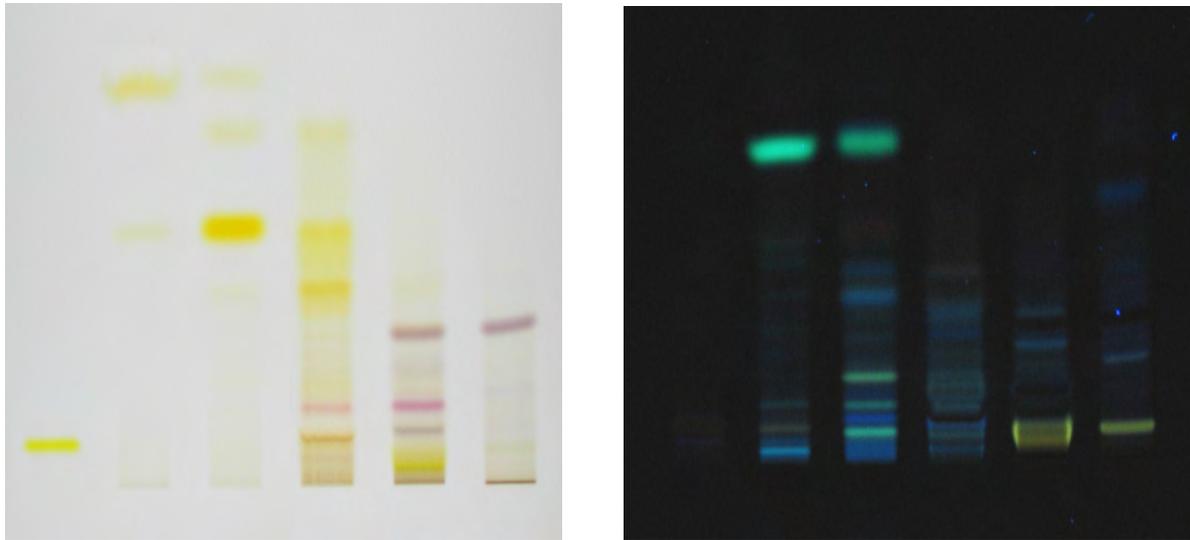


Abb. 39 a) Darstellung der verschiedenen Fraktionen (nativ) von *Natrassia mangiferae* (Fraktion 2-5) in der Dünnschichtchromatographie im Vergleich mit einem Pityriacitrin-Standard (erste Fraktion) links im Tageslicht und b) im UV-Licht bei 366 nm rechts (WinCATS Image 1 und 2)

Darüber hinaus wurde ein weiteres Phänomen auffällig. Während das Rohextrakt aller Melanin-produzierenden Spezies bei der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie das Sephadex dunkel färbten, konnte dies bei *Natrassia mangiferae* nicht beobachtet werden.

4.2.8 *Aspergillus terreus*

Der Schimmelpilz *Aspergillus terreus* wurde neben der bereits bekannten Pigmentbildung (z.B. auf Kimmig-Agar) ebenfalls positiv auf Pigmentbildung auf dem verwendeten Minimalagar getestet. Eine gelb-braune Verfärbung dieses Pigmentagars stellt Abbildung 40 dar. Eine Nährbodenfluoreszenz lässt sich aufgrund des gebildeten Myzels nicht nachweisen.

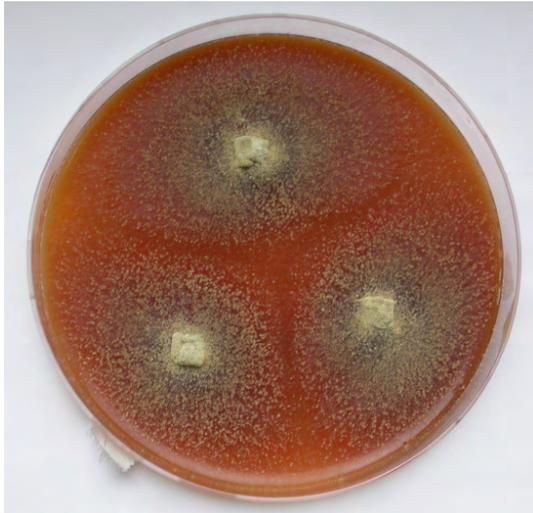


Abb. 40 Positiver Screeningbefund von *Aspergillus terreus*

Die Darstellung der verschiedenen Fraktionen von *Aspergillus terreus* durch die Dünnschichtchromatographie zeigt ein von den bisherigen Spezies abweichendes Bild (vergleiche Abbildung 41 a) und b). Tabelle 13 listet die exakte Auswertung dieser Bilder auf.

Die einzelnen Fraktionen (besonders Fraktionen eins bis drei) lassen verschiedene gelbe und orangefarbene Banden erkennen, von denen nur einzelne klar begrenzt sind. Andere erscheinen über die komplette Laufstrecke gezogen. Nach Auswertung der Rf-Werte der einzelnen Banden konnten keine vergleichbaren Indolderivate vermutet werden. Einzelne Proben, die mittels HPLC weiter aufgereinigt wurden, ließen aufgrund des von den bekannten Strukturen verschiedenen Verhaltens zusätzlich nicht auf Indolderivate schließen. Des Weiteren führten die massenspektroskopischen Untersuchungen in München zu keiner exakten Strukturaufklärung der Substanzen. Obwohl die Stoffe in großen Mengen anfielen, waren sie zu komplex, um die Einzelsubstanzen herausfiltern zu können. Herausgestellt konnte aber auch bei diesen Untersuchungen, dass es sich hierbei nicht um Indolderivate handelt.

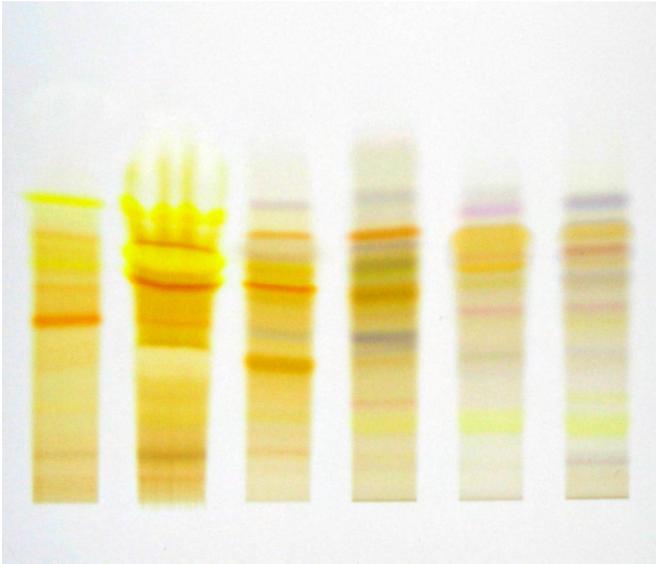


Abb. 41. a) Darstellung der verschiedenen Fraktionen von *Aspergillus terreus* nach Durchlaufen der Dünnschichtchromatographie im Tageslicht (WinCATS Image 1), Fraktion 1-6

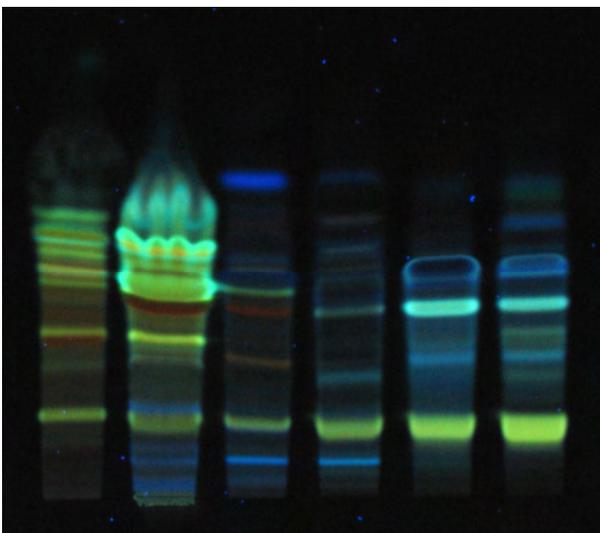


Abb. 41 b) Darstellung der verschiedenen Fraktionen von *Aspergillus terreus* in der Dünnschichtchromatographie im UV-Licht (WinCATS Image 2), Fraktion 1-6

5. Diskussion

Bei *Malassezia furfur* wurde zum ersten Mal das Phänomen der Bildung von Pigmenten und Fluorochromen durch Verstoffwechslung der Aminosäure Tryptophan beschrieben, wenn diese als alleinige Stickstoffquelle vorhanden ist (MAYSER ET AL., 1998). Im Jahr 2004 wurden im Rahmen einer Dissertation weiterführende Untersuchungen bezüglich der Abhängigkeit der Pigmentbildung von der Art der Stickstoffquelle veröffentlicht. Diese Arbeit stellte heraus, dass die Bildung der Pigmente spezifisch ist für die Umwandlung des Tryptophans, während die Lipidquelle austauschbar war. Es zeigte sich, dass die optische Aktivität der Aminosäure nicht bedeutsam war. Weitere strukturell ähnlich Stickstoffquellen (Tryptamin, Serotonin, Gramin) konnten die verwendeten Hefen nicht zur Pigmentproduktion anregen, obwohl auch sie teilweise assimiliert wurden (MAYSER ET AL., 2004). Die Verwertung von Tryptophan zur Pigmentbildung kann grundsätzlich durch zwei verschiedene Synthesewege erfolgen:

- a) Die Öffnung des Pyrrolringes des Indols (Benzopyrrol) und die Bildung von Ommochromen, ihren Vorstufen, Pteridinen sowie Phenoxazin mittels Polyketidsynthasen (Phenoxazin-Ommochrom-Stoffwechselweg).
- b) Der Erhalt des Indolringes und die Bildung von Indolderivaten.

Als Indolderivate und Bestandteile eines neuen Tryptophan-abhängigen Stoffwechselweges konnten bis heute u. a. Malassezin, Pityriacitrin, Pityrialacton, Pityriaanhydrid, Pityriarubine A-C sowie Malassezia-Indol A charakterisiert werden (IRLINGER ET AL., 2005)(Siehe dazu Kapitel 1.1.2.6 auf Seite 4).

Die Komplexität dieser neuen Strukturen sowie die verschiedenen Angriffspunkte in der Wirtszelle ließen darauf schließen, dass *Malassezia furfur*, der zur Standard-Flora der menschlichen Haut gezählt wird, keine Sonderstellung im Reich der Pilze einnimmt. Vielmehr wurde vermutet, einen bei den Pilzen weiter verbreiteten Stoffwechselweg gefunden zu haben, der eventuell neue Einsichten über die Pathogenese verschiedener Mykosen liefern könnte.

Asco- und Basidiomyceten sind evolutionsgeschichtlich Schwesterngruppen, da sie gemeinsame Vorläuferformen haben. Gemeinsam werden sie als Dikaryomycota bezeichnet. Französische Forscher berechneten den Ursprung der Differenzierung dieser Schwesterngruppen in den Zeitraum vor ca. 730 Millionen Jahren, den Ursprung der Entwicklung der Eukaryonten insgesamt in den Zeitraum vor ca. 1 Milliarde Jahren (DOUZERY ET AL., 2004). In ihrer Phylogenese haben sich Asco- und Basidiomyceten im Laufe der Zeit voneinander entfernt. Ascomyceten beispielsweise besitzen meist nur einen Zellkern, wohingegen Basidiomyceten meist mehrere, z. T. auch unterschiedliche Zellkerne aufweisen. Die Systematik der Eumycota ist Abbildung 42 zu entnehmen. Sie zeigt die Einteilung klinisch relevanter Pilze in Anlehnung an den „Atlas of clinical fungi“ (DE HOOG, 2002).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass phylogenetisch weit entfernte Pilze die gleichen Substanzen synthetisieren können, wie sie von *Malassezia furfur* bekannt sind, z. B. Pityriacitrin. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass bereits der gemeinsame Prokaryot, aus dem sich beide Gruppen entwickelten, die Fähigkeit zur Synthese von Pityriacitrin aufwies. Diese Tatsache der gemeinsamen Pigmentbildung bestätigt ebenfalls den Verdacht, dass viele humanpathogene Pilze pigmentierte Indolderivate produzieren können.

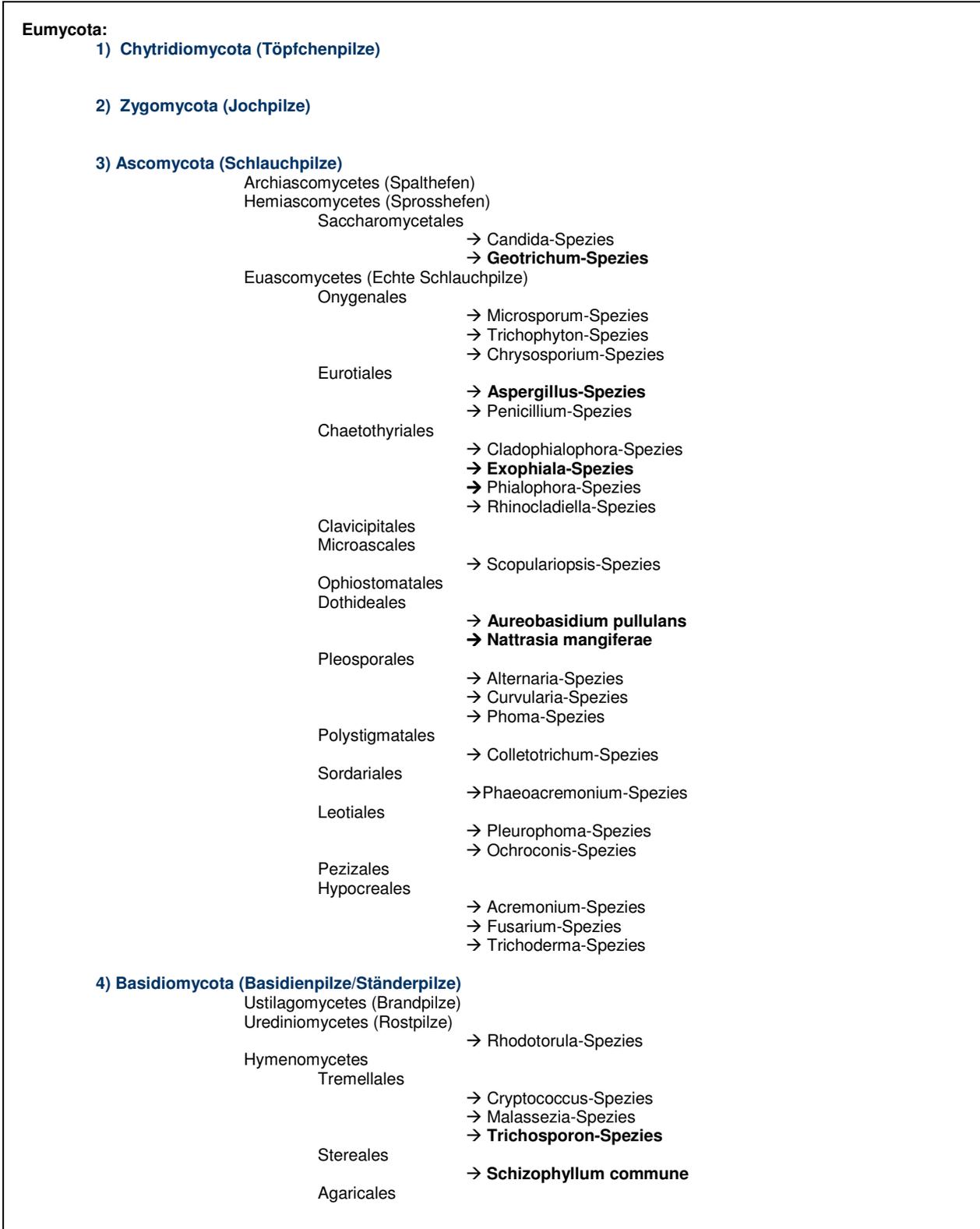


Abb. 42 Vereinfachte Übersicht über die Systematik der Eumycota, angelehnt an DE HOOG (2000). Die in dieser Untersuchung verwendeten Spezies sind fett gedruckt.

Der Umbau von Tryptophan zu diesen aufwändigen Strukturen durch *Malassezia*-Hefen steht vermutlich mit den Fluoreszenzerscheinungen der Pityriasis versicolor und den trotz Depigmentierung sonnengeschützten Arealen in einem direkten klinischen Bezug. Die *Black yeasts*, bestimmte *Trichosporon*-Hefen, *Geotrichum capitatum* sowie *Schizophyllum commune*, die unter den vorliegenden Bedingungen zu dieser Umwandlung des Tryptophans ebenfalls in der Lage sind, weisen nach den vorhandenen Daten nicht direkt klinische Phänomene wie bei der Pityriasis versicolor auf. Dennoch geben diese gebildeten Indolderivate auch bei den hier untersuchten Basidio- und Ascomyceten Ansatzmöglichkeiten für eine Erklärung der Pathogenese einiger Mykosen. Klinische Relevanz erlangt diese Erkenntnis durch das stetige Anwachsen von Pilzinfektionen in der letzten Zeit.

Zu beobachten ist, dass Pilze, die zunächst als non-pathogen eingestuft wurden, trotzdem Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten auslösen können. In diesem Zusammenhang geben PROCOP ET AL. (2004) zu bedenken, dass das vermehrte Auftreten von Infektionen, die von Pilzen ausgelöst werden, nicht auf eine Veränderung der Virulenz dieser Spezies zurückzuführen ist. Die Infektionen gewinnen vielmehr durch die Zunahme an immunsupprimierten Patienten und dem therapeutischen Einsatz der Immunsuppression immer mehr an Bedeutung. Diese Situation macht das Verständnis der Wirt-Mikroorganismen-Interaktion besonders bedeutsam. Auch DIXON ET AL. (1996) verwiesen auf die Anfälligkeit für opportunistisch pathogene Pilze (z.B. *Candida*, *Trichosporon* oder *Malassezia*) sowie auch anderer nicht endemisch vorkommender Pilze (z.B. *Histoplasma capsulatum*) bei Patienten mit HIV-Infektion, Krebs, Knochenmark- oder Organtransplantationen sowie chemotherapeutisch behandelte Patienten oder Neugeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g. BADDLEY ET AL. beschrieben 2004 des Weiteren das vermehrte Auftreten systemischer Pilzinfektionen als eine Folge chirurgischer Eingriffe sowie zunehmender invasiver Diagnostik. Gleichzeitig wird das Problem der zunehmenden Resistenz einiger Spezies gegenüber konventionellen Antimykotika behandelt.

Im Folgenden werden die bei den untersuchten Spezies nachgewiesenen Substanzen und ihre Relevanz als Pathogenitätsfaktor weiter diskutiert.

Im Jahr 2002 wurde von MAYSER ET AL. erstmalig eine neuartige chemische Verbindung sowie ihre physikalischen und spektroskopischen Eigenschaften veröffentlicht und aufgrund ihrer Eigenfarbe als Pityriacitrin bezeichnet (vergleiche Abbildung 4 auf Seite 6). Nachforschungen ergaben, dass eine Forschungsgruppe um NAGAO (1999) aus dem Marine-Bakterium *Paracoccus* (strain F-1547) ebenfalls dieses ultraviolette strahlenabsorbierende Material isoliert hatten, ohne dies weiter zu charakterisieren.

Das gelbe Indolderivat Pityriacitrin ($C_{20}H_{13}N_3O$) hat die Eigenschaft, durch seine komplizierte Ringstruktur vor UVA-, UVB- und UVC-Strahlung zu schützen. Seine Absorptionsmaxima liegen dabei bei 212 nm, 289 nm, 315 nm und 389 nm.

Klinisch interessant wurde Pityriacitrin im Zusammenhang mit der Pityriasis versicolor alba. Die bei dieser Erkrankung beobachtbare Abschirmung vor UV-Strahlen in den pigmentlosen Arealen, die trotz Fehlen des Melanins nicht mehr sonnenstrahlenempfindlich sind als gesunde Bereiche, wurde auf die absorbierenden Eigenschaften des Pityriacitrins zurückgeführt.

Die Bildung von Pityriacitrin konnte in dieser Arbeit bei allen verwendeten pigmentbildenden Spezies mit Ausnahme von *Nattractia mangiferae* sowie *Aspergillus terreus* nachgewiesen werden.

Bei den Schwärzepilzen, zu denen die *black yeasts* zählen, leitet sich die Namensgebung von den Melanineinlagerungen der Zellwände dieser Pilze ab. Melanin schützt als komplexe polymere Struktur unspezifisch vor UV-Strahlen mit ansteigender Effizienz bei niedrigeren Wellenlängen (COCKELL ET AL., 1999). Pityriacitrin dagegen schirmt in bestimmten Wellenlängenbereichen mit maximaler Intensität. Erstmals konnte nun gezeigt werden, dass die *black yeasts* die Anlagen für zwei verschiedene UV-Filtersysteme in ihrem Genom verankert haben, von denen das Melanin permanent, das Pityriacitrin aber nur in einer ganz spezifischen Situation synthetisiert wird. Auch die *Trichosporon*-Hefen, *Geotrichum capitatum* sowie *Schizophyllum commune* aktivieren diesen Sonnenfilter lediglich bei alleinigem Vorhandensein des Tryptophans. Bislang ist allerdings ungeklärt, warum diese Organismen beide UV-Filter produzieren können. Vor allem aber konnte bis heute

nicht erforscht werden, wann für diese Organismen die natürliche Situation vorliegt, dass Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle vorherrscht.

COCKELL ET AL. (1999) beschreibt in seiner Arbeit über UV-protective Systeme die evolutionäre Beziehung dieser Substanzen. Der Ursprung der Lichtschutzsysteme bleibt laut Cockell unklar. Es wird vermutet, dass sie früher andere physiologische Rollen innehatten (z.B. chemische Botenstoffe, osmotische Regulatoren). Das Scytonemin scheint erst nach der Entwicklung eines Photosynthesystems entstanden zu sein, da bei der Biosynthese von Scytonemin Sauerstoff nötig ist. Flavonoide sowie Mycosporin-ähnliche Aminosäuren (MAAs) scheinen sich früher herausgebildet zu haben. Bei den Melaninen wird ein komplett anderer Entwicklungsweg angenommen. Problematisch ist hierbei, dass der Begriff Melanin eine Stoffklasse beschreibt, zu der unterschiedliche Verbindungen mit gleichen chemischen Eigenschaften gezählt werden (z. B. Eumelanin, DOPA-Melanin, DHN-Melanin). Die Entwicklung dieser Verbindungen ist aus diesem Grunde schwer zu klären. Es ist in Insekten, Pilzen, Weichtieren und Zooplankton zu finden, so dass rückwirkend keine genauen Angaben über die Entwicklung des Melanins gemacht werden können.

Pityriacitrin scheint als Absorber im UVC-Bereich bereits eine sehr frühe Entstehung erlebt zu haben. Es wird angenommen, dass im Archaikum (Erdzeitalter von 3,8 bis 2,5 Milliarden Jahren) die Erde keine protektive Ozon-Schicht aufwies (COCKELL ET AL., 2001). UVB- und UVC-Strahlung fanden sich vorrangig in dieser Zeit. Aufgrund dessen kann die Evolution von Pityriacitrin in diesem Zeitraum für möglich gehalten werden. In diesem Zusammenhang kann weiterhin vermutet werden, dass die Fähigkeit, Pityriacitrin zu bilden, im Genom zwar noch von seither verankert ist, aber nur unter bestimmten Voraussetzungen noch synthetisiert wird. Melanin dagegen scheint sich als potenterer Sonnenfilter in breiteren Absorptionsspektren evolutionsgeschichtlich gegenüber dem Indolderivat durchgesetzt zu haben.

Die Bildung des Pityriacitrins durch *Geotrichum capitatum* wirft die Frage der Phylogenese dieser Spezies auf. In den 80er Jahren erfolgte eine Reklassifizierung des vormals *Trichosporon capitatum* zu der Gattung *Geotrichum*. Voruntersuchungen unserer Forschungsgruppe bezüglich der Pigmentbildung des weit verbreiteten

Milchsimmels, *Geotrichum candidum*, kamen zu dem Ergebnis, dass dieser Pilz nicht in der Lage war, den Minimalagar zu verfärben und Pigmente zu bilden. Bei gewissen *Trichosporon*-Hefen konnte aber in dieser Arbeit die Bildung von pigmentierten Indolderivaten gezeigt werden. Andererseits zählt die Gattung *Geotrichum* wie die *Candida*-Hefen zur Familie der Saccharomycetales. Auch bei letzteren konnte die Pigmentbildung nachgewiesen werden (WENZEL ET AL., 2005).

Wie dem Kapitel 4.2.3 (Seite 54) zu entnehmen ist, besitzen die *Trichosporon*-Hefen nur ein geringes Pigmentbildungspotential. Die Darstellung der verschiedenen Banden durch die Dünnschichtchromatographie zeigt ein reduziertes Farb- und Fluorochromspektrum. Bei *Trichosporon cutaneum* z. B. beschränken sich die Banden lediglich auf die Farben gelb, rosa und blass-lila. Orange-rote oder sogar grüne Banden sind nicht zu beobachten. Diese Tatsache konnte ebenfalls bei *Malassezia pachydermatis* (MAYSER ET AL., 2004) festgestellt werden. Bei dieser Spezies konnten von 373 Isolaten 11 % zur Pigmentbildung auf einem Minimalagar ohne Glucose innerhalb 2-3 Wochen angeregt werden. Einige Stämme konnten bei Zugabe von Glucose zu einer schnelleren Pigmentsynthese gebracht werden. Auch bei dieser Spezies konnte lediglich Pityriacitrin aus einem ebenfalls reduzierten Farbspektrum isoliert werden.

Die Pityriarubine A, B und C wurden 2004 (siehe Abbildung 7 auf Seite 8) erstmals von einer Arbeitsgruppe um Dr. Irlinger in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus Liebig Universität Gießen beschrieben. Es handelt sich um drei biologisch aktive Bis(indolyl)spirane, die aus Kulturen der Hefe *Malassezia furfur* isoliert werden konnten. Vereinfacht lassen sich alle Metabolite dieser Hefe von einem gemeinsamen Vorläufer-Molekül ableiten. Dieses hypothetische Triketon wurde in dieser Arbeit von IRLINGER ET AL. (2004) vorgestellt. Die orange-roten Pityriarubine spielen möglicherweise ebenfalls eine wichtige Rolle bei dem Krankheitsbild der Pityriasis versicolor (Kleinflechte). Diese Dermatose geht neben den bereits genannten Farbänderungen der Haut mit bemerkenswert wenigen Entzündungszeichen trotz hoher Erregerzahl einher (WROBLEWSKI ET AL., 2005). Bei der Pityriasis versicolor bleibt trotz belegbar nachgewiesenen Pilzspuren der oberen Hautschicht eine Immunantwort mit neutrophilen Granulozyten fast

vollständig aus. Diese geringe inflammatorische Aktivität wurde in einer Arbeit von KRÄMER ET AL. 2005 weiter untersucht. Durch die Pityriarubine kommt es zu einer Unterdrückung des „oxidativen burst“ der humanen Granulozyten und so zu einem weitestgehendem Ausbleiben der körpereigenen Abwehr.

Der Begriff „oxidativer burst“ ist auch von den Pflanzen bekannt. Diese erzeugen meist primär das Superoxidanion-Radikal (O_2^-), welches spontan oder durch Superoxiddismutase katalysiert zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt. Eine Vielzahl von Enzymen wie Aminoxidase, Oxalatoxidase, Peroxidasen und NADPH-Oxidase können Superoxid und Wasserstoffperoxid bilden. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) spielt eine zentrale Rolle bei der pflanzlichen Pathogenabwehr, indem es die schnellste zu beobachtende Reaktion auf pathogene Pilze, Bakterien und Viren darstellt (WOJTASZEK, 1997).

IRLINGER ET AL. erwähnten 2004 weiterhin die nahe Strukturverwandtschaft der Pityriarubine mit den als Proteinkinase-Inhibitoren bekannten Bis(indolyl)maleimiden. Auch sie unterdrücken konzentrationsabhängig den „oxidativen burst“ von menschlichen Granulozyten im μM -Bereich. Dabei ist die Wirkung der Pityriarubine mit der von Arcyiarubin A vergleichbar. Unterschiedlich in diesem Zusammenhang ist jedoch die selektivere Hemmung der Granulozyten durch die Pityriarubine. Die Ursache dafür ist noch nicht geklärt und muss noch weiter untersucht werden (KRÄMER ET AL. 2005).

In dieser Studie konnte Pityriarubin C bei der „Schwarzen Hefe“ *Aureobasidium pullulans* nachgewiesen werden. Auffälligerweise wurde bei diesem Isolat Pityriarubin C ohne das ihn ansonsten immer begleitende Malassezia-Indol A identifiziert. Auswirkungen der oben beschriebenen Eigenschaften der Pityriarubine auf die Pathogenität dieser Hefe sind bisher unbekannt und bilden so sicherlich die Grundlage für weitere Untersuchungen. Trotz unserer Bemühungen ist es in dieser Studie nicht gelungen, bei *Exophiala dermatitidis* ebenfalls aus orangenen Banden Pityriarubine nachzuweisen.

Das Malassezia-Indol A (siehe Abbildung 17 auf Seite 47) wurde erstmals 2005 in einer Arbeit der Forschungsgruppe um Bernhard Irlinger veröffentlicht. Sie stellt genau wie das Malassezia-Indol B eine interessante neue Struktur eines Indolalkaloids mit bisher unbekanntem Eigenschaften dar. Aufgrund struktureller

Verwandtschaft könnte eine ähnliche Wirkungsweise wie bei den Alsterpaullonen vermutet werden. Diese Substanzen wurden im Jahr 2000 erstmals in einer Veröffentlichung von KUNICK ET AL. vorgestellt. Dabei wurde eine signifikante Erhöhung der CDK1/Cyclin B-inhibitorischen Eigenschaft im Vergleich zu den bereits ein Jahr vorher entdeckten Paullonen sowie eine *in vitro* antiproliferative Aktivität beschrieben. Die Gruppe der Paullone stellt eine neue Klasse der CDK (Cycklin-dependent Kinase)-Inhibitoren dar (ZAHAREVITZ ET AL., 1999). CDKs sind eine Enzymgruppe, die im Ablauf des Zellzyklus eine regulatorische Rolle übernehmen. Sie aktivieren Proteine durch Phosphorylierung des Serins oder des Threonins durch Verwendung des ATPs (Adenosintriphosphat) als Phosphatspender. CDKs sind aufgrund ihrer therapeutischen Eigenschaften auf dem Gebiet der Krebsbehandlung ins Interesse der Forschung geraten. Die meisten humanen Neoplasien stehen in Bezug zu einer Hyperaktivierung der CDKs. Auch bei der Alzheimer'schen Krankheit kann eine abnorme Protein Phosphorylierung beobachtet werden (KUNICK ET AL., 2005). Alsterpaullone (9-Nitropaullone) zählen zu den potentesten Paullonen und induzieren Apoptose durch Aktivierung der Caspase-9 infolge einer Störung des Membranpotentials der Mitochondrien (LAHUSEN ET AL., 2003).

In dieser Studie wurde Malassezia-Indol A erstmalig bei *Exophiala phaeomuriformis* gefunden. Welche Auswirkung diese Tatsache auf die Pathogenität dieser Spezies hat, kann jetzt nicht beantwortet werden. Auch in diesem Punkt sollten weitere Untersuchungen folgen, um herauszufinden, ob diese Verbindung möglicherweise bei humanen Infektionen bedeutsam ist.

Bislang war die auf der Aminosäure Tryptophan basierende Pigmentbildung bei den verwendeten Pilzen nicht bekannt. Durch diese Untersuchungen ist ein neues Feld für viele weiterführende Studien geöffnet worden. In dieser Arbeit konnten neben den bereits beschriebenen Indolderivaten auch vier völlig neuartige Verbindungen durch verschiedene Reinigungsverfahren aus dem gebildeten Pigment isoliert und chemisch aufgeklärt werden. Wie den verschiedenen Chromatogrammen der einzelnen Isolate zu entnehmen ist, ist bislang nur ein kleiner Teil der verschiedenen Banden des Pigments bekannt. Der größte Anteil ist noch nicht geklärt.

Bei *Natrassia mangiferae* konnten in dieser Arbeit zwei neuartige Strukturen aus der dritten und vierten Fraktion mit dem Rf-Wert 0,18 aus einer rosa Bande aufgeklärt werden. Diese sind in Abbildung 34 und 35 (Seite 68) dargestellt. Die Lactonverbindung aus Abbildung 34 stellte sich gereinigt blau, die Verbindung aus Abbildung 35 gereinigt pink dar.

Chemisch gesehen sind diese Verbindungen aufgrund ihrer Ringstrukturen hochinteressant und stellen eine neuartige Substanzklasse dar. Der Indolring des Tryptophans ist zwar noch enthalten, dennoch weist der übrige Teil der Verbindung auf eine völlig neue Verwertung der Aminosäure hin.

Aufgrund der Strukturverwandtschaft zu der 4,5-Dihydroxyisophthalsäure können bei der in Abbildung 35 sichtbaren Substanz Vermutungen in Bezug auf eine mögliche Funktion geäußert werden. Die Gruppe der Phthalsäuren hemmt die Glutamat-Decarboxylase des Gehirns. Dabei stellt die 4,5-Dihydroxyisophthalsäure den potentesten Inhibitor aus dem Kreis der Phthalsäuren dar. Mit Hilfe der Glutamat-Decarboxylase wird der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter, die γ -Aminobuttersäure (GABA), synthetisiert (ENDO ET AL., 1981). Die wirkungsvolle 4,5-Dihydroxyisophthalsäure wurde bereits 1978 ebenfalls von ENDO ET AL. bei *Streptomyces*-Spezies isoliert. Als Folge intraventrikulärer Gabe dieser Phthalsäure bei Mäusen stellten die Forscher eine signifikant geringere GABA-Konzentration des Gehirns fest, die sich bei den Tieren durch Ausbildung von Krämpfen darstellte.

In Bezug auf die Art der gebildeten Pigmente ist es interessant, dass *Aureobasidium pullulans* und *Natrassia mangiferae* zwar zur gleichen Familie - der *Dothideales* - gehören, jedoch im Vergleich zeigen beide Spezies auf dem Minimalagar ein unterschiedlich ausgeprägtes Pigmentbildungspotential. Gemessen an der Menge synthetisierten Pigmentrohextraktes weist *Natrassia mangiferae* eine deutlich stärkere Potenz zur Bildung von Pigmenten auf als *Aureobasidium pullulans*. Die Strukturaufklärung der von ihnen gebildeten Substanzen ergab, dass *Natrassia mangiferae* keine der bisher nachgewiesenen Indolderivate synthetisiert. Bereits 1969 verfassten HOWE ET MOORE eine Arbeit über ein Naphthoquinon (6-Ethyl-5-Hydroxy-2,7-Dimethoxynaphthoquinon) bei *Hendersonula toruloidea* Natrass. 1998 veröffentlichten dann MEDENTEV ET AKIMENKO eine detaillierte Übersicht über Naphthoquinone bei Pilzen, in der auch *Natrassia mangiferae* beschrieben wurde.

Die im Rahmen dieser Untersuchung isolierten Stoffe (vergleiche Kapitel 4.2.6) dieser Spezies unterscheiden sich von den bisher erwähnten Naphthoquinonen sowie von den bisher in Giessen entdeckten neuen Indolderivaten. *Aureobasidium pullulans* dagegen wandelt Tryptophan zu den in Punkt 5.1.1. (Pityriacitrin) sowie in Punkt 5.1.2 (Pityriarubin C) beschriebenen Substanzen um. Diese neue Erkenntnis führt zu der Frage, warum zwei Vertreter der Familie Dothideales sich so prinzipiell in der Verstoffwechslung dieser Aminosäure unterscheiden.

Bei *Exophiala dermatitidis*, Isolat P 1108, wurde aus der fünften und sechsten Fraktion mit dem Rf-Wert 0,37 einer violett-roten Bande eine völlig neuartige Verbindung aufgeklärt, deren Strukturformel Abbildung 15 zu entnehmen ist (Seite 45). Das Isolat P 1108 gehört wie fünf weitere Isolate zu einer Mutationsreihe im Melaninsyntheseweg, welche sich von dem Isolat P 202 (ATCC 34100) ableiten (vergleiche Tabelle 2 auf Seite 22). Die isolierte Verbindung wurde vorläufig als Exophialin bezeichnet. Eine Funktion konnte dieser Substanz bisher noch nicht zugeordnet werden.

Die Strukturformel ermöglicht die Vermutung, dass diese Verbindung die zu Anfang dieses Kapitels beschriebenen Möglichkeiten der Verstoffwechslung des Tryptophans (siehe Seite 73) in sich vereinigt. Zum einen ist der Indolring des Tryptophans erkennbar, welches auf ein Indolderivat hinweist. Zum anderen könnte der restliche Teil der Verbindung aber durch die Öffnung des Pyrrolringes mittels Polyketidsynthesen entstanden sein.

In dieser Studie konnten bislang von den Hefen lediglich Indolderivate isoliert werden. Hyphen-Bildner mit Ausnahme von *Schizophyllum commune* dagegen synthetisierten Verbindungen, die nicht in dieses Schema passten. Inwieweit diese Verbindung nun dadurch zu erklären ist, dass *Exophiala dermatitidis* ein dimorpher Pilz ist, d. h. das er in Hefe- und in Hyphenform wachsen kann und dabei echtes Luftmyzel bildet, kann nicht genau beantwortet werden. In diesem Falle sollten weitere Untersuchungen angeschlossen werden.

Bei *Exophiala phaeomuriformis* konnte aus der vierten Fraktion mit dem Rf-Wert 0,33 aus einer gelb-orangen Bande ebenfalls eine neuartige Verbindung aufgeklärt werden, dessen Strukturformel Abbildung 18 wiedergibt (Vergleiche Seite 47). Diese

Substanz zeigt Ähnlichkeiten mit dem Malassezin (Siehe Abbildung 3, Seite 6), welches bei *Malassezia furfur* erstmalig nachgewiesen wurde (KRÄMER ET AL., 2005). Bei Untersuchungen der Pathogenese der Pityriasis versicolor wurde eine verminderte Melanin-Produktion beobachtet, welche in Verbindung mit den Depigmentierungserscheinungen dieser Hautmykose gebracht wurde. Unter anderem wurde ein toxischer Effekt der gebildeten Pigmente von *Malassezia furfur* aus dem Tryptophan auf die Melanozyten vermutet. Herausgefunden wurde, dass das Malassezin einen Agonisten des Aryl Hydrocarbon (Ah) Rezeptors darstellt und so zur Apoptose der Melanozyten führt (KRÄMER ET AL., 2005). Agonisten dieses Rezeptors werden als mögliche therapeutische Mittel in der Krebstherapie diskutiert. Der Einfluss von Malassezin auf Melanom-Zellen wird derzeit weiter untersucht.

Humanpathogene Pilze verursachen sehr häufig Infektionen von Haut und Schleimhaut, können aber auch lebensbedrohende systemische Mykosen hervorrufen. Systemische Pilzinfektionen sind für fast 25% der Todesursachen bei Leukämie-Patienten verantwortlich. Dabei nutzen die Pilze verschiedene Strategien, um in den Wirt einzuwandern und um dann dort die Erkrankung auszulösen. Es lassen sich viele Gemeinsamkeiten bei den unterschiedlichsten Mikroorganismen feststellen. Die Pathogenese sowie der Ausbruch einer Infektion werden von den Virulenzfaktoren dieser Organismen geprägt. Am Anfang einer Infektion bedeutet dies, dass die Überwindung der Abwehrmechanismen des Wirtes zur initialen Anheftung der Mikroorganismen an das fremde Gewebe eine sehr wichtige Rolle einnimmt. Das Abwehrsystem des Wirtes besteht hauptsächlich aus Barrieren gegen diese initiale Anheftung – später dann Invasion - , nämlich aus lokalen und sekretorischen Faktoren (z. B. Schleim) und dem Immunsystem (VARTIVARIAN, 1992). Auch den Mikroorganismen, in diesem Falle den Pilzen, stehen eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren zur Verfügung.

Pathogene Pilz-Spezies unterscheiden sich in ihrer Zellmorphologie. Die meisten Arten bilden Hyphen in der Umwelt, wandeln aber ihren Phänotyp beim Einwandern in das Wirtsgewebe in eine unizelluläre Form um. Dieser Dimorphismus hat essentielle Bedeutung für die Pathogenität. Auch *Exophiala dermatitidis* bedient sich dieses Pathogenitätsfaktors (DE HOOG ET AL., 1994). Des Weiteren spielen u. a. die

verschiedenen Adhärenz-Systeme (z.B. Oberflächenglykoproteine), unterschiedliche Enzyme (Proteinasen, Superoxid-Dismutasen, Hydrolasen) sowie Toxine (Gliotoxin von *Aspergillus fumigatus*) eine bedeutende Rolle. Darüber hinaus ist für jede Zelle Eisen unverzichtbar. Die Kontrolle und die Regulation des frei verfügbaren Eisens stellen einen strategisch wichtigen Faktor im Kampf zwischen Wirt und Mikroorganismen dar. Viele Pilze verwenden dazu ein Siderophor als ein effektives Eisen-Aufnahme-System (VARTIVARIAN, 1992; SCHRETTE ET AL., 2004).

Unter den Pigmenten sind bisher Melanin, Carotenoide sowie Quinone als Virulenzfaktoren bekannt (siehe 1.1.2.1 bis 1.1.2.3). Melanin dient u. a. zur Neutralisation von Permanganat und Hypochlorid sowie zur Stabilität der Zelle als Hilfeleistung bei der Penetration von Wirtgewebe (ESSER ET AL., 2004). Das bessere Verstehen der pathogenen Eigenschaften von Melanin ist wichtig, weil es in Verbindung mit der Pathogenese mehrerer Erkrankungen gebracht wird, z. B. Pilzinfektionen, malignen Melanomen, Parkinson Krankheit, traumatische anteriore Uveitis sowie Vitiligo (NOSANCHUK ET AL., 1998).

Diesbezüglich ist es wichtig, dass kein Pilz in Bezug auf die Virulenz von einem einzigen Molekül abhängig ist. Molekulare Studien der Virulenz in pathogenen Pilzen haben eine komplexe Interaktion zwischen dem menschlichen Wirt und dem einwandernden Pilzen enthüllt. Sie stellt sich als ein polyvalenter Prozess dar, welcher die Aktivierung vieler Gene in verschiedenen Stadien der Infektion erforderlich macht. Es ist wichtig, eine klare Unterscheidung zwischen Molekülen zu treffen, die die Ausschüttung von „Wirt-interaktiven“ Virulenzmolekülen regulieren und solchen Molekülen, die nur eine „haushaltende“ Funktion haben, d.h. in gleicher Weise in direkter Interaktion mit dem Wirt oder lediglich in entzündetem Gewebe ausgeschüttet werden (ODDS ET AL., 2001). Des Weiteren gilt es zu bedenken, dass es sich bei den betroffenen Patienten meist um immunsupprimierte Personen handelt. In einem gesunden Wirt sind die beschriebenen Virulenzfaktoren oft nicht potent genug, um eine Infektion auszulösen.

Um die indolhaltigen Pigmente, die in dieser Studie bei manchen Spezies erstmals nachgewiesen wurden, als einen möglichen Pathogenitätsfaktor bewerten zu können, muss allerdings geklärt werden, inwieweit eine Situation bei der Infektion angetroffen wird, dass die Aminosäure Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle

vorhanden oder zumindest vorrangig ist. Bei *Malassezia furfur* und dem klinischen Bezug der Pityriasis versicolor konnte diese Situation auf der Haut durch exzessives Schwitzen erklärt werden (LIAPPIS ET AL., 1980). Ob dies bei den in dieser Untersuchung verwendeten Spezies ebenfalls eine Rolle spielt, bleibt noch unklar und sollte weiter untersucht werden.

Malassezia furfur war die erste Hefe, bei der die Bildung von Pigmenten nachgewiesen wurde. Auch die *Candida*-Hefen zeigen teilweise diese Fähigkeit (WENZEL ET AL., 2005). Darauf folgend wurde in dieser Arbeit ebenfalls bei den *Trichosporon*-Hefen, der Hefe *Geotrichum capitatum* sowie den *black yeasts* („schwarzen Hefen“) die Pigmentbildung beobachtet. *Aspergillus terreus* und *Natrasia mangiferae* unterscheiden sich in der Wachstumsform (Bildung von Luftmyzel) sowie in der Art des gebildeten Pigments von den vorher aufgezählten Spezies. Bei ihnen konnten die bisher schon fast „gewohnten“ Substanzen (z. B. Pityriacitrin, Pityriarubine) nicht isoliert werden. Interessant ist weiterhin, dass aber nicht unbedingt jede Hefe Tryptophan in dieser Art umwandelt. So z. B. konnte bei nicht allen *Malassezia*- (MAYSER ET AL., 2004) bzw. *Trichosporon*-Hefen (siehe Kapitel 4.2.3) die Nährbodenverfärbung festgestellt werden. Grund und Ursache hierfür sind nicht bekannt. Es konnte in dieser Arbeit aber auch beobachtet werden, dass bei *Schizophyllum commune*, der keine Hefeform ausbildet, dennoch die Bildung einer geringen Menge an Pityriacitrin für möglich gehalten werden kann. Die ursprünglich angenommene These, dass nur Hefen diese Indolderivate zu synthetisieren vermögen, wird durch *Schizophyllum commune* in Frage gestellt. Bei den Schwärzepilzen ist nach den bisherigen Erkenntnissen diese These dennoch anwendbar. Bei denjenigen Spezies, die keine Hefeform ausbilden, waren die Screeningergebnisse alle negativ und es wurde keine Pigmentbildung beobachtet (vergleiche hierzu Tabelle 12).

In dieser Studie konnte herausgestellt werden, dass Hefen oder in Hefeform wachsende Pilze bevorzugt Pigmente bilden. Rein myzelial wachsende Pilze dagegen weisen eine geringere Tendenz hierfür auf. Es bleibt weiter festzuhalten, dass fast ausschließlich Hefen sowie die Hefeformen dimorpher Pilze die in Giessen erstmals bei *Malassezia furfur* nachgewiesenen Pigmente bilden. Spezies, die

ausschließlich Hyphen bilden, scheinen Pigmente anderer Art zu synthetisieren. Eine bisher bekannte Ausnahme könnte *Schizophyllum commune* darstellen. Bei dieser Spezies konnte zur Spezifizierung dieser These in dieser Studie nicht genügend Material gesammelt werden. In Zukunft sollten aber weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang folgen, um die Pigmentbildung von *Schizophyllum commune* weiter aufzuklären.

In Bezug auf die Evolution der Pilze zeigen phylogenetisch weit entfernte Pilze die Gemeinsamkeit der Pigmentbildung. Es kann jedoch angenommen werden, dass die Ausbildung von Hefen bei Pilzen eine ältere Form darstellt als die Ausbildung von Hyphen. Zur Vermehrung sporenbildender Pilze ist eine gewisse Trockenheit Voraussetzung, wohingegen Hefen Flüssigkeiten bevorzugen. Aufgrund der Tatsache, dass die Evolution der Pilze im Meer begann, kann vermutet werden, dass Luftmyzel bildende Pilze nach dem Landgang eine weiter entwickelte Form darstellen, die die Gene für die Bildung pigmentierter Indolderivate entweder verloren haben oder sie nur unter bislang nicht wieder erreichbaren Bedingungen aktivieren. Da sie andere Pigmente bilden, kann ebenfalls angenommen werden, dass sich ihre gebildeten Substanzen aufgrund der veränderten Lebensbedingungen ebenfalls veränderten bzw. anpassten.

6. Zusammenfassung

Der Begriff „Pigment“ beschreibt in erster Linie farbige Substanzen. Pigmente sind aber darüber hinaus für wichtige metabolische oder physiologische Prozesse verantwortlich.

Im Reich der Pilze gibt es eine Vielzahl von Pigmenten. Zu ihnen zählen die Melanine, die Carotenoide, die Naphthoquinone, die Phenoxazine, die Flavonoide sowie indolhaltige Pigmente. Gewisse Indolderivate wurden von einer Arbeitsgruppe um Prof. Mayser 1998 erstmals bei der Hefe *Malassezia furfur* beschrieben, bei der diese Indolderivate in einem klinischen Zusammenhang mit der Hautkrankheit Pityriasis versicolor stehen könnten (u.a. Pityriacitrin, Pityriarubine). Ziel dieser Studie war es, zu klären, inwieweit auch andere Spezies, insbesondere phylogenetisch weiter entfernte Arten, Tryptophan zu indolhaltigen Pigmenten umwandeln können. Des Weiteren wurde versucht zu klären, ob die Assimilation dieser Aminosäure immer die gleichen Pigmente hervorruft.

Grundlage der Pigmentbildung stellte - aufbauend auf die Untersuchungen von 1998 - ein um Glucose erweiterter Minimalagar dar, dem neben Tween als Lipidquelle lediglich Tryptophan als Stickstoffquelle beigegeben wurde. Insgesamt wurden 57 Isolate untersucht. Das verwendete Pilzgut, welches sich aus vorhandenem Material der Gießener Hautklinik sowie dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Uniklinik Aachen zusammensetzte, wurde auf diesen Minimalagar verimpft und das Wachstum mit einer möglichen Pigmentbildung beobachtet. Von den positiv getesteten Isolaten wurden ca. 200 Nährbodenschalen angezüchtet und nach vierwöchiger Wachstumsphase das Pigment als Rohextrakt gewonnen. Dieses wurde durch chromatographische Techniken aufgereinigt und Reinsubstanzen hergestellt. Die Strukturaufklärung isolierter Substanzen erfolgte am Biochemischen Institut der Technischen Universität München.

In dieser Arbeit wurden elf verschiedene Isolate der Gattung *Trichosporon* getestet (vergleiche Tabelle 1, Seite 21). Von diesen konnten drei Isolate zur Pigmentbildung

angeregt werden (*Trichosporon asteroides*, *Trichosporon cutaneum* sowie *Trichosporon loubieri*). Diese drei Pilze konnten durch strukturaufklärende Untersuchungen als Bildner u. a. des indolhaltigen Pigments Pityriacitrin nachgewiesen werden (siehe Punkt 4.2.3, Seite 54).

Geotrichum capitatum, der bis in die 80er Jahre ebenfalls zu den Trichosporon-Hefen gezählt wurde, wurde auch positiv auf Pigmentbildung gescreent. Diese Spezies zeigte ebenfalls die Synthese von Pityriacitrin.

Des Weiteren fanden 43 Isolate aus dem Bereich der Schwärzepilze Verwendung (vergleiche Tabelle 2, Seite 22). Unter ihnen wurden 22 positiv auf Pigmentbildung getestet. Diese 22 Pilze stammten von fünf verschiedenen Spezies (fünf von *Aureobasidium pullulans*, dreizehn von *Exophiala dermatitidis*, zwei von *Exophiala phaeomuriformis*, eins von *Exophiala spinifera* sowie eins von *Phialocephala*). Auch bei diesen Pilzen konnte die Bildung von indolhaltigen Pigmenten (Pityriacitrin, Pityriarubin sowie Malassezia-Indol A) nachgewiesen werden. Bei *Exophiala phaeomuriformis* und *Exophiala dermatitidis* konnten neue Substanzen mit bislang ungeklärter Funktion isoliert werden. *Nattractia mangiferae* – ebenfalls Angehöriger der Schwärzepilze – unterscheidet sich in einigen Punkten von den bereits erwähnten melaninbildenden Pilzen. Während die eben genannten Schwärzepilze zu den *black yeasts* (schwarze Hefen) gezählt werden, zeigt *Nattractia mangiferae* keinerlei Hefeform. Die isolierten Substanzen von dieser Spezies zeigten keine Übereinstimmung mit den bereits bekannten Indolderivaten. Es konnten zwei neue Substanzen mit ebenfalls bislang unbekannter Funktion in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Alle negativ gescreenten Isolate der Schwärzepilze bildeten Hyphen und Luftmyzel aus.

Die erst seit 1989 als pathogen angesehene hyphenbildende Spezies *Schizophyllum commune* war ebenfalls Bestandteil dieser Untersuchung. Sie zeigte überraschenderweise auch einen schwachen Peak im Bereich der Elutionszeit des Pityriacitrins auf der HPLC, was auf die Bildung dieses Indolderivats hinweist.

Der Schimmelpilz *Aspergillus terreus*, der bereits auf Kimmig-Agar rot-orangene Verfärbungen zeigt, färbt in der gleichen Art und Weise auch den verwendeten Minimalagar. Eine exakte Strukturaufklärung der von ihm gebildeten Substanzen war leider nicht möglich. Herausgefunden konnte aber, dass es sich dabei um von den vorher erwähnten indolhaltigen Pigmenten verschiedene Strukturen handelt.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie herausgefunden, dass mehrere Gattungen und Spezies humanpathogener Pilze gleichermaßen wie *Malassezia furfur* Tryptophan zu pigmentierten Indolderivaten umformen können. Vorherrschend sind Hefen zur Pigmentbildung befähigt. Bei ihnen konnten stets Substanzen aus einer Gruppe bestimmter Indolderivate isoliert werden. Pilze in Hyphenform produzieren weniger häufig Pigmente. Diese haben sich in dieser Untersuchung meist von den bei *Malassezia furfur* gefundenen Stoffen unterschieden. Aus der Vielfalt der gebildeten Pigmente konnten ebenfalls vier neuartige Verbindungen vorgestellt werden, deren Funktion noch ermittelt werden sollte. Diese zeigten zusätzlich interessante chemische Aspekte. Zur Aufklärung der restlichen Bestandteile des Pigments sollten weitere Untersuchungen folgen.

7. Summary

The term „pigment“ primarily describes colored agents. In addition, pigments are responsible for important metabolic and physiological processes. A variety of pigments exist in the world of fungi. These include melanins, carotenoids, naphthoquinones, phenoxazines, flavonoids and indole-containing pigments. In 1998, the working group of Prof. Mayser first described some particular indole derivatives in the yeast *Malassezia furfur*, which might be clinically related to the skin disease pityriasis versicolor (e.g., pityriacitrin, pityriarubins). The aim of the study was to clarify whether other species, in particular phylogenetically more distant ones, are able to transform tryptophan into indole-containing pigments. In addition, it was investigated whether assimilation of this amino acid always produces the same pigments.

Following the studies in 1998, a glucose-enriched minimal agar was used as a basis for pigment production; apart from Tween as lipid source, only tryptophan was added as nitrogen source. A total of 57 isolates were investigated. The fungal material, which had been obtained from the Giessen Clinic of Dermatology and the Institute for Medical Microbiology at Aachen University, was inoculated onto this minimal agar and observed for growth and possible pigment formation. Positive isolates were cultured in approximately 200 plates, and pigment was extracted after a growing phase of 4 weeks. This was chromatographically purified to obtain pure substances. Structural analysis of the isolated substances was performed at the Munich Technological University.

In the present study, eleven different isolates of the genus *Trichosporon* were tested (compare Table 1, page 21). Of these, three isolates could be stimulated to produce pigment (*Trichosporon asteroides*, *Trichosporon cutaneum* and *Trichosporon loubieri*). By means of structure analytical studies, these three fungi were found to produce the indole-containing pigment pityriacitrin (see section 4.2.3, page 54).

Geotrichum capitatum, which had been assigned to the *Trichosporon* yeasts until the 1980s, was also positively screened for pigment formation. This species too showed synthesis of pityriacitrin.

In addition, 43 isolates from black fungi were used (compare Table 2, page 22). Among these, 22 were positively tested for pigment production. These 22 fungi originate from five different species (five from *Aureobasidium pullulans*, thirteen from *Exophiala dermatitidis*, two from *Exophiala phaeomuriformis*, and one each from *Exophiala spinifera* and *Phialocephala*). These fungi too were found to produce indole-containing pigments (pityracitrin, pityriarubin and *Malassezia* indole A). In the case of *Exophiala phaeomuriformis* and *Exophiala dermatitidis*, new substances with hitherto unknown function could be isolated. *Nattrassia mangiferae* – also a member of the black fungus family – differs in some respects from the melanin producing fungi mentioned before. While the latter belong to the black yeasts, *Nattrassia mangiferae* does not show any yeast form. The substances isolated from this species did not correspond to the indol derivatives already known. Two new substances with hitherto unknown function could be structurally analyzed. All negatively screened isolates of black fungus showed formation of hyphae and air mycelium.

The hyphae-forming species *Schizophyllum commune*, which has been considered pathogenic only since 1989, was also investigated in this study. Surprisingly, it also showed a narrow peak within the elution time of pityracitrin during HPLC, indicating indole formation.

The mould *Aspergillus terreus*, which shows red-orange pigmentation on Kimmig agar, did so in the same manner on the minimal agar used in the present study. Unfortunately it was not possible to exactly analyze the structures of the substances produced. However, they were found to differ from those of the indole-containing pigments mentioned before.

In summary, the present study showed that several genera and species of human pathogenic fungi are able to transform tryptophan into pigmented indole derivatives in a manner equal to that of *Malassezia furfur*. Predominantly yeasts are capable of producing pigment: Substances from a group of particular indole derivatives could always be isolated. Pigment is less frequently generated by fungi that have hyphae. In the present study, they mostly differed from the substances found with *Malassezia furfur*. From the variety of pigments produced, four new compounds were presented, the function of which remains to be defined. In addition, they showed interesting chemical aspects. Further studies are planned to elucidate the many other components of the pigment.

8. Literatur

- 1 ALVAREZ J.R., QUIROGA J.S., TABOADA C.R., GONZALES A.F., TORRES F.M., GARCIA-BENGOCHEA J.
Cardiac Aspergillosis with pedunculated mass in the left ventricle
Tex Heart Inst J 31:439-441 (2004)
- 2 BADDLEY J.W., MOSER S.A
Emerging fungal resistance
Clin Lab Med 24:721-735 (2004)
- 3 BAUR X., RICHTER G., PETHRAN A., CZUPPON A.B., SCHWAIBLMAIR M.
Increased prevalence of IgG-induced sensitization and hypersensitivity pneumonitis in nonsmokers exposed to aerosols of a contaminated air conditioner
Respiration 59:211-214 (1992)
- 4 BLASCHKE-HELLMESSEN R., LAUTERBACH I., PAUL K.D., TINTELNOT K., WEISSBACH G.
Detection of *Exophiala dermatitidis* (Kano) De Hoog 1977 in septicemia of a child with acute lymphatic leukemia and in patients with cystic fibroses
Mycoses 37: 89-96 (1994)
- 5 BOLIGNANO G., CRISEO G.
Disseminated nosocomial fungal infection by *Aureobasidium pullulans* var. *Melanigenum*: a case report
J Clin Microbiol 41:4483-4485 (2003)
- 6 BORG-VON ZEPELIN M., MONOD M.
Fungale Pathogene
Pharm unserer Zeit 32:110-116 (2003)
- 7 BRAKHAGE A.A., LANGFELDER K., WANNER G., SCHMIDT A., JAHN B.
Pigment biosynthesis and virulence
Contrib Microbiol 2:205-215 (1999)
- 8 BRAUN-FALCO O., PLEWIG G., WOLFF H.H.
Dermatologie und Venerologie
Springer-Verlag, 4. Auflage (1997)
- 9 BREUER H.
dtv-Atlas zur Chemie
4. Auflage:455 (1989)

- 10 BRITTON G.
The biochemistry of natural pigments
Camebridge University Press, 1.Auflage, 1983
- 11 BUZINA W., BRAUN H., FREUDENSCHUSS K., LACKNER A., SCHIMPL K.,
STAMMBERGER H.
The basidiomycete *Schizophyllum commune* in paranasal sinuses
Mycoses 46(Suppl.1):23-27 (2003)
- 12 CHRISTAKIS G., PERLORENTZUO S., ASLANIDOU M., MEGALAKAKI A., VELEGRAKI A.
Fatal *Blastoschizomyces capitatus* sepsis in a neutropenic patient with acute
myeloid leukemia: first documented case from Greece
Mycoses 48:216-220 (2005)
- 13 COCKELL C.S., HORNECK G.
The history of the uv-radiation climate of the earth – theoretical and space-
based observations
Photochem and Photobiol 73:447-451 (2001)
- 14 COCKELL C.S., KNOWLAND J
Ultraviolet radiation screening compounds
Biol Rev Camb Philos Soc 74:311-345 (1999)
- 15 COFRONCESCO E., VIVIANI M.A., BOSCHETTI C., TORTURANO A.M., BALZANI A.,
CASTAGNONE D.
Treatment of chronic disseminated *Geotrichum capitatum* infektion with high
cumulative dose of colloidal amphotericin B and itraconazole in a leucaemia
patient
Mycoses 38:377-384 (1995)
- 16 DE HOOG G. S., MATOS T., SUDHADHAM M., LUIJSTERBURG K. F., HAASE G.
Intestinal prevalence of the neurotropic black yeast *Exophiala (Wangiella)*
dermatitidis in healthy and impaired individuals
Mycoses 48:142-145 (2005)
- 17 DE HOOG G.S.
Significance of fungal evolution for the understandig of their pathogenicity,
illustrated with agents of phaeohyphomycosis
Mycoses 40(Suppl.2):5-8 (1997)
- 18 DE HOOG G.S., GUARRO J., GENE J., FIGUERAS M.J.
Atlas of clinical fungi
Centralbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, 2nd Edition
(2000)
- 19 DE HOOG G.S., HAASE G.
Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*
Antonie van Leuwenhoek 64:17-26 (1993)

- 20 DE HOOG G.S., TAKEO K., YOSHIDA S., GOTTLICH E., NISHIMURA K., MIYAJI M.
Pleomorphic life cycle of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*
Antonie van Leeuwenhoek 65:143-153 (1994)
- 21 DHINDSA M.K., NAIDU J., SINGH S.M.
A case of subcutaneous infection in a patient with discoid lupus erythematosus
caused by a *Scytalidium* synmorph of *Nattrasia mangiferae*, and its treatment
Med Mycol 36:425-427 (1998)
- 22 DIXON D.M., MCNEIL M.M., COHEN M.L., GELLIN B.G., LA MONTAGNE J.R.
Fungal infections: a growing threat
Public Health Rep 111:226-235 (1996)
- 23 DIXON D.M., POLAK-WYSS A.
The medically important dematiaceous fungi and their identification
Mycoses 34:1-18 (1991)
- 24 DOUZERY E.J.P., SNELL E.A., BAPTESTE E., DELSUC F., PHILLIPE H.
The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile
proteins and fossils?
Proc Natl Acad Sci USA 101:15386-15391 (2004)
- 25 ENDO A., KITAHARA N.
Inhibition of brain glutamate decarboxylase by 4,5-dihydroxyisophthalic acid
and related compounds
J Antibiot (Tokyo) 34:1351-1354 (1981)
- 26 ENDO A., KITAHARA N., OKA H., MIGUCHI-FUKAZAWA Y., TERAHARA A.
Isolation of 4,5-dihydroxyisophthalic acid an inhibitor of brain glutamate
decarboxylase, produced by a *Streptomyces* species
Eur J Biochem 82:257-259 (1978)
- 27 FARR D.F., BILLS G.F., CHAMURIS G.P., ROSSMANN A.Y.
Fungi on plants and plant products in the United States
Am Phytopathol Society Press; St. Paul, Minn (1989)
- 28 FENG B., WANG X., HAUSER M., KAUFMANN S., JENTSCH S., HAASE G., BECKER
J.M., SZANISZLO P.J.
Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in
dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella*
(*Exophiala*) *dermatitidis*
Infect Immun 69:1781-1794 (2001)
- 29 FOUASSIER M., JOLY D., CAMBON M., PEIGUE-LAFEUILLE H., CONDAT P.
Geotrichum capitatum infection in a neutropenic patient : Apropos of a case
review of the literature
Rev Med Interne 19:431-433 (1998)

- 30 FRANKELL D.H., RIPPON J.W.
Hendersonula toruloidea infection in man
Mycopathologica 105:175-186 (1989)
- 31 GARCIA-MARTOS P., MARQUEZ A., GENE J.
Human infections by black yeasts of genus *Exophiala*
Rev Iberoam Micol 19:72-79 (2002)
- 32 GIRMENIA C., PAGANO L., MARTINO B., D'ANTONIO D., FANCI R., SPECCHIA G.,
MELILLO L., VUELLI M., PIZZARELLI G., VENDITI M., MARTINO P., GIMENA
INFECTION PROGRAMM
Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum*
in patients with haematological malignancies: a retrospective multicenter study
from Italy and review of the literature
J Clin Microbiol 43:1818-1828 (2005)
- 33 GRAZIANI S., VASNIER C., DABOUSSI M.J.
Novel polyketide synthase from *Nectria haematococca*
Appl Environ Microbiol 70:2984-2988 (2004)
- 34 GREER D.L., GUTIERREZ M.M.
Tinea pedis caused by *Hendersonula toruloidea*. A new problem in
dermatology
J Am Acad Dermatol 16:1111-1115 (1987)
- 35 GUÉHO E., IMPROVISI L., DE HOOG G.S., DUPONT B.
Trichosporon in humans : a practical account
Mycoses 37:3-10 (1994)
- 36 GUÉHO E., SMITH M.T., DE HOOG G.S., BILLON-GRAND G., CHRISTEN R.,
BATENBURG-VAN DER VEGTE W.H.
Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*
Antonie van Leeuwenhoek 61:289-316 1992
- 37 HAASE G., SKOPNIK H., KUSENBACH G.
Exophiala dermatitidis infection in cystic fibrosis
Lancet 336:188-189 (1990)
- 38 HAASE G., BRAKHAGE A.A.
Melanized fungi infecting humans: Function of melanin as a factor in
pathogenesis
in: DOMER J.E., KOBAYASHI G.S.
The mycota Vol. 12, Human fungal pathogens
Springer-Verlag, 1. Auflage (2004)
- 39 HACHEM R.Y., KONTOYIANNIS D.P., BOKTOUR M.R., AFIF C., COOKSLEY C., BODEY
G.P., CHATZINIKOLAOU I., PEREGO C., KANTARJIAN H.M., RAAD II
Aspergillus terreus: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold
in patients with hematologic malignancies

- Cancer 101:1594-1600 (2004)
- 40 HAMILTON A.J., GOMEZ B.L.
Melanins in fungal pathogens
J Med Microbiol 51:189-191 (2002)
- 41 HAMILTON A.J., HOLDOM M.D.
Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence
Med Mycol 37:375-389 (1999)
- 42 HENKE H.
Flüssig-Chromatographie
Vogel-Verlag (1999)
- 43 HERBRECHT R., KOENIG H., WALLER J., LIU L., GUÉHO E.
Trichosporon infections: clinical manifestations and treatment
J Mycol Med 3:129-136 (1993)
- 44 HERBRECHT R., LIU K.L., KÖNIG H., WALLER J., DUFOUR P., MARCELLIN L.,
MALOISEL F.
Trichosporon capitatum septicemia: Apropos of 5 cases
Agressologie 33(Spec No 2):96-98 (1992)
- 45 HIRUMA M., KAWADA A., OHATA H., OHNISHI Y., TAKAHASHI H., YAMAZAKI M.,
ISHIBASHI A., HATSUSE K., KAKIHARA M., YOSHIDA M.
Systemic phaeohyphomycosis caused by *Exophiala dermatitidis*
Mycoses 36:1-7 (1993)
- 46 HOF, HERBERT
Mykologie für Mediziner
Thieme-Verlag, 1. Auflage (2003)
- 47 HOFFMANN-LA ROCHE & CO., LTD., CH 4002 BASEL, SWITZERLAND, AND
WADSWORTH CENTER FOR LABORATORIES AND RESEARCH, NEW YORK STATE
DEPARTMENT OF HEALTH, ALBANY, NEW YORK 12201-0509
Loss of Melanin in *Wangiella dermatitidis* does not result in greater
susceptibility to antifungal agents
Antimicrob Agents Chemother 33:1639-1640 (1989)
- 48 HORRÉ R., SCHAAL K.P., SIEKMEIER R., STERZIK B., DE HOOG G.S.
Isolation of fungi, especially *Exophiala dermatitidis*, in patients suffering from
cystic fibrosis
Respiration 71:360-366 (2004)
- 49 HOSOE T., NOZAWA K., KAWAHARA N., FUKUSHIMA K., NISHIMURA K. MIYAJI M.,
KAWAI K.I.
Isolation of a new potent cytotoxic pigment along with indigotin from the
pathogenic basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune*
Mycopathologica 146:9-12 (1999)

- 50 HUANG C.L., LU MY, LIN K.H., HUANG L.M.
Geotrichum capitatum fungemia with skin lesions similar to Varicella in a patient with acute lymphocytic leukaemia
Acta Paediatr Taiwan 45:38-40 (2004)
- 51 IRLINGER B., BARTSCH A., KRÄMER H.J., MAYSER P., STEGLICH W.
New tryptophan metabolites from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*
Helvetica Chimica Acta 88:1472-1485 (2005)
- 52 IRLINGER B., KRÄMER H.J., MAYSER P., STEGLICH W.
Pityriarubins, biologically active bis(indolyl)spirans from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*
Angew Chem Int Ed 43:1098-1098 (2004)
- 53 JACOBSON E.S.
Pathogenic roles for fungal melanins
Clin Microbiol Rev 13:708-717 (2000)
- 54 JACOBSON E.S., HOVE E., EMERY H.S.
Antioxidant function of melanin in Black fungi
Infection and Immunity 63:4944-4945 (1995)
- 55 KACZMARSKI E.B., LIU YIN J.A., TOOTH J.A., LOVE E.M., DELAMORE I.W.
Systemic infection with *Aureobasidium pullulans* in a leukaemic patient
J Infect 13:289-291 (1986)
- 56 KALTER D.C.A., TSCHEN J.A., CERNOCH P.L., MCBRIDE M.E., SPERBER J., BRUCE S., WOLF J.E.JR.
Genital white piedra: epidemiology, microbiology, and therapy
J Am Acad Dermatol 14:982-993 (1986)
- 57 KAMALAM A., SENTHAMILSELVI G., AJITHADAS K., THAMBIAH A.S.
Cutaneous trichosporonosis
Mycopathologica 101:167-175 (1988)
- 58 KANTARCIOĞLU A.S., DE HOOG G.S.
Infections of the central nervous system by melanized fungi: e review of cases presented between 1999 and 2004
Mycoses 47:4-13 (2004)
- 59 KAWAYAMA T., FUJIKI R., RIKIMARU T., AIZAWA H
Chronic eosinophilic pneumonia assoziated with *Schizophyllum commune*
Respirology 8:529-531 (2003)

- 60 KHAN Z.U., KORTOM M., MAROUF R., CHANDY R., RINALDI M.G., SUTTON D.A.
Bilateral pulmonary Aspergilloma caused by an atypical isolate of *Aspergillus terreus*
J Clin Microbiol 38:2010-2014 (2000)
- 61 KRÄMER H.J., KESSLER D., STEGLICH W., MAYSER P.
Abstract
Arch Dermatol Res 294, 492 (2003)
- 62 KRÄMER H.J., PODOBINSKA M., BARTSCH A., BATTMANN A., THOMA W., BERND A.,
KUMMER W., IRLINGER B., STEGLICH W., MAYSER P.
Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast
Malassezia furfur, induces apoptosis in primary human melanocytes
Chem Biochem 6:860-865 (2005)
- 63 KUSENBACH G., SKOPNIK H., HAASE G., FRIEDRICH F., DOHMEN H.
Exophiala dermatitidis pneumonia in cystic fibrosis
Eur J Pediatr 151:344-34 (1992)
- 64 LANGFELDER K., STREIBEL M., JAHN B., HAASE G., BRAKHAGE A.A.
Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic
fungi
Fungal Genet Biol 38:143-158 (2003)
- 65 LASSUS A., KANERVA L., STUBBS S.
White Piedra
Arch Dermatol 118:208-211 (1982)
- 66 LIAPPIS N., KOCHBECK E., ECKHARDT G., HAHNE H., KESSLER K., BANTZER P.
Aminosäureverluste im menschlichen Schweiß
Arch Dermatol Res 269:311-323 (1980)
- 67 MARIAT F., LIAUTAUD B., LIAUTAUD M., MARILL F.G.
Hendersonula toruloidea, causative agent of a fungal verrucous dermatitis
observed in Algeria
Sabouraudia 16:133-140 (1978)
- 68 MARINO P., VENDITTI M., MICOZZI A., MORACE G., POLONELLI L., MANTOVANI M.P.,
PETTI M.C., BUGIO V.L., SANTINI C., SERRA P., ET AL.
Blastoschizomyces capitatus: an emergent cause of invasive fungal disease in
leukemia patients
Rev Infect Dis 12:570-582 (1990)
- 69 MARLIER S., DEJAUREGIBERRY J.P., AGUILON P., CARLOZ E., DUVAL J.L.,
JAUBERT D.
Chronic sinusitis caused by *Schizophyllum commune* in AIDS
Presse Med 22:1107 (1993)

- 70 MARTY F.M., BAROUCH D.H., COAKLEY E.P., BADEN L.R.
Disseminated Trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*
J Clin Microbiol 41:5317-5320 (2003)
- 71 MATOS T., DE HOOG G.S., DE BOER A.G., DE CROM I., HAASE G.
High prevalence of the neurotropic black yeast *Exophiala* (*Wangiella*)
dermatitidis in steam bath
Mycoses 45:373-377 (2002)
- 72 MAYSER P., HUPPERTZ M., PAPAVALASSILIS C., GRUNDER K.
Fungi of the *Trichosporon* genus. Identification, epidemiology and significance
of dermatologic disease pictures
Hautarzt 47:913-20 (1996)
- 73 MAYSER P., SCHÄFER U., KRÄMER H.J., IRLINGER B., STEGLICH W.
Pityriacitrin – an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast
Malassezia furfur
Arch Dermatol Res 294:131-134 (2002)
- 74 MAYSER P., STAPELKAMP H., KRÄMER H.J., PODOBINSKA M., WALLBOTT W.,
IRLINGER B., STEGLICH W.
Pityrialactone – a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of
Malassezia furfur
Antonie van Leeuwenhoek 84:185-191 (2003)
- 75 MAYSER P., TÖWS A., KRÄMER H.-J., WEIß R.
Further characterization of pigment-producing *Malassezia*-strains
Mycoses 47:34-39 (2004)
- 76 MAYSER P., WILLE G., INKAMPE A., THOMA W., ARNOLD N., MONSEES T.
Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of
tryptophan as single nitrogen source
Mycoses 41:265-271 (1998)
- 77 MEDENTSEV A.G., AKIMENKO V.K.
Naphthoquinone metabolite of the fungi
Phytochemistry 47:935-959 (1998)
- 78 MILES P.G., LUND H., RAPER JR.
The identification of indigo as a pigment produced by a mutant culture of
Schizophyllum commune
Arch Biochem Biophys 62:1-5 (1956)
- 79 MOORE M.K.
The infection of human skin and nail by *Scytalidium* species
Curr Top Med Mycol 4:1-42 (1992)

- 80 MYOKEN Y., SUGATA T., FUJITA Y., KYO T., FUJIHARA M., KATSU M., MIKAMI Y.
Successful treatment of invasive stomatitis due to *Exophiala dermatitidis* in a patient with acute myeloid leukaemia
J Oral Pathol Med 32:51-54 (2003)
- 81 NOSANCHUK J.D., ROSAS A.L., CASADEVALL A.
The antibody response to fungal melanin in mice
J of Immun 160:6026-6031 (1998)
- 82 ODDS F.C., GOW N.A.R., BROWN A.J.P.
Fungal virulence studies come of age
Genome Biol 2:reviews 1009.1-1009.4 (2001)
- 83 Padhye A.A., Verghese S., Ravichandran P., Balamurugan G., Hall L.,
PADMAJA
Trichosporon loubieri infection in a patient with adult polycystic kidney disease
J Clin Microbiol 41:479-482 (2003)
- 84 PIERROT M., JOSSE P., RASPILLER M.F., GOULMY M., RAMBOURG M.O., MANEL J.,
LAMBERT H.
Intoxications by hallucinogenic mushrooms
Ann Med Interne (Paris) 151(Suppl. B):B16-9 (2000)
- 85 PROCOP G.W., ROBERTS G.D
Emerging fungal diseases: the importance of the host
Clin Lab Med 24:691-719, vi-vii (2004)
- 86 REDONDO-BELLON P., IDOATE M., RUBIO M., IGNACIO HERRERO J.
Chromoblastomycosis produced by *Aureobasidium pullulans* in an immunosuppressed patient
Arch Dermatol 133:663-664 (1997)
- 87 ROH M.L., TUAZON C.U., MANDLER R., KWON-CHUNG K.J., GEIST C.E.
Sphenocavernous syndrome associated with *Schizophyllum commune* infection of the sphenoid sinus
Ophthal Plast Reconstr Surg 21:71-74 (2005)
- 88 SALKIN I.F., MARTINEZ J.A., KEMNA M.E.
Opportunistic infection of the spleen caused by *Aureobasidium pullulans*
J Clin Microbiol 23:828-832 (1986)
- 89 SCHIEMANN R., GLASMACHER A., BAILLY E., HORRE R., MOLITOR E., LEUTNER C.,
SMITH M.T., KLEINSCHMIDT R., MARKLEIN G., SAUERBRUCH T.
Geotrichum capitatum septicaemia in neutropenic patients: case report and review of the literature
Mycoses 41:113-116 (1998)

- 90 SCHLUNEGGER U.P., KUCHEN A., CLEMENCON H.
Mycelium product in higher fungi. i.phenoxazine derivates in *Calocybe gambosa*
Hel Chim Acta 59:1383-1388 (1976)
- 91 SCHNITZLER N., PELTROCHE-LLACSAHUANGA H., BESTIER N., ZÜNDORF J., LÜTTICKEN R., HAASE G.
Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils
Infect Immun 67:94-101 (1999)
- 92 SCHRETTE M., BIGNELL E., KRAGL C., JOECHL C., ROGERS T., ARST JR H.N., HAYNES K., HAAS H.
Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence
J Exp Med 200:1213-1219 (2004)
- 93 SCHULTE T., WELCKER K., SCHATZ J., BRANSCHIED D.
Die chirurgische Therapie des pulmonalen Aspergilloms
Mycoses 48:46-50 (2005)
- 94 SHETT G., CASATI B., WILLINGER B., WEILANDER G., BINDER T., GRABENWOGER F. ET AL.
Endocarditis and aortal embolization caused by *Aspergillus terreus* in a patient with acute lymphoblastic leukemia in remission: diagnosis by peripheralblood culture
J Clin Microbiol 36:3347-51 (1998)
- 95 SIGLER L., SUMMERBELL R.C., POOLE L., WIEDEN M., SUTTON D.A., RINALDI M., AGUIRRE M., ESTES G.W., GALGANI J.N.
Invasive *Natrasia mangiferae* infections: case report, literature review, and therapeutic and taxonomic appraisal
J Clin Microbiol 35:433-440 (1997)
- 96 STEINBACH W.J., BENJAMIN JR. D.K., KONTOYIANNIS D.P., PERFECT J.R., LUTSAR I., MARR K.A., LIONAKIS M.S., TORRES H.A., JAFRI H., WALSH T.J.
Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases
Clin Infect Dis 39:192-198 (2004)
- 97 TAN H.P., WAHLSTROM H.E., ZAMORA J.U., HASSANEIN T.
Aureobasidium pneumonia in a post liver transplant recipient: a case report
Hepatogastroenerology 44:1215-1218 (1997)
- 98 TOROK M., DE WECK A.L., SCHERRER M.
Allergic alveolitis as a result of mold on the bedroom wall
Schweiz Med Wochenschr 111:924-929 (1981)

- 99 TZEAN S.S., ESTEY R.H.
Schizophyllum commune Fr. as a destructive mycoparasite
Can J Microbiol 24:780-784 (1978)
- 100 VERMEIL C., GORDEFF A., LEROUX M.J., MORIN O., BOUC M.
Keloid blastomycosis caused by *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud in
Brittany
Mycopathol Mycol Appl 43:35-39 (1971)
- 101 WADA Y., KITAJIMA H., KUBO M.
A boy highly suspected of hypersensitivity pneumonitis characterized by
generalized mucosal lesions
Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 19:524-536 (1996)
- 102 WATANABE S., HIRAI H., KATO Y., NISHIDA H., SAITO T., YOSHIKAWA N.,
PARKINSON T., KOJIMA Y.
CJ-19,784, a new antifungal agent from a fungus, *Acanthostigmella* sp.
J Antibiot (Tokyo) 54:1031-1035 (2001)
- 103 WENZEL M., HAASE G., MAYSER P., KRÄMER H.J., SPITELLER P.
Tryptophanabhängige Pigmentbildung bei *C.glabrata*
Vortrag bei 39. Wissenschaftl. Tagung der DMYKG e.V., Leipzig (2005)
- 104 WILLE G
Synthese und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Schleimpilzen
und lipophilen Hefen
Dissertation.de, Verlag im Internet, Berlin (2000)
- 105 WILLINGER B., KOPETZKY G., HARM F., APFALTER P., MAKRISTATHIS A., BERER A.,
BANKIER A., WINKLER S.
Disseminated infection with *Nattrasia mangiferae* in an immunosuppressed
patient
J Clin Microbiol 42:478-480 (2004)
- 106 WOJTASZEK P.
Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection
Biochem J 322:681-692 (1997)
- 107 WROBLEWSKI N., BÄR S., MAYSER P.
Missing granulocytic infiltrate in pityriasis versicolor – indication of specific anti-
inflammatory activity of the pathogen
Mycoses 48(Suppl.1):66-71 (2005)

9. Anhang

9.1. Screeningergebnisse

Tab.10 Screening-Ergebnis der *Trichosporon*-und *Geotrichum*-Hefen

Name	Nummer	Screeningergebnis	Bestätigung
<i>Trichosporon asteroides</i>	CBS 2481	Positiv	
<i>Trichosporon cutaneum</i>	CBS 2480	Positiv	
<i>Trichosporon loubieri</i>	CBS 2114	Positiv	
<i>Trichosporon</i> -Spezies	24a/o4	Positiv	
<i>Trichosporon</i> -Spezies	34	Positiv	
<i>Trichosporon ovoides</i>	CBS 7612	Negativ	
<i>Trichosporon asahii</i>	CBS 2479	Negativ	
<i>Trichosporon inkin</i>	CBS 7655	Negativ	Auch n=4
<i>Trichosporon mucoides</i>	CBS 7626	Negativ	Auch n=19
<i>Trichosporon debeummanianum</i>	32	Negativ	
<i>Trichosporon</i> -Spezies	P2145	Negativ	
<i>Geotrichum capitatum</i>	1932/95	Positiv	

Tab.11 Screening-Ergebnis der in Hefeform gewachsenen Schwärzepilze

Name	Nummer	Screeningergebnis
<i>Aureobasidium pullulans</i>	P1741	Positiv
<i>Aureobasidium pullulans</i>	P1740	Positiv
<i>Aureobasidium pullulans</i>	P1151	Positiv
<i>Aureobasidium pullulans</i>	P1742	Positiv
<i>Aureobasidium pullulans v. melan.</i>	P1744	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P1112	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P201	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P914	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P1109	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P1113	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P1814	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp B	P2065	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp B	P2432	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P1108	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P195	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp B	P2428	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P961	Positiv
<i>Exophiala dermatitidis</i> Genotyp A	P2429	Positiv
<i>Exophiala phaeomuriformis</i> Typ IA	P919	Positiv
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	13105	Positiv
<i>Exophiala spinifera</i>	P990	Positiv
<i>Phialocephala</i> *	40b	Positiv

* Das Isolat von *Phialocephala* bildet neben hefeförmigen Bereichen auch Luftmyzel aus. Aufgrund der positiven Pigmentbildung, die der in Hefeform gewachsenen Schwärzepilzen entspricht, wird dieses Isolat hier aufgelistet.

Tab. 12 Screening-Ergebnis der ausschließlich in Hyphenform gewachsenen Schwärzepilze

Name	Nummer	Screeningergebnis
<i>Alternaria alternata</i>	P2027	Negativ
<i>Cladophialophora boppii</i>	126c/04	Negativ
<i>Cladophialophora boppii</i>	P1209	Negativ
<i>Cladophialophora minourae</i>	P1359	Negativ
<i>Exophiala negronii</i>	P963	Negativ
<i>Exophiala alcalophila</i>	P1003	Negativ
<i>Exophiala cf. pisciphila</i>	1969/04	Negativ
<i>Exophiala dopicula</i>	P109	Negativ
<i>Exophiala heteromorpha</i>	P1022	Negativ
<i>Exophiala lecanii-cornii</i>	1975/04	Negativ
<i>Exophiala</i> Spezies	24a/04	Negativ
<i>Exophiala</i> Spezies	157a/04	Negativ
<i>Nattrassia mangiferae</i>	CBS 204.33	Positiv
<i>Phialophora americana</i>	P1002	Negativ
<i>Phialophora europaea</i>	29a/04	Negativ
<i>Phialophora europaea</i>	151b	Negativ
<i>Phialophora europaea</i>	854/99	Negativ
<i>Phialophora reptans</i>	69a/04	Negativ
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	P957	Negativ
<i>Rhinocladiella compacta</i>	P960	Negativ
<i>Rhinocladiella similes</i>	51a/04	Negativ

9.2 Auswertungen der einzelnen Chromatogramme jedes im Ergebnisteil erwähnten Isolates mittels WinCATS-Programm

Tab. 13 Auswertungen der Chromatogramme von *Aspergillus terreus*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH ₃	UV	Vermutung
0,07	2	Braun	hellblau	braun	schwach blau	dunkelgrün	hellblau	
0,07	6	schwach violett		schwach violett		schwach violett		
0,15	1-6	schwach gelb	gelb	schwach gelb	gelb		orange	
0,16	4	violett		schwach violett				
0,19	2		blau		blau		blau	
0,27	4	dunkel lila		dunkel lila		schwach olive		
0,30	1,2	orange	rot	orange	rot	orange	rot (leuchtend)	
0,32	2			Blau			rosa	
0,35	1	schwach orange	schwach rot	schwach orange	schwach rot		rot (leuchtend)	
0,36	2,3	orange	rot	braun	rot	braun		
0,36	5,6		gelb-grün		gelb-grün		gelb-grün	
0,40	2	gelb	olive mit türkisem Rand	Gelb	olive mit türkisem Rand	gelb	olive mit türkisem Rand	
0,44	3,4	orange		orange	schwach orange	rot		
0,44	5,6	orange		orange	blau	orange	blau	
0,48	2	gelb	orange mit türkisem Rand	Gelb	orange mit türkisem Rand	gelb	orange mit türkisem Rand	
0,49	3-6	violett		violett		hellviolett		
0,54	6		orange (254nm)					

Tab. 14 Auswertungen der Chromatogramme von *Aureobasidium pullulans* P1741

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,03	2	gelb		Gelb					
0,05	2		blau		blau				
0,07	3				blau				
0,08	3,4	braun-lila		Blau		orange			
0,10	3		blau						
0,12	2		blau		blau				
0,18	3,4	braun-lila		tief lila		orange			
0,19	2	grün-braun		Grün		orange	blau		
0,20	4	gelb		Orange					
0,21	2		blau		blau				
0,22	3		grün		grün		grün		
0,22	4,5	gelb		Gelb		gelb		Pityriacitrin	TU München
0,25	3	gelb		Orange					
0,28	2	pink		Pink		pink			
0,29	3		grün		grün		grün		
0,29	4	gelb		Orange		orange			
0,29	5	braun-lila		braun-lila		braun-lila			
0,31	3,4	blau-lila		tief-lila		orange			
0,31	5	orange		Orange		braun-orange		PityriarubinB	-
0,32	2,3	blau	grün	Blau	grün	pink	blau		
0,32	3	violett		Lila		orange			
0,33	4	grün		Lila		orange			
0,34	3	gelb		Gelb					
0,34	5	gelb		Gelb		gelb			
0,35	3,4	rot-orange		rot-orange		rot-orange			
0,36	2	pink		Pink		orange			
0,38	5		türkis		türkis		türkis		
0,39	3	rosa		Rosa					
0,41	3,4	orange		Orange		orange		PityriarubinC	TU München
0,42	5		blau		blau		blau		
0,53	2		grün		grün		grün		

Tab. 15 Auswertungen der Chromatogramme von *Exophiala dermatitidis* P1108 (F1, F2, F7 sind nicht beurteilbar)

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,08	2,3		hellblau		hellblau		hellblau		
0,13	2,3,4		blau		blau		blau		
0,14	4		grün		grün		grün		
0,17	4	orange		Orange		orange		PityriarubinA	-
0,20	2		blau		blau		blau		
0,21	6	gelb		Gelb		gelb		Pityriacitrin	PC-Standard
0,23	4		grün		grün		grün		
0,23	4	blaß-orange		Orange		orange		PityriarubinB	-
0,25	4	lila		Lila		orange			
0,27	5	orange		Orange		orange			
0,29	6	gelb		Gelb		gelb			
0,30	5	blau		Lila		orange			
0,30	6	lila		Lila		orange			
0,33	4,5,6	lila		Lila		orange			
0,34	5		hellblau		hellblau		hellblau		
0,36	3,4	pink		Pink		orange			
0,37	5,6	weinrot		Weinrot		weinrot			Neue Substanz
0,41	4	pink		Pink		orange			
0,45	4	weinrot		Lila		braun			
0,46	7		blau		blau		blau		
0,56	4,5	rosa		Rosa		rosa			
0,64	2		türkis		türkis		türkis		

Tab. 16 Auswertungen der Chromatogramme von *Exophiala dermatitidis* P914

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,03	3		hellblau		blau		Hellblau		
0,03	5		blau-lila		blau-lila		blau-lila		
0,05	4	lila		Lila		rosa			
0,07	2,3		hellblau		hellblau		hellblau		
0,09	2,3	rosa		Rosa		rosa			
0,15	4,5	gelb		Gelb		gelb		Pityriacitrin	TU München
0,17	4	orange-rot		orange-rot		orange-rot		PityriarubinA	In Arbeit*
0,18	3,4	lila		Lila		orange			
0,20	3		türkis		türkis		türkis		
0,25	4	orange-rot		orange-rot		orange-rot		PityriarubinB	In Arbeit*
0,29	4	lila		Lila		orange			
0,31	5	orangerot		orangerot		orangerot			
0,32	3	weinrot		weinrot-braun		weinrot			
0,32	4	lila		lila-grün		braun			
0,33	2	grün		Grün		rosa			
0,34	4	gelb	hellblau	Gelb	hellblau	orange	hellblau		
0,35	3	gelb		Gelb		gelb			
0,39	2	rosa		Rosa		schwach rosa			
0,40	4			Pink					
0,40	5	schwach gelb		Schwach gelb		schwach gelb			
0,41	3	rosa Rand		Pink					
0,43	2		türkis-grün		türkis-grün		türkis-grün		
0,43	4	orange-rosa		orange-pink		orange		Pityria-anhydrid	In Arbeit*
0,44	5		hellblau		hellblau		hellblau		
0,51	5	schwach rosa		Schwach rosa		schwach rosa			
0,53	5		türkis		türkis		türkis		
0,55	2		türkis-grün		türkis-grün		türkis-grün		
0,58	5		blau		blau				

* Die vorgereinigte Substanz befindet sich noch in Arbeit der TU München

Tab. 17 Auswertungen der Chromatogramme von *Exophiala dermatitidis*, P201

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,01	6	waldgrün		waldgrün		waldgrün			
0,03	2		hellblau						
0,06	5,6	violett	orange	blau		rot			
0,09	2		hellblau						
0,10	4	rot		rot					
0,15	2		grün-gelb		grün-gelb		grün-gelb		
0,16	6	gelb		gelb		blaßgelb		Pityriacitrin	TU München
0,18	4		grün-gelb	orange	grün-gelb		grün-gelb		
0,18	5	orange	blaßorange	orange	blaßorange	orange	orange		
0,21	4,5,6	blau		lila		orange			
0,23	4	orange	hellblau	orange	hellblau		hellblau		
0,29	2		orange		orange		orange		
0,29	5,6	orange	rotorange	gelb	rotorange	gelb		PityriarubinB	-
0,40	4	orange		orange		blaßorange			
0,41	3	violett		violett		blaßviolett			
0,43	6,7		grün-gelb		grün-gelb		grün-gelb		
0,44	4,5	pink		pink					
0,47	7		hellblau		hellblau		leuchtendblau		
0,47	5,6		orange						
0,54	6,7		grün-gelb		grün-gelb				

Tab. 18 Auswertungen der Chromatogramme von *Exophiala phaeomuriformis*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,01	1	braunlila		braunlila		braunlila			
0,04	1	rosa		rosa		rosa			
0,06	3,4	lila		blau		rosa			
0,07	1	blau-grün		blau-grün					
0,10	1,2	gelb-orange		gelb-orange		rosa			
0,14	1	rosa		pink					
0,14	2		gelb-grün		gelb-grün		gelb-grün		
0,16	4	gelb		gelb		gelb		Pityriacitrin	TU München
0,17	3	rot-orange		rot-orange		rot-orange		PityriarubinA	Zu wenig
0,22	2,3	lila		lila		orange			
0,24	1	grün		grün		grün			
0,28	1		orange						
0,33	3,4	gelb-orange		gelb-orange		gelb-orange			Neue Substanz
0,37	3	lila		lila		orange			
0,38	4	rot-orange		rot-lila		orange		PityriarubinC	Malassezia-Indol A
0,39	2	pink		pink					
0,41	2			grün		rosa			
0,42	4	orange-braun		orange-braun		orange			
0,43	3	gelb		gelb		gelb			
0,47	1	rosa		rosa		rosa			
0,48	5	gelb		gelb		gelb			
0,49	2	pink		pink					
0,49	4		hellblau mit grünem Rand	gelb	hellgrün	gelb	hellblau mit grünem Rand		
0,51	4	hellblau		hellblau		lila			
0,52	2	hellblau mit rosa Rand		hellblau mit rosa Rand	blau				
0,52	3	rosa		rosa		orange			
0,52	5		hellgrün				hellgrün		
0,57	5		blau		blau		blau		
0,70	4	blaßrosa		blaßrosa		blaßorange			

Tab. 19 Auswertungen der Chromatogramme von *Exophiala spinifera*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,02	1		hellblau		hellblau		hellblau		
0,04	1,2		hellblau		hellblau		hellblau		
0,07	2		hellblau		hellblau		hellblau		
0,10	3	gelb		Gelb		gelb		Pityriacitrin	Standard
0,13	2		gelb-grün		gelb-grün		gelb-grün		
0,13	2,3	lila		Lila		orange			
0,14	1		blau		blau		blau		
0,17	1	rosa		Rosa		rosa			
0,19	1	schwach gelb		schwach gelb		schwach gelb			
0,19	2	rot-orange		braun-orange		rot-orange		Pityriarubin A	Zu wenig
0,19	3		gelb-grün						
0,21	2,3	lila		Lila		orange			
0,22	1	rosa	blau	Pink		braun-rot			
0,23	1		hellblau		hellblau		hellblau		
0,24	2	altrosa		Violett		altrosa			
0,24	3	hellblau	blau	Hellblau	blau	schwach violett			
0,25	2		blau		blau		blau		
0,26	1		hellblau		hellblau		hellblau		
0,26	2		gelb-grün		gelb-grün		gelb-grün		
0,28	2		blau		blau		blau		
0,29	2	schwach orange		schwach orange		schwach orange		Pityriarubin B	Zu wenig
0,33	3	gelb		Gelb		gelb			
0,34	1,2	pink		Pink		schwach pink			
0,39	2	altrosa		Pink		altrosa			
0,43	3		blau		blau		blau		
0,50	2	schwach rosa		schwach rosa		schwach rosa			
0,56	2	schwach gelb	türkis	schwach gelb	schwach türkis	schwach gelb	türkis		
0,72	2	rosa	türkis	Rosa	schwach türkis	schwach rosa	schwach türkis		

Tab. 20 Auswertungen der Chromatogramme von *Geotrichum capitatum*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,02	2		hellblau		hellblau		hellblau		
0,03	2	hellgrün		hellgrün		hellgrün			
0,05	2		weißblau		weißblau		weißblau		
0,06	2	hellgelb		hellgelb		hellgelb			
0,06	3		blau		blau		blau		
0,07	4		hellblau		hellblau		hellblau		
0,08	3	hellgelb		hellgelb		hellgelb			
0,15	3	gelb		gelb		gelb		Pityriacitrin	-
0,16	2		blau		blau		blau		
0,17-0,30	3		blau		blau		blau		
0,17	4	orange-rot		orange-rot		orange-rot		PityriarubinA	-
0,18	2	rosa		rosa		rosa			
0,18	5	gelb		gelb		gelb		Pityriacitrin	TU München
0,24	4		hellblau		hellblau		hellblau		
0,27	3	orange		orange		orange		PityriarubinB	-
0,27	5	blau-grün		blau-grün		blau-grün			
0,32	4	orange		orange		orange			
0,35	4		blau-grün				blau-grün		
0,36	4	olivegrün		lila		olivegrün			
0,37	3				blau		blau		
0,38	4	rosa		pink		rosa			
0,40	4	olivegrün	hellblau	lila	hellblau		hellblau		
0,40	5	orange		orange		orange		PityriarubinC	-
0,41	4	gelb		gelb		gelb-orange			
0,42	5		blau		blau		blau		
0,43	3	altrosa		altrosa		altrosa			
0,45	5	gelb		gelb		gelb			
0,46	4			pink					
0,49	4	orange		orange		orange		Pityria-anhydrid	Neue Substanz, zu wenig
0,51	5		blau		blau		blau		

Tab. 21 Auswertungen der Chromatogramme von *Natrassia mangiferae*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,03	4	helllila		hellblau		rosa			
0,04	3				hellblau				
0,07	3	blaßrosa		blaßrosa		blaßrosa			
0,08	4,5	gelb	gelb	gelb	hellblau		orange	6-Ethyl-5-hydroxy-2,7-dimethoxynapht hoquinon	In Arbeit*
0,10	3	blaßlila		blaßlila					
0,13	3	orange		orange		orange			
0,14	4	lila		lila					
0,18	3,4	pink		pink		lila			Neue Substanzen
0,21	5			blaßlila		lila			
0,24	4	lila		lila					
0,25	5			blaßlila					
0,28	4			lila					
0,30	5	weinrot		weinrot		weinrot			In Arbeit*
0,31	4	blaßbraun	hellblau	orange		rosa			
0,33	2		hellblau						
0,34	4	rosa		rosa		rosa			
0,35	6	gelb		gelb		schwach gelb			
0,36	3,4	sonnengelb		sonnengelb		sonnengelb			
0,46	6		blau		blau		blau		
0,48	3	gelb		gelb		gelb			
0,56	2,3	gelb		gelb		schwach gelb			
0,59	2		türkis		türkis		türkis		

* Die vorgereinigte Substanz befindet sich noch in Arbeit der TU München

Tab. 22 Auswertungen der Chromatogramme von *Phialocephala*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,62	4		türkis		türkis		türkis		
0,61	5		blau		blau		blau		
0,04	2		hellblau		hellblau		hellblau		
0,06	3	rosa		rosa		rosa			
0,09	2,3		hellblau		hellblau		hellblau		
0,16	5	orange		schwach orange		schwach orange		PityriarubinA	In Arbeit*
0,22	4		feuerrot		feuerrot		feuerrot		
0,23	4,5	gelb		gelb		gelb		Pityriacitrin	Durch Standatd
0,24	3		türkis		türkis		türkis		
0,24	3,4	lila		lila					
0,34	2	gelb		gelb		gelb			
0,35	5		türkis		türkis		türkis		
0,36	4	lila		lila		orange			
0,36	5	braun-orange		braun-orange		braun-orange		PityriarubinC	In Arbeit*
0,37	3			pink					
0,39	3	braun-orange		braun-orange		braun-orange			
0,39	4		hellblau		hellblau		hellblau		
0,40	2		türkis		türkis		türkis		
0,41	5	lila		lila		lila			
0,42	4	weinrot		weinrot		weinrot			Identisch mit neuer Substanz P 1108
0,44	3	lachs		lachs		lachs			
0,44	5	gelb		gelb		gelb			
0,47	2		türkis		türkis		türkis		
0,47	3	gelb		gelb		gelb			
0,49	5		blau		blau		blau		
0,53	5		gelb-ocker		gelb-ocker		gelb-ocker		
0,54	4	weinrot		weinrot		weinrot			Identisch mit P 1108
0,57	2		türkis		türkis		türkis		

* Die vorgereinigte Substanz befindet sich noch in Arbeit der TU München

Tab. 23 Auswertungen der Chromatogramme von *Schizophyllum commune*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,04	4,5		neongelbgrün		neongelbgrün		weiß		
0,07	1		hellblau		hellblau		hellblau		
0,08	3	orange-rot		orange-rot		orange			
0,10	4,5	orange-rot	rot	orange-rot	rot	gelb	gelb		
0,12	1,2,3	weinrot	dunkelrot	weinrot	dunkel	pink		Schizocommunin	-
0,13	3	orange		orange		schwachorange		Pityriarubin A	Indol-3-Carbonsäure
0,14	1		hellblau		hellblau		hellblau		
0,16	3	gelb		gelb (stark)		gelb (schwach)		Pityriacitrin	HPLC
0,20	3	lila		lila		orange			
0,21	5	lila		lila		orange			
0,29	5	lila		lila		orange			
0,29	4		türkis	lila		orange	gelb		
0,30	3	orange		orange-rot		orange		PityriarubinB	In Arbeit*
0,30	4	rot		rot		orange			
0,31	4	flieder		lila		orange			
0,34	4,5	gelb	hellblau	gelb	hellblau		hellblau		
0,36	4	orange		orange		orange		Pityriarubin C	In Arbeit*
0,40	3	rosa		pink					
0,44	5	orange	rot	orange	rot				
0,57	1		türkis		türkis		türkis		
0,57	5	gelb	türkis	gelb-orange	türkis	schwach-gelb	türkis		

* Die vorgereinigte Substanz befindet sich noch in Arbeit der TU München

Tab. 24 Auswertungen der Chromatogramme von *Trichosporon asteroides*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,09	3	gelb	blaßblau	gelb	blaßblau		blaßblau		
0,12	4	gelb		gelb		gelb		Pityriacitrin	TU München
0,16	2,3	orange		orange		orange			
0,21	2	rosa		pink		rosa	blau		
0,26	4		hellblau		hellblau		blau		
0,27	2	gelb		gelb		gelb	blaßorange		
0,28	3	blaßlila		lila					
0,29	2	rosa		rosa					
0,31	3	blaßlila		lila					
0,38	4	gelb		gelb					
0,41	2	rosa		pink		blaßrosa			
0,45	3	blaßrosa		blaßrosa					

Tab. 25 Auswertungen der Chromatogramme von *Trichosporon cutaneum*

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,01-0,16	1	gelb	Versch. hellblaue Fluoreszenzen	gelb	Versch. hellblaue Fluoreszenzen	gelb	Versch. hellblaue Fluoreszenzen		
0,08	2	gelb		gelb					
0,11	2	gelb		gelb		blaßgelb			
0,15	3	gelb		gelb		gelb		Pityriacitrin	TU München
0,17	2	lila		lila		blaßlila			
0,18	1	violett	grün	violett	grün	blaßviolett	grün		
0,27	1	pink		pink					
0,32	2	lila		lila		blaßlila			
0,33	1	pink		pink		gelb			
0,36	2	lila	hellblau	lila	hellblau	blaßlila	hellblau		
0,37	1	violett	hellblau	violett	hellblau	gelb			
0,38	2	gelb		blaßgelb		blaßgelb			
0,40	1	gelb		gelb		blaßrosa			
0,41	3	gelb		gelb		gelb			
0,43	1	pink		pink					
0,46	2,3	gelb		gelb		gelb			
0,47	3		blau		blau		blau		
0,47	3	gelb		gelb		gelb			
0,48	1	pink		pink					
0,49	5		blau		blau		blau		
0,53	5		gelb-ocker		gelb-ocker		gelb-ocker		
0,54	4	weinrot		weinrot		weinrot			
0,57	2		türkis		türkis		türkis		
0,59	1		hellgrün		hellgrün		hellgrün		
0,59	2	gelb	hellblau	gelb	hellblau	gelb			

Tab. 26 Auswertungen der Chromatogramme von *Trichosporon loubieri* (F2 schlecht beurteilbar)

Rf-Wert	Fraktion	Nativ	UV	HCl	UV	NH3	UV	Vermutung	Bestätigung
0,03	3,4		pink-orange		pink-orange		pink-orange		
0,07	2		hellblau		blau		blau		
0,10	4	lila		blau		rosa			
0,13	3		hellblau		hellblau		hellblau		
0,15	2		weißblau		weißblau		weißblau		
0,15	4	orange		orange		orange		Pityriarubin A	Zu wenig
0,18	5	gelb		gelb		gelb		Pityriacitrin	TU München
0,20	3		hellblau		hellblau		hellblau		
0,21	2,3,4	lila		lila		orange			
0,22	2		blau		blau		blau		
0,24	4	schwach orange		schwach orange		schwach orange			
0,25	2,3		hellblau		hellblau		hellblau		
0,25	5	gelb		gelb		gelb			
0,27	3		hellgrün		hellgrün		hellgrün		
0,26	4	rot-orange		rot-orange		rot-orange		PityriarubinB	Zu wenig
0,34	4	orange		orange		orange			
0,36	3						hellblaugrün		
0,36	5		gelb-grün		gelb-grün		gelb-grün		
0,37	3	rosa		rosa		schwach rosa			
0,38	3,4,5	lila		lila		orange			
0,40	3	gelb		gelb-rosa		schwach gelb			
0,40	3,4						hellblaugrün		
0,41	4	grün	hellblau	grün	hellblau	blaß			
0,41	5	rot-orange		rot-orange		rot-orange			
0,42	2	rosa Rand		rosa Rand		rosa Rand			
0,42	4	orange		orange		orange			
0,42	4		orange-rot		orange-rot		orange-rot		
0,43	5	gelb		gelb		gelb			

0,45	4		gelb-grün		gelb-grün		gelb-grün		
0,46	5		hellblau		hellblau		hellblau		
0,47	3	rosa		rosa		rosa			
0,47	4	orange		orange		orange		Pityriaanhydrid	Zu wenig
0,47	5	violett		violett		violett			
0,48	4		rot-orange		rot-orange		rot-orange		
0,48	5		hellblau		hellblau		hellblau		
0,50	4		blau		blau		blau		
0,54	4,5		türkis		türkis		türkis		
0,58	3,4,5		blau		blau		blau		
0,61	2		türkis		türkis		türkis		

9.3 Chromatogramme der verwendeten Isolate (Images 3 – 7)

9.3.1 *Aspergillus terreus*

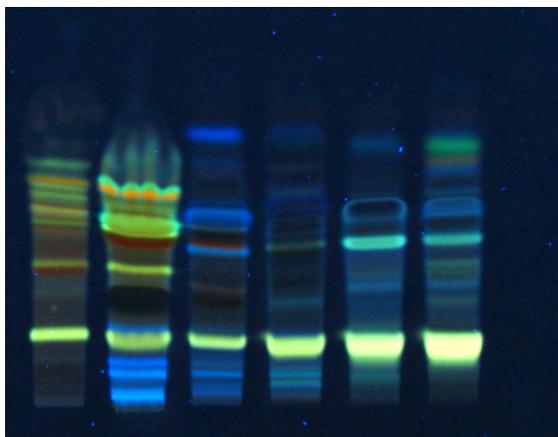


Abb. 43 WinCATS Image 3 (254 nm)

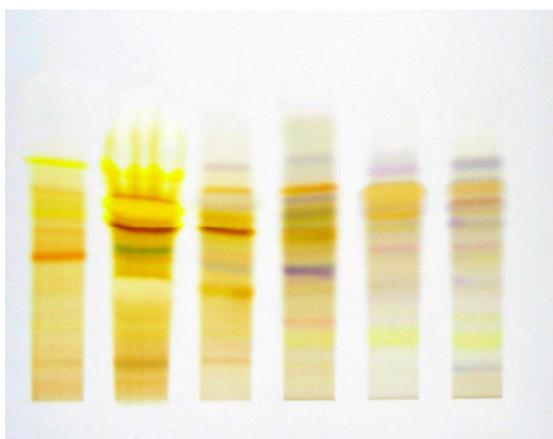


Abb. 44 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

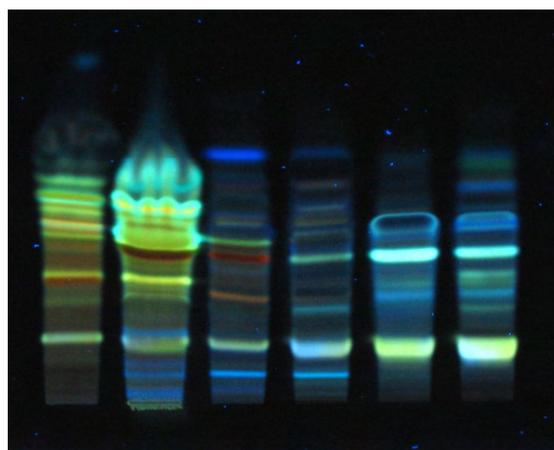


Abb. 45 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

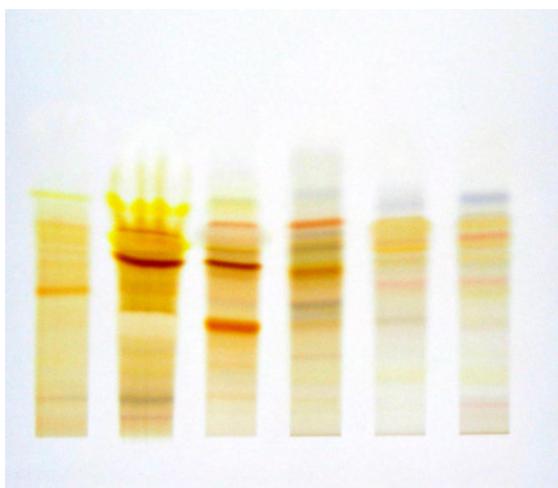


Abb. 46 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

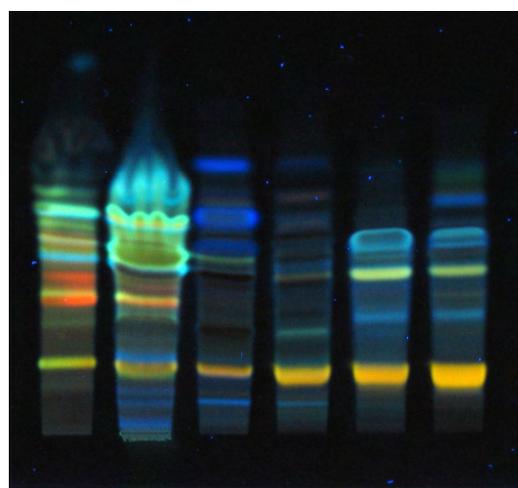


Abb. 47 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.3.1 *Aureobasidium pullulans* P 1741

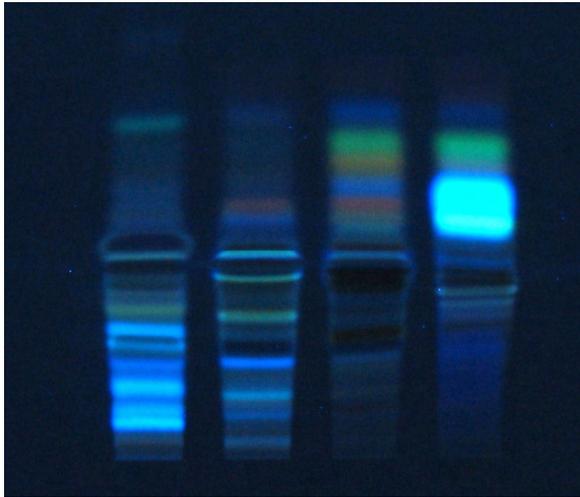


Abb. 48 WinCATS Image 3 (254 nm)

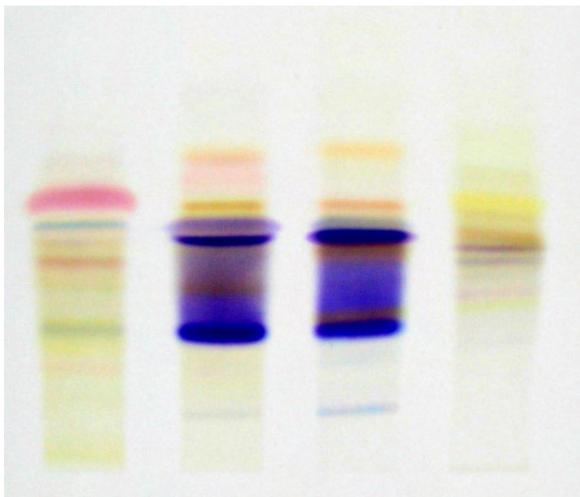


Abb. 49 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

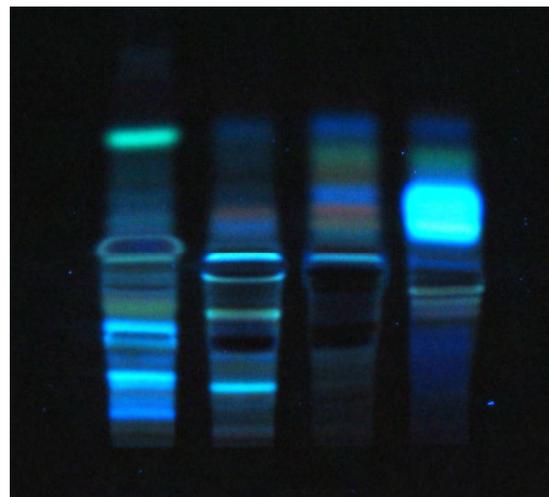


Abb. 50 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

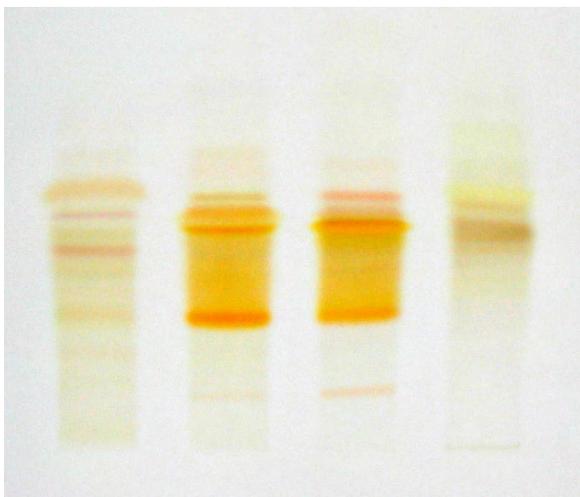


Abb. 51 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

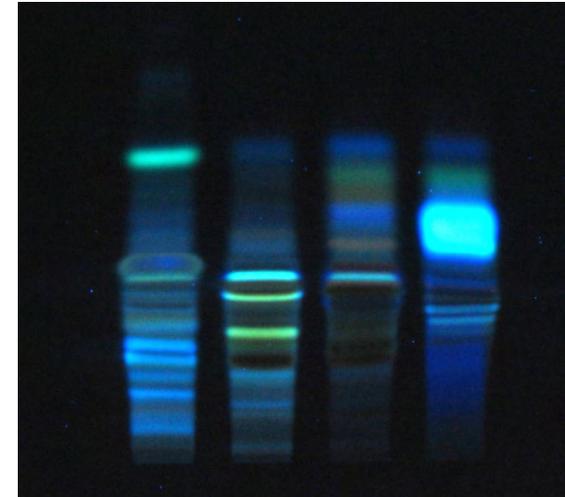


Abb. 52 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.3.2 *Exophiala dermatitidis* P 1108

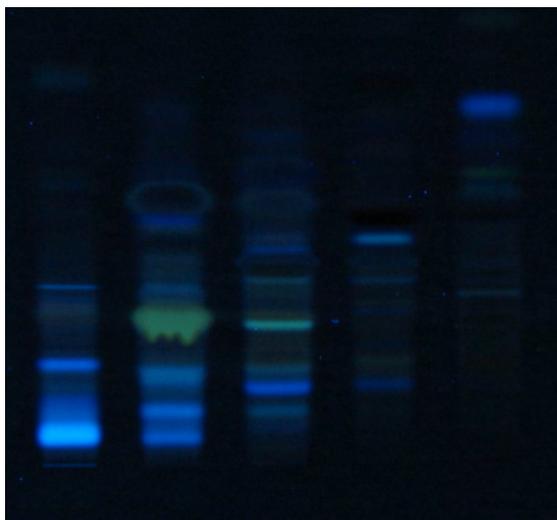


Abb. 53 WinCATS Image 3 (254 nm)

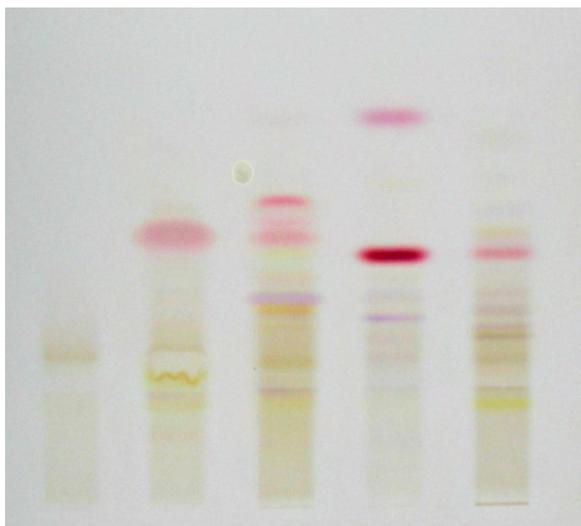


Abb. 54 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

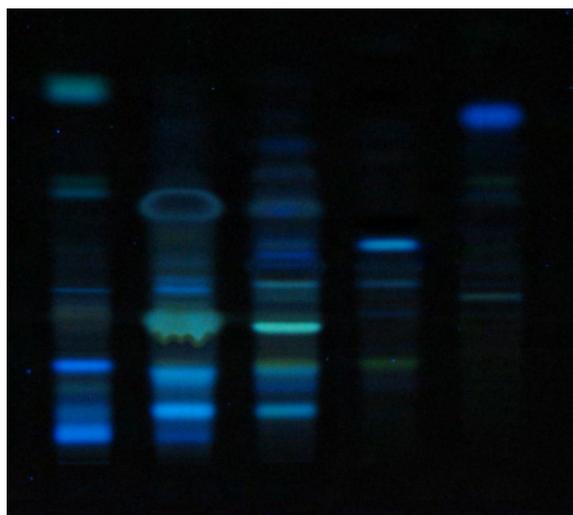


Abb. 55 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

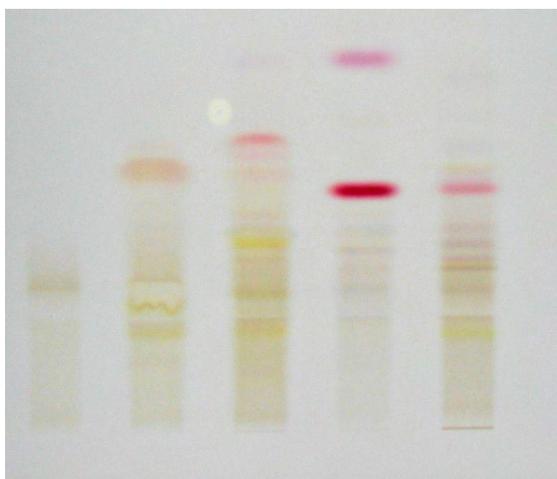


Abb. 56 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

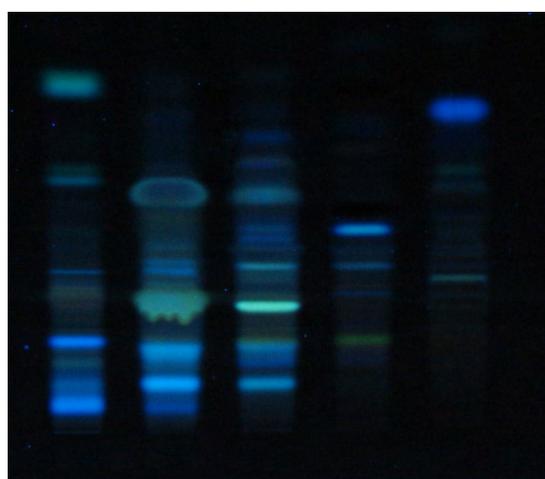


Abb. 57 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.4 *Exophiala dermatitidis* P 914

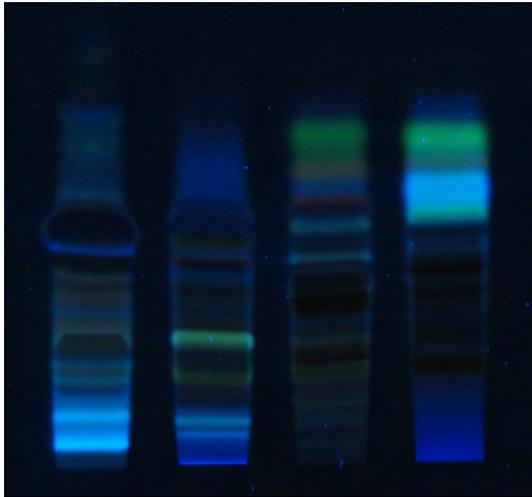


Abb. 58 WinCATS Image 3 (254 nm)

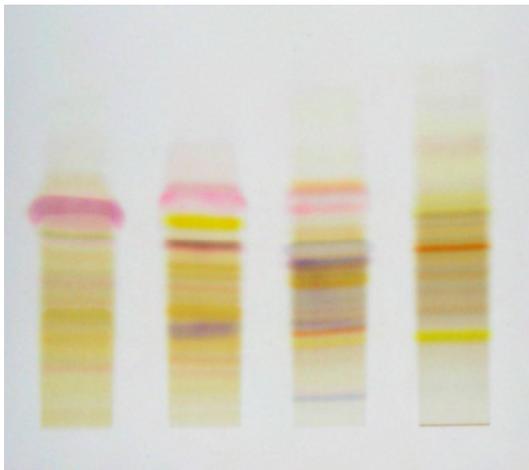


Abb. 59 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

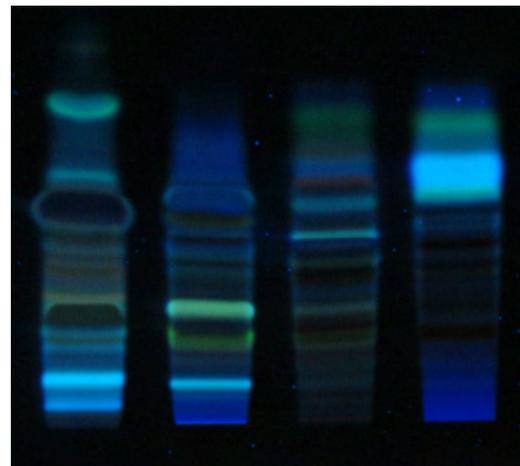


Abb. 60 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

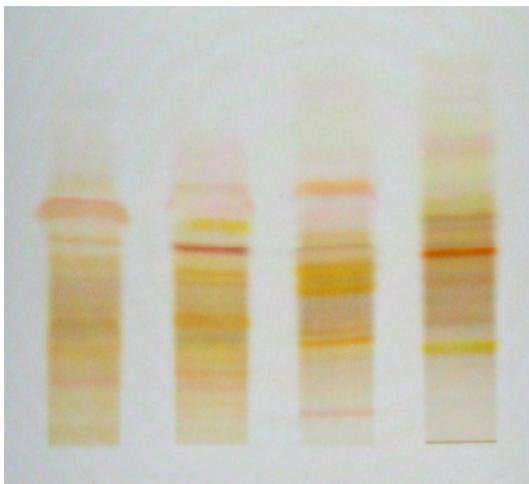


Abb. 61 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

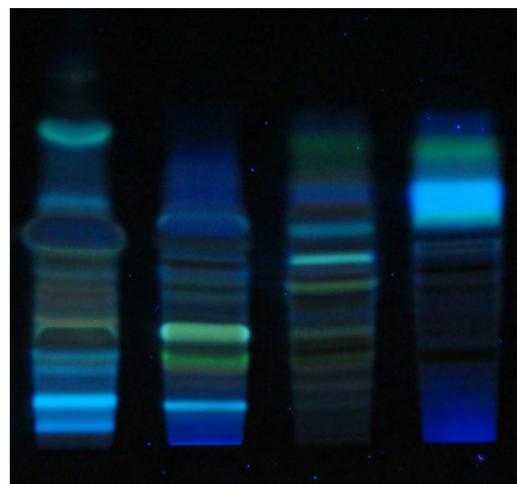


Abb. 62 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.5 *Exophiala dermatitidis* P 201

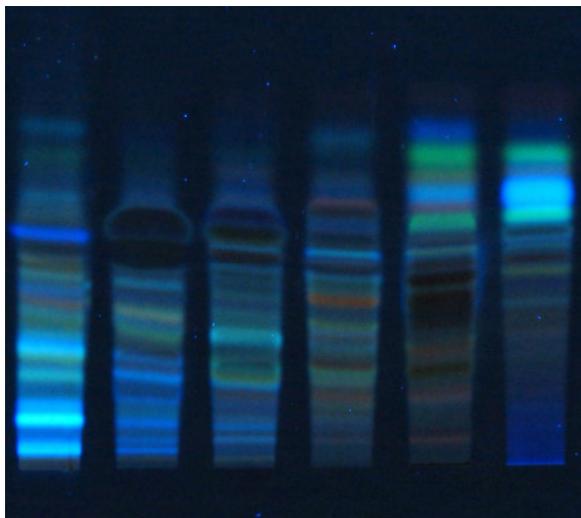


Abb. 63 WinCATS Image 3 (254 nm)

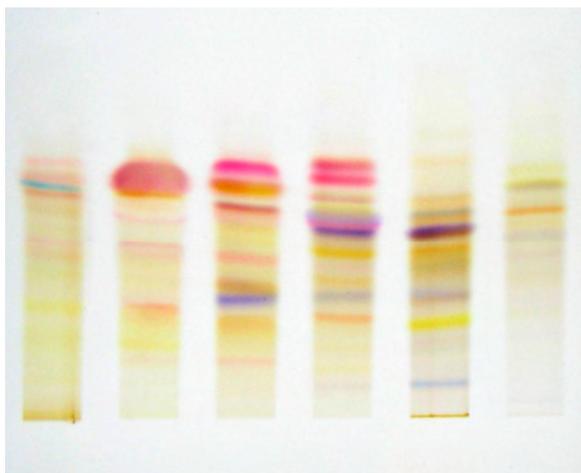


Abb. 64 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

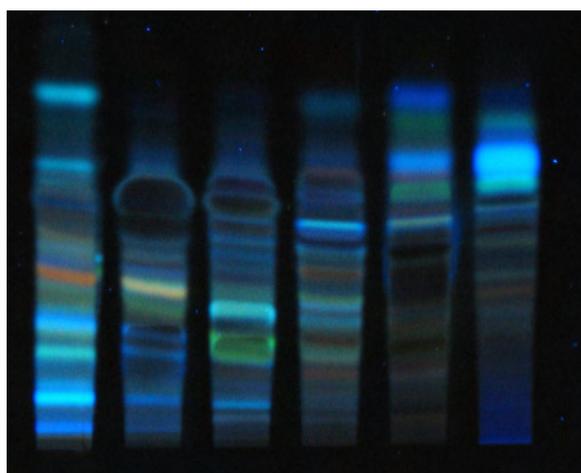


Abb. 65 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

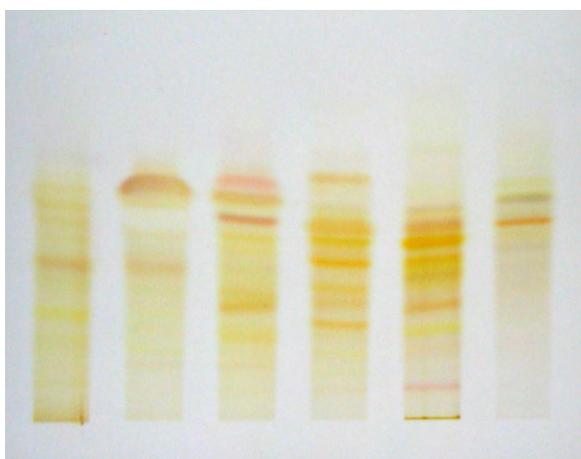


Abb. 66 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

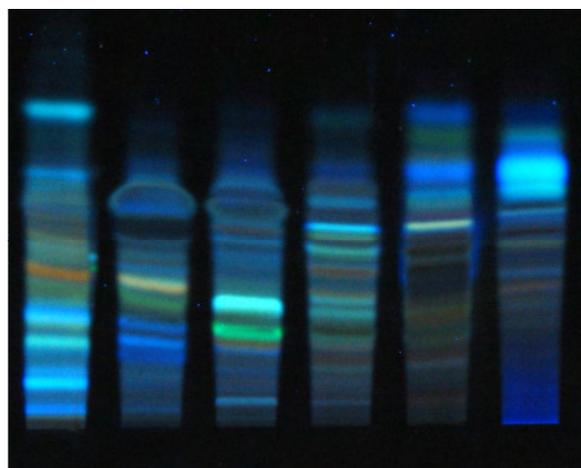


Abb. 67 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.6 *Exophiala phaeomuriformis*

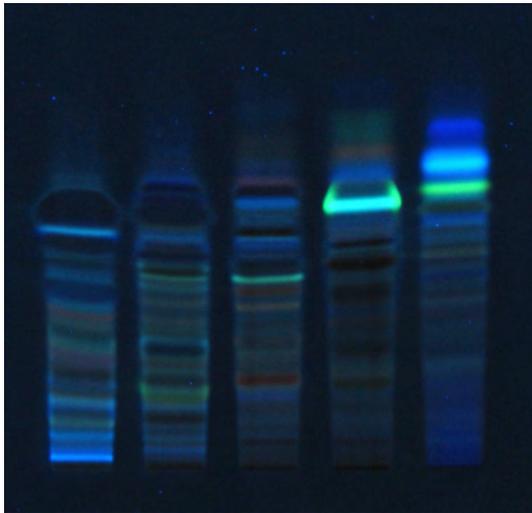


Abb. 68 WinCATS Image 3 (254 nm)

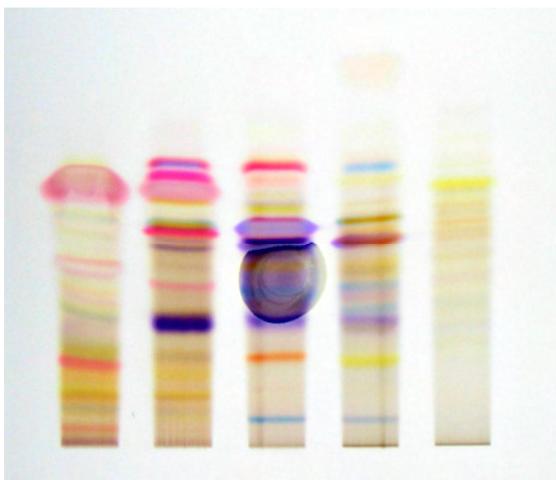


Abb. 69 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

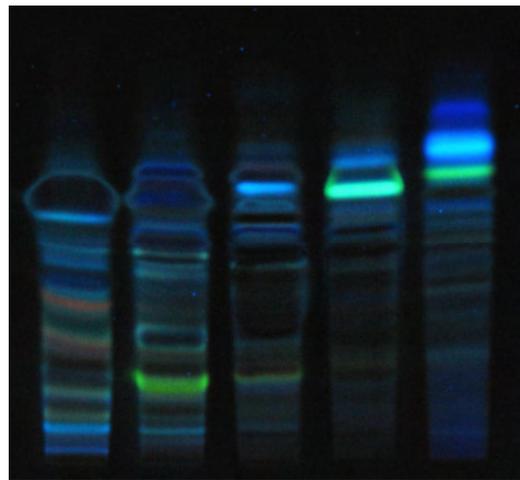


Abb. 70 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

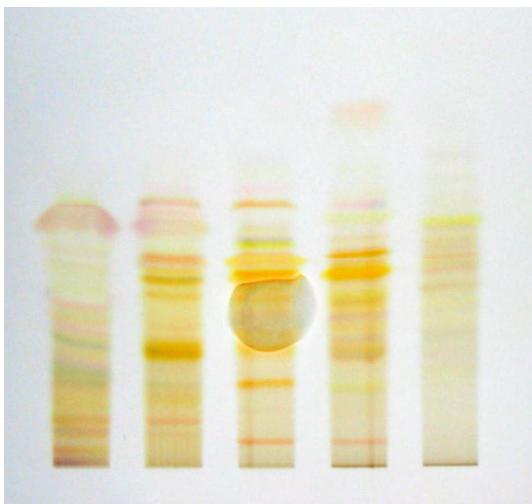


Abb. 71 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

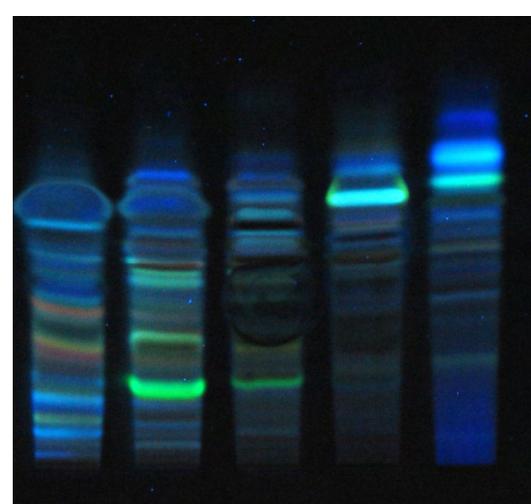


Abb. 72 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.7 *Exophiala spinifera*

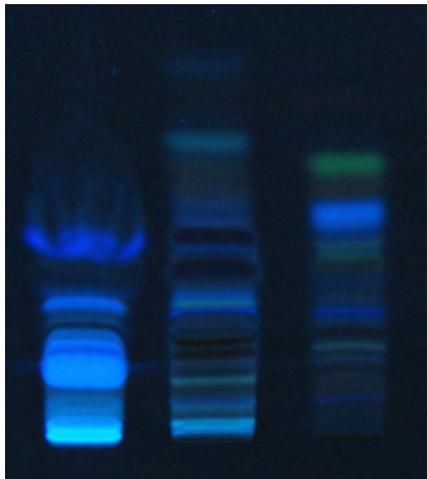


Abb. 73 WinCATS Image 3 (254 nm)



Abb. 74 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

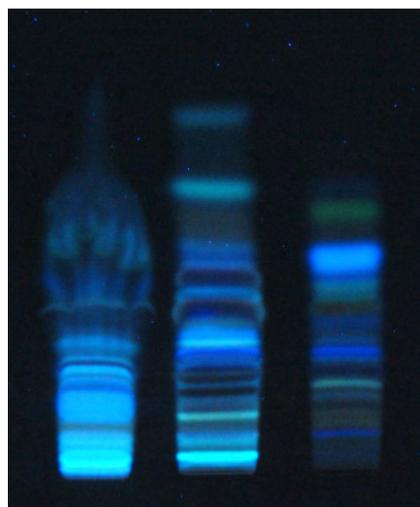


Abb. 75 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

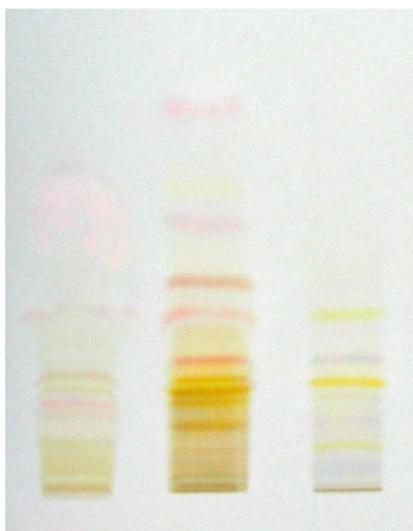


Abb. 76 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

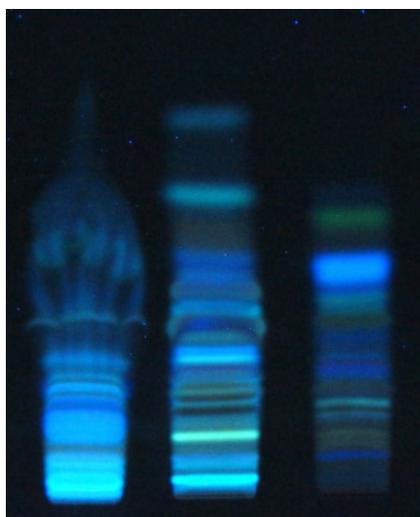


Abb. 77 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.8 *Geotrichum capitatum*

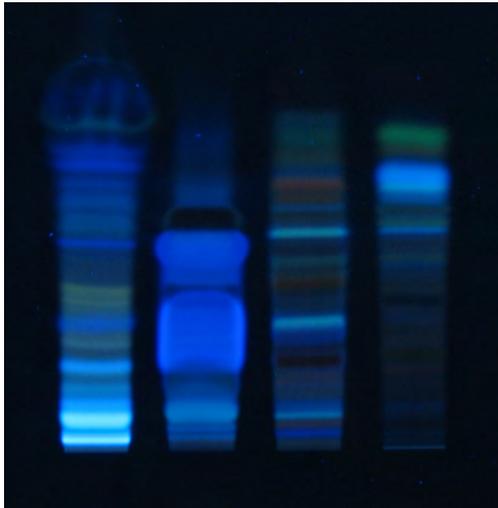


Abb. 78 WinCATS Image 3 (254 nm)



Abb. 79 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

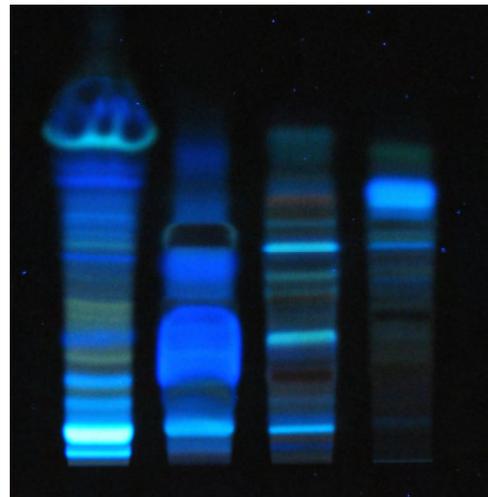


Abb. 80 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)



Abb. 81 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

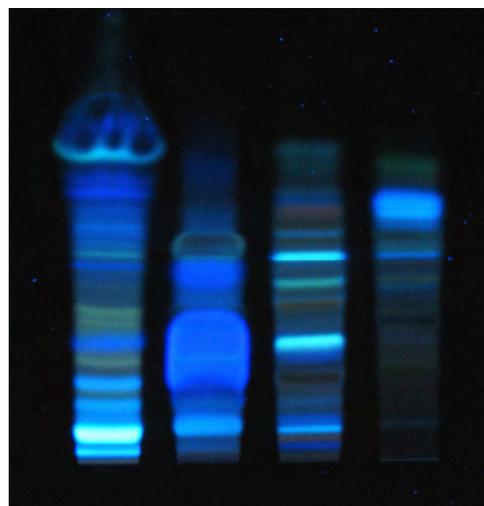


Abb. 82 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.9 *Natrassia mangiferae*

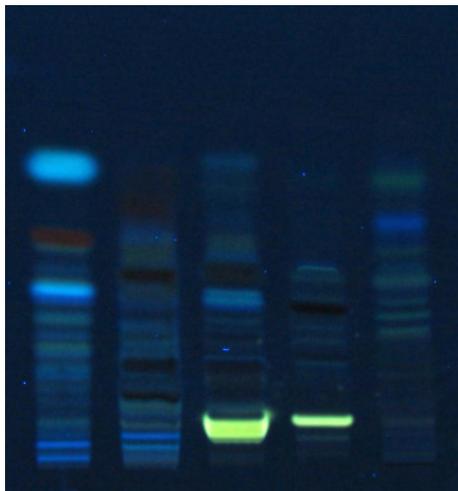


Abb. 83 WinCATS Image 3 (254 nm)



Abb. 84 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

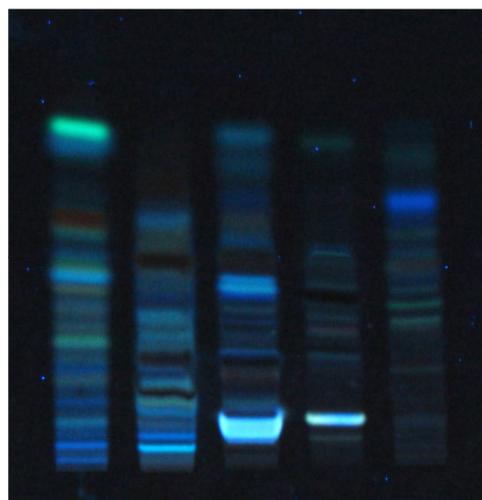


Abb. 85 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

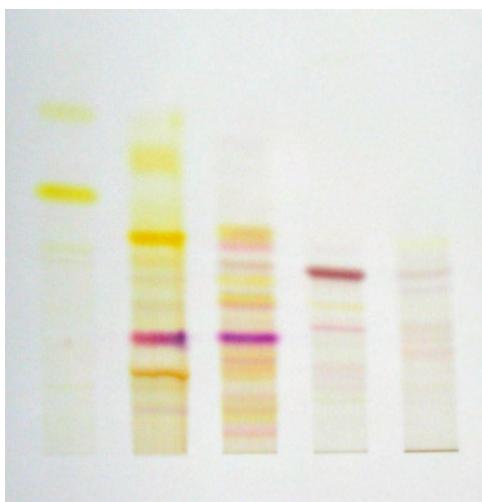


Abb. 86 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

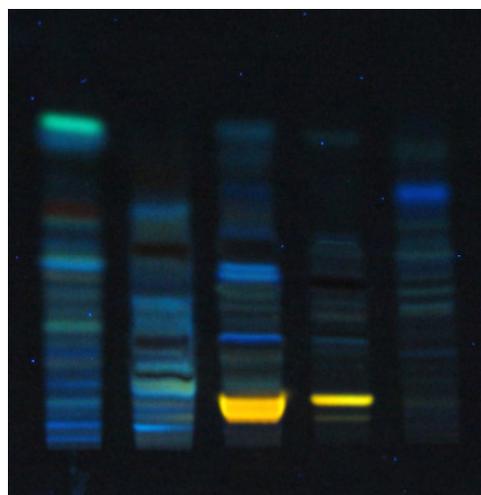


Abb. 87 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.10 *Phialocephala*

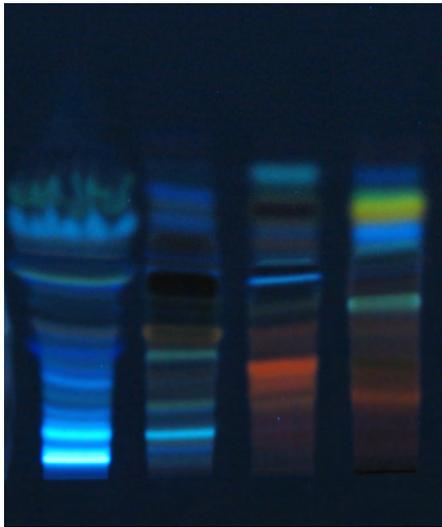


Abb. 88 WinCATS Image 3 (254 nm)

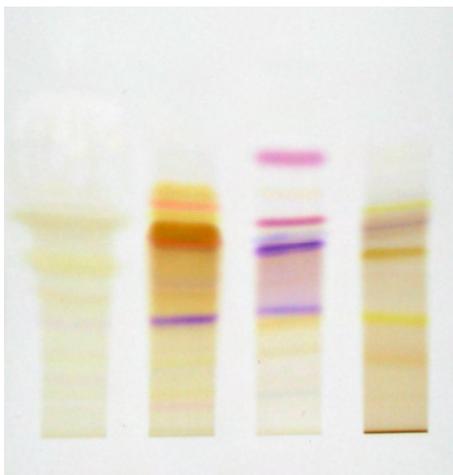


Abb. 89 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

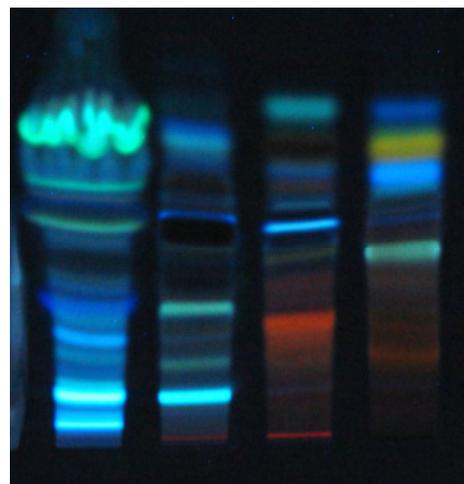


Abb. 90 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

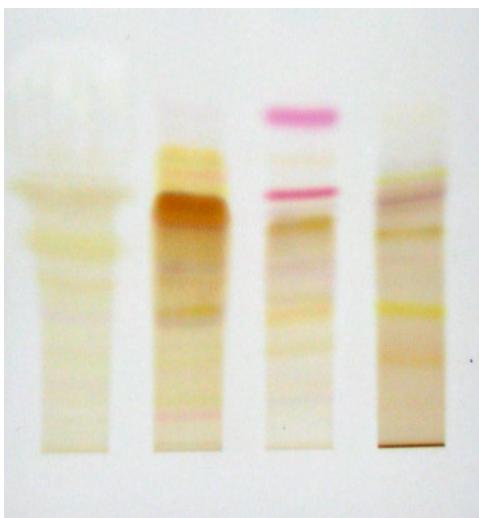


Abb. 91 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

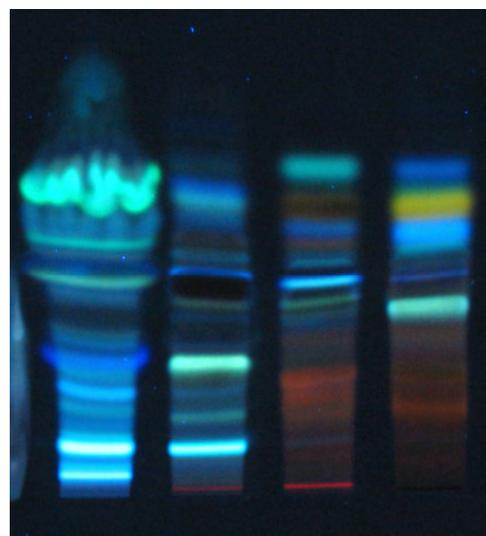


Abb. 92 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.11 *Schizophyllum commune*

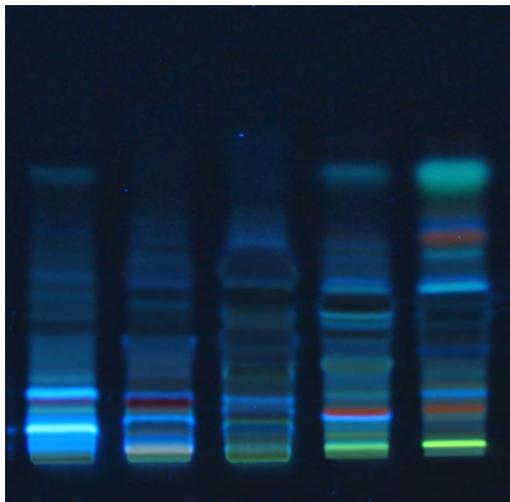


Abb.93 WinCATS Image 3 (254 nm)

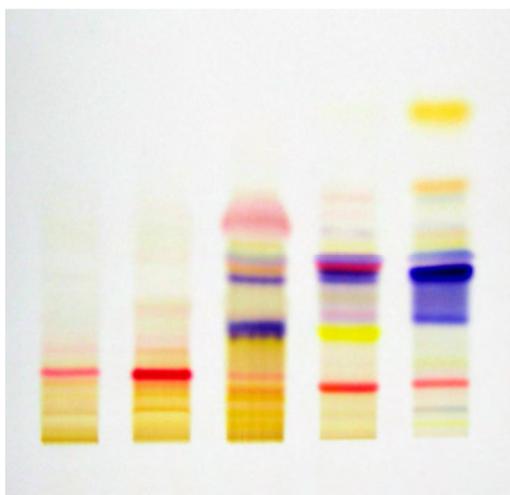


Abb. 94 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

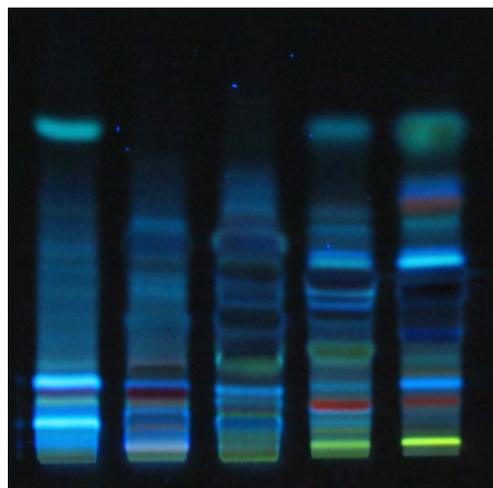


Abb. 95 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

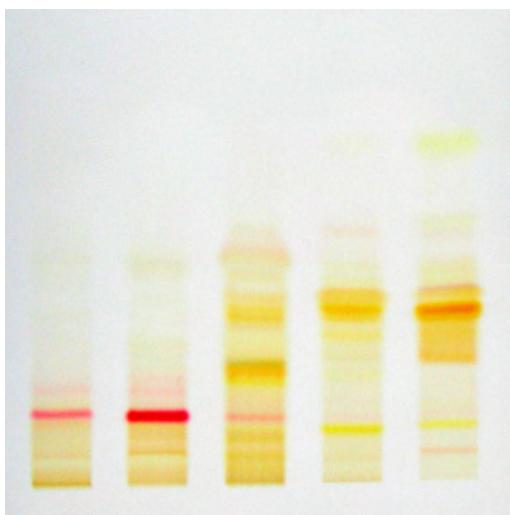


Abb. 96 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

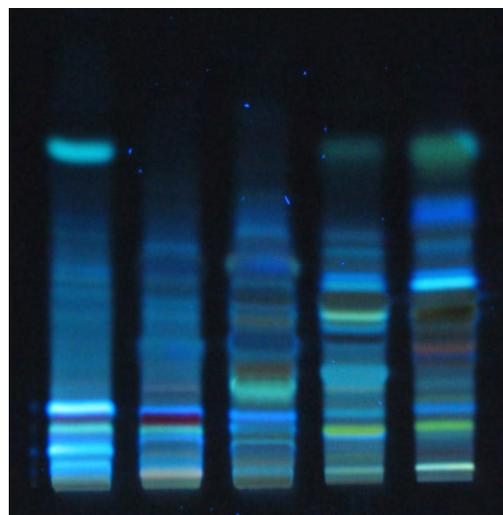


Abb. 97 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.12 *Trichosporon asteroides*

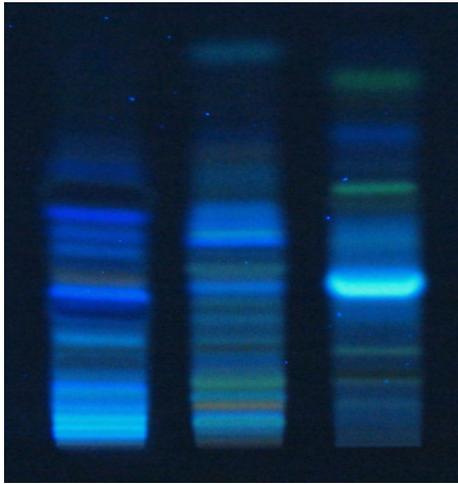


Abb. 98 WinCATS Image 3 (254 nm)



Abb. 99 WinCÁTS Image 4 (Tageslicht, HCl)

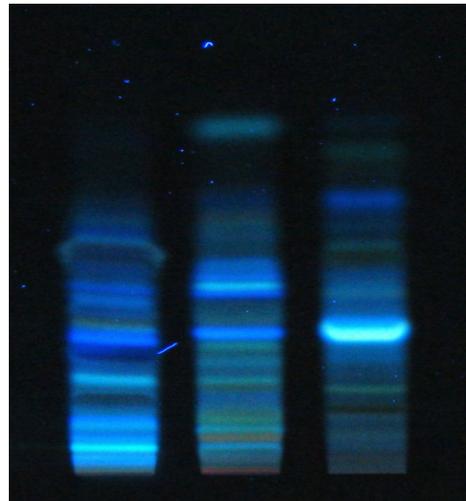


Abb. 100 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)



Abb. 101 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

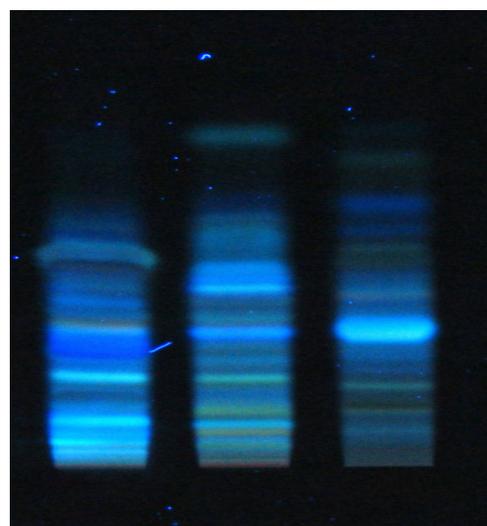


Abb. 102 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.13 *Trichosporon cutaneum*

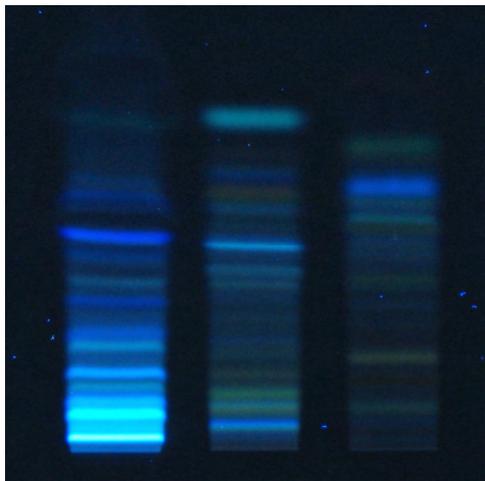


Abb. 103 WinCATS Image 3 (254 nm)



Abb. 104 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

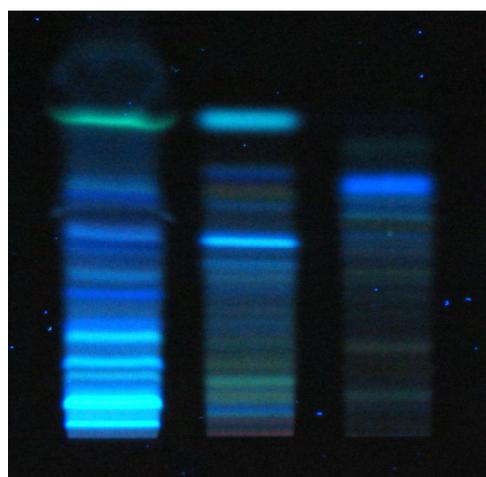


Abb. 105 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)



Abb. 106 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

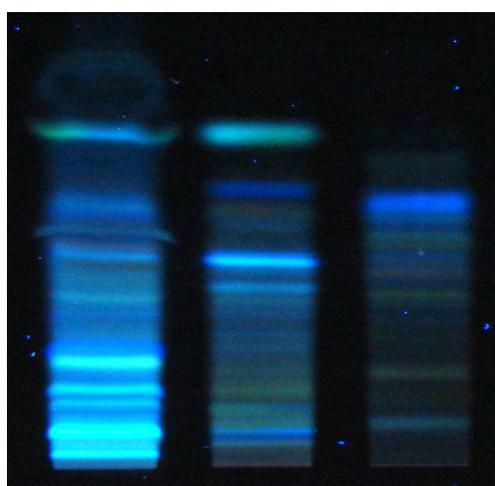


Abb. 107 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

9.4.14 *Trichosporon loubieri*

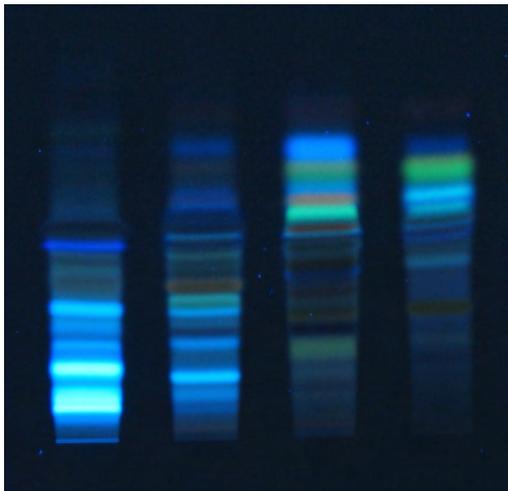


Abb. 108 WinCATS Image 3 (254 nm)

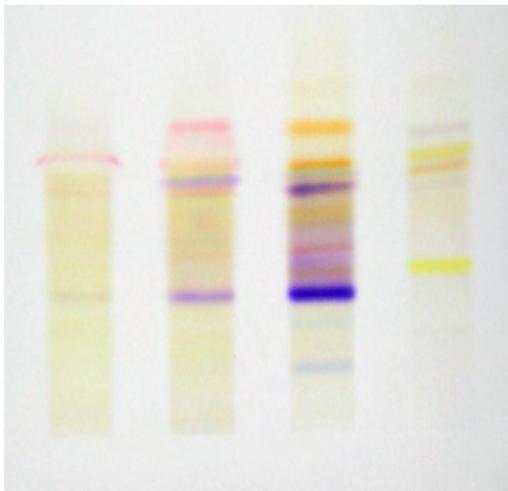


Abb. 109 WinCATS Image 4 (Tageslicht, HCl)

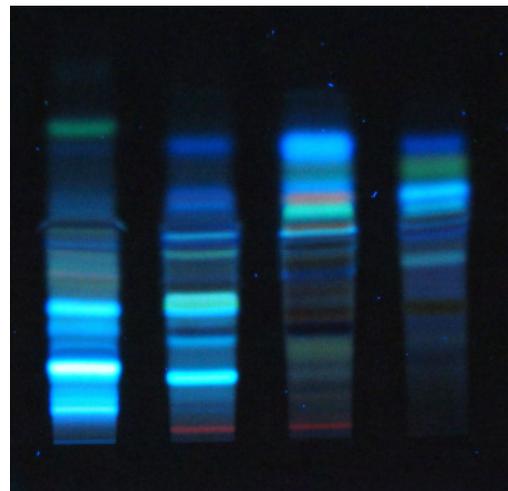


Abb. 110 WinCATS Image 5 (366 nm, HCl)

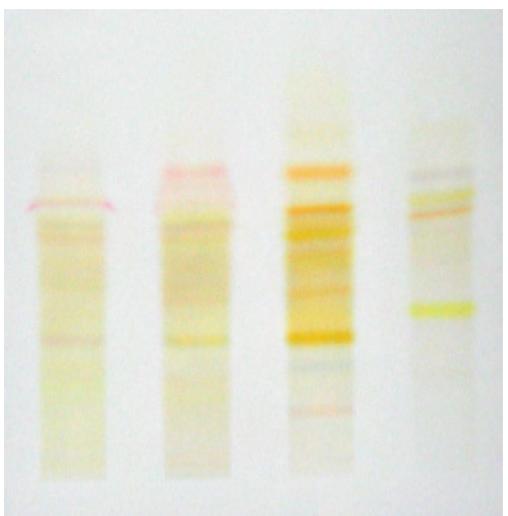


Abb. 111 WinCATS Image 6 (Tageslicht, NH₃)

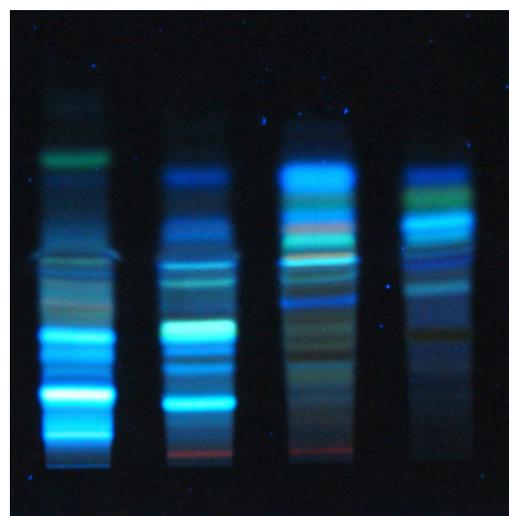


Abb. 112 WinCATS Image 7 (366 nm, NH₃)

Lebenslauf

Name	Silke Marie Nies
Geburtsdatum	10.03.1980
Geburtsort	Hachenburg
Eltern	Ernst-Emil Nies Hildegard Nies
Geschwister	Alexander Nies

Schulischer und beruflicher Werdegang

1986-1990	Wolfsteinschule Bad Marienberg
1990-1999	Privates Gymnasium Marienstatt
Juni 1999	Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
1999-2004	Studium der Zahnheilkunde Justus-Liebig- Universität Giessen
Juli 2000	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
April 2002	Zahnärztliche Vorprüfung
Dezember 2004	Zahnärztliche Prüfung
Januar – Juli 2005	Experimenteller Teil der Promotion
Seit August 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Poliklinik für Kinderzahnheilkunde des Universitätsklinikums Gießen und Marburg/ Standort Gießen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. P. Mayser für die Überlassung dieses interessanten Themas und die außerordentlich gute Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Dipl. Chem. Dr. H.-J. Krämer für seine Unterstützung sowie bei Frau Förste für Ihre nette Mithilfe.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. G. Haase für die großzügige Bereitstellung des Pilzmaterials sowie Dr. Spiteller für die schnelle Bearbeitung der Substanzproben.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5092-4



9 7 8 3 8 3 5 9 5 0 9 2 4